

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



TESE DE DOUTORADO

**IMOBILIZAÇÃO DE XILANASE EM FIBRAS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO PELA
TÉCNICA *ELECTROSPINNING* E SEU COMPORTAMENTO ENZIMÁTICO APÓS
RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO**

Jaqueline Pozzada dos Santos

Engenheira de Alimentos

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Pelotas/2020

Jaqueline Pozzada dos Santos

**IMOBILIZAÇÃO DE XILANASE EM FIBRAS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO PELA
TÉCNICA *ELECTROSPINNING* E SEU COMPORTAMENTO ENZIMÁTICO APÓS
RETICULAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientação:

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier

Pelotas/2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237. Santos, Jaqueline Pozzada dos

Imobilização de xilanase em fibras de álcool polivinílico pela técnica *electrospinning* e seu comportamento enzimático após reticulação com glutaraldeído / Jaqueline Pozzada dos Santos ; Nathan Levien Vanier, orientador. — Pelotas, 2020.

79 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Electrospinning. 2. Atividade da xilanase. 3. Fibra de PVA. 4. Glutaraldeído. I. Vanier, Nathan Levien, orient. II. Título.

CDD : 664

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias (PPGCTA-UFPEL)

Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze (PPGCTA-UFPEL)

Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon (PPGECA-FURG)

Profa. Dra. Rosana Colussi (CCQFA-UFPeI)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conceder a vida com muita saúde para realizar meus sonhos.

À minha mãe, **Denise**, por ser minha maior inspiração e por ter me ensinado a importância do saber. Obrigada por estar sempre ao meu lado me guiando e abençoando em todas minhas decisões. À ela, que me ensinou a beleza das palavras quando ainda não sabia ler, dedico não apenas este trabalho, mas tudo que sou hoje. Vou ser grata para sempre por poder viver maravilhosos 12 anos em sua presença. **Saudades eterna.**

Ao meu noivo **Alex**, por todo o incentivo, carinho e companheirismo. Por sempre apresentar uma palavra de conforto, nas tantas vezes que me encontrava desesperada em meio aos livros. Por toda ajuda e principalmente por toda a paciência. Essa conquista também é sua. Te amo! Agradeço-o ainda mais por ter me proporcionado a dádiva de ser mãe. O presente que mais amo nesse mundo, nosso filho **Arthur**. Filho, você me trouxe a calma quando mais precisei. Te amo infinitamente!

As minhas irmãs, **Aline e Jaíny**. Obrigada pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Obrigada por aguentar meu mau humor nos dias difíceis. Amo vocês para sempre. Agradeço também a toda minha família pai, cunhados, sogros que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador **Nathan Vanier**, por todas as oportunidades e pelo aprendizado durante estes anos de convivência. Obrigada por abrir as portas e acreditar que nossa parceria seria possível. Não apenas guiaste o meu caminho profissional, mas também me ensinaste muito sobre a vida, sobre como enfrentar os desafios diários e sobre como é importante confiarmos em nós mesmos. Obrigada por permitir que eu aprendesse com você. Meu eterno respeito e admiração.

À todos os colegas de laboratório, pela companhia e auxílio na realização deste trabalho, pela disposição todas as vezes que precisei e também pelas risadas quando as coisas pareciam dar errado. Em especial, aos amigos **Igor, Caroline, Cristian, Jéssica, Miriã, Jorge, Cristiano e Franciene.**

Aos professores do programa da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos, disposição e amizade.

Aos meus amigos e amigas de todos os cantos, companheiros de caminhada e de vida, obrigada pelas palavras de incentivo, conforto nos momentos difíceis e carinho a todo instante. Levo cada um de vocês em meu coração.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!

*Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso
oceano da verdade continua misterioso diante de
meus olhos.*

(Isaac Neewton)

Resumo

SANTOS, Jaqueline Pozzada. **Imobilização de xilanase em fibras de álcool polivinílico pela técnica *electrospinning* e seu comportamento enzimático após reticulação com glutaraldeído**. 2020, 79 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A catálise enzimática é cada vez mais utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e química. Isso porque as enzimas, operam sob temperatura e pressão moderadas, apresentam alta especificidade pelo substrato, representam a possibilidade de um processo ambientalmente amigável e não dependem de recursos fósseis. No entanto, para ampla aplicação da tecnologia enzimática na indústria, a manutenção da estabilidade estrutural das enzimas é extremamente relevante, e representa grande desafio do ponto de vista técnico-econômico. Além disso, o fator reutilização também configura importante obstáculo a ser superado. Diante disso, a imobilização enzimática surge como alternativa para superar os desafios apresentados, visto que essa técnica pode proporcionar a melhoria da estabilidade enzimática, além de permitir o reuso de enzimas. A enzima xilanase possui grande potencial de aplicação no setor industrial. Entretanto, a perda da estabilidade operacional e de armazenamento e a alta sensibilidade a oscilações de temperatura e pH inibem seu uso em vários processos industriais. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi melhorar a estabilidade da xilanase através da imobilização em álcool polivinílico (PVA) pela técnica de *electrospinning*. Para isso, num primeiro momento, xilanase foi imobilizada com diferentes concentrações (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5%) em fibras de PVA via *electrospinning*, o uso do encapsulante β -ciclodextrina (β -CD) foi considerado. A morfologia, a estrutura, e a estabilidade térmica das fibras foram investigadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho com Transformado de Fourier (FTIR), Difração de Raio-X (DRX) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), além da atividade enzimática, capacidade de carregamento e estabilidade a diferentes temperaturas e pH. Fibras obtidas apresentaram superfície lisa com diâmetro médio entre 200 e 600 nm. A utilização da β -CD favoreceu a produção de fibras mais espessas. A atividade ótima da xilanase foi alterada de 60 para 70 °C com a imobilização em PVA. Os resultados de FTIR indicaram que a enzima foi incorporada nas fibras. A maior eficiência de imobilização foi obtida com 0,5%, com atividade de 59,73 μ M/min/mg de xilanase imobilizada. Com o objetivo de reduzir a solubilidade das fibras e proporcionar o reuso da enzima imobilizada, o estudo seguiu com a reticulação das fibras utilizando vapor de glutaraldeído. A reticulação foi realizada durante 30, 60, 90 e 180 min. As fibras foram caracterizadas quanto a morfologia, grupos funcionais e análises termogravimétricas (TGA). A atividade enzimática foi estudada em diferentes tempos de armazenamento e ciclos de reutilização. Por fim, a capacidade da enzima de reduzir a turbidez de solução padrão de β -glucana também foi verificada. As fibras reticuladas apresentaram estruturas mais densas e compactadas. Houve melhorias nas propriedades térmicas, bem como na reciclagem e eficiência de armazenamento das fibras reticuladas, em comparação com fibras não reticuladas. A enzima livre e a imobilizada em fibras de PVA reticuladas por 180 min foram capazes de reduzir a turbidez da solução de β -glucana em um grau semelhante.

Palavras-chave: *electrospinning*; atividade da xilanase; fibra de PVA; glutaraldeído

Abstract

SANTOS, Jaqueline Pozzada. **Immobilization of xylanase in polyvinyl alcohol fibers via electrospinning and enzymatic behavior after cross-linked by glutaraldehyde.** 2020, 79 p. Thesis (Doctoral Degree in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Agronomy School Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Enzymatic catalysis is increasingly used in the food, textile, pharmaceutical and chemical industries. This is because the enzymes, operate under moderate temperature and pressure, have high specificity for the substrate, represent the possibility of an environmentally friendly process and do not depend on fossil resources. However, for the wide application of enzyme technology in the industry, maintaining the structural stability of enzymes is extremely relevant, and represents a great challenge from a technical-economic point of view. In addition, the reuse factor is also an important obstacle to be overcome. Therefore, enzymatic immobilization appears as an alternative to overcome the challenges presented, since this technique can provide the improvement of enzymatic stability, in addition to allowing the reuse of enzymes. The xylanase enzyme has great potential for application in the industrial sector. However, the loss of operational and storage stability and the high sensitivity to fluctuations in temperature and pH's inhibit its use in various industrial processes. In this sense, the objective of the study was to improve the stability of xylanase through immobilization in polyvinyl alcohol (PVA) using the electrospinning technique. For this, at first, xylanase was immobilized with different concentrations (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% and 2.5%) in PVA fibers via electrospinning, the use of the encapsulant β -cyclodextrin (β -CD) was considered. The morphology, structure, and thermal stability of the fibers were investigated by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), in addition to enzymatic activity, loading capacity and stability at different temperatures and pH's. The obtained fibers had a smooth surface with an average diameter between 200 and 600 nm. The use of β -CD favored the production of thicker fibers. The optimal xylanase activity was changed from 60 to 70 ° C with PVA immobilization. The FTIR results indicated that the enzyme was incorporated into the fibers. The highest immobilization efficiency was obtained with 0.5%, with an activity of 59.73 μ M / min / mg of immobilized xylanase. With the objective of reducing the solubility of the fibers and providing the reuse of the immobilized enzyme, the study continued with the crosslinking of the fibers using glutaraldehyde steam. Cross-linking was carried out for 30, 60, 90 and 180 min. The fibers were characterized in terms of morphology, functional groups and thermogravimetric analysis (TGA). The enzymatic activity was studied at different storage times and reuse cycles. Finally, the ability of the enzyme to reduce the turbidity of the standard β -glucan solution was also verified. The crosslinked fibers showed denser and more compacted structures. There have been improvements in thermal properties, as well as in the recycling and storage efficiency of crosslinked fibers, compared to non-crosslinked fibers. The free enzyme and the immobilized in crosslinked PVA fibers for 180 min were able to reduce the turbidity of the β -glucan solution to a similar degree.

Keywords: electrospinning; xylanase activity; PVA fiber; glutaraldehyde

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas: (1) endo β -1,4-xilanases (2) α -L-arabinofuranosidases (3) glicuronidase (4) feruloil e p-coumaroil esterases (5) acetil xilana esterase.	21
Figura 2 - Principais métodos para imobilização de enzimas.	24
Figura 3 -Esquema de um processo de <i>electrospinning</i> horizontal	27
Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras de PVA em diferentes concentrações: (a) 6%, (b) 8% e (c) 10%	41
Figura 5 - Morfologia, diâmetro médio e distribuição de diâmetro das fibras de PVA sem enzima (a), XI-PVA 0,5% de enzima (b), XI-PVA 1,0% de enzima (c), XI-PVA 1,5% de enzima (d), XI-PVA 2,0% de enzima (e) e XI-PVA 2,5% de enzima (f)	43
Figura 6 - Morfologia, diâmetro médio e distribuição de diâmetro das fibras de PVA sem enzima (a), XI- β -CD-PVA 0,5% de enzima (b), XI- β -CD-PVA 1,0% de enzima (c), XI- β -CD-PVA 1,5% de enzima (d), XI- β -CD-PVA 2,0% de enzima (e) e XI- β -CD-PVA 2,5% de enzima (f)	44
Figura 7 - Padrões de DRX de β -CD e XI- β -CD (A) e de fibra de PVA e XI- β -CD imobilizada em fibra de PVA (B).	46
Figura 8 - Espectros de FTIR de XI, β -CD e XI- β -CD (A) e XI em fibras de PVA, complexo XI- β -CD em fibras de PVA e mistura física XI- β -CD em fibras de PVA (B).	47
Figura 9 - Curvas de DSC de β -CD, XI, complexo de inclusão de XI- β -CD e mistura física de XI- β -CD	48
Figura 10 - Atividade enzimática em diferentes concentrações de xilanase	50
Figura 11 - Atividade relativa da xilanase livre e imobilizada em função da temperatura ..	52
Figura 12 - Atividade relativa da xilanase livre e imobilizada em função do pH	53
Figura 13 - Efeitos do tempo de reticulação e de solubilização das fibras de XI-PVA reticuladas com glutaraldeído	54
Figura 14 - MEV das fibras XI-PVA: A) Não reticulada e B) Após 180 min de reticulação.	55
Figura 15 - FTIR das fibras XI-PVA não reticulada, reticulada por 30 min e reticulada por 180 min	56
Figura 16 - Reuso das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído	59
Figura 17 - Armazenamento das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído	60

Figura 18 - MEV das fibras de XI-PVA reticuladas por 180 min após ciclos de reuso.....	60
Figura 19 - Alterações na turvação da solução padrão de β -glucana com da adição de xilanase livre e fibra XY-PVA reticulada por 180 min.....	61

Lista de tabelas

Tabela 1 - Imobilização de enzimas hidrolases por diferentes métodos e suas aplicações industriais.....	26
Tabela 2 - Delineamento experimental do Estudo 1, para avaliar efeitos da concentração do polímero PVA sobre características estruturais de fibras obtidas pela técnica de <i>electrospinning</i> *	31
Tabela 3 - Delineamento experimental do Estudo 2, para avaliar as propriedades de fibras e a efetividade de imobilização da enzima pela técnica de <i>electrospinning</i>	31
Tabela 4 - Delineamento experimental do Estudo 3 para avaliar a reticulação com glutaraldeído das fibras com enzima imobilizada	32
Tabela 5 - Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas.....	39
Tabela 6 - Atividade e capacidade de carregamento da xilanase pura e imobilizada.....	51
Tabela 7 - Propriedades termogravimétricas das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído	58

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Hipóteses	18
4. Revisão da literatura	19
4.1 Enzimas na indústria de alimentos	19
4.2 Xilanase	20
4.3 Imobilização enzimática	23
4.3.1 <i>Electrospinning</i> para imobilização de enzimas	26
4.3.2 Glutaraldeído como reticulador	29
5. Material e métodos	30
5.1 Materiais	30
5.2 Delineamento experimental	30
5.3 Métodos	32
5.3.1 Preparo das amostras	32
5.3.2 Caracterização das soluções poliméricas	33
5.3.3 Imobilização de xilanase via <i>electrospinnig</i>	33
5.3.4 Caracterização das fibras	34
5.3.5. Carregamento enzimático	34
5.3.6. Atividade enzimática	35
5.3.7. Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase	36
5.3.8 Reticulação com vapor de glutaraldeído	36
5.3.9 Solubilidade	37
5.3.10 Estudo de reutilização	37
5.3.11 Estabilidade no armazenamento	37
5.3.12 Comportamento catalítico da fibra XI-PVA simulada em solução turva	37
5.4 Análise estatística	38
6. Resultados e discussão	39
6.1 Soluções poliméricas	39

6.2. Fibras de XI-PVA e XI-β-CD-PVA.....	41
6.2.1 Morfologia e distribuição de tamanho.....	41
6.2.2 Difração de Raio-X (DRX)	45
6.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	46
6.2.4 Análise térmica por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).....	47
6.3. Concentração ótima de imobilização.....	48
6.4. Influência da temperatura na atividade de xilanase imobilizada.....	51
6.5. Influência do pH na atividade de xilanase imobilizada	52
6.6 Efeitos do tempo de imersão nas fibras XI-PVA reticuladas	53
6.7 Caracterização da fibra XI-PVA reticulada	55
6.8 Reuso da fibra XI-PVA reticulada	58
6.9 Estabilidade no armazenamento da fibra XI-PVA reticulada	59
6.10 Morfologia da fibra XI-PVA reticulada após ciclos de reuso	60
6.11 Aplicação da fibra XI-PVA reticulada em solução padrão de β-glucana.....	61
7 Considerações finais.....	62
Referências	63
APÊNDICE 1	77
APÊNDICE 2	78

1. Introdução

A xilana é um homopolímero linear que contém monômeros de D-xilose ligados através de ligações β -1,4-glicosil, e é considerado a segunda biomassa renovável mais abundante encontrada na natureza, logo após a celulose (KUMAR et al., 2017, UDAY et al., 2016). A endo-1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) é uma enzima hidrolítica que cliva xilana em pequenos fragmentos por hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas da molécula de xilana. As xilanases são enzimas amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e química (RAVEENDRAN et al., 2018). No entanto, apresentam algumas limitações como a falta de estabilidade em longo prazo e a difícil recuperação e reutilização o que leva à maiores custos operacionais (DICOSIMO et al., 2013). Essas limitações podem ser superadas pela imobilização de enzimas (SOUZA et al., 2017).

A imobilização de enzimas pode ser considerada um tipo especializado de formulação enzimática. O papel dessa formulação é maximizar a estabilidade, tanto enzimática quanto física, de enzimas em uma forma que melhor se adapte à sua aplicação (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Os métodos mais utilizados para a imobilização de enzimas são o aprisionamento (em matriz polimérica ou encapsuladas), a ligação covalente ou cruzada e a adsorção física ou iônica (LIU; CHEN; SHI, 2018). Uma das tecnologias modernas na biocatálise é a imobilização enzimática utilizando a técnica de *electrospinning* (AGGARWAL; CHAKRAVARTY; IKRAM, 2020).

A técnica de *electrospinning* é considerada um método simples, de fácil controle e economicamente viável na fabricação de nanomateriais (MOREIRA et al., 2020). O processo utiliza um jato eletricamente carregado de solução polimérica para a produção de fibras com escala nano, micro e submicro (MORENO-CORTEZ et al., 2015). Os polímeros utilizados para a imobilização enzimática podem proteger as enzimas contra a alta sensibilidade as condições ambientais, favorecendo a estabilidade de pH e temperatura e a estabilidade operacional (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

O potencial de muitos polímeros sintéticos e naturais tem sido investigado no desenvolvimento de produtos utilizando *electrospinning*. Entre eles, o álcool polivinílico (PVA) tem sido amplamente investigado devido as propriedades não-tóxicas, conveniência de processamento, boa estabilidade mecânica e térmica, alta biocompatibilidade e seu comportamento biodegradável (SAALLAH et al., 2016).

Apesar das vantagens atribuídas as fibras de PVA produzidas via *electrospinning* alguns problemas associados com esse material de suporte são relatados, tais como a alta solubilidade em meios aquosos e a limitada interação com a enzima em sua superfície interna (PIACENTINI; YAN; GIORNO, 2016). A este respeito, tem sido demonstrado interesse crescente na reticulação química em materiais nanofibrosos e o uso de auxiliares de imobilização enzimática como complexos utilizando ciclodextrinas (CANBOLAT; SAVAS; GULTEKIN, 2015; MORENO-CORTEZ et al., 2015)

O glutaraldeído é o reticulador químicos mais utilizados na biocatálise, sendo capaz de reagir com a enzima e consigo mesmo (BARBOSA et al., 2014). As soluções de glutaraldeído são comumente utilizadas para reticular o PVA, retardando assim a dissolução em fluidos. O mecanismo de reticulação envolve a ligação química dos grupos hidroxila presentes no PVA com os grupos aldeído do glutaraldeído (SHAIKH et al., 2012).

Estudos com amilases e outras classes de enzimas indicam que a imobilização proporciona liberação controlada da enzima, bem como a manutenção da atividade enzimática durante o armazenamento, proporcionando maior estabilidade operacional sob condições ambientais adversas (CANBOLAT; SAVAS; GULTEKIN, 2017). Pesquisas relacionadas a imobilização de xilanases foram realizadas considerando sua imobilização por métodos não covalentes, em polímeros insolúveis e solúveis (MADAKBAS et al., 2013), nanopartículas de óxido de grafeno superparamagnético (MEHNATI-NAJAFABADI; TAHERI-KAFRANI; BORDBAR, 2018), hidrogéis (DUMITRIU; CHORNET, 1997) ou espuma de poliuretano (HAAPALA et al., 1994) e em esferas de alginato (JAMPALA et al., 2017), seguido de ativação usando reagentes funcionais. No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há relatos disponíveis na literatura sobre o desempenho da xilanase imobilizada em fibras de PVA via *electrospinning* utilizando a capacidade de complexação com β -Ciclodextrinas (β -CD) e o comportamento enzimático após reticulação com vapor de glutaraldeído.

Nesse contexto, a imobilização de diferentes concentrações de xilanase em fibras de PVA, utilizando ou não β -CD, pela técnica de *electrospinning* e avaliação da estabilidade enzimática através da reticulação das fibras com glutaraldeído em fase de vapor, permite aprimorar as informações necessárias no meio científico que visa a aplicação da enzima no meio industrial.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Melhorar a estabilidade da xilanase através da imobilização em álcool polivinílico (PVA) pela técnica *electrospinning* e pela reticulação química com glutaraldeído.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Imobilizar xilanase, em diferentes concentrações, em fibras de PVA através da técnica de *electrospinning*;
- 2) Caracterizar as fibras de PVA em relação a concentração de enzima sobre características estruturais de fibras;
- 3) Avaliar a imobilização de xilanase e a incorporação de β -CD como encapsulante na fibra de PVA em relação a eficiência de imobilização e a atividade enzimática;
- 4) Analisar o comportamento enzimático da xilanase imobilizada na fibra de PVA em diferentes temperaturas e pH's;
- 5) Reticular a fibra que apresentar a concentração de enzima mais estável e reprodutível em função da atividade enzimática, em diferentes tempos de exposição com vapor de glutaraldeído;
- 6) Avaliar a liberação controlada da enzima após reticulação com vapor de glutaraldeído através do armazenamento e do número de ciclos de reutilização sobre a atividade enzimática da xilanase.

