UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE DE DOUTORADO

IMOBILIZAÇÃO DE α-AMILASE EM FIBRAS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO VIA *ELECTROSPINNING* E SUA ATIVIDADE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Mariana Dias Antunes Porto

Química de Alimentos

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Pelotas, 2018

Mariana Dias Antunes Porto

IMOBILIZAÇÃO DE α-AMILASE EM FIBRAS DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO VIA *ELECTROSPINNING* E SUA ATIVIDADE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

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 Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (UFPEL – FAEM)

Profª. Drª. Elessandra da Rosa Zavareze (UFPEL – FAEM)

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P839i Porto, Mariana Dias Antunes

Imobilização de α-amilase em fibras de álcool polivinilico via electrospinning e sua atividade em diferentes substratos / Mariana Dias Antunes Porto ; Alvaro Renato Guerra Dias, orientador ; Elessandra da Rosa Zavareze, coorientadora. — Pelotas, 2018.

61 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Imobilização enzimática. 2. Alfa-amilase. 3. Substratos de amido. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora

Profª. Drª. Elessandra da Rosa Zavareze

Profª. Drª. Caroline Dellinghausen Borges

Profª. Drª. Vilásia Guimarães Martins

Drª. Helen Hackbart

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por sempre me guiar e me acompanhar em todos os momentos.

Aos meus pais, Realda e Nilson, por sempre me escutarem e me aconselharem! Obrigada por acreditarem em mim! Amos vocês!

Aos meus irmãos, Gabriela e Cassiano, por todo amor e carinho dedicado a mim, mesmo estando distante. Amo vocês!

Ao meu esposo, Paulo Ricardo Júnior, pelo companheiro maravilhoso e atencioso que és, por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis! Te amo meu amor!

À minha Laikinha, filha de quatro patas, sempre tornando os meus dias mais alegres e divertidos! Minha companheirinha que me oferece um amor incondicional! Te amo minha vidinha!

Ao meu orientador, Álvaro e à minha coorientadora, Elessandra, pelos ensinamentos!

À minha colega e amiga, Shanise, pela boa vontade em ajudar sempre que precisei! És uma colega como poucas!

Aos meus amigos e colegas, Graziella, Francine, Laura, Jean, Jarine e Rosane, pelas conversas, amizade e carinho. Com certeza vocês fizeram toda diferença nos meus dias!

À todos os colegas do LabGrãos, pelo acolhimento e carinho nesse período.

À todos os professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Agradeço!

RESUMO

PORTO, Mariana Dias Antunes. **Imobilização de α-amilase em fibras de álcool polivinilico via *electrospinning* e sua atividade em diferentes substratos.** 2018, 61p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A α-amilase é uma enzima muito utilizada na indústria alimentícia, porém, existem alguns fatores que podem afetar a sua eficiência e estabilidade, assim a imobilização surge como uma alternativa. O *electrospinning* está emergindo como uma tecnologia promissora para a imobilização de enzimas onde diversos polímeros podem ser utilizados. O álcool polivinílico (PVA) possui boas características para utilização como suporte na imobilização de enzimas, pois possui boas propriedades para produção de fibras por *electrospinning*, é biodegradável, biocompatível, entre outros. No entanto, as fibras elaboradas com PVA apresentam baixa estabilidade térmica. Visando aumentar a sua estabilidade térmica, a utilização de um agente de reticulação, como o glutaraldeído em fase de vapor, tem sido sugerida. O objetivo do estudo foi imobilizar α-amilase em fibras de PVA via *electrospinning* e aplicá-la em substratos de amido de milho, trigo germinado e trigo não germinado. Para tanto, soluções de PVA 8 % (p/v) foram adicionadas de α-amilase nas concentrações de 1, 1,5 e 2 % (p/v) e produzidas fibras ultrafinas via *electrospinning*. As fibras foram avaliadas quanto a morfologia e distribuição de tamanho, grupos funcionais e cadeia, atividade enzimática, capacidade de carregamento e estabilidade a diferentes temperaturas e pH's. Em outra etapa foi realizada a reticulação com glutaraldeído em fase de vapor, nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas de exposição, utilizando as fibras com 1,5 % de α-amilase. Após a reticulação as fibras foram avaliadas quanto a morfologia, atividade enzimática e análise termogravimétrica. Os resultados mostraram que a incorporação da enzima ocasionou uma leve mudança na morfologia das fibras, apresentando fibras mais achatadas e espessas com o aumento da concentração da enzima. Os diâmetros médios variaram de 187 a 282 nm. Os espectros de FTIR indicaram que a enzima foi incorporada nas fibras. O PVA exibiu alta capacidade de carregamento para α-amilase em todas as concentrações testadas, mostrando ser um bom suporte para imobilização de enzimas. A imobilização enzimática melhorou a estabilidade da α-amilase em uma ampla faixa de temperatura e pH. O amido de trigo germinado apresentou maior valor de atividade enzimática, nas diferentes temperaturas e pH's, apresentando um grande potencial para aplicação na hidrólise com α-amilase. Após a reticulação, a morfologia das fibras apresentou uma estrutura mais densa e compacta entre as fibras, resultado da interação química do glutaraldeído com o PVA e a α-amilase. Observou-se também uma diminuição da atividade enzimática após os diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído. A análise de TGA apresentou um aumento da temperatura de decomposição inicial para as fibras, demonstrando uma maior estabilidade térmica das fibras reticuladas. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que as membranas de PVA com α-amilase imobilizada

apresentaram boas características para utilização na hidrólise do amido de diferentes fontes.

Abstract

PORTO, Mariana Dias Antunes. Immobilization of α-amylase in polyvinyl alcohol fibers via electrospinning and its activity on different substrates. 2018, 62p. Thesis (Doctoral Degree in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Agronomy School Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

α-amylase is an enzyme widely used in the food industry, however, there are some factors that may affect its efficiency and stability and immobilization arises as an alternative. Electrospinning is emerging as a promising technology for the immobilization of enzymes where various polymers can be used. Polyvinyl alcohol (PVA) has good characteristics for use as a support in the immobilization of enzymes, since it has good fiber production capacity by electrospinning, it is biodegradable, biocompatible, among others. However, fibers made with PVA have low thermal stability. In order to increase its thermal stability, the use of a crosslinking agent, such as glutaraldehyde in the vapor phase, has been suggested. The aim of the study was to immobilize α-amylase in PVA fibers by electrospinning and apply it to substrates of corn starch, germinated wheat and ungerminated wheat. To that end, solutions of 8% (w / v) PVA were added α-amylase at concentrations of 1, 1.5 and 2% (w / v) and produced ultrafine fibers via electrospinning. The fibers were evaluated for morphology and size distribution, functional groups and chain, enzymatic activity, loading capacity and stability at different temperatures and pH's. In another step, glutaraldehyde cross-linking was carried out at 1, 2, 3 and 4 hours of exposure using the fibers with 1.5% α-amylase. After the crosslinking the fibers were evaluated for morphology, enzymatic activity and thermogravimetric analysis. The results showed that the incorporation of enzyme caused a slight change in the morphology of the fibers, presenting fibers more flattened and thicker with the increase of the enzyme concentration. The mean diameters ranged from 187 to 282 nm. FTIR spectra indicated that the enzyme was incorporated into the fibers. PVA exhibited high loading capacity for α-amylase at all concentrations tested, showing good support for immobilization of enzymes. Enzymatic immobilization improved α-amylase stability over a wide temperature range and pH. The germinated wheat starch presented higher value of enzymatic activity, at different temperatures and pH's, presenting a great potential for application in α-amylase hydrolysis. After the crosslinking, the fiber morphology presented a denser and more compact structure between the fibers, resulting from the chemical interaction of glutaraldehyde with PVA and α-amylase. A decrease in enzyme activity was also observed after different exposure times to glutaraldehyde vapor. The TGA analysis showed an increase in the initial decomposition temperature for the fibers, demonstrating a higher thermal stability of the crosslinked fibers. From the results obtained it is possible to conclude that the membranes of immobilized α-amylase PVA presented good characteristics for use in the hydrolysis of starch from different sources.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática das moléculas de amilose (acima), demonstrando as ligações α-1,4, e amilopectina (abaixo), demonstrando as ligações α-1,6, do amido (OLIVEIRA, 2017). 19
Figura 2 - Ilustração de diferentes métodos de imobilização enzimática (ADAPTADO DE FREITAS, 2012). 22
Figura 3 - Modelo de uma estação de electrospinning para a formação de fibras poliméricas (MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2013). 31
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado. 35
Figura 5 - Espectros de difração de raio X de (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado. 37
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras de PVA com diferentes concentrações de enzima α-amilase. (a, b) fibras de PVA com enzima 0% (p/v); (c, d) fibras de PVA com enzima 1,0% (p/v); (e, f) fibras de PVA com enzima 1,5% (p/v); (g, h) fibras de PVA com enzima 2,0% (p/v). 39
Figura 7 - Espectro FTIR - ATR de (a) α-amilase pura, (b) fibras de PVA, (c) fibras com α-amilase 1%, (d) fibras com α-amilase 1,5% e (e) fibras com α-amilase 2,0%. 41
Figura 8 - Atividade enzimática em U/mL da α-amilase livre e imobilizada (a) substrato amido de milho (b) substrato amido de trigo germinado e (c) substrato amido de trigo não germinado. 43
Figura 9 - Capacidade de carregamento da enzima α-amilase em diferentes concentrações (1 % (p/v); 1,5 % (p/v) e 2 % (p/v)), em fibras de PVA. 45
Figura 10 - Atividade enzimática relativa da α-amilase livre e imobilizada a diferentes temperaturas e substratos (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado. 47

Figura 11 - Atividade enzimática relativa da α-amilase livre e imobilizada a diferentes valores de pH e substratos (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado. 49
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibras ultrafinas de PVA com α-amilase: (a) fibras sem reticulação; (b) fibras após 1 h de reticulação; (c) fibras após 2 h de reticulação; (d) fibras após 3 h de reticulação e (e) fibras após 4 h de reticulação. Magnitude de 1000X. 51
Figura 13 - Atividade enzimática em U/mL da α-amilase imobilizada após diferentes tempos de reticulação (a) substrato amido de milho (b) substrato amido de trigo germinado e (c) substrato amido de trigo não germinado. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental para produção das fibras ultrafinas, frente a diferentes concentrações de α-amilase, pela técnica de electrospinning..... 27
Tabela 2 - Delineamento experimental para reticulação das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase (1,5%) através de diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído..... 28
Tabela 3 - Teor de amilose de amido de milho, amidos de trigo germinado e trigo não germinado. 37
Tabela 4 - Comparação de diferentes concentrações de α-amilase imobilizada e em diferentes substratos, e sua atividade específica. 46
Tabela 5 - TGA das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase imobilizada, em diferentes tempos de reticulação com glutaraldeído em fase de vapor..... 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 Geral 16

2.2 Específicos 16

3 HIPÓTESES 17

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

4.1 Enzima α-amilase 17

4.2 Substratos de amido 18

4.3 Métodos de imobilização e material de suporte 21

4.4 *Electrospinning* para imobilização de enzimas 22

4.5 Aplicação de enzimas imobilizadas 25

5. MATERIAIS E MÉTODOS 26

5.1 Materiais 26

5.2 Delineamentos experimentais 26

5.2.1 Delineamento experimental para produção de fibras ultrafinas com diferentes concentrações de α-amilase 26

5.2.2 Delineamento experimental para reticulação das fibras ultrafinas utilizando diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído. 27

5.3 Métodos 28

5.3.1 Avaliações dos amidos 28

5.3.1.1 Morfologia 28

5.3.1.2 Cristalinidade relativa 29

5.3.1.3 Teor de amilose 29

5.3.2 Preparo da solução tampão e da solução polimérica com e sem enzima 30

5.3.3 Imobilização de α-amilase por *electrospinning* 30

5.3.4 Avaliações das fibras com α-amilase imobilizada 31

5.3.4.1 Morfologia e distribuição de tamanho 31

5.3.4.2 Grupos funcionais e cadeia 32

5.3.4.3 Atividade enzimática 32

5.3.4.4 Capacidade de carregamento 33

5.3.4.5 Estabilidade a diferentes temperaturas 33

5.3.4.6 Estabilidade a diferentes valores de pH 34

5.3.4.7 Reticulação com glutaraldeído em fase de vapor 34

5.3.5 Avaliações das fibras com enzima imobilizada após reticulação 34

5.3.5.1 Morfologia e distribuição de tamanho 34

5.3.5.2 Atividade enzimática 34

5.3.5.3 Análise termogravimétrica 34

5.3.6 Análise estatística 34

6 Resultados e discussão 35

6.1 Caracterização dos amidos 35

6.1.1 Morfologia 35

6.1.2 Cristalinidade relativa 36

6.1.3 Teor de amilose 37

6.2 Avaliações das fibras ultrafinas com α-amilase imobilizada 38

6.2.1 Morfologia e distribuição de tamanho 38

6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 40

6.2.3 Atividade enzimática 42

6.2.3 Capacidade de carregamento 44

6.2.4 Estabilidade enzimática em diferentes temperaturas 46

6.2.5 Estabilidade enzimática em diferentes valores de pH 48

6.3 Avaliações das fibras com enzima imobilizada após reticulação com vapor de glutaraldeído 50

6.3.1 Morfologia 50

6.3.3 Análise termogravimétrica (TGA) 54

7 CONCLUSÕES 56

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

1 INTRODUÇÃO

Na indústria alimentícia, a α-amilase é uma enzima muito utilizada na panificação, na produção de cervejas, de xaropes, entre outros (FREITAS; MARTINS; FERREIRA, 2014). A α- amilase cliva as moléculas de amilose e amilopectina ao acaso, apenas nas ligações α-1,4 liberando como produtos desta reação a maltose, glicose e dextrinas limite. Porém, existem alguns fatores que podem afetar a sua eficiência e estabilidade, como por exemplo a temperatura, pH e concentração do substrato. Para solucionar esses problemas, as técnicas de imobilização podem ser utilizadas, a fim de preservar sua atividade enzimática. No entanto, deve-se considerar o tipo de suporte utilizado e o método de imobilização (COPOLATTI et al., 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). Alternativamente, a técnica de *electrospinning* está emergindo como uma tecnologia promissora para a imobilização de enzimas. Essa técnica baseia-se no processamento eletrodinâmico de fluidos poliméricos, que consiste em submeter a solução de alimentação à um campo elétrico de alta tensão. Desta forma, o jato de polímero carregado é ejetado a partir de um capilar condutor através do qual é bombeado, para um coletor aterrado. Devido às forças eletrostáticas geradas no fluído, o jato é estirado e o solvente evapora antes que o material seja depositado no coletor sob a forma de micro ou nanofibras secas (GÓMEZ-MASCARAQUE; LAGARÓN; LÓPEZ-RUBIO, 2015).

