

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LIVIA SILVA BISPO

MARIA EDUARDA GIBERTONI MIGUEL

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROANALÍTICA DE
BIOSENSORES DE ALFA-AMILASE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

ALFENAS

2025

LÍVIA SILVA BISPO
MARIA EDUARDA GIBERTONI MIGUEL

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROANALÍTICA DE BIOSENSORES
DE ALFA-AMILASE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia - Bacharelado pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Bioeletroquímica
Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

ALFENAS MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Bispo, Livia Silva.

Elaboração e caracterização eletroanalítica de biossensores de alfa-amilase para aplicações biotecnológicas / Livia Silva Bispo, Maria Eduarda Gibertoni Miguel. - Alfenas, MG, 2025.

44 f. : il. -

Orientador(a): José da Silva Ferreira Schneedorf.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Alfa-amilase. 2. Biossensor. 3. Imobilização. 4. Eletroanálise. 5. Bioquímica. I. Miguel, Maria Eduarda Gibertoni. II. Schneedorf, José da Silva Ferreira, orient. III. Título.


Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LÍVIA SILVA BISPO
MARIA EDUARDA GIBERTONI MIGUEL

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROANALÍTICA DE
BIOSSENSORES DE ALFA-AMILASE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia - Bacharelado pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Bioeletroquímica

Aprovada em 24 de outubro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 JOSE MAURICIO SCHNEEDORF FERREIRA DA SILVA
Data: 17/12/2025 08:27:58-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. José Maurício S. Ferreira da Silva Assinatura:

Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira

Assinatura:

Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Gabriel Hornink

Assinatura:

Universidade Federal de Alfenas

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pelos recursos institucionais, infraestrutura laboratorial e condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agência de fomento responsável pela concessão da bolsa que viabilizou a execução deste projeto, cujo apoio foi fundamental para a realização das atividades de pesquisa.

Ao nosso orientador, Prof. Dr. José Maurício S. Ferreira da Silva, pela orientação científica, apoio contínuo, disponibilidade e contribuições decisivas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira e Prof. Dr. Gabriel Hornink, pelas leituras atentas, sugestões construtivas e contribuições valiosas para o aprimoramento desta pesquisa.

Às nossas famílias e aos nossos amigos, pelo apoio constante, incentivo e compreensão ao longo de toda a trajetória acadêmica.

RESUMO

Os biossensores eletroanalíticos têm grande potencial para a detecção de biomoléculas em áreas clínicas, ambientais e industriais, oferecendo vantagens como alta sensibilidade, portabilidade e baixo custo em relação aos métodos tradicionais. Este estudo descreve o desenvolvimento de um biossensor baseado na imobilização adsortiva de alfa-amilase em matriz complexa, enzima responsável pela hidrólise do amido em açúcares redutores, visando a aplicação em monitoramento biotecnológico, principalmente na indústria cervejeira. Ensaio colorimétricos (Teste de Complexação Amido-Iodo (Lugol) e Teste do ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS)) avaliaram a atividade catalítica da enzima, mostrando, no Lugol, uma redução significativa da coloração azul nos primeiros 10 minutos e, no DNS, uma relação linear entre a concentração de maltose e a intensidade de absorbância, possibilitando a construção de curvas de calibração confiáveis. As análises eletroquímicas, realizadas por voltametria cíclica e cronoamperometria, indicaram um comportamento hiperbólico da corrente de pico anódica até 20 minutos, refletindo a cinética da hidrólise enzimática e confirmando a correlação entre a concentração enzimática e a intensidade do sinal. Comparando métodos de imobilização de adsorção quiescente e adsorção física, o carbono vítreo teve resposta linear satisfatória, comprovada pelo valor de R^2 , a pasta de carbono apresentou menor estabilidade catalítica, e os eletrodos de fase sólida (SPE - Screen-printed Electrode) se destacaram por maior reprodutibilidade e sensibilidade, com diferenças estatísticas significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$). A validação do sistema foi realizada em mosturação de malte de cevada cervejeiro, onde o biossensor monitorou a conversão do amido em açúcares fermentáveis por 30 minutos, com resultados confirmados pelo teste de Lugol, que mostrou redução da coloração azul da amilose. Esses resultados confirmam a viabilidade da imobilização de alfa-amilase em eletrodos de fase sólida como uma estratégia eficaz e de baixo custo para o desenvolvimento de biossensores, com grande potencial para o controle de processos biotecnológicos e industriais, especialmente no setor de alimentos e bebidas, além de aplicações clínicas e ambientais.