3. Hipóteses

- 1) A concentração de xilanase influencia na atividade enzimática e na capacidade de carregamento nas fibras;
- 2) A imobilização de xilanase em fibras de PVA, com a incorporação de β -Ciclodextrina, mantém a atividade enzimática em diferentes valores de pH e de temperatura, quando comparada a enzima livre;
- 3) A reticulação com vapor de glutaraldeído amplia a estabilidade das fibras e o controle de liberação da xilanase em meio aquoso e;
- 4) A imobilização da xilanase permite a recuperação e reutilização da enzima, interrompendo a hidrólise contínua.

4. Revisão da literatura

4.1 Enzimas na indústria de alimentos

Enzimas são proteínas globulares que agem como catalisadores e são amplamente utilizadas em bioprocessos industriais. Podem, portanto, ser definidas como um biocatalisador, cuja natureza proteica determina a presença de certas propriedades, tais como especificidade de substrato, dependência da temperatura e dependência do pH. As enzimas têm sido utilizadas a milhares de anos no processamento de alimentos e bebidas. São exemplos a panificação, a fabricação de cerveja, de queijos e de vinhos, embora apenas nas últimas décadas do século XX foram desenvolvidos processos que permitiram a produção em formulações bem caracterizadas em larga escala (MISHRA et al., 2017). O mercado industrial de enzimas foi avaliado em US\$ 6,1 bilhões em 2017 com estimativas de atingir US\$ 8,5 bilhões em 2022, e o mercado de enzimas alimentares representa uma considerável parte desse mercado (ZHANG; HE; SIMPSON, 2018).

A área de alimentos e bebidas lidera o mercado de aplicação de enzimas e este fato está relacionado às vantagens que propiciam a indústria alimentícia, como por exemplo: a) melhorar a produtividade; b) minimizar a formação de subprodutos e reações colaterais indesejadas; c) conduzir processos ambientalmente amigáveis com baixo consumo de energia e emissão de carbono; d) fornecer produtos seguros e de alta qualidade (CHANDRASEKARAN et al., 2015). As enzimas são principalmente utilizadas como auxiliares de processamento, o que significa que são utilizadas durante o processo de produção e não estão presentes no produto final, ou, se for o caso, não têm efeito tecnológico no produto final.

As enzimas são diferenciadas umas das outras pelo tipo de reação catalisada, portanto essa propriedade específica é a base para a classificação e nomeação de enzimas. A nomenclatura classifica cada enzima com um código de quatro algarismos precedido pela sigla em Inglês EC, que significa Comissão de Enzimas. O primeiro algarismo atribui as enzimas a uma das seis classes (oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) que dependem da natureza da reação catalisada. Cada classe é dividida em subclasses que identificam a enzima em termos mais específicos e que são representadas pelo segundo algarismo. O terceiro algarismo define com exatidão

o tipo de atividade enzimática e o quarto é o número da enzima dentro da sua subclasse (CORNISH-BOWDEN, 2014).

Aplicações práticas de enzimas podem requerer ação de uma única enzima, por exemplo a lactase, que promove a hidrólise da lactose na produção de leite sem lactose, ou a ação conjunta de várias enzimas, como por exemplo α - e γ -amilases, pullulanase e glucose isomerase na produção de xarope de alta frutose ou uma combinação de amilases, lipases, oxirredutases e xilanases na produção de pão (CHANDRASEKARAN et al., 2015; HUA; YANG, 2015; MIGUEL et al., 2013). Proteases e lipases são as enzimas mais comumente usadas no processamento de alimentos. No entanto, outras enzimas também encontram espaço de processamento de alimentos, como: a) glucose isomerase, na produção de adoçantes (TOMASIK; HORTON, 2012); b) quimosina protease, como coagulante na produção de queijos (ALINOVI et al., 2018); c) xilanase na clarificação de sucos (SHAHRESTANI et al., 2016); d) transglutaminase, no processamento de carne (SANTHI et al., 2017), entre outras.

4.2 Xilanase

A xilana é o principal polissacarídeo hemicelulósico presente na parede celular de cereais, sua completa degradação requer a atuação de um sistema múltiplo de enzimas específicas com distintos modos de ação (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). O complexo enzimático inclui: a) endo- β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8); b) β -xilosidase (EC 3.2.1.37); c) α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); d) β -glicuronidases (EC 3.1.1.139); e) acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72); f) *p*-coumaroil (EC 3.1.1.73) e feruloil esterase (EC 3.1.1.78) (LIU; KOKARE, 2017; ROSELL; DURA, 2015).

Dois grupos principais se destacam nas enzimas xilanolíticas: as endo- β -1,4 xilanases que estão envolvidas diretamente na quebra das ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal da xilana, liberando oligossacarídeos com baixo ou alto grau de polimerização e eventual xilose, dependendo da família na qual a enzima pertence e região de atuação na estrutura do polissacarídeo (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016); enquanto as β -xilosidases atuam na extremidade não redutora da xilobiose ou de outros oligossacarídeos, liberando xilose (SHALLOM; SHOHAM, 2003). As enzimas auxiliares atuam na remoção dos substituintes laterais da cadeia de xilana (ALOKIKA; SINGH, 2019;

COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Na Figura 1 é apresentada a estrutura esquemática da xilana e os locais de ataque por enzimas xilanolíticas.

A endo- β -1,4-xilanase é a enzima mais importante na despolimerização de arabinoxilanas do ponto de vista funcional. Ela é capaz de hidrolisar as ligações β -1,4 em resíduos de xilose na estrutura dorsal da xilana e, com isso, afeta drasticamente a massa molar e a solubilidade das arabinoxilanas e, portanto, também sua funcionalidade (DORNEZ et al., 2009). A nomenclatura designada para a endo- β -1,4-xilanase é EC 3.2.1.8, que a caracteriza em hidrolase, glicosilase, glicosidase e endógena, respectivamente.

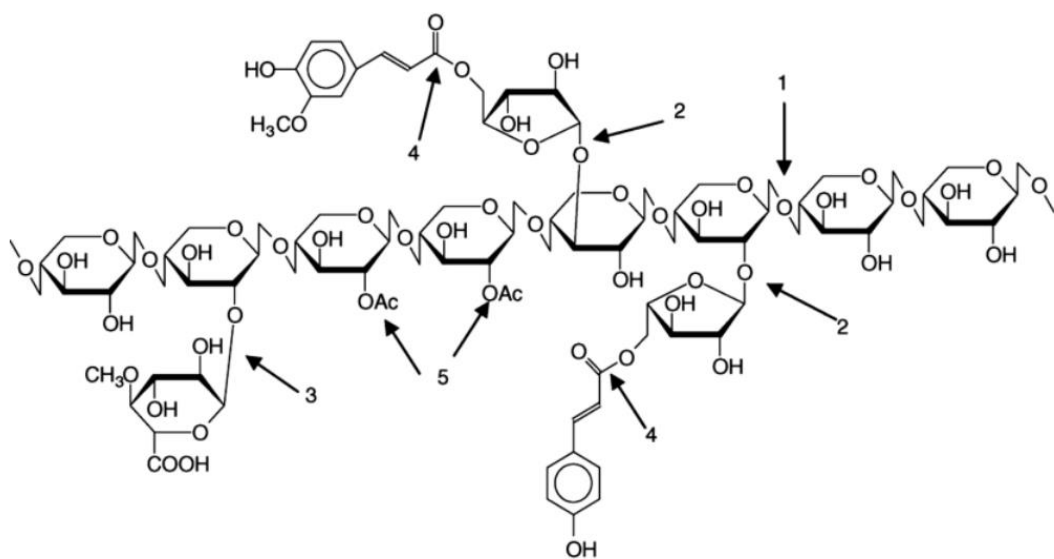


Figura 1 - Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas: (1) endo β -1,4-xilanases (2) α -L-arabinofuranosidases (3) glicuronidase (4) feruloil e p-coumaroil esterases (5) acetil xilana esterase.

Fonte: Adaptado de DORNEZ et al., 2009

As xilanases são cientificamente conhecidas como endo- β -1,4-xilanase e vários sinônimos são utilizados para descrevê-las, tais como β -xilanases, β -1,4-xilanases, endoxilanases e β -1,4-xilana hidrolases (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). A maioria dessas enzimas são produzidas por bactérias e fungos, mas também podem ser encontrados em plantas, insetos, caracóis, crustáceos, algas marinhas e protozoários (DORNEZ et al., 2009). Fungos dos gêneros *Aspergillus* (ADHYARU et al., 2017), *Trichoderma* (AJIJOLAKEWU et al., 2017), *Thermomyces* (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017), *Penicillium* (BORUAH et al., 2016) e *Fusarium* (ALMEIDA et al., 2014), bem como

algumas espécies termófilas (GOLUGURI et al., 2016; ZHAO et al., 2013), têm sido reportados como grandes produtores de xilanases.

As xilanases são classificadas em seis famílias de glicosil-hidrolases (GH) – GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 e GH43 – as quais se diferem quando as propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade. No entanto, a maioria das classificações científicas foi realizada com base na análise de agrupamento hidrofóbico dos domínios catalíticos e as semelhanças nas sequências de aminoácidos, assim as xilanases foram classificadas principalmente como GH 10 e 11 (VERMA; SATYANARAYANA, 2012). Para a maioria das xilanases isoladas de procaríotos, o pH ótimo varia de 6,0 a 9,0 enquanto que para as xilanases isoladas de eucariotos o pH ótimo varia de 4,0 a 6,0. Da mesma forma, a temperatura ótima para a ação das xilanases varia de 35 a 60 °C.

As xilanases têm atraído interesse em pesquisas científicas devido ao seu amplo espectro de aplicação industrial. Essas enzimas têm sido utilizadas na indústria de papel e celulose, mais especificamente no branqueamento da polpa em substituição aos compostos clorados tóxicos (ex. ClO_2 , Cl_2 , hipoclorito) (ADHYARU et al., 2017; BORUAH et al., 2016); na indústria de tecidos em etapas como desengomagem, biopurga (bioscouring) e biopolimento das fibras têxteis (ATY et al., 2018; BATTAN et al., 2012); e na conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, na produção de biocombustíveis (ASTOLFI et al., 2019; BOONCHUAY et al., 2018; ALMEIDA et al., 2014; YANG et al., 2015b).

Na indústria de alimentos, as xilanases apresentam importante papel no melhoramento de processos e de característica tecnológicas e/ou nutricionais, tais como: extração e clarificação de suco de frutas (ADIGUZEL et al., 2019; SILVA et al., 2019; SHAHRESTANI et al., 2016); extração de óleo a partir de plantas (MARASABESSY et al., 2011); fabricação de pães (LIU et al., 2017; PASSARINHO et al., 2019; YEGIN; ALTINEL; TULUK, 2018) e biscoitos (LI et al., 2013), atuando na modificação das propriedades reológicas da massa; e formulação de rações animais (GHAYOUR-NAJAFABADI et al., 2018; VANDEPLAS et al., 2010), aumentando a sua digestibilidade e valor nutricional.

A hidrólise de xilanas pela endo- β -1,4-xilanase é, portanto, uma estratégia frequentemente utilizada na indústria para ajustar a qualidade do processamento, o rendimento e/ou a qualidade produto final. No entanto, a aplicação industrial da xilanase exige que as enzimas sejam capazes de suportar as condições adversas, como ambiente

ácido / alcalino e temperatura elevada, o que torna seu uso desafiador pelas exigências dos processos industriais. Atualmente, a mais proeminente e bem-sucedida estratégias de pesquisa e desenvolvimento para melhorar o desempenho enzimático é a imobilização enzimática.

4.3 Imobilização enzimática

As enzimas são ótimos catalisadores biológicos utilizados nas indústrias de alimentos, energéticas e farmacêuticas devido a sua elevada eficiência catalítica, condições brandas de reação e ausência de poluição (GAO et al., 2013). Há alguns inconvenientes que limitam a aplicação de enzimas livres, tais como baixa estabilidade operacional e dificuldade de recuperação e reutilização do biocatalisador (GROSOVA; ROSENBERG; REBROS, 2008). A imobilização de enzimas é um método potencial para aumentar a estabilidade de enzimas, diminuir o custo e, em consequência, tornar o biocatalisador mais eficiente e amigável ambientalmente (TRAN; BALKUS, 2011).

A imobilização aumenta a estabilidade térmica e fornece maior estabilidade da enzima sob pH e temperaturas extremas, isto porque a imobilização fornece uma estrutura externa mais rígida para a ligação da enzima (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). A mesma explicação também se aplica a retenção de atividade após vários ciclos de uso, a redução da inibição enzimática, e o aumento na estabilidade de armazenamento. A imobilização torna as enzimas menos acessíveis as interações causadas por agentes inibidores e desnaturantes, o que as torna menos expostas a esses agentes (DICOSIMO et al., 2013).

Embora a imobilização permita a otimização funcional de enzimas, esse processo também tem impacto na atividade catalítica. Uma enzima pode ser desnaturada e perder sua atividade quando solubilizada no meio de imobilização ou durante a etapa de ligação do processo de imobilização. A imobilização geralmente promove novas interações entre a enzima e o suporte, que por sua vez podem alterar a configuração final do biocatalisador e sua atividade catalítica (GARCIA et al., 2011). No entanto, em alguns casos, a perda de atividade catalítica é menos importante quando comparada a um ganho de propriedades funcionais, como estabilidade térmica, reutilização, etc (VAZ; MOREIRA; FILHO, 2016).

A reutilização da enzima e a fácil separação dos produtos gerados é um excelente benefício da imobilização, tudo fornecido pelo simples isolamento do material de suporte do meio de reação. As enzimas imobilizadas podem ser separadas dos produtos por remoção física de suporte quando são utilizados macrocondutores, por precipitação, filtração ou magnetismo, dependendo das características do material de suporte (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; MUBARAK et al., 2014)

A seleção da técnica de imobilização é uma etapa extremamente importante no processo geral e pode levar a reduções de tempo e custos (HOMAEI et al., 2013). Existem vários métodos para imobilização de enzimas sendo os mais utilizados definidos como: encapsulamento e interações químicas (ESCOBAR et al., 2016; URRUTIA et al., 2014) (Figura 2).

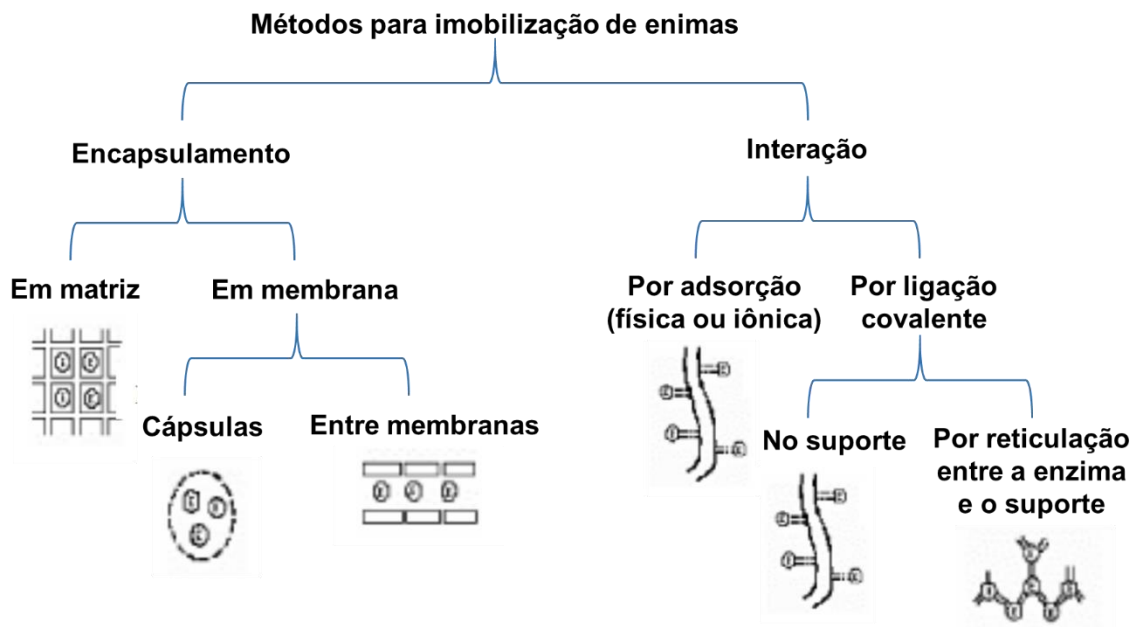


Figura 2 - Principais métodos para imobilização de enzimas.

Fonte: Adaptado por Dalla-Vecchia, Nascimento, Soldi (2004)

Além do método a ser escolhido, o material de suporte está altamente relacionado com a eficiência de imobilização da enzima. A diminuição da transferência de massa entre enzima e substrato causada pelo processo de imobilização gera problemas de difusão que levam à perda da afinidade e da atividade da enzima. Além disso, sabe-se que o sítio de ligação e o sítio ativo da enzima desempenham papel crucial na catálise e, durante o processo de imobilização, esses sítios podem ser bloqueados ou distorcidos, o que resulta

em perda de atividade (VAZ; MOREIRA;FILHO, 2016). No entanto, essas dificuldades podem ser resolvidas com a escolha mais adequada do material de suporte.

A matriz utilizada deve ser inerte, altamente estável, capaz de abrigar grande quantidade de enzima, ser biocompatível, não modificando a estrutura nativa da enzima e comprometer sua atividade biológica (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).O álcool polivinílico (PVA) tem sido utilizado como matriz polimérica para imobilização de enzimas em diversos estudos (FAZELA et al., 2016; SAALLAH et al., 2016; SHAIKH et al., 2012). Este polímero é biodegradável, hidrofílico, atóxico, de relativamente baixo custo e está disponível em uma ampla faixa de pesos moleculares. Além disso, o PVA possui a capacidade de formar ligações secundárias com proteínas que podem dissociar moléculas ligadas ao hidrogênio, facilitando a eletrofixação de biomacromoéculas. Uma alternativa de suporte para a imobilização enzimática é o uso de ciclodextrinas, pois oferecem soluções funcionais criando estruturas complexas que não apresentam toxicidade e têm melhor característica de solubilidade (CANBOLAT; SAVAS; GULTEKIN, 2017).

Vários estudos descrevendo estratégias e condições de imobilização são encontrados na literatura, sendo as enzimas hidrolases mais frequentemente relatadas. A Tabela 1 reúne alguns estudos de imobilização enzimática e suas aplicações industriais.

Resultados promissores, com alta estabilidade de armazenamento e operação, além de maior carregamento de enzimas, foram obtidos pela abordagem de imobilização de enzimas, combinando adsorção e fixação covalente de enzimas (KIM et al., 2009; AHN et al., 2010; LEE et al., 2010). No entanto, as estratégias de imobilização desenvolvidas são trabalhosas, normalmente caras e demoradas, e os sistemas obtidos ainda são deficientes para grande escala e possível aplicação em processos contínuos.

Por encapsulamento, a imobilização é ocasionada pela retenção física da enzima nas cavidades de uma matriz polimérica apresentando uma superfície alto nível de porosidade, possibilitando assim, uma maior quantidade de enzimas aprisionadas. A utilização de suportes nano-estruturados para imobilização de enzimas tem mostrado vantagens adicionais relacionadas a maior retenção da atividade catalítica, melhor estabilidade da enzima imobilizada, aliado a um método simples e versátil para produção desses suportes; os processos eletrohidrodinâmicos (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). No presente estudo, foi utilizado a técnica de

electrospinning para preparar membranas fibrosas como suportes para encapsular a enzima xilanase.