Em comparação a outras técnicas de imobilização, o *electrospinning* possui muitas vantagens, como a alta área superficial e estrutura porosa das membranas nanofibrosas, o que pode aumentar consideravelmente a capacidade catalisadora das enzimas imobilizadas. Além disso, a imobilização pode ser realizada em um único passo, evitando a exposição da enzima a vários

estágios de imobilização que podem aumentar as chances de sua desnaturação (GE et al., 2012; MORENO-CORTEZ et al., 2015).

Devido a versatilidade da técnica *de electrospinning*, vários estudos reportam a utilização de diferentes matrizes poliméricas que melhoram a atividade da enzima imobilizada (REN et al., 2006; LIU et al., 2010; HOMAEI; SABERI 2015; SINGH et al., 2015; SAALLAH et al., 2016).

O polímero álcool polivinílico (PVA) é atóxico, biodegradável, hidrossolúvel, biocompatível, possui boa estabilidade química e térmica e boa capacidade de produção de fibras. Essas características são apropriadas para utilização desse polímero como suporte/matriz para imobilização de enzimas (WU, YUAN, SHENG, 2005; CHRONAKIS, 2015). No entanto, em um ambiente aquoso, as fibras formadas por PVA tornam-se altamente solúveis, podendo ocorrer a lixiviação das enzimas do suporte polimérico e, consequentemente, diminuição da sua eficiência.

Visando diminuir a solubilidade do PVA e evitar a perda excessiva da enzima, controlando sua liberação, a utilização de um agente de reticulação, como o glutaraldeído em fase de vapor, tem sido sugerida (SHAIKH et al., 2012).

O glutaraldeído é um composto bifuncional altamente reativo que interage com os grupamentos hidroxila da molécula de PVA e também com os grupamentos amina disponíveis das enzimas, promovendo uma estrutura mais rígida e carácter hidrofóbico para a membrana de fibras ultrafinas (FAZEL et al., 2016).

A α- amilase, entre outras aplicações, é utilizada na hidrólise parcial do amido para a produção de diferentes produtos. Diferentes fontes de amido podem ser utilizadas para o processo de hidrólise enzimática, no entanto, cada fonte de amido possui características distintas (teor de amilose, cristalinidade relativa, tamanho e tipo de grânulo) que promovem diferentes tipos e quantidades de produtos.

O amido de milho é o mais utilizado na indústria de alimentos, pois o milho é matéria-prima abundante e de fácil armazenamento, quando comparado com outras fontes de amido. Entretanto, faz-se necessário mais estudos sobre a atividade da α-amilase, principalmente na forma imobilizada, utilizando outras fontes de amido como substrato, como o amido de trigo, e principalmente o amido de trigo germinado.

Durante o processo de germinação do trigo ocorre um aumento da atividade de enzimas, principalmente a α-amilase, onde o amido é parcialmente hidrolisado dando origem a moléculas de glicose, maltose e outros oligossacarídeos (TOMIĆ et al., 2016). Devido a isso, este trigo não é aproveitado pela indústria de panificação, sendo na maioria das vezes descartado ou utilizado para ração animal. Além disso, com a germinação o amido torna-se mais susceptível ao ataque enzimático, pois uma parte dos grânulos já sofreram uma hidrólise prévia ficando danificados. Sendo assim, uma alternativa para o aproveitamento deste produto seria a utilização como substrato para hidrólise enzimática com α-amilase.

O objetivo do estudo foi imobilizar a α-amilase em fibras de álcool polivinílico (PVA) pela técnica de *electrospinning* e avaliar sua estabilidade utilizando substratos de amidos de diferentes fontes, juntamente com a reticulação das fibras com glutaraldeído em fase de vapor.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Imobilizar α-amilase em fibras de álcool polivinílico (PVA) pela técnica de *electrospinning* e avaliar sua estabilidade utilizando substratos de amidos de diferentes fontes, juntamente com a reticulação das fibras com glutaraldeído em fase de vapor.

2.2 Específicos

1. Imobilizar a α-amilase, em diferentes concentrações, em fibras de PVA através da técnica de *electrospinning*.
2. Caracterizar as fibras de PVA com diferentes concentrações de α-amilase imobilizada através da morfologia e distribuição de tamanho e grupos funcionais e cadeia.
3. Caracterizar as fibras de PVA com diferentes concentrações de α-amilase imobilizada quanto a atividade enzimática, capacidade de carregamento e estabilidade a diferentes temperaturas e pH’s frente a três substratos (amido de milho, trigo germinado e não germinado).

4. Reticular as fibras que apresentarem melhor resultado de atividade enzimática, em diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído.
5. Caracterizar as fibras após a reticulação através das análises de morfologia, atividade enzimática, frente a 3 substratos (amido de milho, trigo germinado e não germinado) e análise termogravimétrica (TGA).

3 HIPÓTESES

1. É possível imobilizar α-amilase em fibras de PVA pela técnica de *electrospinning*;
2. A concentração de enzima influencia na atividade enzimática e capacidade de carregamento nas fibras ultrafinas;
3. A atuação da enzima imobilizada em fibras ultrafinas de PVA varia em distintos substratos de amido.
4. A enzima imobilizada nas fibras ultrafinas terá maior atividade e maior resistência a diferentes temperaturas e pH's, quando comparada a enzima livre;
5. A reticulação com glutaraldeído em fase de vapor influencia na morfologia das fibras ultrafinas, na atividade enzimática e produz fibras com maior estabilidade à decomposição térmica;

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Enzima α-amilase

A α-amilase (α-1,4 -D-glicano glicano hidrolase, EC 3.2.1.1) é uma enzima amilolítica, amplamente distribuída nos reinos vegetal, animal e microbiano, pertencente à família das hidrolases glicosídicas. Essa enzima é uma endo hidrolase, que degrada as moléculas de amilose e amilopectina do amido de dentro para fora, clivando aleatoriamente as ligações α-1,4 liberando como produtos da reação maltodextrinas, maltose, glicose e algumas dextrinas limite. Porém, ela não cliva as ligações α-1,6, permanecendo intactos todos os pontos de ramificação (FREITAS, 2012; DEY; BANERJEE, 2014,).

As α-amilases, de diferentes fontes, são algumas das enzimas com maior potencial de utilização pela indústria alimentícia, farmacêutica ou têxtil (HOMAEI; SABERI, 2015). As de origem microbiana são produzidas por bactérias ou fungos e possuem características distintas das de origem vegetal e animal.

Existem alguns motivos principais para o interesse de enzimas a partir de fontes microbianas, como o crescimento rápido de micro-organismos e facilidade no manuseio, o que acelera o processo de produção da enzima, são fáceis de manipular, quando comparado as plantas e animais, além de requererem um menor espaço sendo uma fonte econômica. (SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

As produzidas por fungos, como pelo micro-organismo *Aspergillus oryzae*, geralmente possuem pH ótimo entre 5,0-6,0 e temperatura por volta de 50 °C (OLIVEIRA, 2017).

Além disso, a utilização de enzimas nos processos industriais é de grande importância, pois minimizam o uso de reagentes (altamente específicas) e consequentemente diminuem a geração de resíduos (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Contudo, as α-amilases, assim com as outras enzimas, são altamente específicas necessitando de um pH e temperatura ótimos para atuação, além do substrato ideal. Acima da temperatura ótima a enzima pode sofrer desnaturação ou perda irreversível de sua atividade, já em temperaturas abaixo da temperatura ótima, pode ocorrer a inibição da atividade enzimática. O pH, acima ou abaixo do ideal, pode ocasionar desnaturação, perda da atividade enzimática e consequentemente perda da sua interação com o substrato. Além disso, a estabilidade enzimática (condições e tempo em que a enzima mantém sua atividade catalítica) é outro parâmetro importante para manter a atividade da enzima frente a condições adversas (RAO, 2014).

4.2 Substratos de amido

O amido é a substância de reserva de maior importância nas plantas superiores. Compreende-se por amido, o polissacarídeo de reserva em grãos de cereais (trigo, milho, arroz, etc) e por fécula o polissacarídeo de reserva em tubérculos e raízes (batata, mandioca, etc) (FREITAS, 2012). Esse polímero é composto por duas macromoléculas, a amilose e amilopectina. Ambas são formadas por unidades de D-glicose unidas por ligações α-1,4 e cadeia linear,

porém, a amilopectina possui algumas ramificações em sua estrutura composta por ligações α-1,6. O teor de cada molécula varia de acordo com a fonte e idade da planta (BARANZELLI, 2017). A estrutura e composição dos grânulos irão depender da forma como estão associadas as moléculas de amilose e amilopectina, que proporcionará características distintas para cada amido.

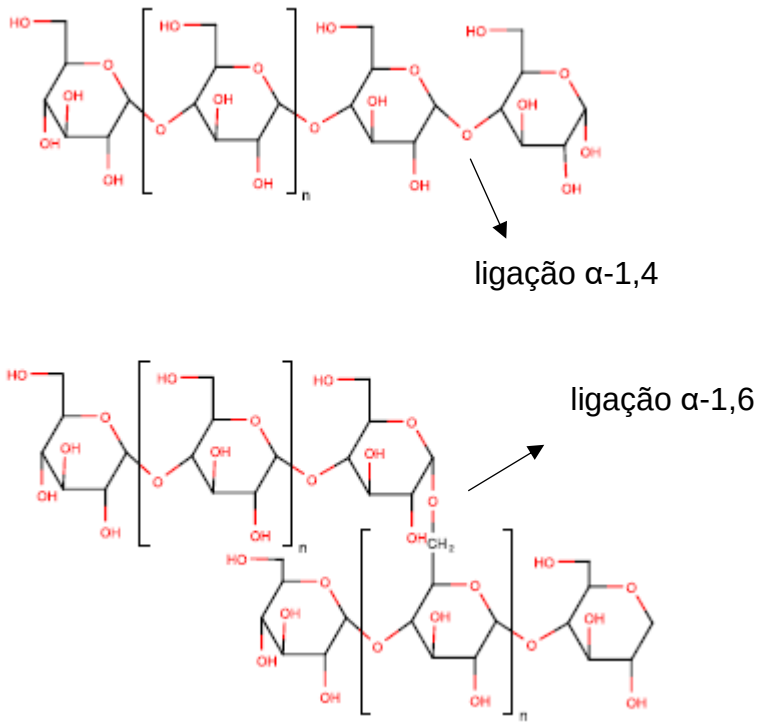


Figura 1 - Ilustração esquemática das moléculas de amilose (acima), demonstrando as ligações α-1,4, e amilopectina (abaixo), demonstrando as ligações α-1,6, do amido (OLIVEIRA, 2017).

Quando aquecido em excesso de água, rompem-se as ligações de hidrogênio das moléculas de amilose e amilopectina do amido e os grânulos começam a intumescer, destruindo a ordem molecular e ocasionando modificações irreversíveis nas suas propriedades, fenômeno este chamado de gelatinização (ZAVAREZE; DIAS, 2012). Após a gelatinização, com a diminuição da temperatura, ocorre outro processo, a retrogradação, que nada mais é que a reassociação das moléculas de amilose e amilopectina, favorecendo uma estrutura mais ordenada (PINTO, 2009).

Industrialmente o amido é extraído de diversas fontes para ser utilizado nos mais variados produtos, como produção de xaropes, utilização na panificação, entre outros. As matérias-primas de maior importância para extração de amido são o milho, trigo, arroz, mandioca e batata. O milho representa a mais expressiva, sendo utilizado cerca de 75% da produção mundial de amido (PINTO, 2009).

No Brasil, o milho é a fonte mais utilizada para extração de amido, sendo encontrado em maior parte no endosperma do grão. Isto ocorre devido a alta disponibilidade deste cereal, simplicidade de armazenamento pós-colheita, fácil adequação a condições climáticas, utilização de quase todas as partes do grão (óleo, fibra, proteína e amido) e sobretudo, pelo alto teor de amido no grão (~ 60%) (FOOD INGREDIENTES, 2015). Seus grânulos possuem formato poligonal e o teor de amilose do amido de milho pode variar entre 25-28%. Porém, existe uma variedade que é constituído por praticamente só amilopectina, referido pelo termo ceroso (“waxy”). Essas diferenças no teor de amilose e a forma como as cadeias estão organizadas promovem propriedades distintas para esses amidos. Por exemplo, o amido de milho, por possuir uma maior quantidade de moléculas de amilose, apresenta maior tendência a retrogradação, não sendo indicado seu uso para produtos que necessitam armazenamento sob refrigeração. Já o amido de milho ceroso, que possui maior quantidade de amilopectina, sofre menor retrogradação, exibindo maior estabilidade a baixas temperaturas (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009; LUCHESE; SPADA; TESSARO 2017)

O amido de trigo é encontrado no endosperma dos grãos e representa o principal componente da farinha. Na indústria de alimentos esse amido é utilizado como ingrediente multifuncional, destacando-se a sua utilização como substrato para hidrólise de enzimas amilolíticas para produção de diversos produtos. Os grânulos do amido de trigo apresentam-se de forma bimodal, classificados em grânulos do tipo A e B, e na forma lenticular e esférica, respectivamente (YAN et al., 2016). As cadeias lineares da amilopectina dão origem a regiões cristalinas, já as cadeias lineares da amilose e as ramificações da amilopectina são responsáveis pela região amorfa. Essa região amorfa presente nos grânulos é mais susceptível ao ataque enzimático, pois é menos densa (BARANZELLI, 2017). O trigo germinado refere-se aos grãos que sofreram uma germinação prévia no campo ou induzida em laboratório, através

de condições favoráveis de temperatura, umidade e oxigênio. Durante esse período ocorrem uma série de transformações morfológicas e reações bioquímicas, como degradação do amido através de enzimas. Uma das enzimas mais importantes que atuam durante esse processo é a α-amilase (BARANZELLI et al., 2018). Através da análise de número de queda (NQ), a qual é expressa em segundos, se avalia indiretamente a atividade da enzima e consequentemente a qualidade tecnológica dessa farinha e o seu destino (AACCI, 2010).

Farinhas de trigo com valores de NQ de 351 s são consideradas de baixa atividade enzimática e inferiores a 200 s são de alta atividade enzimática (BARANZELLI, 2017). Assim, dependendo desses valores, o uso dessa farinha pode estar comprometido não podendo ser utilizado para produtos de panificação, e sim para ração animal (DENDY; DOBRASZCZYK, 2001).

4.3 Métodos de imobilização e material de suporte

As enzimas são ótimos catalisadores biológicos utilizados para várias aplicações industriais. Porém, seu emprego em diferentes produtos é limitado devido sua baixa estabilidade a condições adversas como temperatura e pH. A imobilização de enzimas tem sido uma estratégia para aumentar sua atividade e resistência frente a diferentes situações (HOMAEI; SABERI, 2015). A imobilização de enzimas compreende um conjunto de técnicas que tem por objetivo aprisionar as enzimas em uma matriz, mantendo suas propriedades catalíticas e proporcionando o aumento da sua estabilidade operacional em condições de variações de temperatura e pH, e até mesmo possibilitar sua reutilização, em alguns casos (CRUZ, 2013). Existem vários métodos para imobilização de enzimas (Figura 2), sendo os mais utilizados definidos como: aprisionamento (enredamento, encapsulamento e microencapsulamento) e interações químicas (adsorção, ligação iônica, covalente e cruzada) (FREITAS, 2012).