Palavras chave: Alfa-amilase; biossensor; imobilização; eletroanálise.

ABSTRACT

Electroanalytical biosensors have great potential for detecting biomolecules in clinical, environmental, and industrial fields, offering advantages such as high sensitivity, portability, and low cost compared to traditional methods. This study describes the development of a biosensor based on the adsorptive immobilization of alpha-amylase in a complex matrix, an enzyme responsible for the hydrolysis of starch into reducing sugars, aiming at its application in biotechnological monitoring, mainly in the brewing industry. Colorimetric assays (Starch–Iodine Complexation Test (Lugol) and the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) Test) evaluated the catalytic activity of the enzyme, showing, in the Lugol test, a significant reduction in the blue coloration in the first 10 minutes and, in the DNS test, a linear relationship between maltose concentration and absorbance intensity, enabling the construction of reliable calibration curves. Electrochemical analyses, performed by cyclic voltammetry and chronoamperometry, indicated a hyperbolic behavior of the anodic peak current up to 20 minutes, reflecting the kinetics of enzymatic hydrolysis and confirming the correlation between enzyme concentration and signal intensity. Comparing immobilization methods of quiescent adsorption and physical adsorption, glassy carbon showed a satisfactory linear response, confirmed by the R^2 value, carbon paste presented lower catalytic stability, and solid-phase electrodes (SPE – Screen-Printed Electrode) stood out due to higher reproducibility and sensitivity, with statistically significant differences (Tukey test, $p < 0.05$). System validation was carried out in barley malt brewing mash, where the biosensor monitored the conversion of starch into fermentable sugars for 30 minutes, with results confirmed by the Lugol test, which showed a reduction in the blue coloration of amylose. These results confirm the feasibility of alpha-amylase immobilization on solid-phase electrodes as an effective and low-cost strategy for the development of biosensors, with great potential for the control of biotechnological and industrial processes, especially in the food and beverage sector, in addition to clinical and environmental applications.

Keywords: Alpha-amylase; biosensor; immobilization; electroanalysis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	7
REVISÃO LITERÁRIA.....	8
ESTRUTURA, FUNÇÃO E IMPORTÂNCIA DA ALFA-AMILASE	8
MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA	9
TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ...	10
APLICAÇÕES PRÁTICAS DA ALFA-AMILASE EM MATRIZES COMPLEXAS	11
1. ARTIGO.....	13
REFERÊNCIAS.....	37

INTRODUÇÃO GERAL

A Biotecnologia tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias inovadoras para detecção e monitoramento de biomoléculas, destacando-se os biossensores como ferramentas sensíveis e seletivas, aplicáveis em processos industriais e pesquisas científicas. Esses dispositivos combinam um elemento biológico de reconhecimento, como enzimas ou anticorpos, a um transdutor físico-químico que converte a resposta biológica em sinal mensurável, geralmente elétrico. Sensores eletroquímicos são particularmente relevantes devido à sua sensibilidade, portabilidade e baixo custo, sendo técnicas como cronoamperometria amplamente empregadas para monitorar a atividade enzimática (Grieshaber *et al.*, 2008).

A alfa-amilase (EC 3.2.1.1) é uma enzima de grande importância biotecnológica, responsável pela hidrólise de ligações α -1,4 em polissacarídeos como o amido, liberando açúcares fermentáveis. Sua aplicação abrange setores como produção de biocombustíveis, alimentos, bebidas e detergentes, destacando-se pela eficiência catalítica e versatilidade em diferentes condições industriais (Janecek *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2020).

A imobilização da alfa-amilase em eletrodos de carbono, incluindo pasta de carbono e eletrodos de fase sólida (SPE - Screen-printed Electrode), permite a construção de biossensores reprodutíveis e estáveis, proporcionando medições eletroquímicas confiáveis da atividade enzimática. Complementarmente, métodos colorimétricos clássicos, como Teste de Complexação Amido-Iodo (Lugol) e Teste do ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS), podem ser utilizados para validação visual ou espectrofotométrica da hidrólise do amido (Mafakher *et al.*, 2022; Syaffinaz *et al.*, 2022).