Tabela 1 - Imobilização de enzimas hidrolases por diferentes métodos e suas aplicações industriais

Enzima	Técnica	Sugestão de aplicação	Referência
Celulase (comercial)	Ligação covalente e adsorção	Indústria de alimentos, de cervejas, têxtil, celulose e papel.	HIRSH et al., 2010
Celulase (<i>Trichoderma reesei</i>)	Adsorção	Indústria de etanol	TSAI E MEYER, 2014
Celulase e xilanase comerciais	Reticulação e adsorção	Industria de ração animal, biodiesel, têxtil, polpa e papel	ROMO-SÁNCHEZ et al., 2014
Xilanase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Ligação covalente e adsorção	Industria de etanol	SOOZANIPOUR, TAHERI-KAFRANI, ISFAHANI, 2015
Xilanase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Adsorção	Industria de etanol	LANDARANI-ISFAHANI et al., 2015
Xilanase (comercial)	Ligação covalente		MANRICH et al., 2010
Xilanase (<i>Trichoderma reesei</i>)	Ligação covalente	Produção de xilo-oligossacarídeos	LI et al., 2014
Xilanase (<i>Talaromyces thermophilus</i>)	Ligação covalente	Produção de xilo-oligossacarídeos	DRISS et al., 2014
Lacase (<i>Trametes versicolor</i>)	Encapsulamento	Industria de papel	CANBOLAT, SAVAS, GULTEKIN, 2017
Papain (<i>Carica papaya</i>)	Encapsulamento e ligação covalente	Industria de cerveja e de carnes	MORENO-CORTEZ et al., 2015
Tripsina (pancreas de porco)	Nanoencapsulamento	Industria de carnes	PINTO et al., 2015
α -amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Encapsulamento	Industria de panificação, xaropes, cervejas	PORTO et al., 2019

4.3.1 *Electrospinning* para imobilização de enzimas

A técnica nomeada *electrospinning* é um método fácil, rentável e flexível que utiliza um jato eletricamente carregado de solução polimérica para a produção de fibras com escala nano, micro e submicro (BABITHA et al., 2017). O processo de *electrospinning* geralmente envolve a aplicação de alta voltagem em uma gotícula de solução polimérica no final da agulha metálica. A gotícula se estende sob a influência da tensão aplicada até um ponto crítico, formando o chamado cone de Taylor. Quando a força eletrostática supera a tensão de superfície da gota, esta é forçada a sair do capilar em direção ao coletor

aterrado. Nesse momento o solvente é evaporado e as fibras poliméricas são depositadas secas no suporte. (Figura 3).

As fibras produzidas tem alta razão superfície/volume, com excelente interconectividade, facilitando o maior carregamento e a liberação das moléculas retidas (KHAJAVI; ABBASIPOURB, 2012). Existem alguns parâmetros que podem ser manipulados para alcançar características de fibra desejadas, tais como viscosidade e condutividade do polímero, tensão aplicada e distância entre o jato e o coletor.

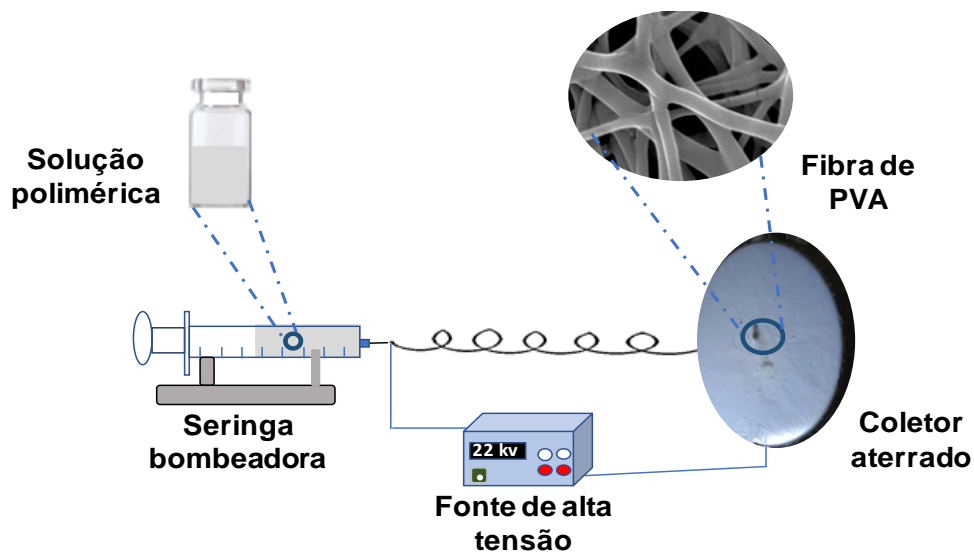


Figura 3 -Esquema de um processo de *electrospinning* horizontal

A premissa do uso de estruturas em nanoescala para imobilização é reduzir as limitações de difusão e maximizar a área superficial funcional para aumentar o carregamento de enzimas (MOHAMAD et al., 2015). A imobilização de enzimas por encapsulamento envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nessa forma de imobilização, a enzima e a solução polimérica são misturadas e subsequentemente ocorre a eletrofiação. A vantagem da utilização desse método é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação. Por outro lado, a técnica pode reter a atividade catalítica da enzima (ZHANG; HE; SIMPSON, 2018).

Estudos promissores vêm sendo descritos utilizando a técnica de *electrospinning* para imobilizar enzimas, como Canbolat; Savas; Gultekin (2017) que obtiveram quase o dobro da atividade da lacase quando a enzima foi imobilizada por *electrospinning* em

nanofibra de poli (ϵ -capro-lactona) (PCL). Outro resultado interessante foi alcançado por Moreno-Cortez et al. (2015), quando investigaram a tripsina imobilizada em condições similares à Canbolat; Savas; Gultekin (2017), observando uma notável estabilidade térmica da enzima imobilizada, cerca de 66% maior do que a forma solúvel livre de tripsina após 1h à 45 °C. Seguindo na mesma linha, Saallah et al. (2016) imobilizaram ciclodextrina glucanotransferase em fibras produzidas pela técnica de *electrospinning* e compararam com um filme produzido pela técnica de *casting*, ambos preparados a partir da solução de álcool polivinílico. Os autores observaram que a enzima imobilizada nas fibras via *electrospinning* apresentou eficiência de carregamento 2,5 vezes maior do que no filme.

O objetivo do estudo de Porto et al. (2019) foi imobilizar α -amilase em fibras de álcool polivinílico por *electrospinning* e avaliar sua estabilidade em diferentes temperaturas e pHs utilizando diversos substratos de amido, como amido de milho e amidos de trigo germinado e não germinado. No estudo, a atividade enzimática foi maior na forma imobilizada do que na forma livre. Além disso, a atividade foi maior quando o amido de trigo germinado foi usado como substrato em diferentes temperaturas e pHs, indicando grande potencial para sua aplicação em hidrólise com α -amilase.

Alonso-González et al. (2020) investigaram as propriedades antimicrobianas da enzima glicose oxidase encapsulada via *electrospinning* e um sistema de membrana multicamadas, onde a enzima foi encapsulada dentro da membrana hidrofílica de álcool polivinílico, que por sua vez foi protegida por duas membranas de policaprolactona hidrofóbica. Os resultados indicaram que esta técnica é adequada para imobilização de enzimas com potencial uso na indústria de embalagens ativas, com excelentes propriedades antibacterianas.

O estudo descrito por El-Shishtawy, Aldahri, Almulaiky, (2020) propôs imobilizar α -amilase e peroxidase de rábano (HRP) via *electrospinning* em duas fibras poliméricas distintas. Os autores destacaram que as atividades catalíticas retidas das enzimas HRP e α -amilase imobilizadas foram de 79 e 80,2% após 10 ciclos, respectivamente. Ainda, após o armazenamento por 12 semanas, as enzimas duplamente imobilizadas ainda retinham quase 90% das atividades, semelhantes às imobilizadas individualmente.

A solução para as limitações encontradas no uso de enzimas em larga escala ainda é o principal assunto da tecnologia enzimática. As combinações de algumas tecnologias envolvendo a imobilização de enzimas são as pesquisas mais proeminentes encontradas,

visto o interesse em sanar dificuldades impostas em cada método. Utilizar a técnica de encapsulamento e reticulação química tem interesse especial neste contexto.

4.3.2 Glutaraldeído como reticulador

O glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados em processos de biocatálise, com capacidade de polimerização (RUBINA et al., 2012). Devido a sua grande versatilidade revelou-se um reagente muito interessante para imobilização/estabilização de enzimas (BARBOSA et al., 2014), embora o mecanismo exato da reação entre o glutaraldeído e as proteínas não seja totalmente compreendido (WINE et al., 2007).

O mecanismo de reação entre o glutaraldeído e a molécula de enzima não se limita apenas a um mecanismo, permitindo imobilizar uma enzima de diferentes maneiras (SIAR et al., 2018), envolvendo principalmente aminoácidos primários e grupos de proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos (tióis, fenóis e imidazóis) (BARBOSA et al., 2014). No entanto, a estrutura exata das principais estruturas relacionadas com a reticulação de proteína ainda não está totalmente esclarecida.

Uma das estratégias utilizadas com o uso do glutaraldeído como reticulador é o tratamento após a imobilização da enzima no suporte (JAMPALA et al., 2017; PIACENTINI et al., 2017; SAALLAH et al., 2016; PORTO et al. 2019). As enzimas são primeiramente imobilizadas nos suportes e isso faz com que a reticulação química apenas modifique os grupos de enzimas envolvidos na imobilização. Normalmente, esse tipo de reticulação produz uma melhor estabilidade, embora esta não seja uma regra geral (MAGRO et al., 2020; BRAHAM et al., 2018).

Os protocolos para a uma imobilização covalente de enzimas geralmente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). As soluções de glutaraldeído são comumente utilizadas para reticular o álcool polivinílico (PVA), retardando, assim, a dissolução em fluidos. O mecanismo de reticulação envolve a ligação química dos grupos hidroxila presentes no PVA com os grupos aldeído do glutaraldeído (SHAIKH et al., 2012).

Diferentes estudos têm utilizado o glutaraldeído como reticulador em imobilizações enzimáticas, como Moreno-Cortez et al. (2015) que imobilizaram a enzima papaína em nanofibras de PVA e as reticularam com vapor de glutaraldeído. A atividade catalítica nesse

estudo foi 88% maior do que a enzima livre e, ainda, a enzima reticulada reteve sua atividade catalítica após seis ciclos de uso. A enzima xilanase foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio e reticuladas com glutaraldeído no estudo realizado por Kumar et al. (2017). Os autores concluíram que a imobilização aumentou o pH e a temperatura ótima da enzima reticulada de 8,0 para 9,0 e de 50 para 60°C, respectivamente. Ainda no mesmo estudo, a estabilidade de armazenamento da xilanase reticulada reteve 80% de sua atividade original a 4°C após 30 dias, em comparação com a enzima livre.

Dogaç et al. (2017) realizaram a imobilização de lipase em nanofibras de alginato/poli (óxido de etileno) (ALG/PEO) e alginato e álcool polivinílico (ALG/PVA), produzidas via *electrospinning*. Após reticulação das fibras com glutaraldeído estes autores observaram que as nanofibras produzidas por ALG/PVA obtiveram melhores resultados de atividade enzimática, comparado as nanofibras de ALG/PEO. Os autores atribuíram esse resultado aos grupos funcionais de hidroxilas presentes no PVA.

5. Material e métodos

5.1 Materiais

Xilanase (E.C. 3.2.1.8 de *Aspergillus oryzae*, $\geq 2500 \text{ U g}^{-1}$), beta-ciclodextrina (β -CD) (97% de pureza), PVA de alta massa molar e parcialmente hidrolisado (87-89% hidrolisado, Mw médio 146.000-186.000 g mol^{-1}), xilana birchwood e xilose foram adquiridos da Sigma – Aldrich Chemical Co. Para o ensaio de proteínas foi utilizado albumina de soro bovino (BSA) (pó liofilizado, pureza de 98%), Coomassie G250 azul brilhante e DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) os quais foram obtidos da Merck Chemical Co. Glutaraldeído (25% (p/v) em água) foi obtido da Merck Chemical Co.

5.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado no Estudo 1 está apresentado na Tabela 2, onde além de incluir ajustes de operação no equipamento de *electrospinning* e condições ambientais, avaliou diferentes concentrações do polímero em relação as características estruturais das fibras obtidas pela técnica. O Estudo 2 teve como objetivo a caracterização das fibras e a avaliação da capacidade de carregamento da enzima xilanase utilizando ou não o complexo de inclusão com β -ciclodextrina, conforme apresentado na Tabela 3.

A partir dos resultados obtidos no Estudo 2, foi selecionada a fibra que apresentou concentração de enzima mais estável e reprodutível em função da atividade enzimática, para ser submetida a reticulação com glutaraldeído em fase de vapor. Foram aplicados quatro tempos de exposição, afim de se obter fibras com maior estabilidade térmica, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 2 - Delineamento experimental do Estudo 1, para avaliar efeitos da concentração do polímero PVA sobre características estruturais de fibras obtidas pela técnica de *electrospinning**

Tratamentos	Variável independente	Variáveis dependentes
	Polímero (%)	
1	6	- Morfologia
2	8	- Viscosidade aparente
3	10	- Condutividade elétrica
		- Distribuição de diâmetro

*Condições do processamento (voltagem aplicada, taxa de fluxo, distância do coletor, tamanho da agulha) e condições ambientais (umidade relativa do ar, temperatura ambiente).

Tabela 3 - Delineamento experimental do Estudo 2, para avaliar as propriedades de fibras e a efetividade de imobilização da enzima pela técnica de *electrospinning*

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Enzima (%)	Complexo de inclusão (enzima/ β -CD – 1:1)	
1			- Grupos funcionais (FTIR)
2			- Difração de raios-X (DRX)
3	0,5	Sem	- Morfologia
4	1,0	Com	- Distribuição de diâmetro
5	1,5		- Capacidade de carregamento
6	2,0		- Atividade enzimática
7	2,5		- Propriedades térmicas (DSC)
...			- Efeito do pH e da temperatura na
10			atividade enzimática

Tabela 4 - Delineamento experimental do Estudo 3 para avaliar a reticulação com glutaraldeído das fibras com enzima imobilizada

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Tempo de reticulação com glutaraldeído (min)		
1	0		- Morfologia
2	30		- Grupos funcionais (FTIR)
3	60		- Análise termogravimétrica
..	90		- Efeito tempo de armazenamento na atividade enzimática
5	180		- Efeito dos ciclos de reutilização na atividade enzimática
			- Solubilidade

5.3 Métodos

5.3.1 Preparo das amostras

5.3.1.1 Complexo de inclusão de β -ciclodextrina e xilanase

O complexo de inclusão de xilanase e β -CD foi preparado como descrito por Petrovic; Stojanovic; Radulovic, (2010) em proporção de 1:1 (p:p), com algumas modificações. Uma quantidade predeterminada de β -CD, com base na concentração de enzima a ser alcançado na solução de entrada para cada tratamento (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5% p v⁻¹), foi dissolvido em 50 mL de água destilada à 35 °C. Após a enzima xilanase foi adicionada, nas proporções mencionadas acima. A mistura foi mantida sob aquecimento e agitação por 3 h à 35 °C, usando um agitador magnético (FISOTOM, Modelo 752/6, Brasil). A solução foi resfriada em temperatura ambiente (25 °C) e, em seguida, foi refrigerado à 4 °C durante 24 h para completa estabilização. O solvente foi evaporado em estufa à 40 °C por 24 h. O complexo obtido foi armazenado em frascos de vidro selados e mantido na temperatura de 4 °C.

5.3.1.2 Mistura física de β -ciclodextrina e xilanase

A mistura física entre XI e β -CD foi preparada na mesma proporção do complexo de inclusão descrito na Seção 5.3.1.1. A avaliação de XI- β -CD não complexada serviu como

controle para a compreensão dos efeitos da eletrofiação e da formação de fibras. A mistura foi homogeneizada com grau e pestilo.

5.3.1.3 Solução de PVA e imobilização enzimática

O PVA foi dissolvido em tampão fosfato (100 mM, pH 6) à 90 °C sob agitação moderada, usando um agitador magnético sobre a placa de aquecimento. A solução foi resfriada a temperatura ambiente (25 °C), antes da adição da enzima. Xilanase pura ou xilanase previamente complexada com β -CD foi adicionada na solução de PVA até obter a solução polimérica com concentração final de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5% p v⁻¹ de enzima. A solução polimérica permaneceu sob agitação magnética à 25 °C por 24 h.

5.3.2 Caracterização das soluções poliméricas

Os principais parâmetros que afetam o processo de *electrospinning* são as propriedades da solução polimérica, como viscosidade aparente e condutividade elétrica. Logo, foram as primeiras análises realizadas. A viscosidade aparente das soluções foi avaliada através de viscosímetro digital Brookfield (Model DV). As soluções (aproximadamente 9 mL) foram colocadas em recipiente de aço inoxidável do viscosímetro e este acoplado ao equipamento utilizando um spindle n°18. A condutividade elétrica das soluções foi determinada através de um condutivímetro (Medidor CON500) expresso em $\mu\text{S cm}^{-1}$. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e em triplicata.

5.3.3 Imobilização de xilanase via *electrospinnig*

Após testes preliminares para avaliação dos melhores parâmetros de produção para fibras com xilanase, o processo de *electrospinning* foi conduzido. A taxa de alimentação para a solução polimérica com e sem a enzima foi de 0,5 mL.h⁻¹, sendo controlada por uma bomba de infusão (KD Scientific, Modelo 100, Holliston, Inglaterra). A distância horizontal entre a ponta da agulha até o coletor durante a produção da fibra foi de 20 cm, enquanto o diâmetro da agulha foi de 0,7 mm. A tensão selecionada foi alcançada conectando o eletrodo positivo (+19,5 kV) da fonte de energia DC (INSTOR, INSES-HV30, Brasil) na

agulha, enquanto o eletrodo negativo (-3,1 kV) foi conectado a um coletor de aço inoxidável que estava coberto por folha de alumínio.

A partir desses dados fixados, foi realizada a imobilização de xilanase em fibras de PVA. As soluções poliméricas foram colocadas em seringas de 1 mL e uma bomba de infusão controlou a taxa de alimentação da solução. A temperatura do processo foi controlada em 21 ± 2 °C usando condicionador de ar e a umidade relativa foi ajustada à $43 \pm 2\%$ com desumidificador. As fibras produzidas de álcool polivinílico (PVA), álcool polivinílico contendo xilanase (XI-PVA), álcool polivinílico contendo xilanase complexada com beta-ciclodextrina (XI- β -CD-PVA) foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) até o momento das análises.

5.3.4 Caracterização das fibras

A morfologia das fibras, bem como o diâmetro médio e a distribuição de diâmetro, foi investigada por meio da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Jeol JSM 6010LV, Japão) com uma voltagem de aceleração de 15 kV. O diâmetro médio e a distribuição de diâmetro das fibras foram avaliados das micrografias com base em 100 fibras selecionadas aleatoriamente utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

Espectros de FTIR foram registrados por espectrofotometria de infravermelho transformada por Fourier (Modelo Shimadzu, Prestige 21, Japão), usando uma frequência de varredura na faixa de 4000 à 400 cm^{-1} . As medidas de DRX foram registradas utilizando Difractômetro Bruker D8 Advance (Bruker AXS, Alemanha), em um intervalo de 2θ variando de 2 à 60°. A análise térmica das fibras foi realizada utilizando um calorímetro de varrimento diferencial (DSC-60, Shimadzu, Japão), onde aproximadamente 2 mg de amostra foram pesadas em cadinho de alumínio com varredura na faixa de 30 à 300 °C a uma taxa de 10 °C min^{-1} . Já a estabilidade térmica de cada amostra foi determinada usando um analisador termogravimétrico (TGA) (TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (8–10 mg) foram aquecidas de 30 à 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} , um fluxo de 50 mL min^{-1} de nitrogênio foi usado.

5.3.5. Carregamento enzimático

A quantidade de enzima carregada na fibra de PVA foi determinada utilizando o ensaio de Bradford, como descrito por Ivanova (2010), com algumas modificações. A fibra (4,5 mg) foi incubada em 200 μL de tampão fosfato pH 6,0 por 16 h à 4 °C. Após, 1800 μL do reagente Bradford foi adicionado a solução. A mistura foi suavemente misturada por 3 min para permitir a ligação da proteína e, então, a absorbância foi medida a 595 nm. A albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão. A carga enzimática foi determinada usando Equação 1.

$$\text{Carregamento enzimático (mg/g)} = \frac{\text{Quantidade de proteína na fibra (mg)}}{\text{Massa de fibra (g)}} \quad (1)$$

onde a quantidade de enzima carregada na fibra (mg) foi determinada pelo método de Bradford e a massa de fibra (g) foi a massa inicial da fibra contendo a enzima.

5.3.6. Atividade enzimática

A atividade da xilanase foi determinada com a formação de xilose, de acordo com o método relatado por Bailey; Biely; Poutanen (1992), utilizando xilana birchwood como substrato, com modificações. A atividade da xilanase foi avaliada pelo cálculo da taxa de produção de xilose equivalente sob as condições padrão usando o reagente de 3,5-ácido dinitrossalicílico (DNS). A solução de xilana (1%, p v⁻¹) foi preparado dissolvendo o xilana birchwood em 100 mM de tampão fosfato, pH 6,0. Em frascos tipo Falcon, 10 mg de fibra contendo xilanase foi incubada (sob agitação) com 500 μL de tampão fosfato pH 6,0 durante 24 h à 25 °C. Após, 900 μL de substrato foi adicionado e a mistura foi mantida à 60 °C durante 10 min.