Além do método a ser escolhido, o material de suporte está altamente relacionado com a eficiência de imobilização da enzima. 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. Assim, a enzima imobilizada exige um ambiente ótimo do material de suporte (WANG et al., 2009; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

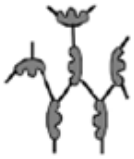
Enzimas Aprisionadas		Enzimas ligadas			
Matriz Polimérica (enredamento)	Encapsuladas	Ligação covalente	Ligação cruzada	Adsorção física	Adsorção lônica
					

Figura 2 - Ilustração de diferentes métodos de imobilização enzimática (ADAPTADO DE FREITAS, 2012).

O poli (álcool vinílico) (PVA) tem sido utilizado como matriz polimérica para imobilização de enzimas em diversos estudos (WU; YA; SHENG, 2005; REN et al., 2006; FAZEL et al., 2016; SAALLAH; NAIM, 2016). Este polímero é biodegradável, hidrofílico, atóxico, de relativo baixo custo e está disponível em uma ampla faixa de massas molares (REN et al., 2006). Além disso, o PVA possui a capacidade de formar ligações secundárias com proteínas que podem dissociar moléculas ligadas ao hidrogênio, facilitando a eletrofiação de biomacromoéculas. Uma das tendências de imobilização enzimática é a utilização de materiais nanoestruturados como suporte. Esse tipo de material se destaca de outros devido a suas proporções de áreas de superfície/volume extremamente altas, aumentando a eficiência de imobilização bem como a estabilização das enzimas (WANG et al., 2009). Sendo assim, uma das técnicas que pode ser utilizada para imobilização de enzimas é a técnica de *electrospinning*, que produz nanofibras a partir de diferentes polímeros, e possuem um grande potencial para imobilização enzimática (SAALLAH et al., 2016).

4.4 *Electrospinning* para imobilização de enzimas

O *electrospinning* é uma técnica que vem sendo estudada há muitos anos nas mais diversas áreas devido ao seu potencial para fabricação de fibras ultrafinas com diâmetros na ordem de nano ou sub-micrometros (WU; YUAN; SHENG, 2005). A partir de diferentes polímeros é feita uma solução polimérica onde é colocada diretamente em uma seringa que possui uma agulha de diâmetro conhecido onde um forte campo elétrico é aplicado. Quando a força eletrostática supera a tensão de superfície da gota esta é forçada a sair do capilar em direção ao coletor aterrado. Nesse período o solvente é evaporado e as fibras poliméricas são depositadas secas no suporte.

Nesse processo vários parâmetros são estudados e influenciam a formação das fibras, como a tensão aplicada, a taxa de fluxo da solução, a distância da agulha ao coletor, concentração da solução polimérica utilizada e também condições ambientais, como umidade relativa do ar e temperatura ambiente (WU; YUAN; SHENG 2005; KHAJAVI; ABBASIPOURB, 2012). Na imobilização de enzimas esta técnica apresenta muitas vantagens, como: diversos polímeros podem ser utilizados e serem aplicados como suporte para enzimas, atendendo a diferentes exigências, alta porosidade do suporte fabricado, superfície funcionalizada, estabilidade ambiental (maior estabilidade a extremos de temperatura e pH), capacidade direta de transferência de elétrons entre a enzima e o polímero, facilidade de preparo e fabricação, além da alta relação superfície/volume que aumenta a capacidade de carregamento de enzimas, quando comparada a outros processos (WANG et al., 2009; COPOLATTI et al., 2014).

Diferentes estudos têm utilizado esta técnica para imobilizar enzimas, como Dogaç et al. (2017) que realizaram a imobilização de lipase, através de adsorção, em nanofibras de alginato/poli(óxido de etileno) (ALG/PEO) e alginato e álcool polivinílico (ALG/PVA) produzida pelo *electrospinning,* após a reticulação das fibras com glutaraldeído. Estes autores observaram que as nanofibras produzidas por ALG/PVA obtiveram melhores resultados de atividade enzimática e quantidade de enzima, comparado as nanofibras de ALG/PEO. Isto possivelmente é atribuído a maiores quantidades de sítios de ligação no PVA devido aos grupos funcionais de hidroxilas.

Wu e colaboradores (2005) procederam a imobilização de celulase em nanofibras de álcool polivinílico (PVA) pela técnica de *electrospinning* e após,

realizaram a reticulação das membranas com glutaraldeído em fase de vapor. A fim de comparação estes autores realizaram a imobilização desta enzima também pela técnica de *casting*. Como resultados principais, a atividade da enzima imobilizada por eletrofiação foi mais de 65% do valor da enzima livre e quase duas vezes maior que a imobilizada por *casting*.

Fazel et al. (2016) imobilizaram peroxidase de rábano (*Horseradish*) em membranas nanofibrosas biocompostas de PVA/BSA (*Bovine serum albumin*) e após submeteram a reticulação com glutaraldeído. Foi verificado que a presença de BSA nas membranas melhorou a atividade de retenção da enzima. Enquanto 0,7% da atividade de retenção enzimática aumentou em nanofibras de PVA, a presença de BSA nas membranas resultou no aumento de 7,7% da atividade enzimática retida.

Moreno-Cortez et al. (2015) realizaram a imobilização de papaína em nanofibras de PVA via *electrospinning*. Observou-se que a partir de 15% de enzima a atividade específica diminuiu consideravelmente. Os autores relatam que este fato pode estar relacionado ao confinamento da enzima no suporte sólido, e como consequência, o acesso ao substrato é mais restrito, comparado a ela livre. Os autores também justificam devido à alta quantidade de papaína encapsulada nas nanofibras de PVA, que em conjunto com outros fatores, poderia limitar o acesso do substrato para o sítio ativo da enzima imobilizada.

Saallah et al. (2016) imobilizaram ciclodextrina glucanotransferase em fibras de PVA por *electrospinning* e compararam com um filme preparado a partir da mesma solução de PVA. Foi observado que a enzima imobilizada nas fibras via *electrospinning* apresentou eficiência de carregamento 2,5 vezes maior do que no filme e atividade catalítica 31% maior.

Existem duas formas de imobilização de enzimas pelo *electrospinning*: imobilização das enzimas na superfície externa das nanofibras e imobilização *in situ* pela mistura das enzimas com a solução polimérica e subsequente eletrofiação, isto é, imobilização por encapsulação das enzimas nas nanofibras. No primeiro tipo podem ser usados materiais poliméricos solúveis em meio orgânico, contudo, o interior das nanofibras permanecem inativos. Em contraste, na segunda abordagem podem ser utilizados polímeros solúveis em água. No entanto, pode ocorrer a dissolução das fibras em meio aquoso e consequente lixiviação das enzimas, reduzindo a eficiência de imobilização. Fazel et al. (2016)

visando solucionar este problema realizou ligação cruzada, através da utilização de vapor de glutaraldeído, nas nanofibras, impedindo a total dissolução do suporte em ambientes aquosos.

4.5 Aplicação de enzimas imobilizadas

A imobilização de enzimas vem sendo muito estudada a fim de conseguir minimizar custos com a sua utilização em vários processos industriais. As enzimas imobilizadas, em alguns casos, podem ser reutilizadas, gerando assim um maior aproveitamento para um determinado processo. Elas são aplicadas em diversos setores, como na indústria têxtil, médica, farmacêutica, alimentícia, de detergentes, de biosensores, entre outras.

Na indústria de alimentos ela pode ser utilizada na produção do leite sem lactose, onde o leite é processado através de uma coluna com a enzima lactase imobilizada podendo após esse processo ser consumido por pessoas intolerantes a lactose. Outra utilização de enzimas imobilizadas na indústria de alimentos é na produção de xaropes de glicose e também na conversão em xarope de milho de alto teor de frutose. Nesta conversão a enzima glicose-isomerase é imobilizada e converte a glicose em frutose produzindo um xarope com sabor mais doce, podendo ser utilizado como adoçante, por exemplo (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Já na produção de xarope de glicose, a enzima α-amilase é a primeira a atuar na liquefação do amido, convertendo-o em moléculas de menor massa molecular, tornando possível a conversão através de outras enzimas, produzindo diferentes tipos de xaropes (FREITAS, 2012). Outros exemplos são as enzimas, como a lipase, que são utilizadas para conversão em substitutos de manteiga de cacau e a papaína, para remoção de precipitados em cerveja (KRAJEWSKA, 2004; HOMAEI, SABERI, 2015). A utilização de enzimas imobilizadas melhora a eficiência desses processos, uma vez que aumentam a estabilidade operacional e atividade catalítica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Álcool polivinílico (percentual de hidrólise, 86,5 - 89,5%), α-amilase (*A. oryzae*) (pó, atividade ~30 $U.mg^{-1}$) (EC 3.2.1.1), D-(+)-Maltose monohidratada (≥99,0% HPLC, PM=360.31 $g.mol^{-1}$), adquiridos de Sigma-Aldrich. Fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio bibásico heptahidratado e ácido fosfórico (85%) foram adquiridos da Labsynth. Ácido 3,5- dinitrosalicilico (DNS) adquirido de INLAB Confiança, azul brilhante de coomassie G 250 adquiridos de Vetec Química Fina LTDA e glutaraldeído 25 % (v/v). O amido de milho foi adquirido no comércio local da cidade de Pelotas/RS e os amidos de trigo germinado (NQ 168 s) e não germinado foi gentilmente fornecido pela EMBRAPA Trigo, Passo Fundo, RS.

5.2 Delineamentos experimentais

5.2.1 Delineamento experimental para produção de fibras ultrafinas com diferentes concentrações de α-amilase

O experimento 1 constou da elaboração e avaliação de fibras resultantes da adição de 3 concentrações de α-amilase na solução polimérica de 8% de PVA, conforme apresentado na Tabela 1.

As concentrações da solução do polímero PVA foram obtidas através de testes preliminares e fixadas para o decorrer do experimento.

Tabela 1 - Delineamento experimental para produção das fibras ultrafinas, frente a diferentes concentrações de α-amilase, pela técnica de *electrospinning*.

Tratamentos	Variável independente	Variáveis dependentes
	Enzima (%)	
1	0,0	Morfologia e distribuição de tamanho
2	1,0	Grupos funcionais e cadeia (FTIR)
3	1,5	Atividade enzimática*
4	2,0	Capacidade de carregamento
		Estabilidade a diferentes temperaturas*
		Estabilidade a diferentes pH's*

* As análises também foram realizadas na enzima livre.

5.2.2 Delineamento experimental para reticulação das fibras ultrafinas utilizando diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído.

A partir dos resultados obtidos no delineamento experimental 1, foi selecionada a fibra que apresentou melhor atividade enzimática para ser submetida a reticulação com glutaraldeído em fase de vapor. Na porção inferior de um dessecador foi adicionado cerca de 200 mL de solução de glutaraldeído 25% (v/v), enquanto as amostras de fibras com e sem enzima foram dispostas em grade com pequenos furos sobre a solução. O sistema foi mantido fechado para transmitir um ambiente rico em vapor. Foram aplicados quatro tempos de exposição, a fim de se obter fibras com maior estabilidade térmica, conforme apresentado na Tabela 2.

O delineamento 2 constou de 5 tratamentos, resultantes da combinação de uma membrana de fibras com 5 tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído, distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento experimental para reticulação das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase (1,5%) através de diferentes tempos de exposição ao vapor de glutaraldeído.

Tratamentos	Variáveis independentes	Variáveis dependentes
	Tempo de exposição ao vapor de glutaraldeído (h)	
1	0	Morfologia Atividade enzimática Análise Termogravimétrica
2	1	
3	2	
4	3	
5	4	

5.3 Métodos

5.3.1 Avaliações dos amidos

5.3.1.1 Morfologia

A morfologia dos amidos de milho, trigo germinado e não germinado foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, EUA). Uma pequena porção dos amidos foi colocada na superfície de um *stub* e subsequentemente revestida com ouro através de um revestidor por crepitação. Uma pequena porção de amido foi colocada na superfície de um *stub* e revestido

com ouro usando um pulverizador catódico Desk V (Jeol, NJ, EUA). As imagens foram analisadas no microscópio eletrônico utilizando uma voltagem de aceleração de 15kV e uma magnitude de 2000 X. Esta análise foi realizada no CEMESUL - FURG.

5.3.1.2 Cristalinidade relativa

Os difratogramas de raios-X dos amidos de milho, trigo germinado e não germinado foram obtidos através da análise com difratômetro de raios-X (XRD-6000, Shimadzu, Brasil). A região de difração de varredura variou de 5° a 45°, com uma tensão de 30 kV, corrente de 30 mA e velocidade de varredura de $1°.min^{-1}$. A cristalinidade relativa (CR) dos grânulos de amido foi calculada conforme descrito por Rabek (1980). Esta análise foi realizada no CEMESUL - FURG.

5.3.1.3 Teor de amilose

O teor de amilose foi determinado por método colorimétrico com iodo, conforme método descrito por McGrane; Cornell e Rix (1998). Aproximadamente 20 mg de amido desengordurado (b.s) juntamente com 8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 90% foi agitado durante 20 min e posteriormente condicionado em banho à 85 °C durante 2 h. Após arrefecimento, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, homogeneizado e o volume ajustado. Uma alíquota de 1 mL da solução foi adicionada de 5 mL de solução de I2/KI (0,0025 mol. L^{-1} de I_2 e 0,0065 $mol.L^{-1}$ de KI) e aferido para 50 mL. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em repouso por 15 min previamente a leitura da absorbância em 600 nm (UV mini – 1240, UV–Vis Spectrophotometers, SHIMADZU). Para a realização da curva padrão de amilose, foi utilizado 20 mg de amilose de batata pura (Sigma Aldrich) sendo retirados alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL para determinação da absorbância em espectrofotômetro e construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em percentual de amilose.

5.3.2 Preparo da solução tampão e da solução polimérica com e sem enzima

A solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0 foi preparada dissolvendo-se 1,19 g de fosfato de sódio monohidratado e 0,37 g de fosfato de sódio bibásico heptahidratado em 100 mL de água destilada. A solução polimérica de PVA (8% p/v) foi preparada dissolvendo-se 0,8 g em 10 mL de tampão fosfato (pH 6,0). Posteriormente, foram adicionadas à solução de PVA a enzima α-amilase nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0% (p/v). As soluções foram mantidas sob agitação magnética a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) por 24 h para completa solubilização da enzima.