Dessa forma, o desenvolvimento e a caracterização de biossensores baseados em alfa-amilase oferecem soluções eficientes para aplicações biotecnológicas, incluindo controle de qualidade de alimentos, monitoramento ambiental e processos fermentativos, como a produção de cerveja. Assim, o presente trabalho teve como objetivo elaborar e caracterizar biossensores eletroanalíticos de alfa-amilase, comparando diferentes estratégias de imobilização e avaliando sua aplicabilidade em matriz real (mosturação cervejeira), a fim de demonstrar sua viabilidade prática em sistemas biotecnológicos.

REVISÃO LITERÁRIA

ESTRUTURA, FUNÇÃO E IMPORTÂNCIA DA ALFA-AMILASE

A alfa-amilase (α -1,4-glucano-glucanohidrolase) é uma hidrolase da família das glicosil-hidrolases responsável pela clivagem de ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) em polissacarídeos como amido e glicogênio, originando glicose, maltose e dextrinas de diferentes tamanhos. Essa enzima é encontrada em organismos distintos, como plantas, microrganismos e animais, desempenhando papel fundamental no metabolismo energético. Em humanos, por exemplo, está presente na saliva (ptialina) e no pâncreas, contribuindo para a digestão de carboidratos (Kandra, 2003).

Do ponto de vista estrutural, a alfa-amilase é uma proteína monomérica de cerca de 50 kDa, composta por três domínios principais. O domínio A apresenta estrutura de barril TIM e abriga o sítio catalítico; o domínio B está associado à ligação de íons cálcio, que estabilizam a estrutura enzimática; e o domínio C confere flexibilidade e participa na interação com o substrato. O mecanismo de catálise envolve resíduos de ácido aspártico e glutâmico, essenciais para a quebra da ligação glicosídica (Kandra, 2003).

As condições ideais de atividade variam de acordo com a origem da enzima. Cepas bacterianas como *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* produzem amilases termoestáveis e ativas em pH alcalino, sendo amplamente utilizadas na indústria de detergentes. Já espécies fúngicas, como *Aspergillus oryzae*, produzem amilases mais adaptadas a condições ácidas, aplicadas principalmente em panificação e fermentação alcoólica (Mafakher *et al.*, 2023).

O fungo *Aspergillus oryzae* apresenta grande relevância biotecnológica, sendo classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (Kandra, 2003; Mafakher *et al.*, 2023). Além de produzir alfa-amilase em quantidades significativas, a cepa produz outras hidrolases de interesse, como proteases e lipases, o que reforça seu papel como microrganismo modelo em processos fermentativos. A alfa-amilase de *A. oryzae* possui atividade ótima em pH levemente ácido (4,5–6,0) e temperatura de 50–55 °C, condições compatíveis com matrizes alimentares como o mosturação cervejeira, sendo responsável pela produção de maltose e dextrinas que favorecem

a fermentação subsequente pelas leveduras. Além disso, trata-se de uma cepa segura, com uso tradicional em bebidas e alimentos orientais, como saquê e shoyu, o que garante sua aceitação regulatória e fortalece sua aplicabilidade industrial. No contexto deste trabalho, a escolha de *A. oryzae* como fonte de alfa-amilase não apenas assegura condições experimentais adequadas, mas também amplia o potencial de aplicação prática do biossensor em indústrias alimentícias e de bebidas.

A determinação da atividade da alfa-amilase possui grande relevância em diferentes áreas. Na indústria de alimentos e bebidas, a quantificação da enzima é crucial para o controle de processos fermentativos e de mosturação. Na biotecnologia, permite o monitoramento da hidrólise de amido para obtenção de xaropes de glicose e produção de bioetanol. Já na área clínica, a dosagem da alfa-amilase em fluidos biológicos é utilizada como ferramenta diagnóstica em distúrbios metabólicos e em patologias pancreáticas (Sharma *et al.*, 2012). Considerando essa diversidade de aplicações, diversas metodologias foram desenvolvidas ao longo do tempo. As técnicas colorimétricas se consolidaram como métodos clássicos pela simplicidade e baixo custo, enquanto os biossensores eletroquímicos vêm ganhando espaço por oferecerem rapidez, alta sensibilidade e aplicabilidade em matrizes complexas.

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA

Os métodos colorimétricos estão entre as abordagens mais tradicionais para quantificação da atividade da alfa-amilase, destacando-se pela simplicidade, baixo custo e ampla difusão em laboratórios de pesquisa e indústrias. De modo geral, essas técnicas exploram alterações de cor provocadas pela hidrólise do amido ou pela formação de produtos da reação enzimática capazes de interagir com reagentes cromogênicos. Entre os ensaios mais empregados nesse grupo encontram-se o Lugol, que avalia indiretamente a hidrólise do amido, e o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), que quantifica indiretamente os açúcares redutores liberados.