A reação foi interrompida por resfriamento imediato em água gelada, seguido da adição de 1500 μL do reagente de DNS. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho de água fervente durante 5 min e depois arrefecida até a temperatura ambiente (23 °C). A solução foi diluída adicionando 8 mL de água destilada e a quantidade de açúcar redutor (xilose) foi determinada por espectrofotometria a 540 nm, usando um Espectrômetro UV-VIS (modelo Jenway 6700, Jenway, United Reino). Em cada conjunto experimental, preparou-se uma curva padrão de xilose. Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol equivalente

de açúcar de xilose por minuto sob as condições de ensaio especificado. A atividade enzimática foi calculada conforme a Equação 2:

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \frac{\mu\text{moles de xilose} \times \text{Fd (mL)}}{T \text{ (min)} \times V \text{ enzima (mL)}} \quad (2)$$

onde os micromoles de xilose é calculado com base na sua massa molar e curva padrão, Fd é o fator de diluição, T é o tempo de reação enzimática em minutos e V é a quantidade de enzima utilizada na reação em mililitros

5.3.7. Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase

A estabilidade térmica e de pH da xilanase livre e imobilizada foi determinado como descrito por Mehnati-Najafabadi; Taheri-Kafrani; Bordbar (2018), com algumas modificações. A atividade relativa da xilanase livre, da fibra XI-PVA e XI-β-CD-PVA em diferentes pH e temperaturas foi avaliada utilizando fibras com concentrações de xilanase 1,5% p v⁻¹ (atividade enzimática mais estável). A atividade de xilanase em função da temperatura foi determinada após 10 min de incubação em tampão fosfato (100 mM, pH 6,0) com temperatura entre 40 e 80 °C, em intervalos de 10 °C. O efeito do pH sobre a atividade da xilanase foi determinada pela incubação da fibra em soluções tampão a pH específico (4,0, 5,0, 6,0, 8,0) durante 24 h à 25 °C. Após, a atividade enzimática foi realizada conforme descrito na Seção 5.3.6.

5.3.8 Reticulação com vapor de glutaraldeído

Fibras de XI-PVA (1,5% p v⁻¹ de enzima) com dimensões de 1,5 x 2,0 cm e peso médio de 5 mg, foram mantidas em dessecador hermeticamente fechado em contato com glutaraldeído na fase vapor (25% v/v). As fibras foram suspensas sobre a solução de glutaraldeído usando uma peneira de malha fina. A reação de reticulação foi investigada em função do tempo das fibras em ambiente rico em vapor por períodos de 30, 60, 90, 120 e 180 min (testes preliminares) à 25 °C. Após, as amostras foram retiradas do dessecador e condicionadas à 40 °C em estufa por 1 h. Por fim, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por até 24 h antes das análises.

5.3.9 Solubilidade

O estudo do comportamento de imersão e liberação da enzima imobilizada foi realizado nas fibras XI-PVA (1,5% p v⁻¹ de enzima) reticuladas com vapor de glutaraldeído. As fibras foram condicionadas em tampão fosfato (pH 6,0) à 23 °C. Após 6 h, as amostras intumescidas foram centrifugadas a 14.000 rpm e o sobrenadante analisado quanto a atividade enzimática, conforme descrito na Sessão 5.3.6. O procedimento foi repetido após intervalos de tempos específicos (6 h) por até 36 h.

5.3.10 Estudo de reutilização

A eficiência de reutilização da xilanase imobilizada em fibras de PVA foi avaliada em função da atividade enzimática, conforme descrito na Sessão 5.3.6. Para o estudo do reuso, vários ciclos de operação de hidrólises sucessivas foram realizados na fibra XI-PVA reticulada por 180 min. As fibras (5 mg) foram colocadas em Eppendorfs e incubadas com 1000 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 6) à 22 °C por 6 h. Ao final de cada ciclo, as fibras foram centrifugadas (14.000 rpm) e o sobrenadante analisado por sua atividade enzimática. Nas fibras remanescentes foi novamente adicionado tampão e o processo de reciclagem repetido até quando, a olho nu, observasse fibras no fundo do Eppendorfs (4 ciclos).

5.3.11 Estabilidade no armazenamento

As fibras XI-PVA reticuladas por 180 min foram incubadas em 1000 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 6) e armazenadas a 5 e a 22 °C. A atividade enzimática da xilanase foi determinada em 7, 14, 21 e 28 dias, conforme descrito na sessão 5.3.6.

5.3.12 Comportamento catalítico da fibra XI-PVA simulada em solução turva

Afim de verificar a comportamento catalítico da fibra XI-PVA reticulada por 180 min, solução de β-glucana foi dissolvida em tampão fosfato (100 mM, pH 6). A solução estoque de β-glucana tinha concentração de 1000 mg L⁻¹. A capacidade da xilanase imobilizada de reduzir a turbidez da solução foi determinada após a adição da fibra XI-PVA na solução de β-glucana (0,75 mg mL⁻¹). A mistura foi então incubada à 60 °C por 10 min.

A turbidez da solução de β -glucana foi determinada por espalhamento de luz de 90° à 580 nm, conforme descrito pelo método oficial ASBC (ASBC, 1992), usando um espectrofotofluorímetro (RC-5301pc, Shimadzu, Japão) com os comprimentos de onda de excitação e emissão fixados em 580 nm. Solução estoque de formazina contendo 69.000 FTU (Unidade de Formazina Nefelométrica) foi preparada a partir de sulfato de hidrazina a 10,0 mg L⁻¹ e hexametilenotetramina 100 mg L⁻¹, mantida em repouso por 24 h sob agitação suave a temperatura ambiente (23 °C) para formar partículas de névoa estáveis. Soluções foram preparadas por diluições da solução estoque (6,9, 13,8, 20,7, 27,6, 34,5 e 41,4 (FTU) para obter a curva de calibração.

5.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparações de médias foram baseadas no teste de Tukey a um nível de significância de $p > 0,05$ (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

6. Resultados e discussão

6.1 Soluções poliméricas

Diversos parâmetros afetam a morfologia e o diâmetro das fibras formadas durante o processo de *electrospinning*. Esses parâmetros podem ser dividido em três grupos: parâmetros de processo, como campo elétrico aplicado, distância do coletor e taxa de alimentação; de solução, como viscosidade e condutividade e ambientais como umidade e temperatura (BABITHA et al., 2017).

As soluções de álcool polivinílico (PVA) nas concentrações testadas (6, 8 e 10%) foram caracterizadas quanto a viscosidade aparente e condutividade elétrica, os resultados estão apresentados na Tabela 5. A condutividade elétrica das soluções diminuiu com o aumento da concentração do polímero. A alta condutividade elétrica resulta em maior mobilidade de íons e, conseqüentemente, com a aplicação de um campo elétrico eles tendem a ser direcionados com mais facilidade. Isso resulta em um alongamento maior do jato de polímero reduzindo o diâmetro das fibras (RAMAKRISHNA et al., 2005). Com a redução do diâmetro das fibras a área superficial aumenta, sugerindo que a condutividade elétrica alta se torna adequada para a formação de fibras.

Independente da concentração de solução de PVA utilizada, considerou-se que a condutividade estava apropriada para desenvolvimento das fibras por *electrospinning*, pois as mesmas permitiram a formação de jato contínuo e estável, levando a formação de fibras contínuas.

Tabela 5 - Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas

Concentração de PVA (%)	Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	Viscosidade aparente (cP)
6	7530,0 ± 10,1 ^a	483,2 ± 3,3 ^c
8	5792,0 ± 17,5 ^b	681,6 ± 8,4 ^b
10	4364,0 ± 11,1 ^c	1261,0 ± 13,2 ^a

*Médias na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

A viscosidade aparente das soluções aumentou com o aumento da concentração de polímero, o que era esperado pois o aumento da viscosidade geralmente é proporcional ao aumento de sólidos na solução (Tabela 5). Para o processo de *electrospinning* é necessária

uma viscosidade ideal da solução, a qual está relacionada a cada solução polimérica, que permite a formação de fibras contínuas, uniformes e sem a presença de *beads* (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Soluções com viscosidade baixa não permitem a formação de fibras contínuas. Por outro lado, soluções com viscosidades elevada tornam o alongamento das fibras difícil e lento, além de resultar no aumento do diâmetro das mesmas (WEN et al., 2016).

Segundo Neo et al. (2012), a influência da viscosidade da solução na formação de fibras pelo *electrospinning* pode ser explicada devido ao emaranhamento entre as moléculas que é forte suficientemente para estabilizar o jato eletrificado propiciando a formação de fibras ao invés de microesferas (Neo et al., 2012). O aumento da viscosidade da solução tende a evitar a formação de *beads*, no entanto, o diâmetro da fibra pode aumentar. O grau de emaranhamento da cadeia deve ser suficiente para manter o nível de viscosidade da solução e produzir um jato uniforme durante *electrospinning* e, assim, restringir os efeitos da tensão superficial, que desempenha um papel significativo na formação de *beads* (BHARDWAJ; KUNDU 2010).

A morfologia e o diâmetro das fibras nas concentrações 6, 8 e 10% estão apresentadas na Figura 4. As fibras produzidas com 6% de PVA apresentaram *beads*, que está associado a baixa viscosidade da solução, enquanto as fibras com 10% de PVA apresentaram uma forma de fita, devido a espessura das fibras ser proporcional a concentração de sólidos presentes na solução. Os *beads* não são desejáveis para imobilização de enzimas, pois aumentam a relação massa/área de superfície, diminuindo a eficiência de carregamento (JIA et al., 2002).

O aumento da viscosidade e a redução da condutividade na solução, efeitos da maior concentração de PVA, não influenciou sobre o processo de formação das fibras, porém causou um aumento no diâmetro das mesmas. As fibras produzidas a partir de 8% de PVA apresentaram uma morfologia cilíndrica e homogênea sem a presença de *beads*. Logo, através desses resultados, a concentração de 8% de PVA foi escolhida para o seguimento do estudo.

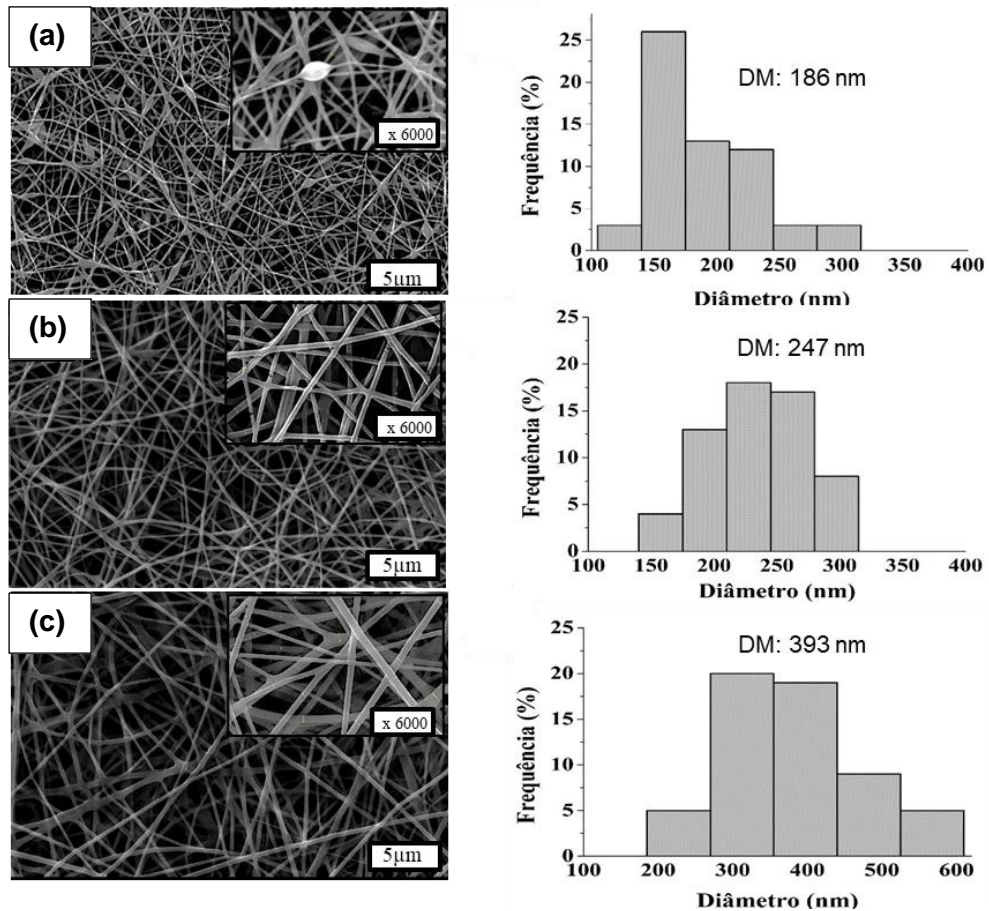


Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras de PVA em diferentes concentrações: (a) 6%, (b) 8% e (c) 10%

6.2. Fibras de XI-PVA e XI-β-CD-PVA

6.2.1 Morfologia e distribuição de tamanho

A morfologia, o diâmetro médio e a distribuição de diâmetro das fibras de XI-PVA e XI-β-CD-PVA em diferentes concentrações de enzima estão mostradas nas Figuras 5 e 6, respectivamente. A morfologia das fibras apresentou distribuição homogênea, lisa e superfície compacta. A adição da enzima modificou a morfologia das fibras, com leve aumento de diâmetro médio conforme a adição de enzima. Sendo seus diâmetros médios variando entre 271 e 449 nm para fibras de XI-PVA e 284 e 589 nm para fibras de XI-β-CD-PVA. O diâmetro médio maior encontrado nas fibras com complexo de inclusão pode ser resultado das maiores dimensões moleculares do complexo xilanase- β-ciclodextrina que as encontradas nas fibras contendo apenas xilanase.

A morfologia da fibra está associada a eficiência catalítica de enzimas imobilizadas devido a minimização dos efeitos de difusão de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional (ENGASSER; HORVATH,1973). Wu et al. (2005) descreveram que pequenas quantidades de *beads* não afetou a atividade da enzima imobilizada. Esses autores destacaram ainda que, o aparecimento de *beads* se intensificou com o aumento da concentração de enzima celulase imobilizada via *electrospinning* em fibras de PVA.

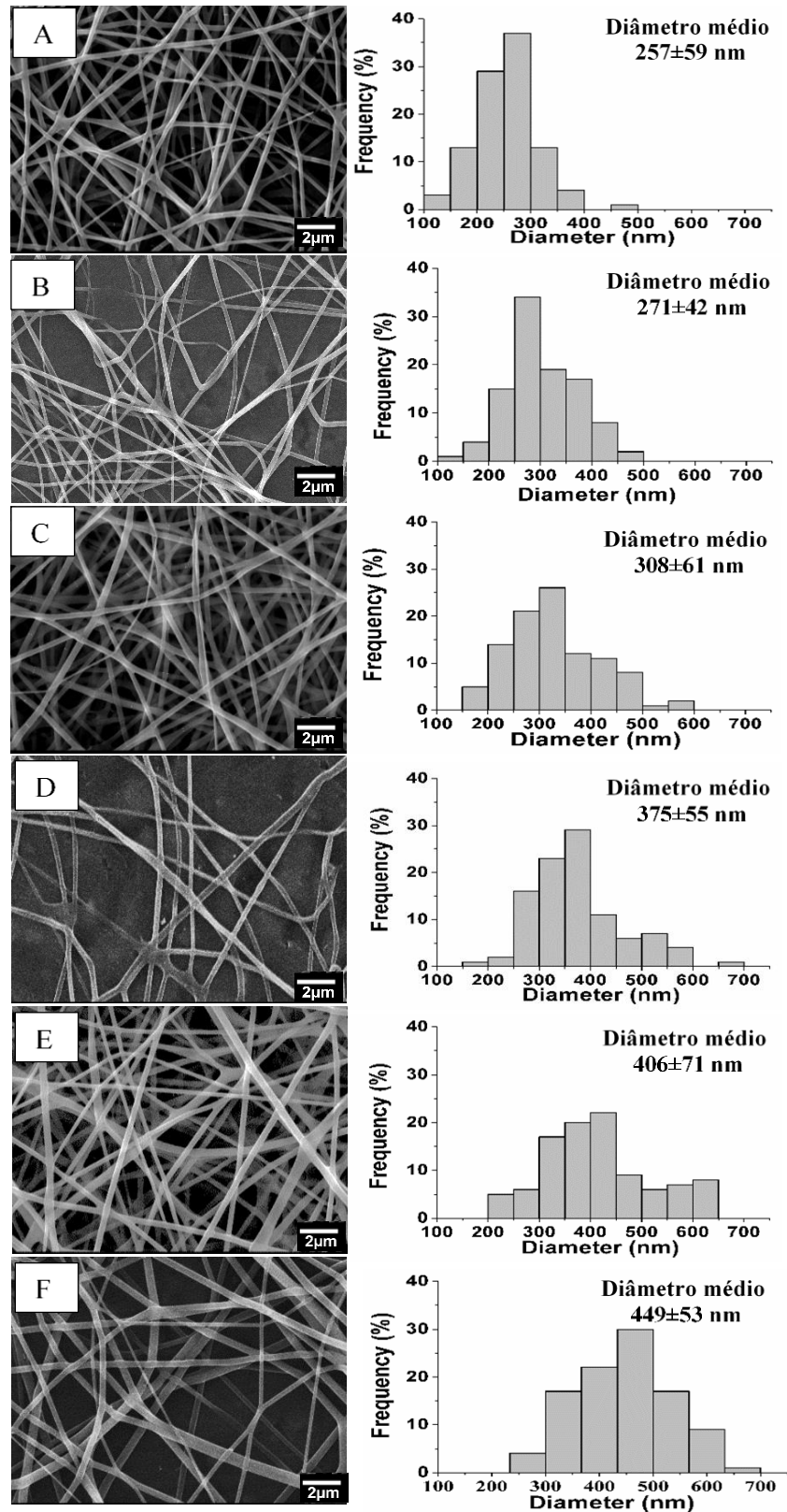


Figura 5 - Morfologia, diâmetro médio e distribuição de diâmetro das fibras de PVA sem enzima (a), XI-PVA 0,5% de enzima (b), XI-PVA 1,0% de enzima (c), XI-PVA 1,5% de enzima (d), XI-PVA 2,0% de enzima (e) e XI-PVA 2,5% de enzima (f)

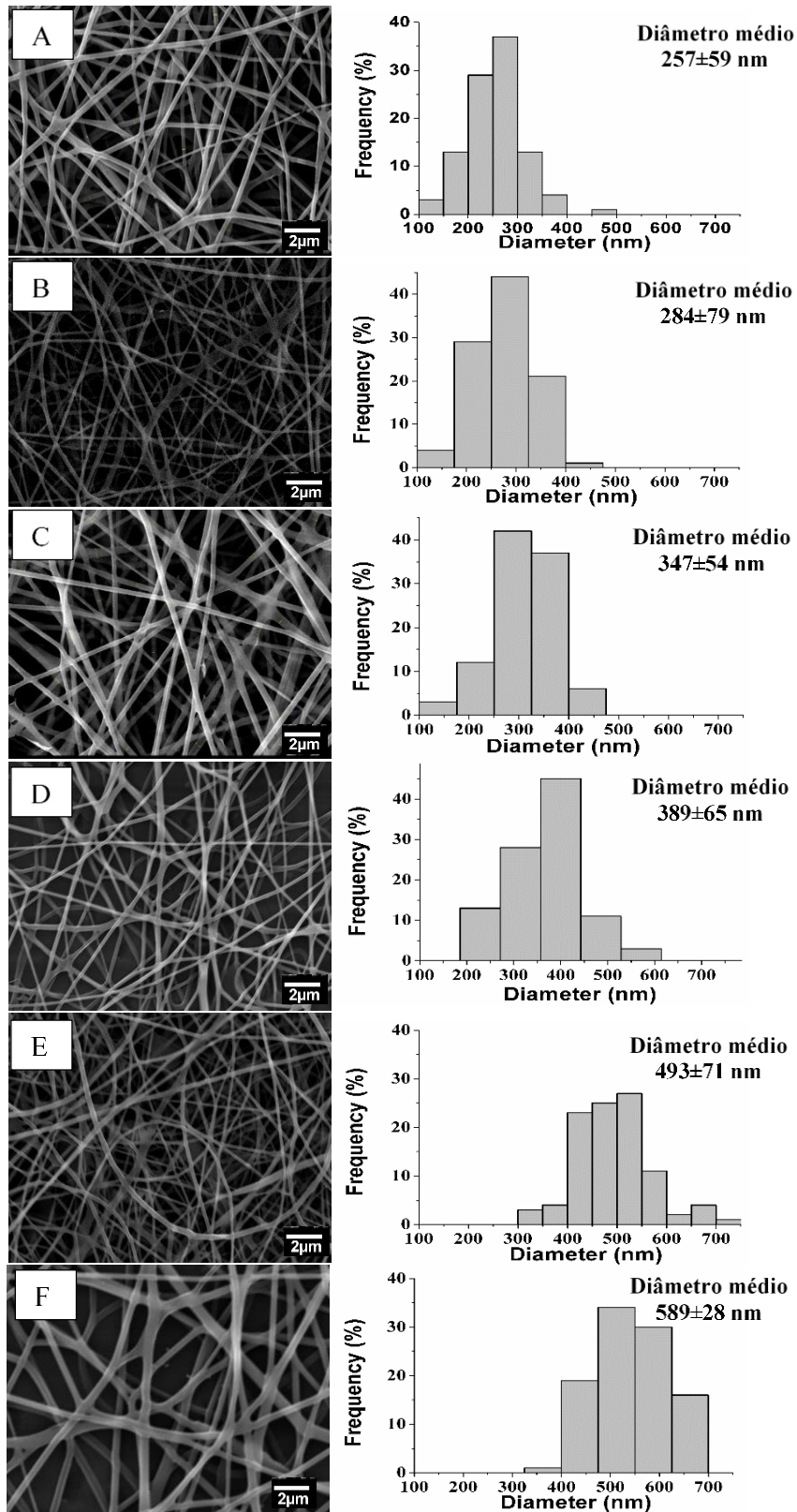


Figura 6 - Morfologia, diâmetro médio e distribuição de diâmetro das fibras de PVA sem enzima (a), XI-β-CD-PVA 0,5% de enzima (b), XI-β-CD-PVA 1,0% de enzima (c), XI-β-CD-PVA 1,5% de enzima (d), XI-β-CD-PVA 2,0% de enzima (e) e XI-β-CD-PVA 2,5% de enzima (f)

6.2.2 Difração de Raio-X (DRX)

A difratometria é um método útil para a detecção de complexação de ciclodextrinas (XIAO et al., 2014). As ciclodextrinas, em seu estado cristalino, formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que estabilizam a conformação da molécula e sua estrutura, gerando difratogramas bem definidos. Se ocorrer complexação, a cristalinidade das partículas é reduzida, com alterações nos perfis de difração da amostra (ABARCA et al., 2016 ; RAOOV; MOHAMAD; ABAS, 2014). Os padrões de DRX de β -CD, do complexo XI- β -CD, assim como da fibra de PVA e da fibra XI- β -CD-PVA são apresentados Figura 7.