5.3.3 Imobilização de α-amilase por *electrospinning*

Foram realizados testes preliminares para avaliação dos melhores parâmetros de produção de fibras com a enzima. Os parâmetros testados foram: taxa de alimentação, distância da ponta da agulha ao coletor e tensão aplicada. As fibras obtidas foram visualizadas em microscópio ótico, com o objetivo de verificar a homogeneidade e presença de *beads*. A taxa de alimentação para a solução polimérica com e sem a enzima foi de 1 $mL.h^{-1}$, a distância da agulha até o coletor de 17 cm, diâmetro da agulha foi de 0,7 mm e a tensão em torno de +20 ± 2 kV e -3,0 ± 2 kV, foram os parâmetros mais adequados para a produção de fibras homogêneas, a partir de testes preliminares. A partir desses dados fixados, foi feito a imobilização de α-amilase em fibras de PVA. A solução polimérica de PVA (com e sem enzima) foi colocada em uma seringa de 3 mL e uma bomba de infusão controlou a taxa de alimentação da solução. O processo de *electrospinning* foi realizado através da utilização de um eletrodo positivo, conectado a uma fonte de alta tensão com corrente contínua (INSTOR – Projetos & Robótica), com uma tensão de cerca de 20 kV, o qual foi acoplado diretamente na ponta da agulha metálica na saída da seringa e um eletrodo negativo foi conectado a um alvo metálico coberto com folha de alumínio posicionado no sentido horizontal à bomba de infusão a uma distância de 17 cm da ponta da agulha até o alvo, para a deposição das fibras com enzima imobilizada. No decorrer do processo a temperatura ambiente foi controlada a 23 ± 2 °C pelo condicionador de ar e a umidade relativa ficou em 45 ± 2% controlada por um

desumidificador. As fibras foram formadas em função da atração e transporte da solução polimérica ao alvo metálico, conforme ilustra a Figura 3. As fibras foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) até o momento das análises.

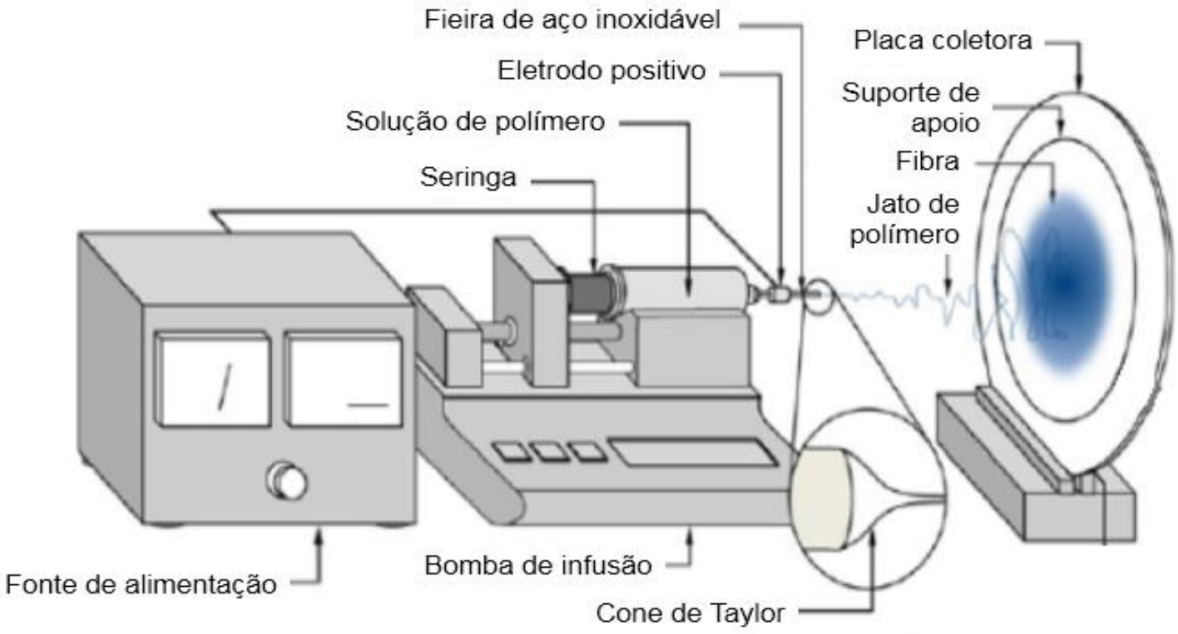


Figura 3 - Modelo de uma estação de *electrospinning* para a formação de fibras poliméricas (MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2013).

5.3.4 Avaliações das fibras com α-amilase imobilizada

5.3.4.1 Morfologia e distribuição de tamanho

A morfologia das fibras foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, EUA). Uma pequena porção das fibras foi colocada na superfície de um *stub* e subsequentemente revestida com ouro através de um revestidor por crepitação. Uma pequena porção das fibras foram colocadas na superfície de um *stub* e revestidas com ouro usando um pulverizador catódico Desk V (Jeol, NJ, EUA). As imagens foram analisadas no microscópio eletrônico utilizando uma voltagem de aceleração de 10 kV e uma

magnitude de 3000 X. O diâmetro médio e a distribuição do diâmetro das fibras foram avaliados a partir das imagens do MEV, sendo medidas 50 fibras através do programa *ImageJ*.

5.3.4.2 Grupos funcionais e cadeia

A interação entre os polímeros e a enzima foi avaliada utilizando espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR – ATR) (IRPrestige21, Shimadzu, Japão). A análise dos espectros foi feita na região do infravermelho médio com intervalo de número de onda de 400-5000 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1}. Os sinais foram processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, EUA).

5.3.4.3 Atividade enzimática

A atividade de α-amilase imobilizada foi medida de acordo com o método sugerido por Bernfield (1955) com modificações. Resumidamente, preparou-se uma solução de amido (1% em peso) por dissolução deste em tampão fosfato pH 6,0. Em um frasco, adicionaram-se, aproximadamente, 10 mg de fibras com α-amilase imobilizada e 500 µL de tampão fosfato pH 6,0. Incubou-se por cerca de 16 h à 4 °C. Após esse período foi retirado uma alíquota de 100 µL da amostra (fibras + enzima) e adicionou-se 400 µL de solução de amido 1% (p/v). A reação foi realizada em banho-maria a 50 °C por 10 min. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de solução de DNS (2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicilico em 50 mL de NaOH 2 $mol.L^{-1}$ e 125 mL de água destilada. Após completa dissolução adiciona-se 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio e completa o volume para 250 mL.) e as amostras foram incubadas em um banho de água fervente durante 5 min e depois arrefecida até a temperatura ambiente rapidamente. Depois de diluir a amostra com 13 mL de água destilada, a quantidade de açúcar redutor (maltose) foi determinada por espectrofotometria a 550 nm. Em cada conjunto de experiências, preparou-se uma curva padrão com soluções de maltose (2 mg/mL) de diferentes concentrações (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 $mg.mL^{-1}$). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para

produzir 1 µmol de açúcar redutor (maltose).min^{-1}. A atividade enzimática foi calculada conforme a Equação 1:

$$Atividade\ enzimática\ (U/mL) = \frac{\mu mols\ (maltose \times Fd)}{t \times Enzima} \qquad \text{Eq. (1)}$$

Onde: µmols = micromoles de maltose calculado com base no seu peso molecular e curva padrão
Fd = Fator de diluição
t = Tempo de reação enzimática em minutos
Enzima = Quantidade de enzima utilizada na reação em mililitros

5.3.4.4 Capacidade de carregamento

A capacidade de carregamento que quantifica a enzima carregada nas fibras de PVA foi determinada utilizando análise colorimétrica como descrito no Ensaio de Bradford (1976), com pequenas modificações conforme Saallah et al. (2016). A fibra com enzima imobilizada foi incubada em 200 µL de tampão fosfato pH 6,0 durante cerca de 12 h à 4 °C. Então, 1800 µl de Bradford foi adicionado na solução. A mistura foi agitada suavemente durante 3 min para permitir a ligação da proteína e a absorbância medida em espectrofotômetro a 595 nm. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão. A capacidade de carregamento da enzima foi determinada utilizando a Equação 2:

$$Capacidade\ de\ carregamento\ (mg/g) = \frac{\text{Quantidade de proteína nas fibras}}{Massa\ total\ das\ fibras} \qquad \text{Eq. (2)}$$

5.3.4.5 Estabilidade a diferentes temperaturas

O efeito da temperatura sobre a enzima α-amilase na forma livre e imobilizada foi medido por pré-aquecimento da enzima livre e imobilizada a diferentes temperaturas (40; 50; 60; 70; 80 e 90 °C) (EMAN et al., 2017). Em seguida a atividade enzimática foi testada conforme o item 5.3.4.3

5.3.4.6 Estabilidade a diferentes valores de pH

Os perfis de estabilidade ao pH foram realizados investigando a atividade de α-amilase imobilizada nas mesmas condições do item 5.3.4.3, mas com diferentes valores de pH utilizando tampão fosfato (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0) (LIU et al., 2010).

5.3.4.7 Reticulação com glutaraldeído em fase de vapor

A reticulação foi avaliada durante 1, 2, 3 e 4 h em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) na presença de vapor de glutaraldeído (25% v/v), como proposto por Saallah et al. (2016).

5.3.5 Avaliações das fibras com enzima imobilizada após reticulação

5.3.5.1 Morfologia e distribuição de tamanho

Segundo o item 5.3.4.1

5.3.5.2 Atividade enzimática

Segundo o item 5.3.4.3

5.3.5.3 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica e perda de massa das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase imobilizada, após diferentes tempos de reticulação com glutaraldeído em fase de vapor, foi avaliada através de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (~4 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina numa faixa de 50 a 600 ºC, com taxa de aquecimento de 10 ºC.min^{-1} e um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min^{-1}. Uma cápsula de platina vazia foi utilizada como referência.

5.3.6 Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por teste T e *Tukey* a um nível de significância $p > 0,05$.

6 Resultados e discussão

6.1 Caracterização dos amidos

6.1.1 Morfologia

A morfologia dos grânulos de amido de milho, amido de trigo germinado e não germinado está apresentada na figura 4.

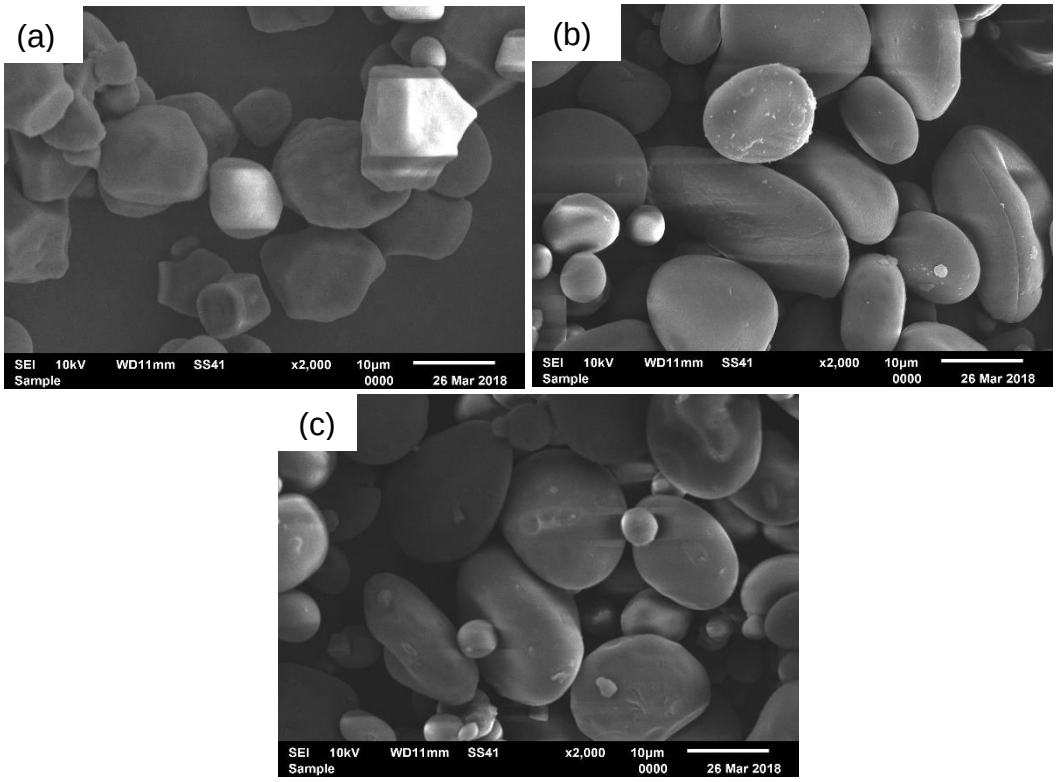


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado.

Os amidos de milho, trigo germinado e não germinado apresentaram morfologia característica de cada espécie (Figura 4). Os grânulos de amido de milho (Figura 4a) apresentaram morfologia poliédrica e arredondada (LUCHESE; SPADA; TESSARO, 2017). Já os grânulos do amido de trigo germinado e não germinado (Figuras 4b e 4c, respectivamente) apresentaram morfologia com característica bimodal, sendo grânulos maiores (tipo A) em formato de disco ou lenticulares e grânulos menores (tipo B) em forma esférica ou poligonal (YAN, et al., 2016). Os grânulos do amido de trigo germinado no campo não apresentaram diferenças morfológicas para o trigo não germinado.

6.1.2 Cristalinidade relativa

Os padrões de difração de raios-X dos três diferentes amidos estão apresentados na Figura 5. Todos os amidos exibiram picos em 2θ= 15°, 17°, 18° e 22° característicos de amidos provenientes de cereais, com padrão de cristalinidade tipo A (LUCHESE et al., 2017). O amido de milho, trigo germinado e não germinado apresentaram cristalinidade relativa de 39,5%, 39,9% e 33,6%, respectivamente. Li et al. (2018) e Ji et al. (2018) ao avaliarem a cristalinidade relativa para amido de milho encontraram um valor de cerca de 29%. No entanto Utrilla-Coello et al. (2018) encontraram 32,5% de índice de cristalinidade para amido de milho. Zhang et al. (2015) ao caracterizar o amido de trigo nativo encontraram 19,3% de cristalinidade relativa. No entanto Bruni et al. (2018) encontraram 25,6% de cristalinidade relativa para amido de trigo nativo. Vários são os fatores que interferem no grau de cristalinidade dos amidos de uma mesma fonte, como a cultivar, o teor de amilose, comprimento médio da cadeia de amilopectina e também a forma como as cadeias estão arranjadas (DENARDIN; SILVA, 2008). Um menor valor de cristalinidade relativa não é obrigatoriamente sinônimo de uma menor ordenação molecular nos grânulos e sim um indicativo do menor tamanho dos cristais (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

No presente estudo o maior valor de cristalinidade relativa do amido de trigo germinado, comparado ao amido de trigo não germinado, pode ser explicado devido a hidrólise ocorrida durante o período de germinação. Utrilla-Coello et al. (2014) relataram que o tempo de hidrólise enzimática no amido pode

aumentar a cristalinidade relativa até um determinado tempo, com posterior diminuição. Além disso, Noda et al. (2004) atribuem mudanças na cristalinidade relativa de amido de trigo germinado ao comprimento da cadeia e distribuição da amilopectina. No presente estudo a cristalinidade relativa dos amidos não apresentou diferença entre as amostras, não ocasionando diferenças na atividade da enzima entre os substratos de amido, por este motivo.

