

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE XILANASE EM MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Beatriz Gomes de Paula Vendicto¹, Érica Daniely Santos², Thais Suzane Milessi^{1, 2}.

¹ Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Engenharia Química, Rod. Washington Luís, s/n, Monjolinho - 13565-905 - São Carlos-SP, Brasil, beatrizvendicto@estudante.ufscar.br.

² Universidade Federal de São Carlos/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rod. Washington Luís, s/n, Monjolinho - 13565-905 - São Carlos-SP, Brasil, edsantos@estudante.ufscar.br, thais.milessi@ufscar.br.

Resumo

A imobilização enzimática é uma técnica essencial para a indústria, pois aumenta a estabilidade e possibilita a reutilização das enzimas, reduzindo custos industriais. As micropartículas magnéticas destacam-se como alternativa promissora, embora seu uso ainda seja pouco explorado. Com isso, o presente estudo teve como objetivo a imobilização da enzima xilanase em micropartículas magnéticas, utilizando glutaraldeído em duas concentrações distintas (5% e 0,8%) como agente reticulador. Os resultados indicaram que ambas as concentrações de glutaraldeído permitiram um rendimento de imobilização de 100%. No entanto, a concentração de 5% se mostrou superior, resultando em uma atividade recuperada de 44,9%, enquanto a concentração de 0,8% recuperou apenas 24,4% da atividade inicial. A enzima imobilizada demonstrou leve resistência térmica em comparação à sua forma livre, retraindo 36,15% de sua atividade após 45 minutos de incubação a 70 °C. Entretanto, o tempo de meia-vida se apresentou ligeiramente inferior que o encontrado para a enzima livre. Apesar disto, estes resultados corroboram o sucesso da imobilização na melhoria das propriedades catalíticas da enzima.

Palavras-chave: Xilanase. Micropartículas magnéticas. Imobilização. Estabilidade térmica.

Área do Conhecimento: Engenharias. Engenharia Química

Introdução

As xilanases (endo- β -1,4-xilanases; EC 3.2.1.8) constituem uma família de enzimas de grande relevância biotecnológica, responsáveis pela hidrólise da xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (Ramos *et al.*, 2024). Sua versatilidade as posiciona como biocatalisadores essenciais em diversas indústrias, incluindo a de papel e celulose, têxtil e de alimentos, com destaque para a produção de xilooligosacarídeos (XOS). Os XOS são compostos funcionais reconhecidos por suas propriedades prebióticas, antioxidantes e anti-proliferativas, o que os torna ingredientes promissores para a formulação de alimentos funcionais e suplementos (Wahba *et al.*, 2024).

Apesar de suas vastas aplicações, o uso de enzimas na forma solúvel apresenta diversas limitações que comprometem a viabilidade econômica dos processos industriais. As xilanases livres, por exemplo, são frequentemente suscetíveis à desnaturação por fatores como variações de temperatura e pH, além de serem difíceis de recuperar e reutilizar após o ciclo de reação. Essa instabilidade e o alto custo associado ao descarte da enzima após um único uso representam barreiras significativas para a otimização de bioprocessos (Tadesse; Liu, 2025). A imobilização de enzimas em suportes sólidos, como a xilanase, é uma técnica industrial promissora. Ela melhora a estabilidade e a eficiência da enzima, permitindo sua reutilização e reduzindo custos. Além disso, facilita a purificação do produto final. Para que essa tecnologia seja viável em larga escala, a escolha da matriz de imobilização é fundamental. (Aslam *et al.*, 2025).