A Figura 7A apresenta o difratograma característico para β -CD. De acordo com Narayanan et al. (2017) , picos característicos em 2θ para β -CD geralmente aparecem em, aproximadamente, 9,1, 12,6, 22,5, 26,9, 31,9 e 34,7 °, indicando um alto grau de cristalinidade. Para o complexo XI- β -CD (Figura 7A), alguns picos tiveram sua intensidade e posição angular modificadas, indicando a ocorrência de uma possível mudança de fase. De acordo com Aytac et al. (2017) picos menos intensos é indicativo de formação de complexo de inclusão com a β -CD.

O difratograma da fibra de PVA (Figura 7B) exibe picos no ângulo de difração 2θ de 13,6, 29,7 e 41,4°, que são características de ângulos de difração para a fase cristalina de PVA (FERNANDES et al., 2013). Ao comparar a fibra de PVA e a fibra com XI- β -CD (Figura 7B), observou-se um pequeno deslocamento de pico, de 18,3 para 19,4°, respectivamente. Este deslocamento de pico pode estar relacionado a presença do complexo de inclusão na fibra. Diferenças semelhantes em difratogramas de nanofibras preparados com complexo de inclusão foram observados por Canbolat; Savas; Gultekin (2017) ao estudar lacase- γ -CD imobilizado em poli (ϵ -caprolactona) via *electrospinning*.

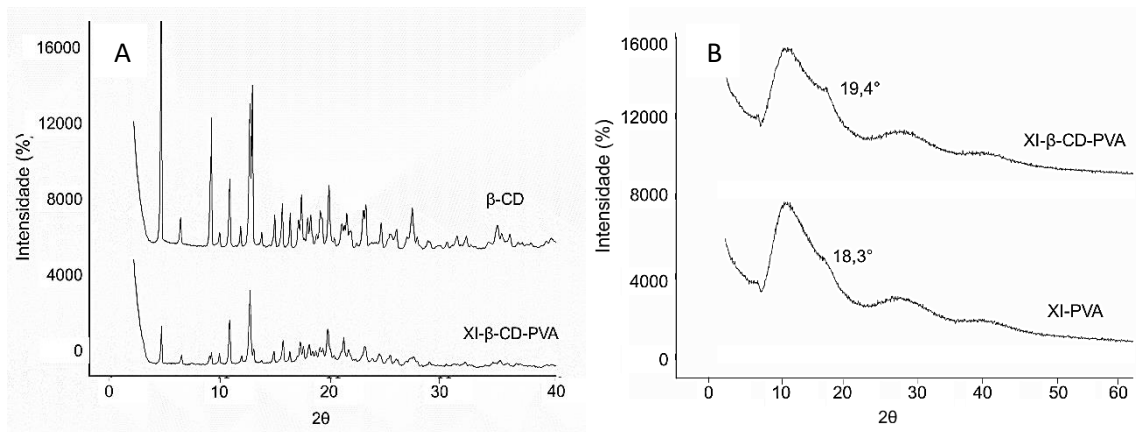


Figura 7 - Padrões de DRX de β -CD e XI- β -CD (A) e de fibra de PVA e XI- β -CD imobilizada em fibra de PVA (B).

6.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR da XI, da β -CD e do complexo de inclusão XI- β -CD, apresentados nas Figuras 8A e 8B, respectivamente, mostram espectros de fibras de XI-PVA, de XI- β -CD-PVA e da mistura física XI- β -CD-PVA (ausência de formação do complexo de inclusão), todos com concentrações de 1% de enzima. A Figura 8A de XI mostraram bandas em 2920 e 1530-1660 cm^{-1} , que são atribuídas a absorbância por grupos amino de xilanases (ROBERGE et al., 2003). Para o espectro de β -CD, o alongamento O-H foi observado em 3380 cm^{-1} e a banda em 2925 cm^{-1} representaram alongamento C-H (Figura 8A, indicado por setas). As bandas em 1158 cm^{-1} resultam na vibração do alongamento C-O e 1064 cm^{-1} representa o estiramento C-O-C.

No complexo de inclusão XI- β -CD houve uma mudança nas bandas na posição 1064 a 1072 cm^{-1} . A ausência de bandas em 1064 e 1015 cm^{-1} que foram previamente determinadas no espectro de β -CD, pode estar relacionado ao envolvimento de C-O e C-O-C ligados no arranjo do complexo. Além disso, observou-se uma banda em 1027 cm^{-1} no espectro de complexo, que também foi encontrado no espectro da XI.

Em relação aos grupos funcionais presentes nas fibras (Figura 8B), todas as amostras apresentaram uma vibração de alongamento C-N a 1379 cm^{-1} juntamente com as vibrações de alongamento simétricas de C-O em 1435 cm^{-1} que podem ser atribuídos a grupos amida de carbonila (CO-NH₂) (ABARCA et al., 2016). Para fibra contendo o

complexo XI- β -CD-PVA não foi possível identificar a presença da banda em 1646 cm^{-1} , que foi determinada para a fibra XI-PVA e para a fibra contendo a mistura física XI- β -CD-PVA.

A banda em 1646 cm^{-1} é atribuída a ligação C=O, então a ausência dessa banda sugere seu envolvimento no arranjo do complexo de inclusão. Além disso, quando a fibra da mistura física XI- β -CD-PVA foi analisada, bandas claras em 756 e 1156 cm^{-1} foram observadas, as quais foram suprimidas quando o complexo de inclusão XI- β -CD foi utilizado para imobilização em PVA. As bandas em 1097 e 3315 cm^{-1} observadas em todas as fibras estão associadas ao alongamento de C-O e a ligação de hidrogênio e álcool (O-H) do PVA, respectivamente (MORENO-CORTEZ et al., 2015).

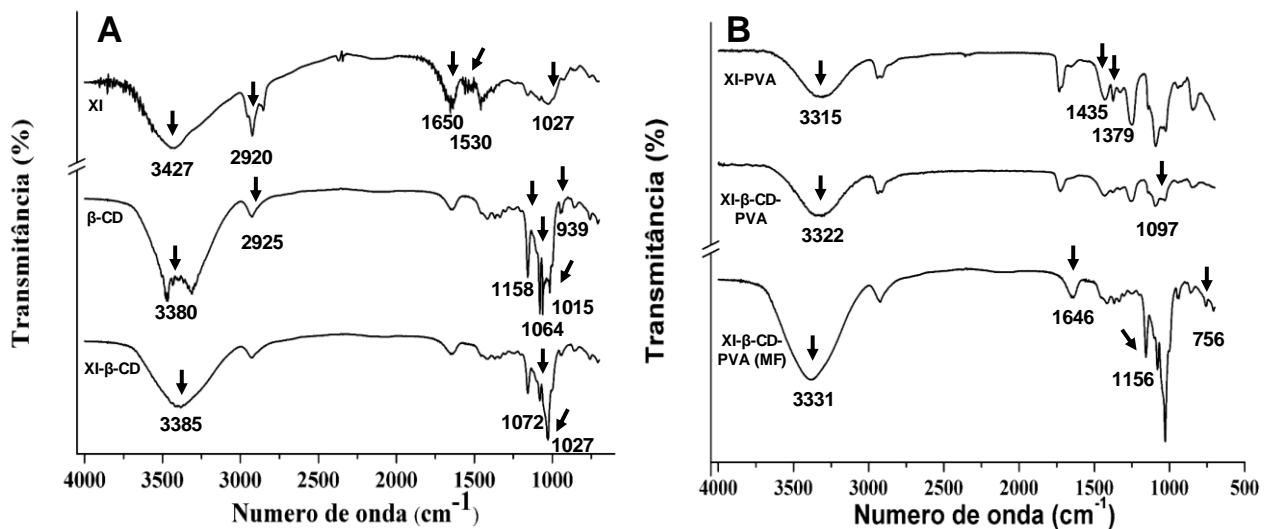


Figura 8 - Espectros de FTIR de XI, β -CD e XI- β -CD (A) e XI em fibras de PVA, complexo XI- β -CD em fibras de PVA e mistura física XI- β -CD em fibras de PVA (B)

6.2.4 Análise térmica por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

O termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tem sido utilizada para verificar a formação de complexos de inclusão (WANG et al., 2011). A molécula hóspede é incorporada na cavidade de ciclodextrinas e isso provoca o deslocamento ou até mesmo o desaparecimento de pontos de fusão, ebulição ou sublimação (PINTO et al., 2015). As curvas DSC de β -CD, de XI, do complexo de inclusão XI- β -CD e da mistura física de XI- β -CD estão mostrados na Figura 9. A curva de β -CD apresentou um único pico endotérmico

em 190,25 °C. Segundo Wang et al. (2011), este pico está relacionado com a perda de água no interior da cavidade hidrofóbica da β -CD.

A XI utilizada no presente estudo exibiu um pico endotérmico em 179 °C. Comportamento endotérmico diferente foi observado no termograma do complexo XI- β -CD, onde o pico original observado em 179 °C alterou para 183 °C, o que indica interação entre XI e a β -CD, sugerindo a formação do complexo de inclusão. Comparando as áreas de pico e as temperaturas iniciais e de conclusão dos picos da mistura física XI- β -CD e do complexo de inclusão XI- β -CD apresentados na Figura 9, a área de pico inferior e as temperaturas iniciais e finais claramente estreitas observado para o complexo XI- β -CD, indica maior homogeneidade e interação de ambos os polímeros, observado pela fusão definida no termograma.

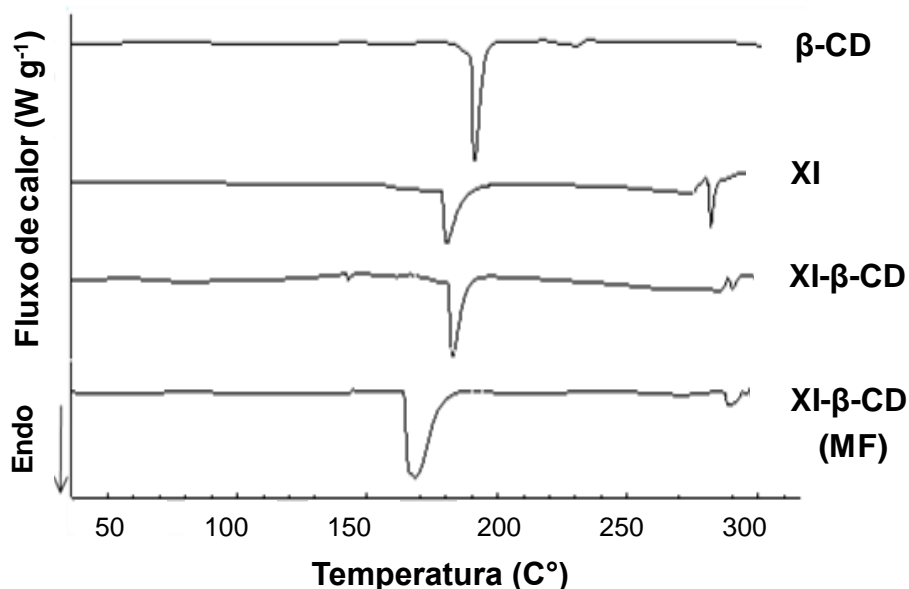


Figura 9 - Curvas de DSC de β -CD, XI, complexo de inclusão de XI- β -CD e mistura física de XI- β -CD

6.3. Concentração ótima de imobilização

O efeito da concentração de xilanase sobre a atividade da enzima imobilizada em fibras de XI-PVA e XI- β -CD-PVA foi investigado e comparado com a atividade da xilanase na forma livre, sob as mesmas condições reacionais (pH 6,0 e temperatura de 60 °C) (Figura 10). As forças eletrostáticas do processo de eletrospiação e as interações intermoleculares polares com o PVA, não afetaram a atividade enzimática da xilanase após o processo de imobilização por *electrospinning*.

A xilanase imobilizada apresentou maior atividade que a xilanase na forma livre para concentrações variando de 0,5 à 2,5%, para ambos os meios de imobilização: XI-PVA e XI- β -CD-PVA (Figura 10). A maior atividade catalítica da enzima imobilizada pode ser atribuída a mínima resistência a difusão, visto que o substrato e o produto podem mover-se livremente dentro da rede de fibras porosas, aumentando assim a interação enzima-substrato (CHRONAKIS, 2015).

A atividade da xilanase imobilizada em fibras XI-PVA foi maior ($p < 0,05$), quando comparada em fibras XI- β -CD-PVA, independentemente da concentração. A menor atividade da enzima observada em fibras de XI- β -CD-PVA foi inesperada, considerando resultados previstos para lacase (CANBOLAT; SAVAS; GULTEKIN, 2017). A hipótese é que um empacotamento denso foi formado entre XI e β -CD na fibra, dificultando o acesso enzimático ao substrato. Logo, a premissa de uma liberação controlada da enzima utilizando a β -CD como encapsulante seria vantajosa. No entanto, neste primeiro momento, a β -CD foi capaz de interferir na taxa da catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo biológico ou especificidade da reação. Contudo, a β -CD pode exibir característica de inibidor reversível, levando a formação de um complexo em um sistema de equilíbrio e permanecendo constante até um certo tempo.

Resultados similares foram encontrados por Jampala et al. (2017) quando imobilizaram xilanase em nano-híbridos utilizando quatro diferentes matrizes (alginato de sódio, quitina, sílica e membrana de nitrato de celulose). A nanofibra produzida com alginato de sódio apresentou menor constante de Michaelis (K_m) e maior velocidade máxima (V_{max}) em relação a xilanase na forma livre, indicando maior afinidade e alta reatividade com o substrato.

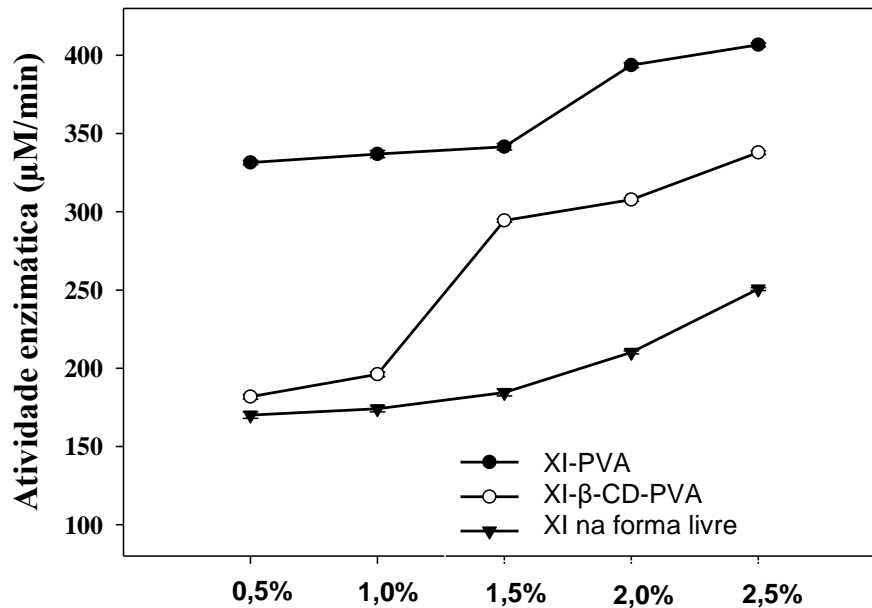


Figura 10 - Atividade enzimática em diferentes concentrações de xilanase

A atividade enzimática, a capacidade de carregamento e a atividade específica da xilanase livre e imobilizada, em diferentes concentrações, estão mostrados na Tabela 6. A quantidade de enzima imobilizada por grama de fibra eletrofiada aumentou com o aumento da concentração de enzima. No entanto, a atividade da enzima nas fibras XI-PVA e XI-β-CD-PVA não acompanhou os aumentos da capacidade de carregamento de forma semelhante. Isso explica a redução da atividade específica (atividade por mg de enzima imobilizada) de xilanase imobilizada quando a concentração inicial de enzima aumenta.

Mehnti-Najafabadi; Taheri-Kafrani; Bordbar (2018) imobilizaram xilanase em diferentes concentrações (0,0 a 2,0%) em nanofibras superparamagnéticas de óxido de grafeno e relataram o aumento da atividade enzimática até certa concentração. Os autores sugeriram que a diminuição da atividade subsequente poderia estar relacionada a limitação de transferência de massa. Moreno-Cortez et al. (2015) ao imobilizarem papaína nas concentrações de 10 a 35 % em fibras de PVA via *electrospinnig*, observaram que na concentração de 13 % de enzima, a atividade específica da papaína nas fibras atingiu um valor máximo. Observou-se subsequente diminuição da atividade específica com o aumento da concentração de enzima. Os autores relacionaram estes resultados à limitação da enzima ao substrato devido ao aprisionamento desta no suporte sólido.

Tabela 6 - Atividade e capacidade de carregamento da xilanase pura e imobilizada

Tratamento	Concentração de Xilanase (%)	Capacidade de carregamento (mg XI imobilizada/g fibra)	Atividade enzimática ($\mu\text{M min}^{-1}$)	Atividade específica ($\mu\text{M/min/mg de XI imobilizada}$)
Xilanase livre	1,5	-	184,44	-
XI-PVA	0,5	5,55	331,50	59,73
	1,0	10,66	336,85	31,60
	1,5	12,45	341,53	27,43
	2,0	15,99	393,68	24,63
	2,5	18,06	406,71	22,52
XI- β -CD-PVA	0,5	6,04	181,76	30,09
	1,0	9,52	196,13	20,60
	1,5	11,72	294,40	25,11
	2,0	13,59	307,77	22,65
	2,5	16,03	337,86	21,08

6.4. Influência da temperatura na atividade de xilanase imobilizada

A melhora na atividade da xilanase em diferentes temperaturas é importante para ampliar as aplicações industriais de xilanase bem como a eficiência de processos industriais usando esta enzima. A atividade relativa da xilanase livre e das fibras XI-PVA e XI- β -CD-PVA foi determinada nas temperaturas entre 40 e 80 °C a pH 6,0 e está apresentado na Figura 11. A maior atividade enzimática para cada um dos três tratamentos foi considerada como 100% da atividade relativa. Os valores absolutos da atividade enzimática da xilanase livre e imobilizada em função da temperatura está apresentado no Apêndice 1.

A xilanase livre exibiu temperatura ótima em 60 °C, enquanto que para xilanase imobilizada na fibra XI-PVA e XI- β -CD-PVA a temperatura ótima da reação aumentou para 70 °C. A xilanase imobilizada em PVA permitiu maior atividade enzimática em 40, 50, 70 e 80 °C do que a xilanase livre (Figura 11). A redução da atividade na maior temperatura estudada (80 °C) sugere uma alteração na conformação da xilanase ou desnaturação da proteína (JAMPALA et al., 2017).