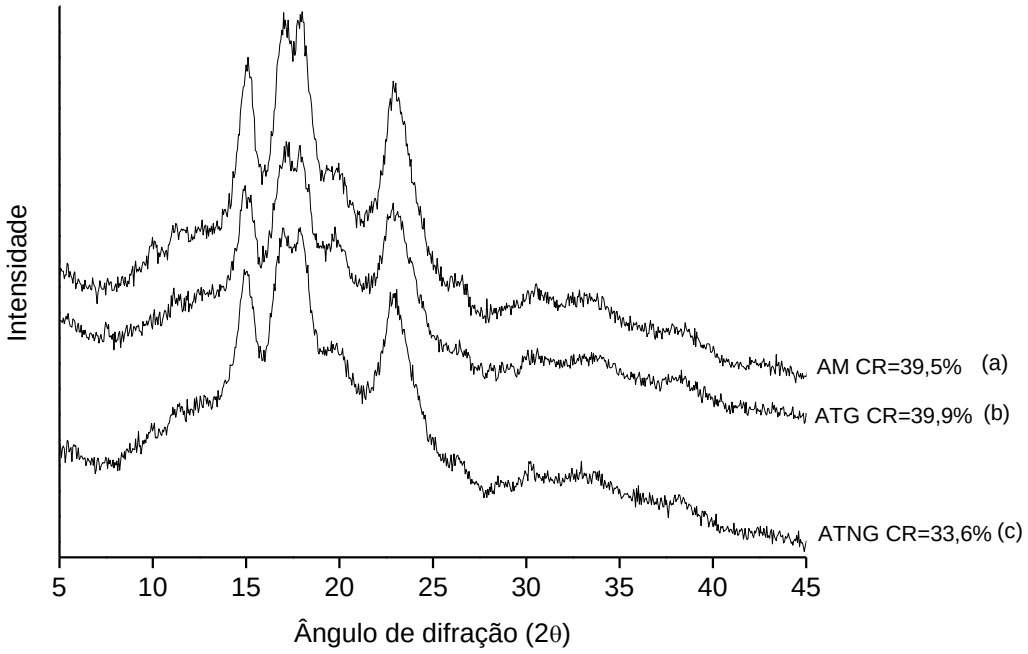


Figura 5 - Espectros de difração de raio X de (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado.

6.1.3 Teor de amilose

O teor de amilose dos amidos de milho, trigo germinado e não germinado está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Teor de amilose de amido de milho, amidos de trigo germinado e trigo não germinado.

Amostra	Teor de amilose (%)
Amido de milho	28,02 ± 1,29[a]
Amido de trigo germinado	30,26 ± 0,85[a]
Amido de trigo não germinado	29,53 ± 1,73[a]

[1] Letras minúsculas distintas na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância.

A partir da Tabela 3 pode-se observar que não houve diferença significativa no teor de amilose entre os amidos avaliados. Portanto, o grau de germinação no campo deste trigo germinado não influenciou no teor de amilose deste.

6.2 Avaliações das fibras ultrafinas com α-amilase imobilizada

6.2.1 Morfologia e distribuição de tamanho

As imagens de MEV para fibras de PVA com enzima em concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2,0% (p/v) e a sua distribuição de diâmetro são mostrados na Figura 6.

A morfologia das fibras com diferentes concentrações de enzima apresentou-se homogênea, lisa, com formato arredondado e sem a presença de *beads* (Figuras 6a, 6c, 6e e 6g). A adição de enzima modificou a morfologia das fibras. Verificou-se também que as fibras, em todos os tratamentos, apresentaram diâmetros médios próximos, entre 187 a 282 nm (Figuras 6b, 6d, 6f e 6h), com um leve aumento conforme a adição de enzima. Dogaç et al. (2017) ao imobilizar lipase em fibras compostas de alginato e poli(óxido de etileno) e alginato e álcool polivinílico, pela técnica de *electrospinning*, também observaram a morfologia das fibras lisas, com formato cilíndrico e um diâmetro médio até 220 nm. Vários são os fatores que afetam a morfologia e diâmetro das fibras produzidas por *electrospinning*, como a concentração do polímero, massa molecular, campo elétrico aplicado, distância da agulha ao coletor, entre outros.

Os *beads*, que são defeitos encontrados nas fibras em alguns casos, não são desejáveis para imobilização de enzimas, pois aumentam a relação massa/área de superfície, diminuindo a eficiência de carregamento (JIA et al., 2002).

Wu et al. (2005) realizaram a imobilização de celulase em fibras de álcool polivinílico e verificaram que com o aumento da concentração de enzima, surgiram o aparecimento de *beads.* Porém, estes autores relataram que uma pequena quantidade de *beads* não afetou a atividade da enzima imobilizada.

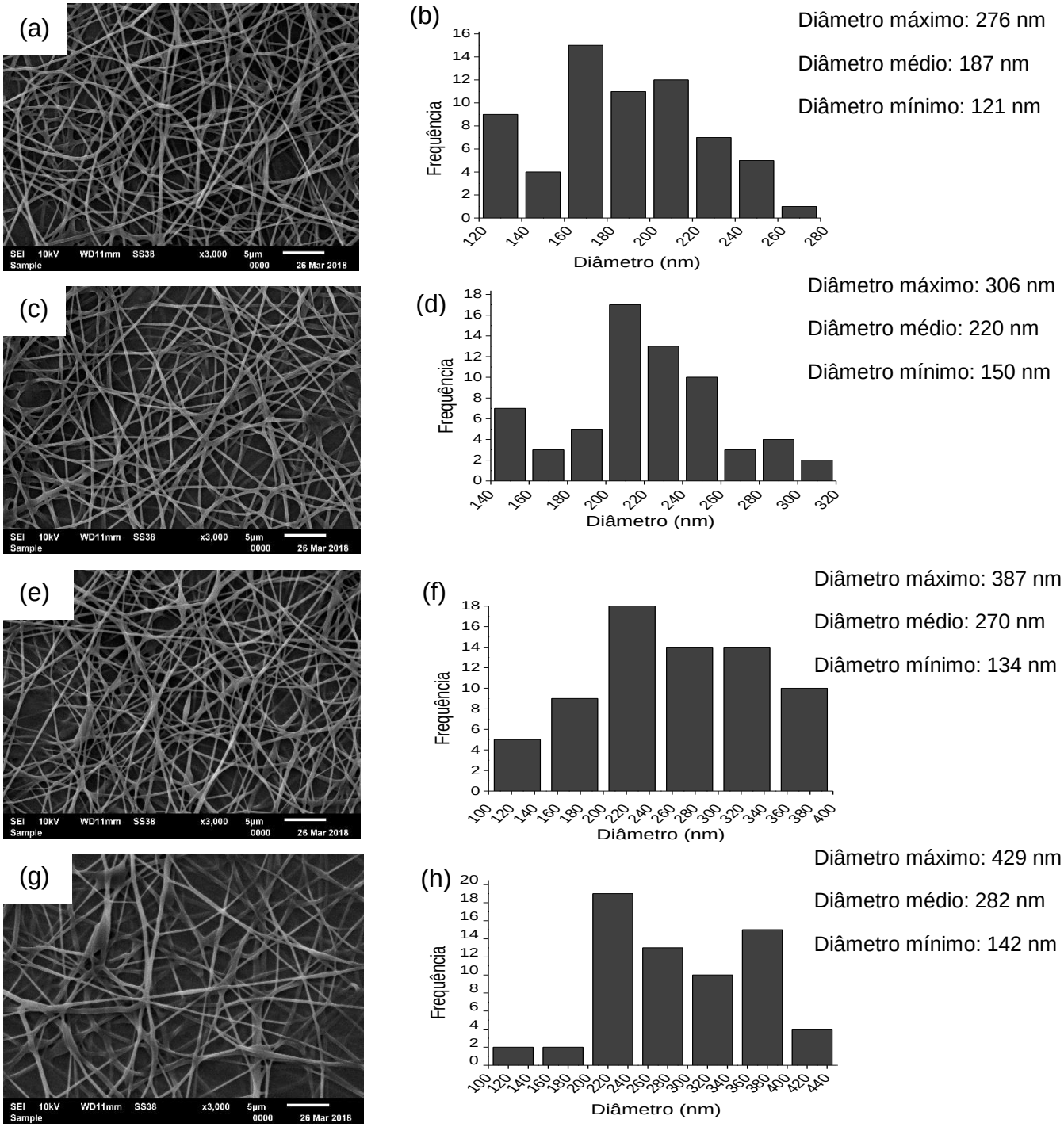


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de diâmetro de fibras de PVA com diferentes concentrações de enzima α-amilase. (a, b) fibras de PVA com enzima 0% (p/v); (c, d) fibras de PVA com enzima 1,0% (p/v); (e, f) fibras de PVA com enzima 1,5% (p/v); (g, h) fibras de PVA com enzima 2,0% (p/v).

Ren et al. (2006) ao imobilizar glicose oxidase em fibras de álcool polivinílico observaram o aparecimento de *beads* com a adição da enzima. Estes autores explicam que, uma proteína, como a glicose oxidase, não tem a capacidade de formar fibras pelo *electrospinning* sozinha, devido a sua estrutura tridimensional e suas fortes interações intra e intermoleculares, que impede a eletrofiação. Portanto, a mistura de enzima com álcool polivinílico permite a formação de fibras, pois o álcool polivinílico tem a capacidade de formar ligações secundárias com proteínas (REN, et al., 2006).

6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A interação entre a enzima e as fibras de PVA foi investigada através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Figura 2).

A forte absorvância em 3282 cm^{-1}, presente em todos os espectros, está associada ao estiramento da ligação O-H, que foi afetado pelas ligações de hidrogênio intra e inter-moleculares, resultado dos grupos hidroxil presentes na molécula de PVA, e que se sobrepõe à banda de estiramento de ligação N-H, na enzima. As bandas fracas de estiramento em 2926 cm^{-1} e 2935 cm^{-1} são atribuídas as ligações C-H presentes na estrutura da α-amilase e nas fibras de PVA, respectivamente.

A enzima pura apresentou bandas em 3282 cm^{-1} (νO-H sobreposto a νN-H) da amida A, 2926 cm^{-1} (ν_sC-H), 1742 cm-1 (νC=O) dos grupos peptídeos da amida I e, 1638 cm^{-1} (νC-N sobreposto ao δN-H) das ligações amida II. As bandas I e II, nesta região, indicam grupos característicos de α-aminoácidos. Ainda são observadas bandas das amidas em 1442 cm^{-1} (νC-O sobreposta a δO-H) e banda em 1364 cm^{-1} (δN-H sobreposto a ρN-H) e, por fim, banda observada como “pequeno ombro” em 1144 cm^{-1} (νO-C-C) na banda larga em 1005 cm^{-1} (νC-O-C) são características de cadeia.

A fibra de PVA pura (fibra sem enzima) apresentou bandas características de grupamentos alcoóis polivinílicos em 3282 cm^{-1} (νO-H), 2935 cm^{-1} (ν_sC-H), 1722 cm^{-1} (δC-H) associado a banda 1643 cm^{-1} (νC=C) do grupamento vinílico, 1435 cm^{-1} (δO-H) em conjunto com 1080 cm^{-1} (νC-O) de alcoóis primários e, por fim a banda em 1249 cm^{-1} (νC-C-O-H) da cadeia.

Na análise das fibras observa-se que a região *fingerprint* (800 < cm^{-1} < 1500) apresentou bandas características do PVA para as concentrações 1 % e 1,5 % enquanto que o aumento da concentração 2 % apresentou esta região de forma mais similar a enzima pura. Na fibra 1% é possível observar as bandas características do PVA, enquanto, que as bandas características da enzima não são observadas, isto se deve ao fato da incorporação da enzima nos poros da fibra de PVA. Na fibra 1,5% além das bandas características do PVA é possível observar bandas características da enzima, no entanto, o deslocamento das bandas em 1364 cm^{-1} (δN-H sobreposto a ρN-H) e 1144 cm^{-1} (νO-C-C), antes observadas na enzima, para as regiões de 1374 cm^{-1} e 1083 cm^{-1}, observadas na concentração 1,5 %, sugere uma interação de hidrogênio entre o grupamento amino da enzima e o grupamento hidroxil do álcool. Por fim, a fibra 2% ilustra bandas características desta mesma interação e, difere das demais por apresentar a região de *fingerprint* característica da enzima, o que sugere uma incorporação saturada da enzima no PVA (REN et al., 2006; PINTO et al., 2015).

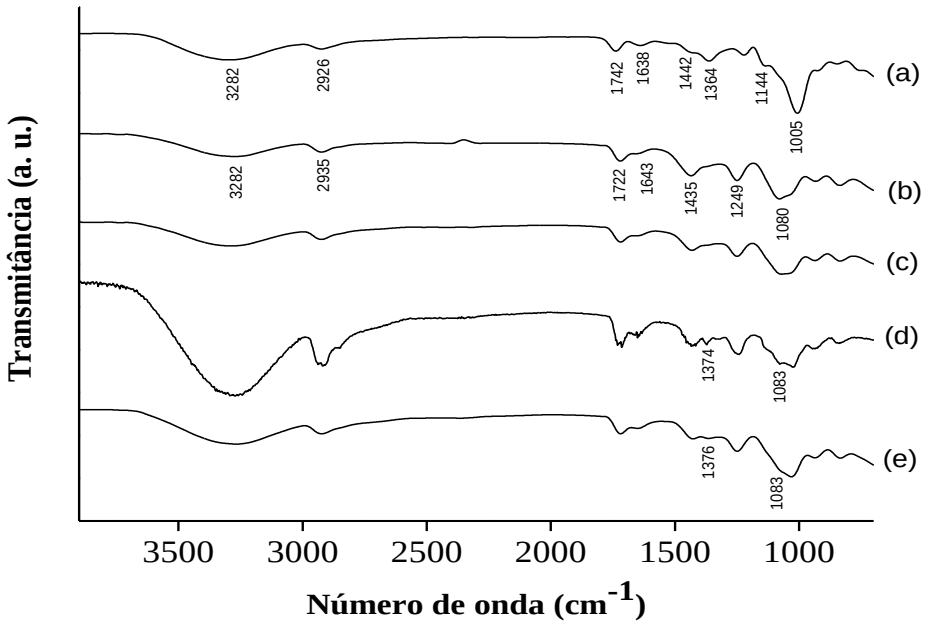


Figura 7 - Espectro FTIR - ATR de (a) α-amilase pura, (b) fibras de PVA, (c) fibras com α-amilase 1%, (d) fibras com α-amilase 1,5% e (e) fibras com α-amilase 2,0%.

6.2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática da α-amilase livre e imobilizada nas fibras de PVA em diferentes concentrações, utilizando diferentes substratos de amido, está apresentada na Figura 8.

Como pode ser observado na Figura 8a, para o substrato de amido de milho, houve diferença significativa na atividade da α-amilase livre e imobilizada nas concentrações de 1,0 e 1,5%. Pode-se notar que a atividade da enzima, em solução aquosa, foi maior quando imobilizada nas fibras do que quando na forma livre em todas as concentrações avaliadas.