Entre as diversas estratégias disponíveis, a imobilização em micropartículas magnéticas tem ganhado proeminência devido a suas vantagens operacionais, como a fácil separação do biocatalisador do meio reacional por aplicação de um campo magnético externo, alta área superficial e a possibilidade de funcionalização com diversos polímeros (Gama Cavalcante *et al.*, 2024). A ativação dessas partículas com agentes de reticulação, como o glutaraldeído, tem se mostrado particularmente eficaz (Artico *et al.*, 2025). O glutaraldeído é um agente bifuncional que forma ligações covalentes com grupos

amina ($\epsilon\text{-NH}_2$ de resíduos de lisina) presentes na superfície da enzima e/ou do suporte, criando uma rede de pontes cruzadas que confere maior rigidez e estabilidade à estrutura da proteína. A concentração de glutaraldeído, assim como o pH e o tempo de imobilização, influenciam diretamente a densidade de ligações cruzadas e a orientação espacial da enzima, impactando sua atividade e estabilidade final (Tadesse; Liu, 2025).

Apesar dos avanços na imobilização enzimática, ainda existem lacunas a serem exploradas, especialmente no que tange à otimização dos parâmetros de reticulação para enzimas específicas. A relação entre a porcentagem de glutaraldeído e a estabilidade térmica e operacional da xilanase imobilizada em nanopartículas magnéticas ainda requer investigações aprofundadas para a obtenção de biocatalisadores com desempenho superior. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de imobilização de xilanase em partículas magnéticas ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído, assim como a estabilidade térmica do biocatalisador obtido.

Metodologia

Materiais: As micropartículas magnéticas (Captura N) utilizadas para a imobilização foram gentilmente fornecidas pela empresa Kopp Technologies (São Carlos, Brasil). Foram utilizadas a xilanase NS22036 (Novozymes, Dinamarca), xilana de faia (Carl Roth, Alemanha) e borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich SA, EUA). Demais reagentes PA de marcas variadas.

Ativação dos suportes magnéticos: Os suportes magnéticos foram ativados com glutaraldeído de acordo com Milessi *et al.* (2015). O suporte foi suspenso em tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) e submetido à agitação por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se glutaraldeído nas concentrações de 0,8% ou 5% (v/v), mantendo a mistura sob agitação contínua por 1 h. Ao término da ativação, o suporte foi lavado com água deionizada e imediatamente utilizado na imobilização da xilanase.

Imobilização: Os ensaios de imobilização da xilanase foram conduzidos utilizando baixa carga proteica (5 mg.g⁻¹suporte⁻¹). Para tal, o suporte foi suspenso em solução enzimática na proporção de 1:10 (V_{suporte}/V_{solução}). O processo de imobilização ocorreu em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, a 25 °C, sob agitação contínua, com coletas periódicas de amostras para monitorar a atividade enzimática do sobrenadante. Após a etapa de imobilização e formação das bases de Schiff, os grupos aldeído (-COH) foram reduzidos com borohidreto de sódio (1 mg.mL⁻¹) por 1 h em banho de gelo, seguida de lavagens exaustivas dos derivados com tampão citrato 50 mM, pH 5,0, para posterior armazenamento até o uso.

Os parâmetros de imobilização, incluindo rendimento de imobilização (RI em %) e atividade recuperada (AR em %), foram determinados de acordo com Adriano *et al.* (2008), utilizando as Equações 1 e 2. Um ensaio controle sem suporte foi conduzido paralelamente, a fim de contabilizar possíveis perdas de atividade enzimática decorrentes das condições do processo de imobilização.

$$RI = \left(1 - \frac{A_{t \text{ sobrenadante}}}{A_{t \text{ controle}}}\right) 100 \quad (1)$$

$$AR = \frac{A_{t \text{ aparente}}}{A_{t \text{ teórica}}} * 100 \quad (2)$$

Onde $A_{t \text{ sobrenadante}}$ (UI.mL⁻¹) são as unidades de enzima que não foram retidas no suporte, $A_{t \text{ controle}}$ (UI.mL⁻¹) são as unidades de enzima do controle ao final da imobilização, $A_{t \text{ aparente}}$ (UI.g⁻¹suporte⁻¹) a atividade aparente da enzima imobilizada e $A_{t \text{ teórica}}$ (UI.g⁻¹suporte⁻¹) é a atividade teoricamente imobilizada.