É de grande relevância o aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da xilanase principalmente em 70 e 80 °C (Apêndice 1), o que torna a imobilização de xilanase em fibras de PVA via *electrospinning* promissora para melhoria da estabilidade térmica da enzima. Segundo DICOSIMO et al. (2013), a imobilização torna as enzimas menos acessíveis as interações causadas por agentes inibidores e desnaturantes, o que as torna menos expostas a esses agentes (DICOSIMO et al., 2013).

Esses resultados estão de acordo com relatos anteriores de Pinto et al. (2015), que imobilizaram a tripsina em nanofibras de poli (ϵ -caprolactona) preparadas via *electrospinning*. Esses autores encontraram atividades maior na tripsina em faixa de temperatura mais alta ao comparar enzima imobilizada e tripsina livre, atribuindo este comportamento as menores taxas de desnaturação da enzima imobilizada, devido ao aprisionamento da enzima e sua menor flexibilidade.

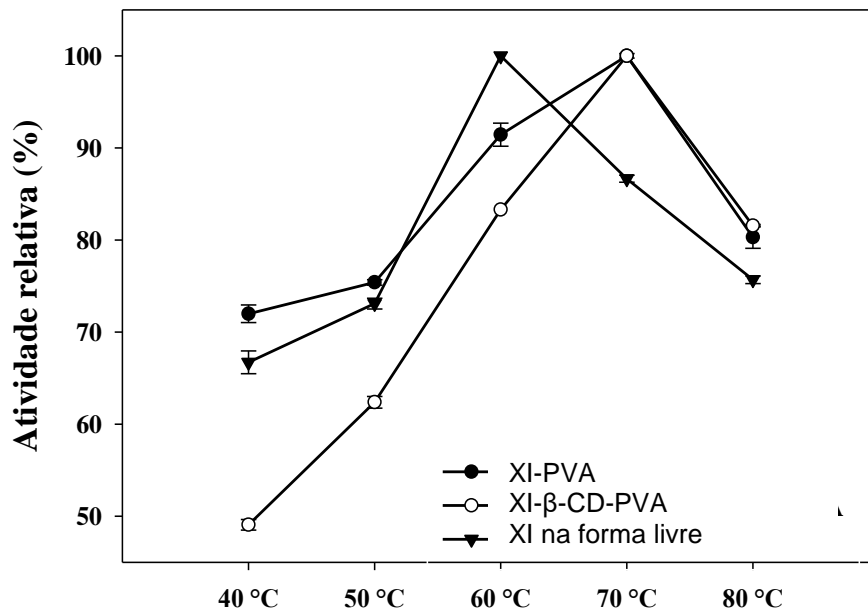


Figura 11 - Atividade relativa da xilanase livre e imobilizada em função da temperatura

6.5. Influência do pH na atividade de xilanase imobilizada

A atividade relativa para xilanase livre, XI-PVA e XI-β-CD-PVA foi determinada em função do pH e está apresentado na Figura 12. Os valores absolutos da atividade enzimática da xilanase livre e imobilizada em função do pH está apresentado no Apêndice 1. A xilanase imobilizada em PVA exibiu maior ($p < 0,05$) atividade relativa em ampla faixa de pH, com valores maiores em pH 4, 5, 7 e 8, em comparação com a xilanase livre.

A maior diferença na atividade enzimática foi encontrada no pH 8, entre xilanase imobilizada em fibras XI-PVA e xilanase na forma livre, onde os valores médios foram 313,79 e 144,33 $\mu\text{M min}^{-1}$, respectivamente (Apêndice 1). Resultado semelhante foi relatado para xilanase imobilizada em monoacrilato de polietilenoglicol (PEGMA), onde a

xilanase imobilizada apresentou maior atividade em pH's extremamente ácidos e básicos, em comparação com a xilanase livre (AKDEMIR; DEMIR; KAHRAMAN, 2011). Segundo Moreno-Cortez et al. (2015), melhorias na atividade catalítica das enzimas imobilizadas são atribuídas a mobilidade reduzida na estrutura tridimensional da proteína dentro das fibras eletrofiadas, reduzindo os efeitos de pH e temperatura na desnaturação da enzima.

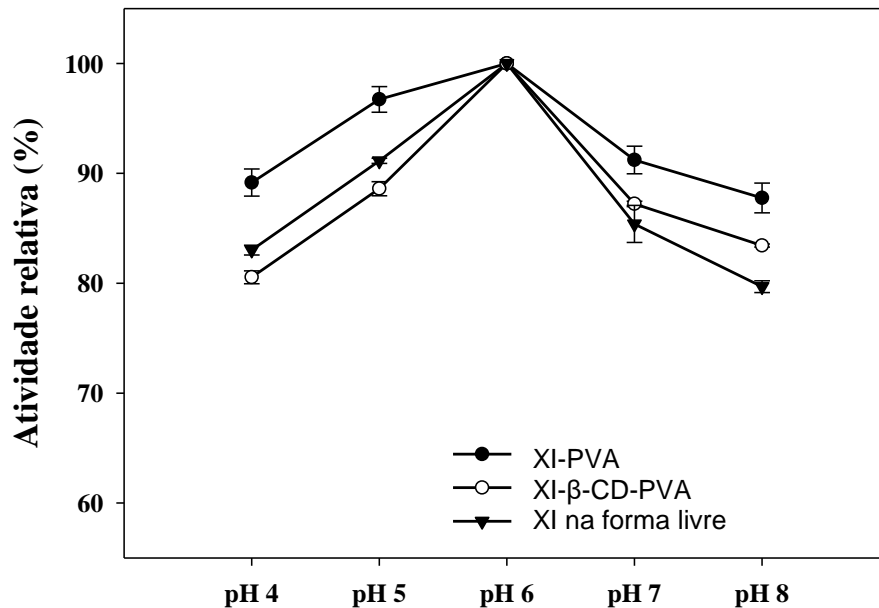


Figura 12 - Atividade relativa da xilanase livre e imobilizada em função do pH

Neste estudo, ao final da reação, independentemente do pH e da temperatura utilizados, as fibras eletrofiadas foram completamente solubilizadas. Embora houvesse um aumento na função catalítica da xilanase, a recuperação da enzima não foi possível uma vez que a fibra foi completamente solubilizada. A este respeito, a tese seguiu o estudo de xilanase imobilizada em fibras de PVA via *electrospinning*, utilizando a reticulação com glutaraldeído na fase vapor, afim de reduzir a solubilidade das fibras.

6.6 Efeitos do tempo de imersão nas fibras XI-PVA reticuladas

Apesar das vantagens atribuídas as fibras de PVA produzidas via *electrospinning* alguns problemas associados com esse material de suporte são relatados, tais como a alta solubilidade em meios aquosos. A atividade enzimática da xilanase imobilizada em fibras XI-PVA reticuladas por 30, 60, 90 e 180 min foram determinadas em diferentes tempos de

imersão (Figura 13). O aumento do tempo de reticulação afetou a atividade enzimática das fibras. A atividade catalítica das fibras XI-PVA reticuladas por 90 e 180 min foi menor ($p \leq 0,05$) do que a observado nas fibras reticuladas por 30 e 60 min (Figura 13).

A alta atividade enzimática da xilanase nas fibras XI-PVA acondicionadas por 6 h de imersão podem ser atribuídas a dessorção inicial e a difusão rápida da enzima na superfície da fibra para o meio de dissolução. A reticulação com glutaraldeído nas fibras XI-PVA mostraram aumento na atividade enzimática quando a imersão foi aumentada de 6 para 36 h. Esse comportamento pode ser observado principalmente entre 24 e 36 h de imersão, quando um aumento substancial na atividade enzimática foi observado, devido a difusão do estado sólido das fibras de PVA reticuladas (Figura 13).

O uso de polímeros com baixa solubilidade facilita a preservação da integridade estrutural e mecânica da fibra para manuseio em meio aquoso e, portanto, a reutilização da enzima com atividade catalítica. Assim, o uso de materiais alternativos para reduzir a solubilidade da fibra e aumentar a interação entre o material de suporte e a enzima contribuem para a eficiência do processo (JAMPALA et al., 2017).

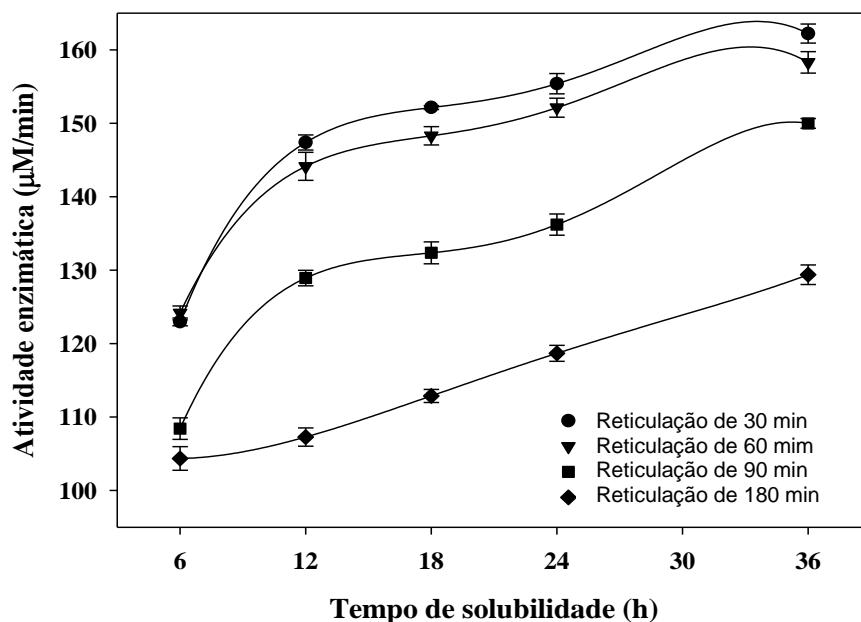


Figura 13 - Efeitos do tempo de reticulação e de solubilização das fibras de XI-PVA reticuladas com glutaraldeído.

6.7 Caracterização da fibra XI-PVA reticulada

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia das fibras XI-PVA reticuladas por 180 min e comparar com as fibras não reticuladas, conforme mostradas na Figura 14. A fibra não reticulada (Figura 14A) revelou a formação de fibras cilíndricas uniformes em orientação aleatória. Enquanto a fibra reticulada apresentou estruturas mais densas e compactadas (Figura 14B). Resultados semelhantes foram observados por Wu; Yuan; Sheng, (2005) quando celulase foi imobilizada em fibras de PVA reticuladas com glutaraldeído. Os autores observaram que após a reticulação, as nanofibras tornaram-se densamente compactadas devido a conglutinação entre as moléculas de PVA e, como resultado, a área de superfície foi reduzido, tornando o acesso do substrato a enzima mais difícil.

A mudança na estrutura da fibra pode contribuir para atrasos na liberação da enzima devido a diminuição da área superficial disponível para dissolução. Mudanças na morfologia da fibra após reticulação química por processo de adsorção foram relatadas por Amaly et al. (2018). Os autores modificaram membranas de poli (álcool vinílico-etileno) nanofibras com 3-sulfobenzoato, obtendo membranas carregadas negativamente com grupos sulfonato. As membranas modificadas com solução de sulfonato 5% mostraram diâmetro de fibra maior quando comparado a membrana não modificada (AMALY et al., 2018).

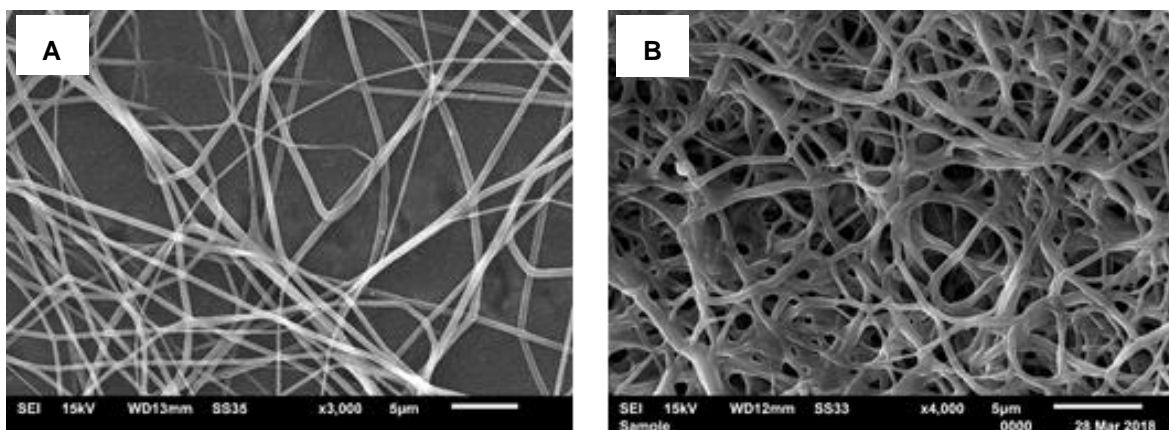


Figura 14 - MEV das fibras XI-PVA: A) Não reticulada e B) Após 180 min de reticulação.

Grupos funcionais das fibras reticuladas foram avaliados por análise de FTIR. O espectro da fibra não reticulada foi analisado e incluído para comparação (Figura 15). A interação entre PVA e glutaraldeído pode ocorrer através da formação de grupo C-O-C entre o -OH da típica estrutura do PVA e o -C- da molécula do glutaraldeído (HOMAEI et al., 2013).

A reticulação de PVA com glutaraldeído foi confirmada pela presença de bandas de absorção em 1100 cm^{-1} para grupos alifático de glutaraldeído e a banda de absorção em 1725 cm^{-1} para os grupos de aldeído (Figura 15). Semelhantes resultados foram encontrados por Moreno-Cortez et al. (2015), que realizou o tratamento de reticulação com glutaraldeído em fibras de PVA contendo a enzima papaína. Segundo Shaikh et al. (2012), a banda de absorção em 1150 cm^{-1} caracteriza o sucesso do processo de reticulação, indicando a formação de ligações C-O-C, produzidas por uma reação entre o grupo -OH da molécula de PVA e o -C- da molécula de glutaraldeído (Shaikh et al., 2012).

Grupos amida carbonil (CO-NH₂) dentro da matriz fibrosa são representados por uma vibração de alongamento C-N em 1379 cm^{-1} junto com vibrações de alongamento simétrico de C-O em 1435 cm^{-1} (MORENO-CORTEZ et al. 2015). A molécula de xilanase pode interagir com os grupos reativos dos agentes de reticulação, como grupos -CHO do glutaraldeído.

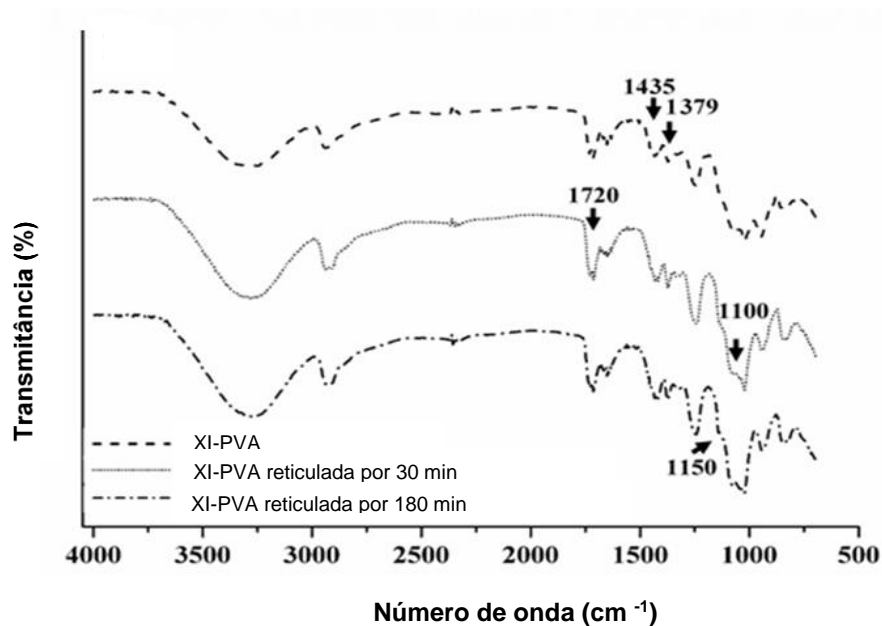


Figura 15 - FTIR das fibras XI-PVA não reticulada, reticulada por 30 min e reticulada por 180 min

A estabilidade das fibras reticuladas com vapor de glutaraldeído foi analisada por termogravimetria. A temperatura inicial de decomposição, a análise diferencial térmica (TDA) e a porcentagem dos resíduos em 400 e 600 °C são mostrados na Tabela 7. As fibras reticuladas mostraram perda de massa inicial em temperaturas mais altas quando comparadas com fibras não reticuladas, sugerindo estabilidade térmica.

Três etapas principais de perda de massa foram observadas. A primeira foi atribuída a evaporação da água não ligada absorvida pelo PVA e a segunda conhecida como a evaporação de água ligada. Na terceira etapa, a decomposição da fibra ocorreu a uma temperatura de aproximadamente 356 °C. A temperatura de degradação nas fibras de PVA reticuladas aumentaram, conforme aumentou do tempo de reticulação, devido a interação da ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do glutaraldeído e do PVA, que está em concordância com observações feitas em nossos resultados de FTIR (Figura 15).

Os maiores valores de temperatura inicial de decomposição das fibras foram observados conforme o maior tempo de reticulação (Tabela 7), mostrando que as fibras reticuladas começam a se decompor em temperaturas maiores (Tabela 7). Comportamento semelhante foi observado em fibras de α -amilase-PVA reticuladas com glutaraldeído (PORTO et al., 2019). Segundo o Porto et al. (2019) e Tang et al. (2014), o processo de reticulação favorece a ligação covalente entre a enzima e a fibra, isso pode aumentar a inflexibilidade da estrutura da enzima, aumentando sua rigidez e causando uma melhoria na estabilidade térmica.

Embora as fibras reticuladas mostrem maior temperatura de decomposição, elas tinham uma estrutura mais frágil após o início do seu processo de decomposição, uma vez que perderam mais massa nas temperaturas de 400 e 600 °C, quando comparada a fibras não reticuladas (Tabela 7). Em resumo, o aumento no tempo de reticulação resultou em maior perda de peso nas fibras, independentemente da temperatura analisada. Este fato pode ser devido ao maior número de grupos hidroxila em torno da estrutura, devido a reticulação com glutaraldeído (JALAJA; JAMES, 2015).

Tabela 7 - Propriedades termogravimétricas das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído

Fibras	Tempo de reticulação (min)	Temperatura de decomposição inicial (°C)	Picos de DTG (°C)	Perda de massa (%)	
				400 °C	600 °C
XI-PVA	controle	283,23	42,24; 182,07; 356,29; 441,53.	49,50	72,95
	30	293,25	53,18; 188,26; 371,33; 445,19.	51,71	76,91
	60	295,54	60,90; 368,33; 439,11.	52,96	78,30
	90	298,51	54,48; 183,83; 364,67.	56,01	73,22
	180	305,92	59,12; 184,52; 377,66.	53,90	77,79

6.8 Reuso da fibra XI-PVA reticulada

Para examinar o comportamento de reutilização da fibra, as fibras XI-PVA que foram reticuladas por 180 min foram submetidos a quatro ciclos de solubilização e centrifugação. A atividade catalítica foi avaliada em intervalos de tempo repetidos afim de determinar a atividade residual da enzima (Figura 16). A reticulação reteve cerca de 19% da atividade inicial no primeiro ciclo de reutilização, para XI-PVA.

A fibra XI-PVA não reticulada mostrou aumento ($p \leq 0,05$) na atividade enzimática no primeiro ciclo, enquanto as fibras reticuladas exibiram atividade enzimática baixa no primeiro ciclo ($p \leq 0,05$). No entanto, o oposto ocorreu no segundo ciclo. A atividade enzimática pronunciada no primeiro ciclo para fibra XI-PVA não reticulada pode ser atribuída a dessorção inicial e difusão rápida da enzima da superfície da fibra para o meio de dissolução. A enzima xilanase provavelmente interagiu com os grupos reativos do agente de reticulação, como descrito nos resultados de FTIR. Embora, a reticulação nas fibras XI-PVA com glutaraldeído não causou perda de enzima atividade, como mostrado na Figura 16.

No quarto ciclo, observou-se baixa atividade enzimática. A principal causa da perda de atividade catalítica pode estar relacionada a fraca interação entre a enzima imobilizada e o suporte, causado pelo quarto ciclo de uso repetido (Hehman et al., 2013). Além disso, após os ciclos de reutilização, é possível que a natureza hidrofílica das cadeias de PVA que não foram reticuladas causem uma perda gradual do tecido fibroso das fibras de PVA. Isso pode reduzir a área superficial total da fibra, além de diminuir a eficácia da função catalítica da enzima imobilizada (SATHISHKUMAR et al., 2014). Estudos futuros podem ser realizados afim de produzir o material fibroso com manutenção morfológica após o reuso.