Para o substrato de amido de trigo germinado, na concentração de 1,0% houve diferença significativa entre a atividade da α-amilase livre e imobilizada, enquanto que em 1,5 e 2,0% não foi observada diferença estatística (Figura 8b). Porém, verificou-se que a atividade da α-amilase livre foi sucintamente maior (1,0 e 2,0%) quando comparada à forma imobilizada e em 1,5% obteve-se o mesmo valor de atividade para a enzima livre e imobilizada.

Para o substrato de amido de trigo não germinado, em todas as concentrações testadas, houve diferença significativa na atividade enzimática para a forma livre e imobilizada, sendo que os maiores valores de atividade foram para a forma imobilizada (Figura 8c).

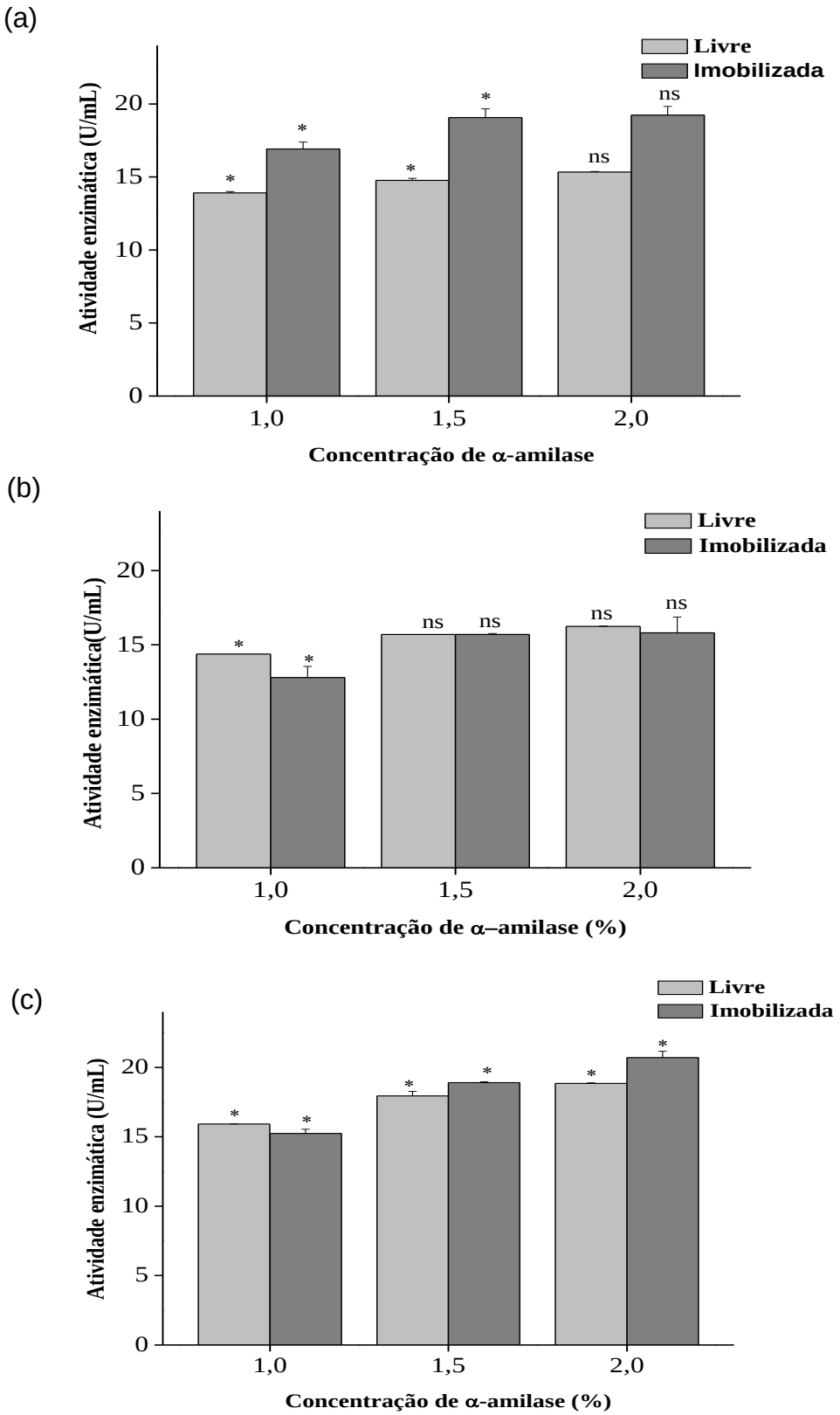


Figura 8 - Atividade enzimática em U/mL da α-amilase livre e imobilizada (a) substrato amido de milho (b) substrato amido de trigo germinado e (c) substrato amido de trigo não germinado.

Diferença significativa (*) e não significativa (ns) quando comparada a atividade da enzima livre e imobilizada na mesma concentração.

Esta melhora na atividade catalítica da enzima imobilizada pode ser atribuída a mínima resistência à difusão, visto que o substrato e o produto moveram-se livremente dentro da rede de fibras porosas, aumentando assim a interação enzima-substrato (CHRONAKIS, 2015). Sugere-se também que, a maior atividade enzimática da α-amilase imobilizada nas fibras de PVA é devido aos sítios de ligação da molécula de PVA, ou seja, interações dos grupos funcionais hidroxilas do PVA com a enzima (DOGAÇ et al., 2017).

Além disso, foi observado que como a atividade da α-amilase foi preservada após o processo de imobilização por *electrospinning*, nem as forças eletrostáticas do processo de eletrofiação e nem as interações intermoleculares polares com o PVA, afetaram a atividade da enzima, similar ao encontrado no estudo de MORENO – CORTEZ, et al. (2015).

6.2.3 Capacidade de carregamento

A capacidade de carregamento da enzima α-amilase imobilizada nas fibras de PVA está apresentada na Figura 4. As fibras de PVA exibiram uma alta capacidade de carregamento da enzima, que foi de 37,52 $mg.g^{-1}$ para 1% de enzima, 48,41 $mg.g^{-1}$ para 1,5% de enzima e 52,11 $mg.g^{-1}$ para 2% de enzima. Esta boa capacidade de carga da enzima está atribuída principalmente a estrutura tridimensional do material de suporte (PVA) em conjunto com sua interconectividade e porosidade (SAALLAH et al., 2016).

Assim como na atividade enzimática, conforme aumentou a concentração de enzima, aumentou a capacidade de carregamento da enzima nas fibras, nas concentrações estudadas. Porém, este fato nem sempre acontece, pois a partir de uma certa quantidade de enzima, ocorre uma diminuição da capacidade de carga da enzima no suporte devido ao excesso desta no suporte sólido (MORENO-CORTES et al., 2015).

A relação entre a capacidade de carregamento da α-amilase, atividade enzimática e sua atividade específica (definida como unidades de atividade por miligrama de α-amilase) pode ser observada na Tabela 4. Nas concentrações de enzima estudadas, quanto maior a concentração de α-amilase nas fibras de PVA, maior foi sua capacidade de carregamento e atividade enzimática. Porém,

a atividade específica foi inversamente proporcional a capacidade de carregamento e à atividade enzimática.

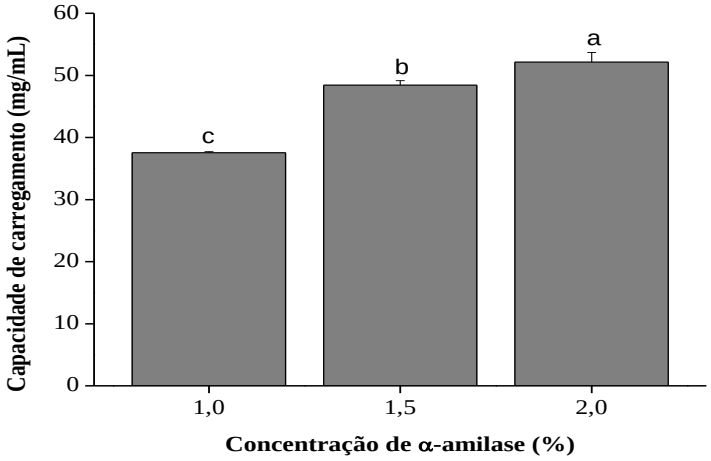


Figura 9 - Capacidade de carregamento da enzima α-amilase em diferentes concentrações (1 % (p/v); 1,5 % (p/v) e 2 % (p/v)), em fibras de PVA.

Valores com a mesma letra em uma coluna não diferiram significativamente (p> 0,05).

Pinto et al. (2015) ao imobilizar tripsina em fibras de poli(ε-caprolactona) via técnica de *electrospinning*, também observaram que conforme aumentava a capacidade de carregamento da enzima sua atividade específica diminuía. Moreno-Cortez et al. (2015) ao imobilizarem papaína nas concentrações de 10 a 35 % em fibras de PVA, utilizando a mesma técnica, observaram que na concentração de 13 % de enzima, a atividade específica da papaína nas fibras atingiu um valor máximo. No entanto, foi observado subsequente diminuição, conforme ocorreu um aumento na concentração da enzima. A eficiência de carregamento aumentou com a concentração da enzima, porém ocorreu uma queda acentuada na sua atividade. Esses autores relacionaram estes resultados à limitação da enzima ao substrato devido ao aprisionamento desta no suporte sólido.

Tabela 4 - Comparação de diferentes concentrações de α-amilase imobilizada e em diferentes substratos, e sua atividade específica.

Substrato[a]	α-amilase (%)	Capacidade de carregamento ($mg.g^{-1}$)	Atividade enzimática ($U.mL^{-1}$)	Atividade específica ($U.mL.mg^{-1}$ de α-amilase imobilizada)
Amido de milho	1,0	37,52	16,91	0,45
	1,5	48,41	19,06	0,39
	2,0	52,11	19,22	0,36
Amido de trigo germinado	1,0	37,52	12,79	0,34
	1,5	48,41	15,69	0,32
	2,0	52,11	15,80	0,30
Amido de trigo não germinado	1,0	37,52	15,23	0,40
	1,5	48,41	18,89	0,39
	2,0	52,11	20,70	0,39

6.2.4 Estabilidade enzimática em diferentes temperaturas

A estabilidade a diferentes temperaturas (30 – 80 °C) da α-amilase livre e imobilizada nas fibras de PVA, foi avaliada através da atividade enzimática, utilizando três substratos de amido (Figura 10). Como pode ser observado nas Figuras 10a, 10b e 10c, em geral, a atividade enzimática da α-amilase em solução aquosa, para todos os substratos de amido, foi maior na forma imobilizada do que na forma livre. Como era previsto, a atividade da enzima aumentou a medida que a temperatura foi elevada a um nível máximo, ocorrendo uma diminuição após essa temperatura ótima. Esse resultado pode ser associado a desnaturação enzimática (PINTO et al., 2015).

A partir da Figura 10 pode-se observar que a temperatura ótima de atividade da α-amilase na forma livre e imobilizada, para os diferentes

substratos, foi de 60 °C e 50 °C, respectivamente. Porém, na maior temperatura avaliada (80 °C) a enzima na sua forma imobilizada apresentou em média 80% da sua atividade, enquanto que na forma livre a atividade foi de apenas 36% em média, para os diferentes substratos de amido.

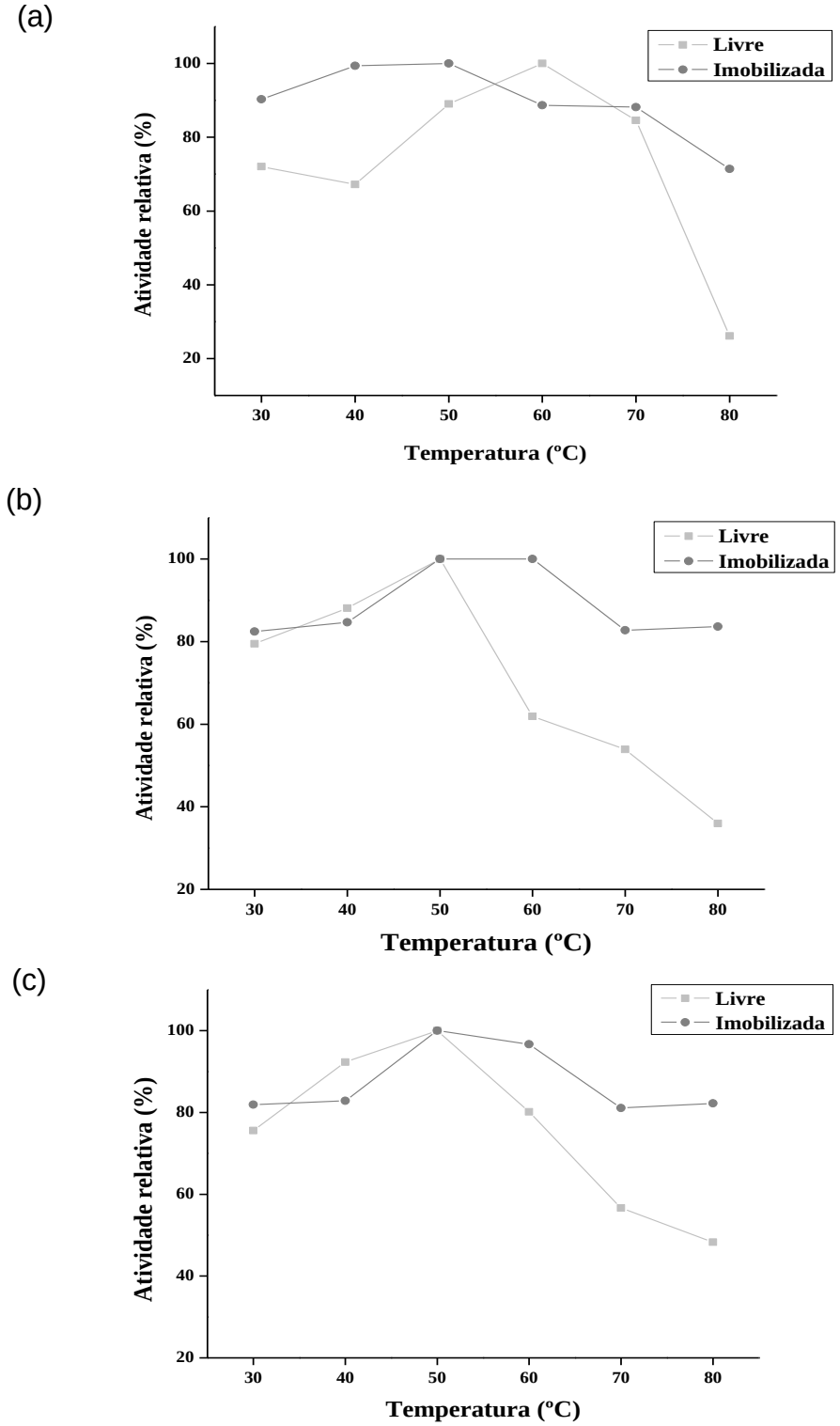


Figura 10 - Atividade enzimática relativa da α-amilase livre e imobilizada a diferentes temperaturas e substratos (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado.