Estabilidade térmica: A estabilidade térmica da xilanase imobilizada foi avaliada a 70 °C em tampão citrato 50 mM, pH 5,5. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo predefinidos para a quantificação da atividade enzimática residual, a fim de se estimar o tempo de meia-vida e a constante de desativação térmica da enzima.

Atividade enzimática: A atividade xilanólítica foi mensurada conforme o método descrito por Milessi *et al.* (2015), a partir da velocidade inicial de hidrólise da xilana a 50 °C catalisada por uma quantidade previamente conhecida de enzima. Como substrato padrão, utilizou-se xilana de faia preparada em tampão citrato 50 mM, pH 5,5. Amostras de enzimas, tanto na forma livre quanto imobilizada, foram adicionadas ao meio reacional e incubadas por 10 min sob agitação constante e alíquotas foram coletadas a cada 2 min. A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

dinitrossalicílico (DNS), conforme Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto sob as condições experimentais estabelecidas.

Resultados

A Figura 1 ilustra as partículas magnéticas utilizadas para a imobilização da xilanase.

Figura 1 – Partículas magnéticas utilizadas na imobilização.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de imobilização da xilanase, utilizando 5 $\text{mg.g}_{\text{suporte}}^{-1}$ e 27,7 UI.g^{-1} de atividade oferecida, em diferentes concentrações de glutaraldeído (5% e 0,8% v/v), onde observa-se parâmetros superiores utilizando-se 5% de glutaraldeído.

Tabela 1 – Influência da concentração de glutaraldeído nos parâmetros de imobilização da xilanase NS22036 em micropartículas magnéticas.

Parâmetro de imobilização	5% ^a	0,8% ^b
A_t (UI.g^{-1}) ^c	12,4	6,8
RI (%) ^d	100	100
AR (%) ^e	44,9	24,4

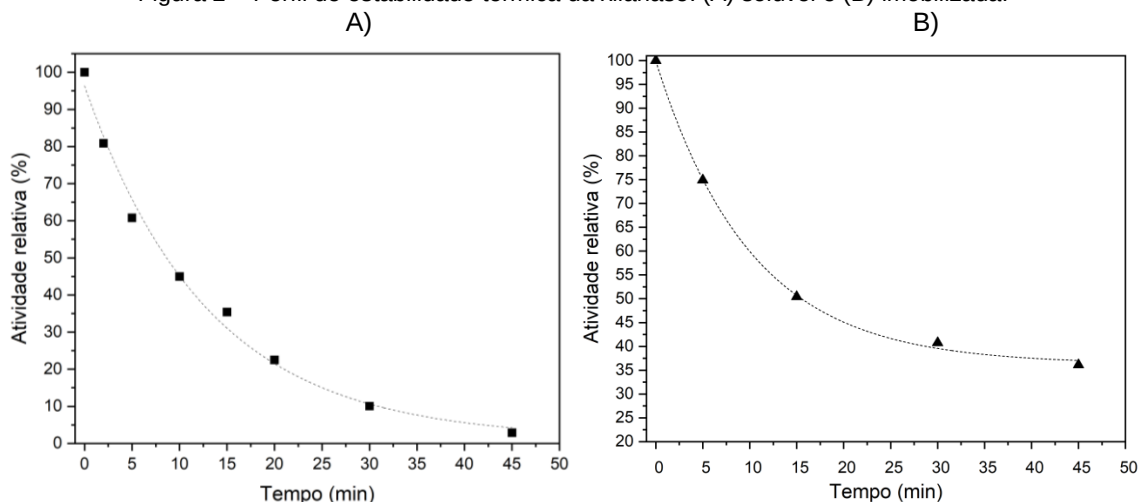
^a concentração de 5% de glutaraldeído; ^b concentração de 0,8% de glutaraldeído; ^c atividade enzimática do imobilizado; ^d rendimento da imobilização; ^e atividade recuperada.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A partir dos resultados obtidos anteriormente na imobilização, o derivado de maior desempenho foi selecionado para prosseguir com os ensaios de estabilidade. Portanto, a Figura 2 apresenta o perfil de estabilidade térmica da xilanase imobilizada em partículas magnéticas funcionalizadas com glutaraldeído 5%.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 2 – Perfil de estabilidade térmica da xilanase: (A) solúvel e (B) imobilizada.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A partir do ajuste dos dados de atividade relativa em função do tempo, obtiveram-se os valores da constante de desativação térmica e do tempo de meia-vida da enzima livre ($0,08 \text{ min}^{-1}$ e $8,94 \text{ min}$) e imobilizada ($0,09 \text{ min}^{-1}$ e $7,01 \text{ min}$), respectivamente.