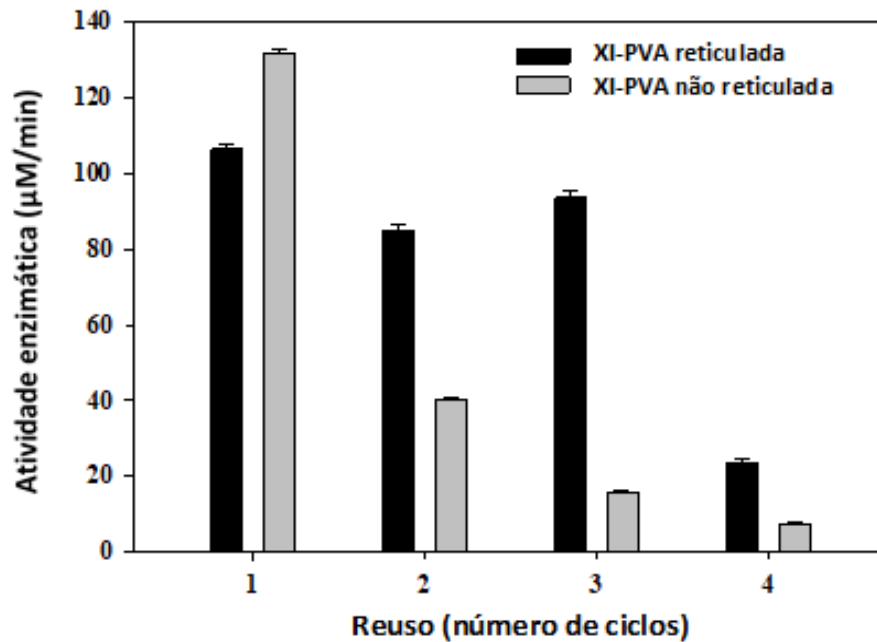


Figura 16 - Reuso das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído

6.9 Estabilidade no armazenamento da fibra XI-PVA reticulada

A estabilidade no armazenamento é um dos principais fatores que afeta a avaliação final e a seleção de qualquer enzima industrialmente importante. Para avaliação da estabilidade de armazenamento, fibras XI-PVA reticuladas foram armazenadas a 5 ou 22 °C em tampão de fosfato (pH 6), e a atividade enzimática foi determinada durante um período de 28 dias (Figura 17).

As ligações intermoleculares entre as fibras de PVA, formado pela reação de reticulação com glutaraldeído, aparentemente teve um efeito positivo durante o tempo de armazenamento no comportamento enzimático da xilanase imobilizada. A xilanase imobilizada reteve quase 20% da sua atividade após 28 dias de armazenamento a 5 °C, que indica maior resistência a difusão enfrentada pela enzima nas fibras reticuladas.

Os resultados desse estudo concordam com relatórios anteriores de Kumar et al. (2017) em que a xilanase foi imobilizada em alginato de cálcio e reticuladas com glutaraldeído. Os autores alegaram reter 80% da atividade inicial da xilanase à 4 °C após 30 dias. Além disso, Bhushan; Pal; Jain, (2015) relataram que a melhor estabilidade de armazenamento de xilanase imobilizada pode ser devido ao melhor contato físico, a maior rigidez estrutural ou a boa estabilização da enzima quando o suporte sofre reticulação com glutaraldeído.

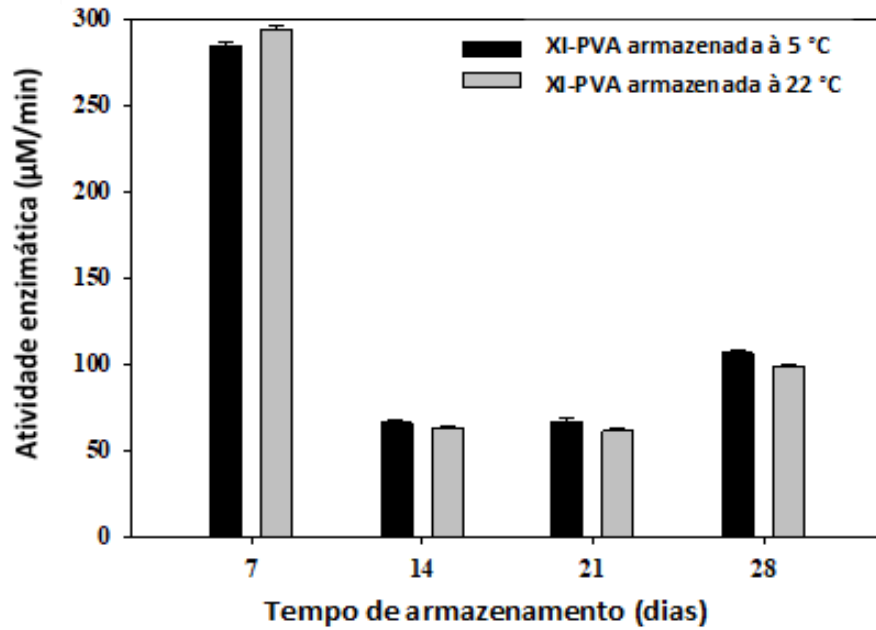


Figura 17 - Armazenamento das fibras XI-PVA reticuladas com glutaraldeído

6.10 Morfologia da fibra XI-PVA reticulada após ciclos de reuso

A morfologia após cada reuso das fibras XI-PVA reticuladas por 180 min com glutaraldeído na forma de vapor está apresentado na Figura 18. No primeiro ciclo é possível observar a perda da estrutura fibrosa. No terceiro ciclo, com reuso sucessivo, é possível observar membranas de PVA, onde o polímero está quase totalmente fundido e sem estrutura. No quarto ciclo não foi possível obter amostra para análise devido alta solubilização sofrida pelo material de suporte.

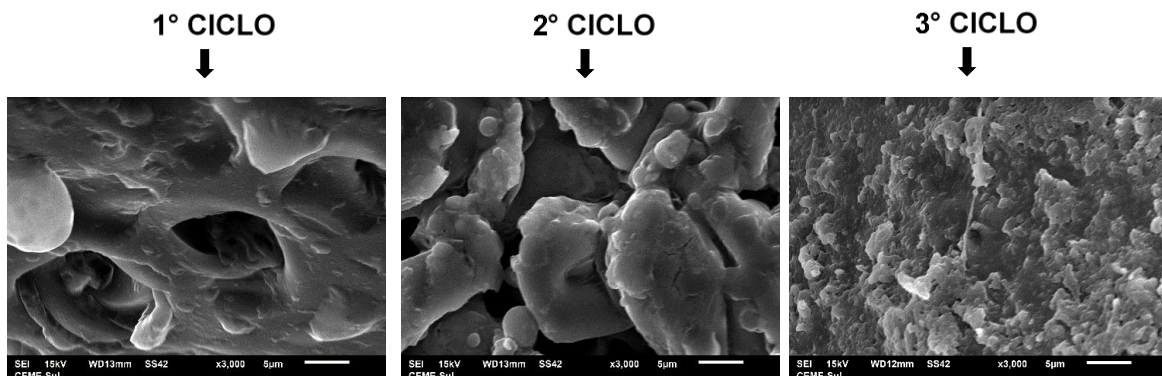


Figura 18 - MEV das fibras de XI-PVA reticuladas por 180 min após ciclos de reuso

6.11 Aplicação da fibra XI-PVA reticulada em solução padrão de β -glucana

A solução de β -glucana foi preparada para simular uma solução de névoa e avaliar o comportamento catalítico da xilanase imobilizada. A turbidez da solução de β -glucana foi determinada antes e depois a adição da xilanase na forma livre e da fibra XI-PVA reticulada por 180 min (Figura 19). Observou-se que a adição de xilanase reduziu a turbidez da solução. A redução da turbidez na solução de β -glucana não teve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a xilanase livre e a fibra XI-PVA. No entanto, as fibras XI-PVA que foram reticuladas por 180 min apresentam vantagens na reciclagem. A reutilização de enzimas reduz custos de produção e amplia a aplicação da xilanase nas indústrias.

A simulação descrita é precisa, confiável e simples e, a partir dela foi possível demonstrar que as fibras reticuladas contendo xilanase podem ser usadas para reduzir os níveis de β -glucana. Além disso, o método pode ser usado para determinar mudanças na turbidez em diferentes temperaturas e pH's e avaliar a estabilidade da xilanase.

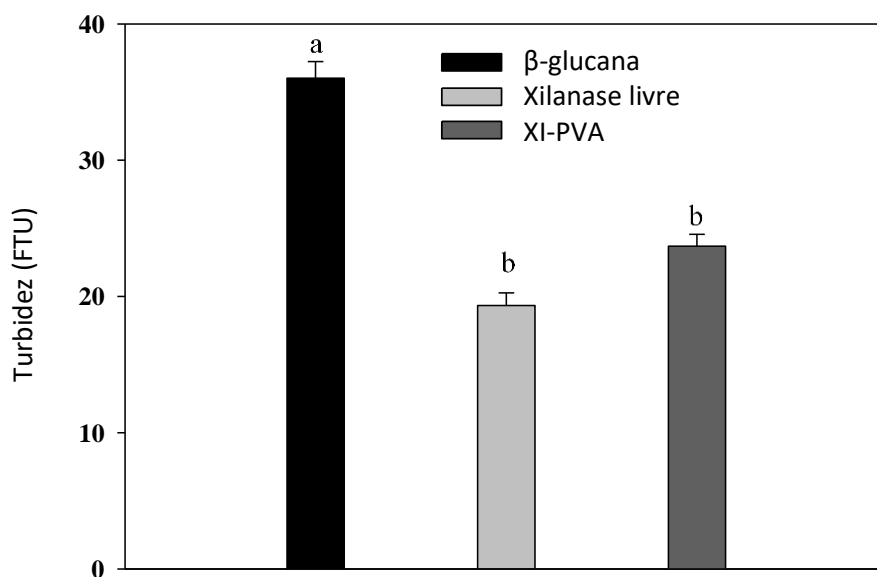


Figura 19 - Alterações na turvação da solução padrão de β -glucana com da adição de xilanase livre e fibra XY-PVA reticulada por 180 min

*Barras exibindo diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$).

7 Considerações finais

O presente estudo forneceu informações valiosas para as indústrias que utilizam xilanase em seu processo, com o propósito de melhorar a estabilidade enzimática em condições extremas de pH e temperatura, além de reduzir os custos de produção devido a reutilização de enzimas. É possível imobilizar enzimas em fibras de PVA pela técnica de *electrospinning*, melhorando a estabilidade operacional da xilanase, uma vez que o processo pode alterar propriedades da enzima, produzindo biocatalisadores com elevada atividade em diferentes temperaturas e pHs.

A melhoria da atividade da xilanase pode ser resultado de uma conformação da enzima mais eficiente obtida após a imobilização, como sugerido pelos resultados de FTIR. A atividade ótima da xilanase foi alterada de 60 para 70 °C quando a enzima foi imobilizada em fibras de PVA. As fibras exibiram diâmetro variando de 200 a 600 nm, dependendo da concentração de enzima imobilizada. Além disso, o uso do complexo de inclusão entre xilanase e β -ciclodextrina favoreceu a formação de fibras mais grossas. Todas as fibras exibiram uma superfície lisa e sem *beads*.

O vapor de glutaraldeído favoreceu a retenção da enzima na fibra, auxiliando na liberação mais uniforme e controlada da xilanase para o meio de reação. Houve melhorias nas propriedades térmicas, bem como na eficiência de reciclagem e de armazenamento nas fibras reticuladas, em comparação com fibras não reticuladas. As fibras reticuladas foram capazes de apresentar atividade enzimática satisfatória em até 3 ciclos de reutilização. A enzima livre e a imobilizada em fibras de PVA reticuladas por 180 min foram capazes de reduzir a turbidez da solução de β -glucana de forma semelhante. No entanto, apenas as fibras reticuladas possuem a vantagem da reciclagem. Apesar do sucesso com o vapor de glutaraldeído, existem melhorias e modificações a fazer, sobretudo na perspectiva de tornar a fibra menos solúvel, com liberação controlada e reutilizável.

Referências

ABARCA, R. L.; RODRÍGUEZ, F. J.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J.; BRUNA, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975, 2016.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Cellulase-free-thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8: Over-production through statistical approach, purification and bio-deinking/bio-bleaching potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 220–227, 2017.

ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571–578, 2019.

AGGARWAL, S.; CHAKRAVARTY, A.; IKRAM, S. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, S0141-8130, 2020.

AHN, H.K.; KIM, B.C.; JUN, S.H.; CHANG, M.S.; LOPEZ-FERRER, D.; SMITH, R.D.; GU, M.B.; LEE, S.W.; KIM, B.S.; KIM, J. Robust trypsin coating on electrospun polymer nanofibers in rigorous conditions and its uses for protein digestion, **Biotechnology Bioengineering**, v.107, 917–923, 2010.

AJIJOLAKEWU, K. A.; PENG, C.; KEONG, C.; ABDULLAH, W.; NADIAH, W. Characterization of novel *Trichoderma* hemicellulase and its use to enhance downstream processing of lignocellulosic biomass to simple fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 166–175, 2017.

AKDEMIR, Z. S.; DEMIR, S.; KAHRAMAN, M. V.; APOHAN, N. K. Preparation and characterization of UV–curable polymeric support for covalent immobilization of Xylanase enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 104-108, 2011.

ALINOVI M.; CORDIOLI M.; FRANCOLINO, S.; LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; MONTI, L.; TIDONA, F.; MUCCHETTI, G.; GIRAFFA, G. Effect of fermentation-produced camel chymosin on quality of Crescenza cheese. **International Dairy Journal**, v. 84, p. 72-78, 2018.

ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; PAES, G. B. T.; RIBEIRO, J. I.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; PEREIRA, O. L.; DE REZENDE, S. T. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1332–1346, 2014.

ALOKIKA; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8763–8784, 2019.

ALONSO-GONZÁLEZ, M.; CORRAL-GONZÁLEZ, A.; FELIX, M.; ROMERO, A.; MARTIN-ALFONSO, J.E. Developing active poly(vinyl alcohol)-based membranes with encapsulated antimicrobial enzymes via *electrospinning* for food packaging, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.162, p. 913-921, 2020.

AMALY, N.; SI, Y.; CHEN, Y.; EL-MOGHAZY, A.Y.; ZHAO, C.; ZHANG, R.; ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512-523, 2012.

ASTOLFI, V.; ASTOLFI, A. L.; MAZUTTI, M. A.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; CAMARGO, A. F.; DALASTRA, C.; KUBENECK, S.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 677–685, 2019.

ATY, A.E.; A. A.; SALEH, S. A. A.; EID, B. M.; IBRAHIM, N. A.; MOSTAFA, F. A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129–137, 2018.

AYTAC, Z.; IPEK, S.; DURGUN, E.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. **Food Chemistry**, v. 233, p. 117-124, 2017.

AZERI, C.; TAMER, U.; OSKAY, M. Thermoactive cellulase-free Xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agro-residues and their potential in biobleaching of kraft pulp. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 63-72, 2010.

BABITHA, S.; RACHITA, L.; KARTHIKEYAN, K.; SHOBA, E.; JANANI, I.; POORNIMA, B.; SAI, K. P. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 52-90, 2017.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of Xylanase activity. **Journal Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BALCÃO, V.M; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art, **Enzyme Microbiol Technology**, v.18, 392, 1996.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p.1583-1600, 2014.

BARTH-HAAS GROUP. Barth-Report 2017/2018, **United Nations and World Bank Statistics Beer Production**. Market Leaders and Their Challengers in the Top 40 Countries in 2018. Joh. Barth & Sohn GmbH & Co., Nurnberg. p. 18, 2018.

BATTAN, B.; DHIMAN, S. S.; AHLAWAT, S.; MAHAJAN, R.; SHARMA, J. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 222–229, 2012.

BERNAL, C.; SIERRA, L.; MESA, M. Design of β -galactosidase/silica biocatalysts: Impact of the enzyme properties and immobilization pathways on their catalytic performance. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, p. 85-94, 2014.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325-347, 2010.

BHUSHAN, B.; PAL, A.; JAIN, V. Improved Enzyme Catalytic Characteristics upon Glutaraldehyde Cross-Linking of Alginate Entrapped Xylanase Isolated from *Aspergillus flavus* MTCC 9390, **Journal Enzyme Research**, p.1–9, 2015.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. *Electrospinning and electrospraying techniques: potential food-based applications*. **Trends Food Science Technology**, v. 38, p. 21–33, 2014.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1260–1274, 2016. **Bioresource Technology**, 117 (2012), pp. 360-367

BOONCHUAY, P.; TECHAPUN, C.; LEKSAWASDI, N.; SEESURIYACHAN, P. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 399–407, 2018.

BORUAH, P.; DOWARAH, P.; HAZARIKA, R.; YADAV, A.; BARKAKATI, P.; GOSWAMI, T. Xylanase from *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum* - a potential source for bamboo pulp bleaching. *Journal of Cleaner Production*, v. 116, p. 259–267, 2016.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experiments: Design, Innovation, and Discovery**. second ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005.

BRAHAM, S.A.; HUSSAIN, F.; STERLING, M.R.; KAMAL, S.; KORNECKI, J.F.; BARBOSA, O.; KATI, D.E.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: enzyme stabilization and improved proteolytic activity, *Biotechnology Progress*, p. 1-8, 2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA**. Instrução Normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001. Estabelece a identidade e qualidade dos produtos de cervejaria destinados ao consumo humano. *Diário Oficial da União*, Brasília, 6 nov. 2001.

CANBOLAT, M. F.; SAVAS, H. B.; GULTEKIN, F. Enzymatic behavior of laccase following interaction with α -CD and immobilization into PCL nanofibers. *Analytical Biochemistry*, v. 528, p. 13-18, 2017.

CHANDRASEKARAN, M.; BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; KRISHNA, J. G.; BEENA, P. S. Enzymes in food and beverage production: an overview. In: Chandrasekaran, M. (Ed.), **Enzymes in Food and Beverage Processing**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 118-137, 2015.

CHANDRASEKARAN, M.; BEENA, P. S. Enzymes in confectioneries. In: Chandrasekaran, M. (Ed.), **Enzymes in Food and Beverage Processing**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 205–225, 2015.

CHRONAKIS, I. S. Micro- and nano-fibers by electrospinning technology: processing, properties, and applications. Capítulo 22, p. 513-548, 2015.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 3–23, 2005.

CORNISH-BOWDEN, A. 2014. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 74–87, 2014.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 326-346, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p 623-630, 2004.

DENG, Y.; BI, H.; YIN, H.; YU, J.; DONG, J.; YANG, M.; MA, Y. Influence of ultrasound assisted thermal processing on the physicochemical and sensorial properties of beer **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 166-173, 2018.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

DORNEZ, E.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Grain-associated Xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 495-510, 2009.

DRISS, D.; HADDAR, A.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S.E. Production of xylooligosaccharides by immobilized His-tagged recombinant xylanase from *Penicillium occitanis* on nickel-chelate Eupergit C, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.173, p. 1405–1418, 2014.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Immobilization of Xylanase in chitosan–xanthan hydrogels. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 539-545, 1997.

EL-SHISHTAWY, R.M.; ALDHAHRI, M.; ALMULAIKY, Y.Q. Dual immobilization of α -amylase and horseradish peroxidase via *electrospinning*: A proof of concept study, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.163, p.1353-1360, 2020.

ENGASSER, J.-M.; HORVATH, C. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. **Journal of Theoretical Biology**, v. 42, p. 137-155, 1973.

ESCOBAR, S.; ILLANES, A.; WILSON, L.; BERNAL, C.; MESA, M. In situ immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* in silica by sol-gel process: Application in prebiotic synthesis. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, p. 396-404, 2016.

FAZELA, R.; TORABIA, S.-F.; NASERI-NOSARA, P.; GHASEMPURA, S.; RANAIE-SIADATB, S.-O.; KHAJEH, K. Electrospun polyvinyl alcohol/bovine serum albumin biocomposite membranes for horseradish peroxidase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93, p. 1-10, 2016.

FERNANDES, D. M.; ANDRADE, J. L.; LIMA, M. K.; SILVA, M. F.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M.; WINKLER-HECHENLEITNER, A. A.; GÓMEZ-PINEDA, E. A. Thermal and photochemical effects on the structure, morphology, thermal and optical properties of PVA/Ni_{0.04}Zn_{0.96}O and PVA/Fe_{0.03}Zn_{0.97}O nanocomposite films, **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, p. 1862-1868, 2013.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ M.; SANROMÁN M. A.; MOLDES D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 08-25, 2013.

GALAN, G.C.; MURCIA, A.B.; LAFUENTE, F.R.; RODRIGUES, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, 2885–2904, 2011.