O ensaio com Lugol baseia-se na interação entre o iodo e as regiões helicoidais da amilose, que produzem coloração azul intensa. Durante a ação da alfa-amilase, o amido é progressivamente degradado, diminuindo a intensidade da cor, o que pode ser monitorado espectrofotometricamente em 620 nm (Mafakher *et al.*, 2023). Apesar da simplicidade, o

método apresenta limitações em termos de sensibilidade e sofre influência de substâncias interferentes, especialmente em amostras complexas.

O método do DNS, descrito por Miller (1959), tornou-se referência para a determinação de açúcares redutores liberados pela ação enzimática. Nessa reação, o DNS interage em meio alcalino com glicose e maltose, formando um produto alaranjado cuja absorbância é medida em 540 nm. Trata-se de um método robusto, amplamente utilizado em pesquisas e indústrias, embora demande aquecimento e consumo relativamente alto de reagentes. Versões adaptadas em microplacas de 96 poços foram desenvolvidas para reduzir custos e permitir a análise simultânea de várias amostras, aumentando a eficiência experimental (Rauf *et al.*, 2021).

TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O avanço da eletroquímica aplicada ao estudo enzimático permitiu o desenvolvimento de biossensores capazes de detectar alfa-amilase de forma rápida e sensível. Entre as técnicas mais empregadas destacam-se a voltametria cíclica e a amperometria, que permitem monitorar correntes proporcionais à concentração de produtos da reação enzimática, como glicose e maltose (Mello *et al.*, 2008). Para a construção desses sensores, os materiais de carbono são os mais utilizados devido à sua boa condutividade elétrica e estabilidade. O carbono vítreo apresenta elevada área superficial e boa linearidade de resposta, os eletrodos de pasta de carbono oferecem baixo custo e flexibilidade para modificações químicas, enquanto os eletrodos de fase sólida (SPEs) se destacam pela portabilidade, baixo custo e possibilidade de descarte após o uso (Araújo, 2018).

A calibração do sistema eletroquímico é frequentemente realizada utilizando soluções de ferro/ferricianeto de potássio como sonda redox, o que garante a verificação do desempenho do eletrodo antes da aplicação em amostras (EP0541083B1, 1993). Além disso, estratégias enzimáticas acopladas, envolvendo α -glicosidase e glicose oxidase, têm sido empregadas para aumentar a seletividade da detecção de glicose resultante da hidrólise de maltose e dextrinas (Afobmcis, 2016). O uso de nanomateriais, como nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas, também tem sido reportado, ampliando a área ativa e favorecendo a transferência eletrônica, o que permite alcançar limites de detecção ainda mais baixos (Wang, 2005).

APLICAÇÕES PRÁTICAS DA ALFA-AMILASE EM MATRIZES COMPLEXAS

A determinação da atividade amilásica em matrizes reais é desafiadora devido à presença de interferentes, entretanto, representa uma etapa fundamental para validar metodologias analíticas. Na indústria cervejeira, a alfa-amilase é uma das enzimas-chave no processo de mosturação, pois promove a conversão do amido do malte em açúcares fermentáveis em conjunto com a beta-amilase e outras enzimas amilolíticas (Hornink, 2024).. A eficiência dessa etapa impacta diretamente características como teor alcoólico, corpo e perfil sensorial da cerveja (Hillinck *et al.*, 2020). Ensaio colorimétricos são aplicáveis, mas geralmente demandam preparação da amostra, nesse contexto, sensores eletroquímicos têm se mostrado vantajosos, por apresentarem resposta rápida, operação direta em mosturação cervejeira e baixo tempo de análise (Araújo, 2018). Além da cerveja, estudos apontam que a atividade enzimática da amilase também influencia o perfil sensorial de destilados e outras bebidas alcoólicas, demonstrando que a quantificação da enzima está diretamente relacionada à qualidade final do produto (Hillinck *et al.*, 2020).