Discussão

Apesar de ambas as concentrações de glutaraldeído utilizadas para a funcionalização do biocatalisador resultarem em rendimentos de imobilização de 100%, a concentração de 5% apresentou uma melhor eficiência para os demais parâmetros, sendo 1,8 vezes maiores que aqueles obtidos para a concentração de 0,8%. Diversos estudos que empregaram a funcionalização de biocatalisadores com glutaraldeído também relataram aumento no rendimento e na estabilidade ao final dos processos, contudo, os resultados mais expressivos foram observados quando se utilizaram concentrações entre 0,8% e 3% (Corradini *et al.*, 2021; Milessi *et al.*, 2015; Mostafa *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2024). A aplicação do glutaraldeído é considerada fundamental, pois fornece grupos altamente reativos capazes de estabelecer ligações covalentes durante a imobilização enzimática (Wahba *et al.*, 2024). A utilização de glutaraldeído como agente de reticulação é frequentemente acompanhada por etapas rigorosas de lavagem dos suportes imobilizados, a fim de eliminar qualquer excesso de agente, garantindo que apenas a fração que está covalentemente ligada permaneça, evitando, assim, riscos de toxicidade (Romo-Sánchez *et al.*, 2014).

A partir dos dados da Figura 2 é possível notar que a imobilização em partículas magnéticas apresentou um perfil de desativação apenas ligeiramente mais lento que a xilanase solúvel, visto que após 45 min de incubação o imobilizado ainda manteve 36,15% de sua atividade inicial (Figura 2B), já a livre perdeu quase 100% de sua atividade catalítica em apenas 30 min de incubação (Figura 2A). O que justifica esse resultado é o fato dos nanomateriais magnéticos possuírem uma grande área de superfície e uma alta relação superfície-volume. Isso oferece mais locais para a ligação da enzima, o que pode levar a uma maior carga de enzima e, conseqüentemente, a uma atividade catalítica aumentada, demonstrado melhorias na estabilidade térmica e de pH, além de facilitar a recuperação e reutilização (Cavalcante *et al.*, 2024). Entretanto, a constante de desativação térmica e o tempo de meia-vida da enzima imobilizada foram muito próximos, o que se era esperado, uma vez que a imobilização unipontual, comum em suportes ativados com glutaraldeído, geralmente não melhora significativamente a estabilidade (Ramos *et al.*, 2024).

Mostafa *et al.*, 2019 também observaram que a estabilidade térmica da xilanase imobilizada foi melhorada, perdendo apenas 8% de atividade após 15 minutos a 60°C , enquanto a enzima livre perdeu 29%. Utilizando o mesmo suporte de partículas magnéticas para imobilizar xilose isomerase (XI), Ramos *et al.* (2024) obtiveram uma estabilidade térmica maior com o biocatalisador imobilizado, além do aumento em quase 4 vezes do valor de meia-vida (de 10,36 h), sendo as partículas magnéticas o

melhor suporte para estabilidade térmica, dentre todos os testados. Estes trabalhos corroboram com os resultados obtidos neste estudo, e evidenciam sua capacidade de imobilizar, além da facilidade de recuperação do biocatalisador no final do processo. Vale ressaltar que, apesar da pouca estabilização observada na xilanase estudada no presente trabalho, a reutilização da mesma em sucessivos ciclos devido à facilidade de separação da mesma pode representar expressivo avanço no desenvolvimento de bioprocessos utilizando a enzima desenvolvida.