Segundo Oktay, Demir, Kayaman-Apohan (2015), quando uma enzima está conectada à uma superfície sólida em multipontos, a sua estabilidade térmica pode ser aumentada.

Essa maior termoestabilidade para a enzima imobilizada comparada a sua forma livre, também pode estar associada a taxas mais baixas de desnaturação correspondente ao aprisionamento e menor flexibilidade da enzima (PINTO et al., 2015). Além disso, a imobilização em fibras de PVA ocasionou um aumento da rigidez conformacional da estrutura proteica, limitando mudanças conformacionais extremas, resultando em uma maior estabilidade em relação a desnaturação térmica (HOMAEI; SABERI, 2015; EMAN et al., 2017).

Comparando os três substratos de amido, a atividade enzimática, tanto na forma livre como imobilizada, foi maior quando utilizado o amido de trigo germinado (Figura 10b).

Essa maior susceptibilidade ao ataque enzimático no amido de trigo germinado, comparado ao amido de milho e de trigo não germinado, pode estar atribuída a estrutura de superfície dos grânulos menos ordenada, pois o amido já foi parcialmente digerido durante o período de germinação (NODA et al., 2004).

6.2.5 Estabilidade enzimática em diferentes valores de pH

Além da termoestabilidade enzimática outro parâmetro importante testado foi a estabilidade em diferentes faixas de pH (4,0-8,0), da enzima livre e imobilizada, nos três substratos de amido.

A partir da Figura 11 pode-se verificar que a atividade da α-amilase em solução aquosa se manteve estável quando utilizada na sua forma imobilizada, em todos os valores de pH testados, para os três substratos de amido. Já quando testada a atividade enzimática na sua forma livre, a estabilidade da enzima diminuiu consideravelmente para todos os substratos de amido. A atividade máxima na forma imobilizada foi observada em pH 6,0, para o amido de milho e pH 5,0 para os amidos de trigo germinado e não germinado. Na sua forma livre, a maior atividade foi verificada em pH 5,0 para o amido de milho e trigo não germinado e pH 6,0 para o amido de trigo germinado.

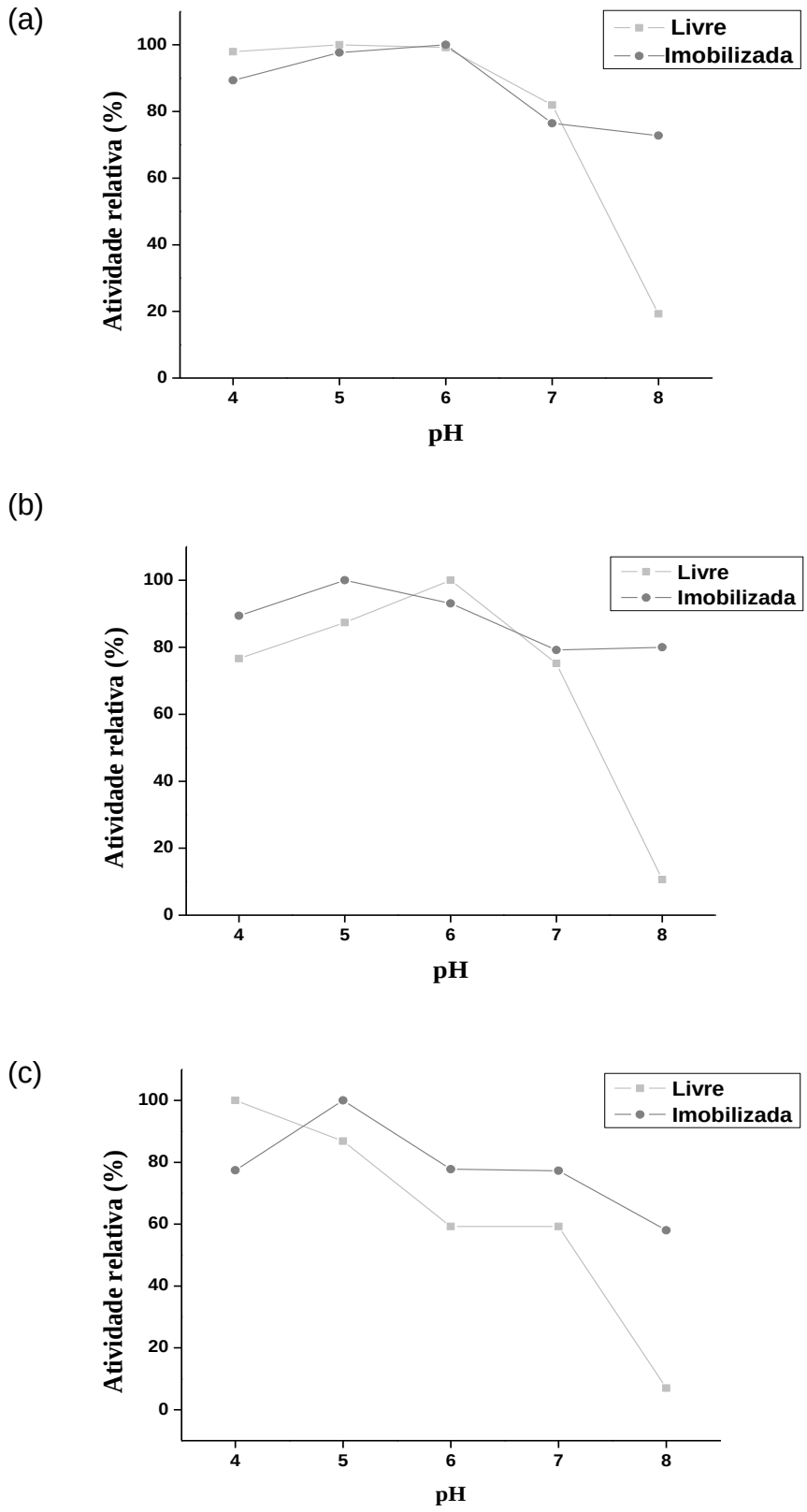


Figura 11 - Atividade enzimática relativa da α-amilase livre e imobilizada a diferentes valores de pH e substratos (a) amido de milho, (b) amido de trigo germinado e (c) amido de trigo não germinado.

Quando avaliada a atividade da α-amilase em solução tampão pH 8,0 utilizando o substrato de amido de milho, a atividade se manteve em cerca de 70% na forma imobilizada, quando na sua forma livre era de apenas 19%. Para o substrato de amido de trigo germinado, a atividade da enzima na forma imobilizada se manteve em 80% e na forma livre em 10% e quando utilizado o substrato de amido de trigo não germinado a atividade enzimática era de 58%, na forma imobilizada, contra 7 % na forma livre.

Oktay et al. (2015) ao imobilizar α-amilase em fibras eletrofuncionais enxertadas com poli(metacrilato de glicidila) por polimerização por transferência radical iniciada por superfície (ATRP) também avaliou a atividade enzimática em diferentes faixas de pH (4,0-8,0). Os autores observaram que a enzima na forma imobilizada manteve sua atividade mesmo nos extremos de pH, enquanto que nestes mesmos valores a enzima na forma livre diminuiu sua atividade. Em suma, a α-amilase imobilizada se manteve estável em valores amplos de pH.

6.3 Avaliações das fibras com enzima imobilizada após reticulação com vapor de glutaraldeído

6.3.1 Morfologia

A partir da Figura 12 pode-se observar as imagens de MEV para as fibras de PVA com α-amilase imobilizada reticuladas em diferentes tempos.

É possível verificar que as fibras, após o processo de reticulação com vapor de glutaraldeido durante os tempos de 1, 2, 3 e 4 h (Figuras 12b, 12c, 12d e 12e), formaram uma rede de conexão inter-fibras, produzindo uma estrutura mais densa e compacta entre as fibras, quando comparada as fibras sem reticulação, porém ainda manteve parte da sua morfologia fibrosa (Figura 12a).

Esta característica é atribuída a redução das propriedades de solubilidade do polímero e de dilatação da membrana, quando expostas em um ambiente saturado de vapor de glutaraldeido, que evita a perda do polímero durante a dissolução em meio aquoso e subsequente lixiviação da enzima. Além disso, essa mudança na estrutura das fibras pode favorecer a redução da liberação da enzima para o meio, devido a diminuição da área superficial (FAZEL et al., 2016).

Segundo Shaikh et al. (2012) o sistema de reticulação compreende a ligação química entre os grupos hidroxil da molécula de PVA com os grupos aldeído da molécula do glutaraldeído, principalmente.

Entretanto, como um reagente bifuncional, o glutaraldeído é fortemente reativo também para os grupamentos amina disponíveis na molécula da enzima, podendo inserir numerosas ligações covalentes entre os compartimentos da membrana compósita (FAZEL et al., 2016).

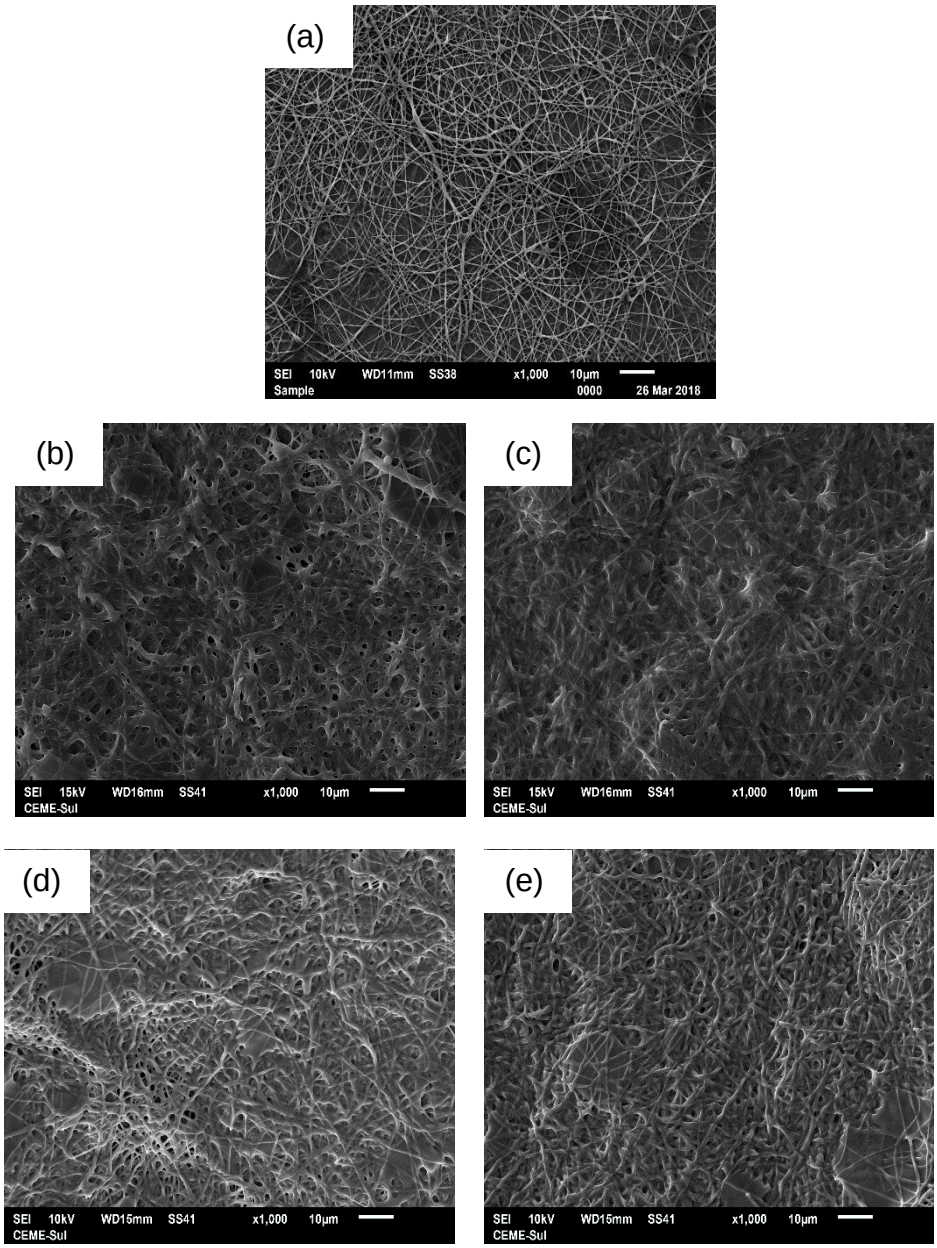


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibras ultrafinas de PVA com α-amilase: (a) fibras sem reticulação; (b) fibras após 1 h de reticulação; (c) fibras após 2 h de reticulação; (d) fibras após 3 h de reticulação e (e) fibras após 4 h de reticulação. Magnitude de 1000X.

Wu et al. (2005) ao realizarem reticulação em nanofibras de PVA com celulase imobilizada, nos tempos de 1, 2 e 4 h, também verificaram mudanças na morfologia das fibras. Os autores observaram que após a reticulação as nanofibras tornaram-se densamente empacotadas devido a conglutinação entre as moléculas de PVA, e como resultado a área superficial foi reduzida, dificultando o acesso do substrato a enzima.

6.3.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática da α-amilase imobilizada nas fibras de PVA, utilizando diferentes substratos de amido e após 0, 1, 2, 3 e 4 horas de reticulação, está apresentada na Figura 13.

Como pode ser observado a atividade enzimática da α-amilase imobilizada diminuiu gradualmente conforme o aumento do tempo de reticulação com vapor de glutaraldeído, para todos os substratos utilizados, quando comparada a sua atividade sem reticulação (Figuras 13a, 13b e 13c).

Como já é conhecido, a reticulação exerce grande influência na atividade de enzimas imobilizadas, pois pode ocorrer a diminuição da porosidade das fibras, limitando a acessibilidade do substrato ao sitio ativo da enzima (WANG, et al., 2009).

Além disso, durante o processo de reticulação a enzima é complementarmente ligada a molécula de PVA, dificultando ainda mais o acesso ao substrato e, consequentemente, diminuindo a sua atividade catalítica (WU; YUAN; SHENG, 2005).