Em aplicações clínicas, a alfa-amilase é empregada como biomarcador em análises de soro e urina, auxiliando no diagnóstico de pancreatite aguda e de alterações metabólicas. Nesse contexto, o desenvolvimento de sensores descartáveis tem grande potencial para diagnósticos rápidos e de baixo custo (Sharma *et al.*, 2012). No âmbito industrial e ambiental, a alfa-amilase é utilizada para controle de qualidade em processos de produção de etanol, xaropes de glicose e formulações enzimáticas, em que métodos convencionais ainda são adotados, mas há crescente interesse pelo uso de sensores portáteis e automatizados (Mello *et al.*, 2008).

Diante do exposto, observa-se que a alfa-amilase é uma enzima de ampla relevância, tanto no metabolismo biológico quanto em diferentes setores industriais e clínicos. Sua detecção pode ser realizada por métodos clássicos, como Teste de Complexação Amido-Iodo (Lugol) e Teste do ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS), que ainda são amplamente utilizados, mas que apresentam limitações de sensibilidade e aplicabilidade em matrizes complexas. As técnicas eletroquímicas, por outro lado, surgem como alternativas modernas, capazes de oferecer maior rapidez, sensibilidade e possibilidade de aplicação direta em sistemas complexos, como a mosturação cervejeira. Assim, observa-se que, embora os métodos colorimétricos continuem sendo amplamente empregados devido à simplicidade e baixo custo, sua baixa sensibilidade e aplicabilidade restrita em matrizes complexas limitam o alcance dos resultados. As técnicas

eletroquímicas, por outro lado, têm se mostrado alternativas modernas e promissoras, possibilitando maior rapidez, seletividade e aplicação direta em sistemas complexos. No entanto, ainda são escassos os estudos que explorem de forma comparativa diferentes estratégias de imobilização da alfa-amilase em eletrodos e que validem, em condições reais, a aplicabilidade desses biossensores. Diante disso, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e a caracterização de biossensores eletroanalíticos de alfa-amilase, avaliando distintos suportes de imobilização e demonstrando sua viabilidade em matrizes reais, tendo a mosturação cervejeira como um exemplo de aplicação relevante no contexto biotecnológico e industrial.

Considerando as diretrizes institucionais, optou-se pela apresentação dos capítulos seguintes no formato de artigo científico, conforme previsto no Regulamento do Trabalho de Conclusão de Curso do Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Tal formato é permitido desde que sejam mantidos os elementos obrigatórios estabelecidos pelas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), especialmente a NBR 14724/2011 e a NBR 6022/2018, que dispõem sobre a estrutura de trabalhos acadêmicos e artigos científicos. Dessa forma, o presente trabalho articula uma revisão contextual ampla com a produção científica em formato de artigo, assegurando tanto o rigor acadêmico quanto a adequação às exigências formais da instituição.

1. ARTIGO

Elaboração e caracterização eletroanalítica de biossensores de alfa-amilase para aplicações biotecnológicas

Maria Eduarda Gibertoni Miguel
Livia Silva Bispo
José Maurício S. Ferreira da Silva

Resumo

Biossensores eletroanalíticos configuram-se como alternativas sensíveis e de baixo custo para a detecção de biomoléculas em diferentes contextos biotecnológicos e industriais. Neste trabalho, desenvolveu-se e caracterizou-se um biossensor baseado na imobilização de alfa-amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido em açúcares fermentáveis. Ensaios colorimétricos evidenciaram a aplicabilidade dos métodos clássicos: Teste de Complexação Amido-Iodo (Lugol) demonstrou rápida redução da coloração azulada nos primeiros 10 minutos de reação, enquanto o Teste do ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS) apresentou relação linear entre concentração de maltose e absorvância, com valores crescentes de 0,035 a 0,148 (0,3 a 1,8 mg/mL), permitindo a construção de curva de calibração confiável. As análises eletroquímicas, conduzidas por voltametria cíclica e cronoamperometria, revelaram comportamento hiperbólico da corrente anódica até 20 minutos, diretamente proporcional à concentração enzimática. Diferentes suportes de imobilização foram comparados: o carbono vítreo apresentou estabilidade intermediária, a pasta de carbono menor retenção da enzima e os eletrodos de fase sólida ((SPE - Screen-printed Electrode) destacaram-se pela maior sensibilidade e reprodutibilidade, com diferenças significativas em relação aos demais (teste de Tukey, $p < 0,05$). Como exemplo de aplicação prática, o biossensor foi empregado em um processo de mosturação de malte de cevada cervejeira, monitorando de forma eficaz a hidrólise de amido em açúcares fermentáveis. Os resultados confirmam a viabilidade da estratégia proposta para controle de processos biotecnológicos e industriais.