Conclusão

A imobilização da xilanase em partículas magnéticas, utilizando glutaraldeído como agente reticulante, demonstrou ser uma estratégia eficaz para a imobilização da xilanase estudada. A otimização da concentração de glutaraldeído foi um fator determinante no desempenho da enzima, com a condição de 5% superando significativamente a de 0,08% em termos de atividade recuperada. A enzima imobilizada apresentou uma ligeira melhoria no tempo de desativação térmica, restando mais de 36% de sua atividade em condições que levariam à completa desativação da enzima livre. Em suma, os resultados deste trabalho evidenciam que a imobilização em micropartículas magnéticas ativadas com glutaraldeído é uma abordagem viável e promissora para o desenvolvimento de biocatalisadores mais robustos e reutilizáveis, com potencial para aplicação em processos industriais mais sustentáveis e econômicos.

Referências

ADRIANO, W. S. *et al.* Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 1 ago. 2008.

ARTICO, M. *et al.* One-point covalent immobilization of a xylanase on elastomer: effects of surface stretching on enzymatic activity. **Appl. Surf. Sci.**, v. 706, p. 163554, 2025.

ASLAM, S. *et al.* Covalent immobilization of thermotolerant recombinant nano-coupled xylanase for improved stability and reusability in the saccharification process. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 308, p. 142169, 2025.

CORRADINI, F. A. S. *et al.* High stabilization and hyperactivation of a Recombinant β -Xylosidase through Immobilization Strategies. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 145, p. 109725, abr. 2021.

FAHIM, Y. A. *et al.* Biomedical and environmental applications via nanobiocatalysts and enzyme immobilization. **Eur. J. of Med. Res.**, v. 30, n. 1, p. 505, 2025.

GAMA CAVALCANTE, A. L. *et al.* Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. **RSC Adv.**, v. 14, n. 25, p. 17946–17988, 2024.

KATIĆ, K. *et al.* Biotransformation of xylan isolated from sunflower meal into xylo-oligosaccharides using endo-xylanase immobilized on oxidized nanocellulose. **Mol. Catal.**, v. 585, p. 115340, 2025.

MILESSI, T. S.S. *et al.* Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catal. Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MOSTAFA, F. A. *et al.* Immobilization of xylanase on modified grafted alginate polyethyleneimine bead based on impact of sodium cation effect. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 140, p. 1284–1295, 2019.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

PASCHOA, J. L.F. *et al.* Production and purification of xylooligosaccharides from sugarcane bagasse and antioxidant potential assessment for functional ingredient application in the food industry. **Ind. Crops Pro.**, v. 208, p. 117844, 2024.

RAMOS, M. D. N. *et al.* Immobilization, Characterization and Application of a Xylose Isomerase Biocatalyst for Xylose Fermentation in Biorefineries. **Fermentation**, v. 10, n. 12, p. 659, 2024.

ROMO-SÁNCHEZ, S. *et al.* Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports. **Adv. Biosci. Biotechnol.**, v. 05, n. 06, p. 517–526, 2014.

TADESSE, M.; LIU, Y. Recent Advances in Enzyme Immobilization: The Role of Artificial Intelligence, Novel Nanomaterials, and Dynamic Carrier Systems. **Catalysts**, v. 15, n. 6, p. 571, 2025.

WAHBA, M. I. *et al.* Xylanase immobilization using activated carrier of gellan gum-agar beads: Improved stability and catalytic activity for the production of antioxidant and anti-proliferative xylooligosaccharides **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 56, p. 103013, 2024.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (FAPESP, #2018/14552-9). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processos 407716/2021-1 e 310753/2025-2