GHAYOUR-NAJAFABADI, P.; KHOSRAVINIA, H.; GHEISARI, A.; AZARFAR, A.; KHANAHMADI, M. Productive performance, nutrient digestibility and intestinal morphometry in broiler chickens fed corn or wheat-based diets supplemented with bacterial- or fungal-originated xylanase. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, p. 165–174, 2018.

GHOSHAL, G.; SHIVHARE, U. S.; BANERJEE, U. C. Thermo–mechanical and micro–structural properties of Xllanase containing whole wheat bread. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, p. 219-229, 2016.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkalithermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 823–829, 2016.

GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 318-328, 2010.

HAAPALA, P.; LINKO, S.; PARKINEN, E.; SUOMINEN, P. Production of endo-1,4-glucanase and Xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. **Biotechnology Technology**, v. 8, p. 401-406, 1994.

HIRSH, S.L.; BILEK, M.M.M.; NOSWORTHY, N.J.; KONDYURIN, A.; REMEDIOS, C.G.; MCKENZIE, D.R. Comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture, **Langmuir**, v.26, p.14380–14388, 2010.

HOMAEI, A.A.; SAIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update, **Journal Chemistry Biology**, v.6, p. 185–205, 2013.

HUA, X.; YANG, R. Enzymes in starch processing. In: Chandrasekaran, M. (Ed.), **Enzymes in Food and Beverage Processing**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 139–169, 2015.

IVANOVA, V. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus macerans* ATCC 8244 on magnetic carriers and production of cyclodextrins. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 516-528, 2010.

JALAJA, K.; JAMES, N.R.; Electrospun gelatin nanofibers: a facile cross-linking approach using oxidized sucrose, **International Journal Biological Macromolecules**, v.73, p.270–278, 2015.

JAMPALA, P.; PREETHI, M.; RAMANUJAM, S.; HARISH, B. S.; UPPULURI, K. B.; ANBAZHAGAN, V. Immobilization of levan–Xylanase nanohybrid on an alginate bead improves Xylanase stability at wide pH and temperature. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 95, p. 843-849, 2017.

JAYAKUMARB, N.S.; GANESANE, P. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.107, p.124–131, 2014.

KHAJAVI, R.; ABBASIPOURB, M. Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 2029–2034, 2012.

KIM, B.C.; LOPEZ-FERRER, D.; LEE, S.M.; AHN, H.K.; NAIR, S.; KIM, S.H.; KIM, B.S.; PETRITIS, K.; CAMP, D.G.; GRATE, J.W.; SMITH, R.D.; KOO, Y.M.; GU, M.B.; KIM, J.

Highly stable trypsin-aggregate coatings on polymer nanofibers for repeated protein digestion, **Proteomics**, v.9, 1893–1900, 2009.

KUMAR, S.; HAQ, I.; PRAKASH, J.; RAJ, A. Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped Xylanase from *Bacillus licheniformis*. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 98, p. 24-33, 2017.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, p. 226–235, 2018.

LANDARANI-ISFAHANI, A.; TAHERI-KAFRANI, A.; AMINI, M.; MIRKHANI, V.; MOGHADAM, M.; SOOZANIPOUR, A.; RAZMJOU, A. Xylanase immobilized on novel multifunctional hyperbranched polyglycerol-grafted magnetic nanoparticles: an efficient and robust biocatalyst, **Langmuir**, v.31, p. 9219–9227, 2015.

LEE, S.M.; NAIR, S.; AHN, H-K.; KIM, B.S.; JUN, S-H.; AN, H.J.; HSIAO, E.; KIM, S.H.; KOO, Y.-M.; KIM, J. Property control of enzyme coatings on polymer nanofibers by varying the conjugation site concentration, **Enzyme Microbiology Technology**, v.47, 216–221, 2010.

LEITCH, M. E.; LI, C.; IKKALA, O.; MAUTER, M. S.; LOWRY, G. V. Bacterial nanocellulose aerogel membranes: novel high-porosity materials for membrane distillation. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 3, p. 85-91, 2016.

LI, J.; HOU, G. G.; CHEN, Z.; GEHRING, K. Effects of endoxylanases, vital wheat gluten, and gum Arabic on the rheological properties, water mobility, and baking quality of whole-wheat saltine cracker dough. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 437–445, 2013.

LI, X.; SHAN, Z.; SONG, X.; OUYANG, J.; XU, Y.; YONG, Q.; YU, S. Immobilization of xylanase on poly (ethylene glycol) methyl ether 5000 and its self-extractive bioconversion for the production of xylo-oligosaccharides, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p. 2022–2029, 2014.

LIU, W.; BRENNAN, M. A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C. S. Effect of cellulase, xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v. 234, p. 93–102, 2017.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: Brahmachari, G., Demain, A.L., Adrio, J.L. (Eds.), **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Academic Press -Elsevier, London, UK, p. 267-298, 2017.

MAGRO, L.D.; KORNECKI, J.F.; KLEIN, M.P.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, 109397, 2020.

MANRICH, A.; KOMESU, A.; ADRIANO, W.S.; TARDIOLI, P.W.; GIORDANO, R.L.C. Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports, **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.161, p.455–467, 2010.

MARASABESSY, A.; MOEIS, M. R.; SANDERS, J. P. M.; WEUSTHUIS, R. A. Enhancing Jatropha oil extraction yield from the kernels assisted by a xylan-degrading bacterium to preserve protein structure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 2027–2036, 2011.

MEHNATI-NAJAFABADI, V.; TAHERI-KAFRANI, A.; BORDBAR, A. Xylanase immobilization on modified superparamagnetic graphene oxide nanocomposite: effect of PEGylation on activity and stability. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 107, p. 418-425, 2018.

MIGUEL, A. S. M.; MARTINS-MEYER, T. S.; FIGUEIREDO, E. V. C.; LOBO, B. W. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M. Enzymes in bakery: current and future trends. In: Muzzalupo, I. (Ed.), **Food Industry**. Intech, Rijeka, Croatia, p. 287-321, 2013.

MISHRA, S. S.; RAY, R. C.; ROSELL, C. M.; PANDA, D. Microbial enzymes in food applications: history of progress. In: Ray, R. C.; Rosell, C. M. (Eds.), **Microbial Enzyme Technology in Food Applications**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 3-17, 2017.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 205-220, 2015.

MOREIRA, A.; LAWSON, D.; ONYEKURU, L.; DZIEMIDOWICZ, K.; ANGKAWINITWONG, U.; COSTA, P.F.; RADACSI, N.; R.WILLIAMS, G.R. Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying. **Journal of Controlled Release**, S0168-3659, 2020. MORENO-CORTEZ, I. E.; ROMERO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; GARCÍA-GUTIERREZ, D. I.; GARZA-NAVARRO, M. A.; CRUZ-SILVA, R. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 306-314, 2015.

MUBARAK, N.M; WONGA, J.R.; TANA, K.W; SAHUC, J.N.; ABDULLAHD, E.C.; NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; GUPTA, V.K. Immobilization of Xllanase on glutaraldehyde activated aluminumoxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1402-1410, 2012.

NARAYANAN, G.; BOY, R.; GUPTA, B.S.; TONELLI, A.E. Analytical techniques for characterizing cyclodextrins and their inclusion complexes with large and small molecular weight guest molecules, **Polymer Testing**, v.62, p. 402-439, 2017.

NEO, Y. P.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D.; QUECK, S. Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein–gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1013-1021, 2013.

OORT, M. V. Enzymes in food technology – introduction. Chapter 1. In: Whitehurst, R.J., Van Oort, M. (Eds.), **Enzymes in Food Technology**, second ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, p. 1–17, 2010.

PASSARINHO, A. T. P.; VENTORIM, R. Z.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE OLIVEIRA, E. B.; GUIMARÃES, V. M. Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 741–747, 2019.

PETROVIC, G. M.; STOJANOVIC, G. S.; RADULOVIC, N. S. Encapsulation of cinnamonoil in β -cyclodextrin. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 4, p. 1382-1390, 2010.

PIACENTINI, E.; YAN, M.; GIORNO, L. Development of enzyme-loaded PVA microspheres by Membrane Emulsification, **Journal of Membrane Science**, v. 524, p. 79-86, 2017.

PINTO, S. C.; RODRIGUES, A. R.; SARAIVA, J. A.; SILVA, J. A. L. Catalytic activity of trypsin entrapped in electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofiber. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 8-18, 2015.

PORTO, M. D. A.; SANTOS, J.P.; HACKBART, H.; BRUNI, G.P.; FONSECA, L.M.; ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Immobilization of α -amylase in ultrafine polyvinyl alcohol (PVA) fibers via electrospinning and their stability on different substrates, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.126, p.834-841, 2019.

RAJ, A.; KUMAR, S.; SINGH, S.K.; KUMAR, M. Characterization of a new *Providencia* sp. strain x1 producing multiple xylanases on wheat bran. **Scientific World Journal**, p. 1-10, 2013.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. An Introduction RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M.R. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V), **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 100-119, 2014.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S.B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A.K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Application of microbial enzymes in food industry. **Food Technology Biotechnology**, v. 56, p. 16-30, 2018.

REHMAN, H.U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; UL QADAR, S.A.; MOLINARO, A. ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, v.139, p. 1081-1086, 2013.

ROBERGE, M.; LEWIS, R. N.; SHARECK, F.; MOROSOLI, R.; KLUEPFEL, D.; DUPONT, C; MCELHANEY, R.N. Differential scanning calorimetric, circular dichroism, and Fourier transform infrared spectroscopic characterization of the thermal unfolding of Xylanase a from *Streptomyces lividans*. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, p. 341-354, 2003.

ROBINSON, L. H.; EVANS, D. E.; KAUKOVIRTA-NORJA, A.; VILPOLA, A.; ALDRED, P.; HOME, S. The interaction between malt protein quality and brewing conditions and their impact on beer colloidal stability. **MBAA Technology Qu**, v. 41, p. 353–362, 2004.

ROMO-SÁNCHEZ, S.; CAMACHO, C.; RAMIREZ, H.L.; ARÉVALO-VILLENA, M. Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two polymeric supports, **Advance Bioscience Biotechnology**, v.5, 517–526, 2014.

ROSELL, C. M.; DURA, A. Enzymes in baking industries. In: Chandrasekaran, M. (Ed.), **Enzymes in Food and Beverage Processing**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 171–195, 2015.

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENT, R. Chemical Modification in the

Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **Chemical Society Reviews**, v. 16, p. 1436-1455, 2016.

SAALLAH, S.; NAIM, M. N.; LENGGORO, I. W.; MOKHTAR, M. N.; BAKAR, N. F. A.; GEN, M. Immobilisation of cyclodextrin glucoamylase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 44-48, 2016.

SANTHI, D.; KALAIKANNAN, A.; MALAIRAJ, P.; PRABHU, A. Application of microbial transglutaminase in meat foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 2071–2076, 2017.

SATHISHKUMAR, P.; KAMALA-KANNAN, S.; CHO, M.; KIM, J. S.; HADIBARATA, T.; SALIM, M. R.; OH, B.-T. Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 111-120, 2014.

SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2016.

SHAIKH, R. P.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y. E.; TOIT, L. C. D.; PILLAY, V. Crosslinked electrospun PVA nanofibrous membranes: elucidation of their physicochemical, physicomechanical and molecular disposition. **Biofabrication**, v. 4, 21 pp., 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219–228, 2003.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 223–235, 2013.

SIAR, E.-H.; ARANA-PEÑA, S.; BARBOSA, O.; ZIDOUNE, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses, **Catalysts**, v.8, p. 149, 2018.

SILVA, P. O.; DE ALENCAR GUIMARÃES, N. C.; SERPA, J. D. M.; MASUI, D. C.; MARCHETTI, C. R.; VERBISCK, N. V.; ZANOELO, F. F.; RULLER, R.; GIANNESI, G. C. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification

and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101312, 2019.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179-211, 2016.

SOOZANIPOUR, A.; TAHERI-KAFRANI, A.; ISFAHANI, A.L. Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, **Chemistry Engineering Journal**, v. 270, p. 235–243, 2015.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotechnology Applied Agroindustria**, São Paulo: Blucher, p. 529-568, 2017.

SPIER, M. R.; NOGUEIRA, A.; ALBERTI, A.; GOMES, T. A.; DHILLON, G. S. Potential Applications of Enzymes in Brewery and Winery, **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**, Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass, p. 261-278, 2016.

SRIVASTAVA, G.; ROY, S.; KAYASTHA, A. M. Immobilisation of Fenugreek b-amylase on chitosan/PVP blend and chitosan coated PVC beads: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 172, p. 844-851, 2015.

STEINER, E.; GASTL, M.; BECKER, T. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. **Journal European Food Research and Technology**, v. 232, p. 191-204, 2011.

SUN, G. Reusable anionic sulfonate functionalized nanofibrous membranes for cellulase enzyme adsorption and separation, **Colloids and Surface: B**, v.170, p. 588–595, 2018.

TANG, C.; SAQUING, C.D.; SARIN, P.K.; KELLY, R.M.; KHAN, S.A. Nanofibrous membranes for single-step immobilization of hyperthermophilic enzymes, **Journal technique, Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325 - 347, 2010.
to Electrospinning and Nanofibers (5. ed.). Cingapura: **World Scientific**, 2005.

TOMASIK, P.; HORTON, D. Enzymatic conversions of starch, **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 68, p. 59-436, 2018.

TSAI, C.; MEYER, A.S. Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate, **Molecules**, v.19, p.19390–19406, 2014.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of Xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 8, p. 1041-1054, 2016.

URRUTIA, P.; BERNAL, C.; ESCOBAR, S.; SANTA, C.; MESA, M.; WILSON, L. Influence of chitosan derivatization on its physicochemical characteristics and its use as enzyme support. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, p. 1-10, 2014.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; THONART, P.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y. Effect of the bacterial or fungal origin of exogenous xylanases supplemented to a wheat-based diet on performance of broiler chickens and nutrient digestibility of the diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 90, p. 221–228, 2010.

VAZ, R.P.; MOREIRA, L.R.S.; FILHO, E.X.F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.133, 127–135, 2016.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases, **Membrane Science**, v.472, p. 251–260, 2012.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680-1685, 2011.

WEN, P.; ZHU, D.; WU, H; ZONG, M; JING, Y.; HAN, S. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366-376, 2016.

WINE, Y.; COHEN-HADAR, N.; FREEMAN, A.; FROLOW, F. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis, **Biotechnology Bioengineer.**, v.98, p. 711-718, 2007.

WU, L.; YUAN, X.; SHENG, J.; Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, **Membrane Science**, v. 250, p.167–173, 2005.

XIAO, C.-F.; LI, K.; HUANG, R.; HE, G.-J.; ZHANG, J.Q.; ZHU, L.; YANG, Q.-Y.; JIANG, K.M.; JIN, Y.; LIN, J. Investigation of inclusion complex of Epthilone A with cyclodextrins, **Carbohydrate Polymers**, v.102, p. 297-305, 2014.

YANG, M.; ZHANG, J.; KUITTINEN, S.; VEPSÄLÄINEN, J.; SOININEN, P.; KEINÄNEN, M.; PAPPINEN, A. Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone–butanol–ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 131–137, 2015b.

YEGIN, S.; ALTINEL, B.; TULUK, K. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 389–397, 2018.

ZHANG, Y.; SHUDONG, HE.; SIMPSON, B. K. Enzymes in food bioprocessing - novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 30-35, 2018.

ZHAO, H.; SUN-WATERHOUSE, D. Interactions Between Proteins and Polyphenols in Beer. **Reference Module in Food Science**, 100596-5.21487-x, 2018.

ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable Energy**. v. 103, p. 383-387, 2017.

ZHAO, L.; MENG, K.; SHI, P.; BAI, Y.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1879–1885, 2013.

APÊNDICE 1

Tabela 1 – Valores da atividade enzimática da xilanase livre e imobilizada em função da temperatura

Temperatura (°C)	Métodos de imobilização	Atividade enzimática	
		Valores absolutos ($\mu\text{M min}^{-1}$)	Valores relativos (%)

40	XI-PVA	312,45	71,42
	XI- β -CD-PVA	178,76	49,07
50	XI-PVA	329,83	75,39
	XI- β -CD-PVA	227,22	62,37
60	XI-PVA	400,02	91,44
	XI- β -CD-PVA	303,43	83,29
70	XI-PVA	437,46	100
	XI- β -CD-PVA	364,26	100
80	XI-PVA	351,28	80,29
	XI- β -CD-PVA	297,07	81,56

Tabela 2 – Valores da atividade enzimática da xilanase livre e imobilizada em função do pH

pH	Métodos de imobilização	Atividade enzimática	
		Valores absolutos ($\mu\text{M min}^{-1}$)	Valores relativos (%)
4	XI-PVA	318,80	89,15
	XI- β -CD-PVA	233,90	80,54
5	XI-PVA	345,87	96,72
	XI- β -CD-PVA	257,30	88,60
6	XI-PVA	357,57	100
	XI- β -CD-PVA	290,39	100
7	XI-PVA	326,16	91,21
	XI- β -CD-PVA	253,29	87,22
8	XI-PVA	313,79	87,75
	XI- β -CD-PVA	242,26	83,42

APÊNDICE 2

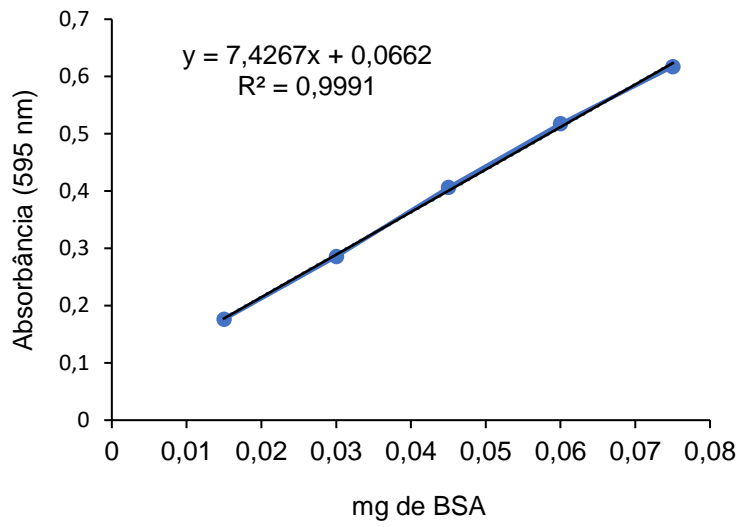


Figura 1 – Curva padrão BSA

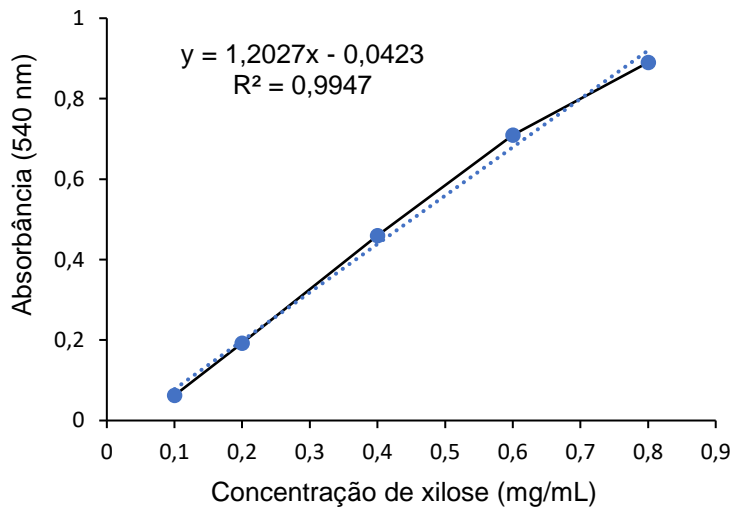


Figura 2 – Curva padrão da xilose

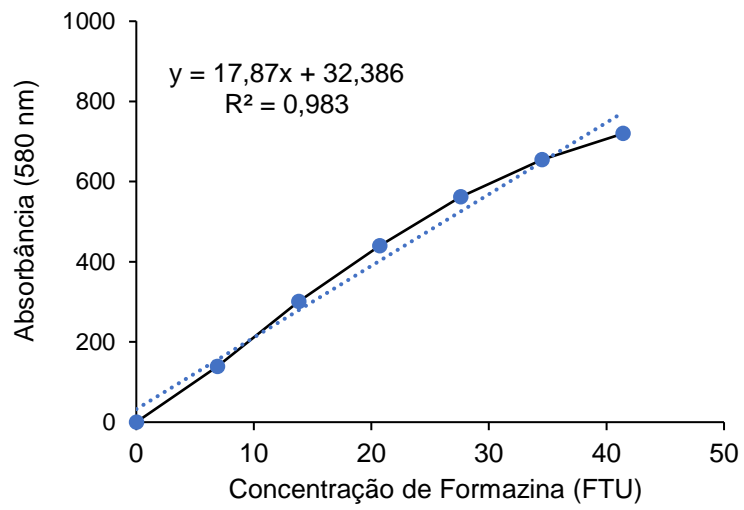


Figura 3 – Curva padrão de Formazina