Palavras chave: Alfa-amilase; biossensor; imobilização; eletroanálise.

1. INTRODUÇÃO

A contínua evolução no campo da Biotecnologia tem promovido o desenvolvimento de

¹Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0544849130236328>. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: maria.miguel@unifal-mg.edu.br

²Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2559695105533369>. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: livia.bispo@unifal-mg.edu.br

³Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0436922594542722>. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: jose.dasilva@unifal-mg.edu.br

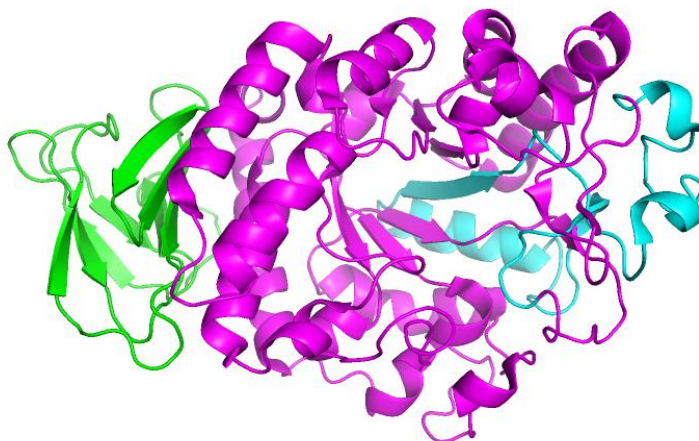
tecnologias cada vez mais avançadas e inovadoras, voltadas para o aprimoramento da detecção e monitoramento de biomoléculas específicas. Nesse cenário, os biossensores destacam-se como ferramentas essenciais, desempenhando um papel crucial em diversas áreas de estudo e aplicações práticas, especialmente no contexto biotecnológico. Esses dispositivos permitem a identificação precisa, sensível e seletiva de biomoléculas de interesse, fornecendo informações que contribuem significativamente para o avanço de processos industriais e de pesquisa.

Os biossensores são sistemas analíticos compostos por um elemento biológico de reconhecimento, como enzimas, anticorpos, células ou ácidos nucleicos, acoplado a um transdutor físico-químico, que converte a resposta biológica em um sinal mensurável, geralmente elétrico, e auxiliado por um mecanismo de detecção (ex: radioatividade, espectroscopia, eletroquímica). Dentre os tipos de transdução de sinal, os sensores eletroquímicos têm se destacado por sua sensibilidade, portabilidade, baixo custo e possibilidade de miniaturização. No desenvolvimento desses sensores, técnicas como voltametria e cronoamperometria são amplamente empregadas para monitorar reações biológicas, permitindo a construção de dispositivos confiáveis e eficazes (Grieshaber *et al.*, 2008).

Entre as biomoléculas de interesse na área biotecnológica, a enzima alfa-amilase (EC 3.2.1.1) ocupa um lugar de destaque devido ao seu papel fundamental na hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos como o amido, liberando unidades menores, como, dextrinas, maltose e glicose. Essa enzima está presente em diversos organismos, incluindo plantas, animais e microrganismos, como fungos e bactérias. Sua função no sistema digestivo e em processos industriais, como a produção de biocombustíveis, alimentos, bebidas e detergentes, reforça sua importância como uma ferramenta biotecnológica de ampla aplicabilidade (Janecek *et al.*, 2014).

Do ponto de vista estrutural, a alfa-amilase é uma proteína monomérica composta por aproximadamente 512 aminoácidos e peso molecular de cerca de 50 kDa. Ela apresenta três domínios principais: o domínio A ($((\beta/\alpha)_8)$), o domínio B (localizado entre uma cadeia e uma hélice do domínio A) e o domínio C (com estrutura em folha associada ao domínio B). O sítio ativo da enzima, onde ocorre a catálise, encontra-se entre os domínios A e B, contendo resíduos essenciais como o glutamato e dois aspartatos (Zorzin, 2014; Buisson *et al.*, 1987).

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da alfa-amilase de *Aspergillus oryzae*



Fonte: Elaborado pelas autoras - Software: PyMol (2025).

Legenda: Representação da estrutura cristalográfica da alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* (PDB ID: 6TAA). O domínio A (TIM barrel) está representado em magenta, o domínio B (ligação a Ca^{2+}) em ciano e o domínio C (β -sanduíche C-terminal) em verde.