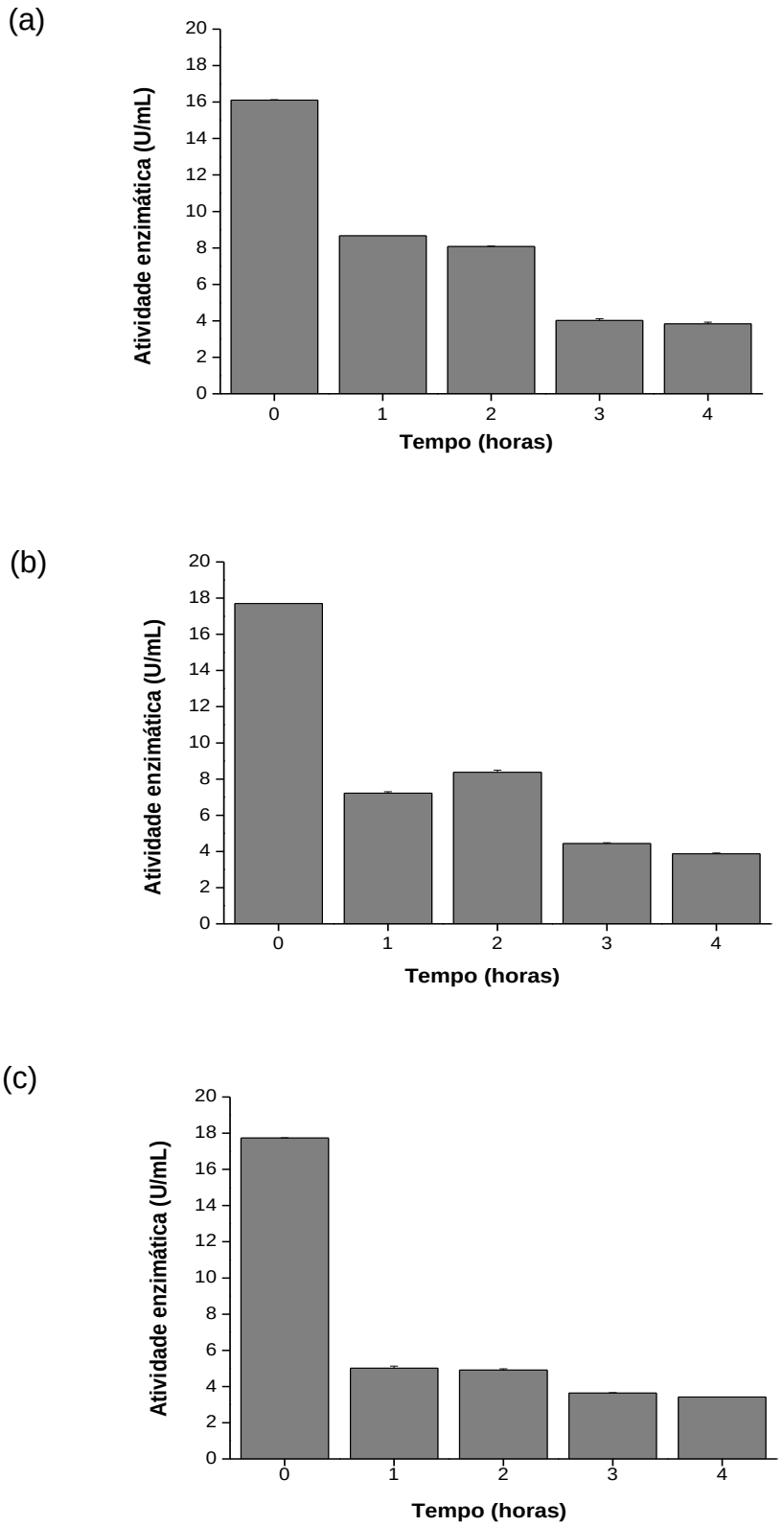


Figura 13 - Atividade enzimática em U/mL da α-amilase imobilizada após diferentes tempos de reticulação (a) substrato amido de milho (b) substrato amido de trigo germinado e (c) substrato amido de trigo não germinado.

6.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A partir da Tabela 5 pode-se observar as temperaturas de decomposição térmica inicial e final e perda de massa das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase imobilizada, após diferentes tempos de exposição ao glutaraldeído em fase de vapor.

Como pode ser visto, houve um aumento da temperatura de decomposição inicial das fibras ultrafinas a partir da primeira hora de reticulação. Com o prolongamento do tempo de reticulação, verificou-se um aumento linear nas temperaturas de decomposição inicial. Além disso, notou-se uma diminuição na temperatura de decomposição final, nos tempos de 1 e 2 horas de reticulação, em comparação com as fibras sem reticulação.

Também observou-se que a perda de massa das fibras ultrafinas, entre 180 - 490 °C, diminuiu até as 3 horas de reticulação, e praticamente manteve essa perda a partir de 4 horas, comparada as fibras sem reticulação.

Tabela 5 - TGA das fibras ultrafinas de PVA com α-amilase imobilizada, em diferentes tempos de reticulação com glutaraldeído em fase de vapor.

Amostras	Tdi (°C)[a]	Tdf (°C)[b]	Perda de Massa (%) (180 – 490 °C)
Fibras 0h	180,1	478,8	74,4
Fibras 1h	240,2	424,6	63,2
Fibras 2h	260,8	467,8	56,9
Fibras 3h	263,8	479,8	71,0
Fibras 4h	275,0	486,2	75,0

[a]Tdi: Temperatura de decomposição inicial

[b]Tdf: Temperatura de decomposição final

Segundo Tang et al. (2014), o processo de reticulação permite ligações covalentes entre a enzima e a fibra, podendo ocorrer o aumento da inflexibilidade da estrutura da enzima, aumentando sua rigidez e ocasionando a melhora na estabilidade térmica.

Esses resultados vão de encontro aos relatados nas análises de morfologia (seção 6.3.1) e atividade enzimática (seção 6.3.2) após os diferentes tempos de reticulação das fibras ultrafinas. Após a reticulação, as fibras ultrafinas apresentaram morfologia mais densa e compacta, melhorando a estabilidade térmica e, consequentemente, impactando na atividade enzimática.

7 CONCLUSÕES

A α-amilase foi imobilizada com sucesso em fibras de PVA pela técnica de *electrospinning*. O aumento da concentração de enzima nas fibras ultrafinas de PVA modificou sua morfologia, aumentando o diâmetro médio à medida que a concentração da enzima aumentou.

A atividade enzimática da α-amilase foi maior na forma imobilizada do que na forma livre quando foram utilizados os substratos de amido de milho, nas concentrações 1 e 1,5%, e amido de trigo não germinado, em todas as concentrações avaliadas.

O PVA exibiu boa capacidade de carga para α-amilase, servindo como excelente suporte para a imobilização de enzimas. A atividade de α-amilase a 80 °C na forma imobilizada foi mantida em 80%, enquanto na forma livre, sua média foi de apenas 36%, para todos os substratos utilizados. Ao avaliar a atividade enzimática em pH 8,0 utilizando os substratos de amido de trigo germinado e não germinado, a forma imobilizada manteve sua atividade em 80% e 58%, enquanto que na forma livre, a atividade foi de apenas 10% e 7%, respectivamente.

O amido de trigo germinado apresentou a maior atividade enzimática da α-amilase imobilizada em diferentes temperaturas e valores de pH (quando os diferentes substratos foram comparados), indicando seu grande potencial para aplicação na hidrólise da α-amilase, mas pelos resultados obtidos, verificou-se que todos os amidos avaliados apresentaram boas características para utilização como substratos na hidrólise com α-amilase imobilizada.

O processo de reticulação com glutaraldeído em fase de vapor, nos diferentes tempos de exposição, modificou a morfologia das fibras e diminuiu a atividade enzimática, em todos os substratos avaliados. Porém, a reticulação promoveu um aumento na temperatura de decomposição inicial das fibras com α-amilase imobilizada, proporcionando uma maior estabilidade térmica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. American Association of Cereal Chemists. In. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists.** AACC International. 11 ed. Saint. Paul, MN, U.S.A, 2010.

BARANZELLI, J. **Germinação pré-colheita e induzida de trigo: atividade enzimática, propriedades físico-químicas, reológicas, de panificação e teor de ácido γ-aminobutírico.** 92 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

BARANZELLI, J.; KRINGEL, D. H.; COLUSSI, R.; PAIVA, F. F.; ARANHA, B. C.; MIRANDA, M. Z.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. D. Changes in enzymatic activity, technological quality and gamma aminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 483–490, 2018.

BERNFELD, P. α and β-amylases. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-158, 1955.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254, 1976.

BRUNI, G. P., OLIVEIRA, J. P., HALAL, E., MELLO, S. L., FLORES, W. H., GUNDEL, A., & ZAVAREZE, R. Phosphorylated and cross-linked wheat starches in the presence of polyethylene oxide and their application in biocomposite films. **Starch-Stärke,** p. 1-9, 2018.

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

COPOLATTI, E. P.; SILVA, M. J. A; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization: Review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 99, p. 56– 67, 2014.

CRUZ, M. V. **Imobilização de α-amilase em blendas de pectina-pva.** 84 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, 2013.

DENARDIN, C. C., DA SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 1-10, 2008.

DENDY, D.A.V.; DOBRASZCZYK, B.J. **Cereales y productos derivados: química y tecnología.** Zaragoza: Acribia, 2001, 537p.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α-amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2014.

DOGAÇ, Y. I.; DEVECIB, I.; MERCIMEKC, B.; TEKE, M. A comparative study for lipase immobilization on to alginate based composite electrospun nanofibers with effective and enhancedstability. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 96, p. 302–311, 2017.

EMAN, A.; KARAM, W. A.; ABDEL W. S. A. A.; SALEH M. E.; HASSAN A. L.; KANSOH MONA A. E. Production, Immobilization and Thermodynamic Studies of Free and Immobilized Aspergillus awamori Amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p. 694-703, 2017.

FAZEL, R.; TORABI, S.-F.; NASERI-NOSAR, P.; GHASEMPUR, S.; RANAEI-SIADAT, 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.

FREITAS, A. C. **Desenvolvimento de novas tecnologias para produção de xarope de glicose a partir de amido.** 102 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α-amilase de *Syncephalastrum racemosum.* **Revista Brasileira de Biociências.** v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

GE, L.; ZHAO, Y.-L.; MO, T.; LI, J.-R.; LI, P. Immobilization of glucose oxidase in electrospun nanofibrous membranes for food preservation. **Food Control**, v. 26 p. 188-193, 2012.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrosprayed gelatina submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food hydrocolloids**, v. 49, p. 42-52, 2015.

GONTARD, N.; GUILBERT, S; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films-influence of the main process variables on films properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

HOMAEI, A.; SABERI, D. Immobilization of α-amylase on gold nanorods: An ideal system forstarch processing. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1394–1399, 2015.

JIA, H.; ZHU, G.; VUGRINOVICH, B.; KATAPHINAN, W.; RENEKER, D. H.; WANG, P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. **Biotechnology Prog**. v. 18, p. 1027-1032, 2002.

JI, Y.; YU, J. In vitro digestion and physicochemical characteristics of corn starch mixed with amino acid modified by heat-moisture treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 720-725, 2018.

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.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 35, p. 126–139, 2004.

LI, L.; CHEN, H.; WANG, M.; LV, X.; ZHAO, Y.; XIA, L. Development and characterization of irradiated-corn-starch films. **Carbohydrate Polymers,** v. 194, p. 395-400, 2018.

LIU, D.-M., CHEN, J., SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.

LIU, Y.; JIA, S.; RAN, J.; WU, S. Effects of static magnetic field on activity and stability of immobilized α-amylase in chitosan bead. **Catalysis Communications**, v. 11, p. 364–367, 2010.

LUCHESE, C. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 619–626, 2017.

MCGRANE, S. J.; CORNELL, H. J.; RIX, C.J. A. simple and rapid colourimetric method for determination of amylose in starch products. **Starch/Stärke**, v.50, p. 158-163, 1998.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. –T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in food science & technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MORENO-CORTEZ, I. E.; ROMERO-GARCIA, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; GARCÍA-GUTIERRES, 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**, v. 52, p. 306–314, 2015.

NODA, T.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; SAITO, K.; TAKATA, K.; TABIKI, T.; WICKRAMASINGH, H. A. M.; YAMAUCHI, H. The physicochemical properties of partially digested starch from sprouted wheat grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 271–277, 2004.

OLIVEIRA, G. A. V. **Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de α-amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja.** 68 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, 2017.

OKTAY, B.; DEMIR, S.; KAYAMAN-APOHAN, N. Immobilization of α-amylase on to poly(glycidyl methacrylate) grafted electrospun fibers by ATRP. **Materials Science and Engineering C**, v. 50, p. 386–393, 2015.

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

PINTO, M. P. **Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada.** 40 f. 2009. Diassertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2009.

RABEK, J. F. Experimental methods in polymer chemistry: applications of wide-angle X-ray diffraction (WAXD) to the study of the structure of polymers. **Wiley Interscience**, Chichester, 1980.

RAO, U. J. S. P.; HEMALATHA, M. S. **Products science and technology**, Second Edition, chapter 15: Enzymes, 275-294, 2014.

REN, G.; XU, X.; LIU, Q.; CHENG, J.; YUAN, X.; WUAN, Y. Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p. 1559–1564, 2006.

REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê amidos. Editora Insumos LTDA, n. 35, p. 31-56, 2015.

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

SHAIKH, P. R.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y.; TOIT, L. C DU.; PILLAY, V. Crosslinked electrospun PVA nanofibrous membranes: elucidation of their physicochemical, physicomechanical and molecular disposition. **Biofabrication**, v. 4, p. 1-21, 2012.

SINGH, K.; SRIVASTAVA, G.; TALAT, M.; SRIVASTAVA, O. N.; KAYASTHA, A. M. α-Amylase immobilization on to functionalized graphene nanosheets as scaffolds: Its characterization, kinetics and potential applications in starch based industries. **Biochemistry and Biophysics Reports,** v. 3, p. 18–25, 2015.

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.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α-Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

TANG, C., SAQUING, C. D., SARIN, P. K., KELLY, R. M., KHAN, S. A. **Journal of Membrane Science**, v. 472, p. 251–260, 2014.

TOMIĆ, J., TORBICA; A., POPOVIC, L.; HRISTOV, N.; NIKOLOVSKI, B. Wheat breadmaking properties in dependance on wheat enzymes status and climate conditions. **Food Chemistry**, v. 199, p. 565–572, 2016.

UTRILLA-COELLO, R. G., HERNÁNDEZ-JAIMES, C., CARRILLO-NAVAS, H., GONZÁLEZ, F., RODRÍGUEZ, E., BELLO-PEREZ, L. A., & ALVAREZ-RAMIREZ, J. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 596-602, 2014.

WANG, Z.-G.; WAN, L.-S.; LIU, Z.-M.; HUANG, X.-J.; XU, Z.-K. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 56, p. 189–195, 2009.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

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

YAN, Z.; QI, G.; NAN, F.; JIN-RONG, W.; SHU-JUN, W.; ZHONG-HU, H. Characterization of A- and B-type starch granules in Chinese wheat cultivars. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 10, p. 2203–2214, 2016.

ZAVAREZE, E. R; DIAS, A. R. G. **Propriedades físico-químicas, funcionais e aplicações de amido de arroz. Qualidade de arroz da pós-colheita ao consumo.** Pelotas: Editora UFPel, cap. 10, p. 161-171, 2012.

ZHANG, B., WU, C., LI, H., HU, X., JIN, Z., TIAN, Y., & XU, X. Long-term annealing of C-type kudzu starch: Effect on crystalline type and other physicochemical properties. **Starch-Stärke**, v. 67, 577-584, 2015.