Evidencia-se na estrutura cristalográfica da alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* (PDB ID: 6TAA) a organização tripartida característica da família GH13, composta pelos domínios A, B e C. O domínio A conforma-se como um barril $(\beta/\alpha)_8$ do tipo TIM, no interior do qual se encontra o sítio ativo da enzima. O domínio B corresponde a uma inserção entre a terceira folha β e a terceira hélice α , desempenhando papel essencial na coordenação de íons Ca^{2+} que estabilizam a estrutura, enquanto o domínio C, localizado no C-terminal, apresenta um motivo em “ β -sanduíche”, associado à flexibilidade conformacional e à interação com substratos. O sítio ativo é formado pelos resíduos catalíticos altamente conservados Asp206, que atua como nucleófilo, Glu230, responsável pela função de ácido/base, e Asp297, que estabiliza o estado de transição. O mecanismo catalítico ocorre em duas etapas principais: inicialmente o Asp206 realiza o ataque nucleofílico à ligação α -1,4-glicosídica, auxiliado por Glu230, e em seguida o Asp297 promove a estabilização do estado de transição, resultando na hidrólise do amido em maltose e dextrinas. Adicionalmente, a presença de um íon Ca^{2+} , juntamente com um sítio de ligação para Cl^- localizado próximo ao centro catalítico, contribui para a estabilidade estrutural da enzima e aumenta a sua eficiência catalítica (Buisson *et al.*, 1987; Kandra, 2003; Janecek; Svensson; Macgregor, 2014).

A alfa-amilase possui características específicas que a tornam apropriada para diferentes setores industriais. Na indústria de bebidas, por exemplo, enzimas termoestáveis são preferidas devido aos processos de aquecimento; já no setor de detergentes, enzimas com resistência a solventes e estabilidade térmica são desejáveis. Na produção de biocombustíveis, a eficiência catalítica e a rapidez na conversão de amido em açúcares fermentáveis são fundamentais

(Ferreira *et al.*, 2020).

A utilização de biossensores para a detecção da atividade da alfa-amilase oferece vantagens significativas. A imobilização da enzima no sensor é um passo crítico, e a adsorção física em eletrodos de carbono, como o de pasta de carbono ou os eletrodos de fase sólida (SPE - Screen-printed Electrode), tem se mostrado uma estratégia promissora. Esta abordagem permite a reutilização do biossensor, promove estabilidade operacional e facilita a interação entre a enzima e o substrato, resultando em respostas eletroquímicas confiáveis e reproduzíveis (Mafakher *et al.*, 2022; Hansen, 2011).

Técnicas como cronoamperometria são amplamente utilizadas na caracterização eletroquímica de biossensores, pois permitem monitorar a corrente elétrica gerada pela interação da enzima com o substrato ao longo do tempo. Essas análises fornecem dados quantitativos sobre a atividade enzimática e permitem avaliar parâmetros como sensibilidade, seletividade, limite de detecção e estabilidade (Hansen, 2011). No caso da alfa-amilase, essa abordagem é eficaz para estudar sua atividade catalítica em diferentes condições experimentais e sua interação com superfícies eletroativas, como as de carbono.

Além das análises eletroquímicas, métodos colorimétricos clássicos, como o uso do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e de I_2/KI (Lugol), continuam sendo ferramentas complementares na detecção de açúcares redutores gerados pela ação da alfa-amilase. Tais métodos oferecem uma alternativa visual ou espectrofotométrica, auxiliando na validação de dados e confirmação da atividade enzimática (Syaffinaz *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

Dessa forma, elaboração e caracterização de biossensores baseados na alfa-amilase contribuem diretamente para o desenvolvimento de sistemas de detecção de alto desempenho, com aplicações promissoras em áreas como controle de qualidade de alimentos, produção de biocombustíveis, monitoramento ambiental e processos fermentativos, como o da produção de cerveja artesanal. O presente trabalho, portanto, busca aprofundar o conhecimento sobre a construção desses biossensores, avaliando diferentes estratégias de imobilização enzimática e técnicas de detecção eletroquímica, com ênfase na aplicação biotecnológica na mosturação cervejeira, promovendo a integração entre pesquisa acadêmica e demanda industrial.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento deste trabalho contempla a descrição dos métodos utilizados e a

apresentação dos resultados obtidos para a avaliação da atividade da alfa-amilase. Foram empregadas abordagens complementares, combinando técnicas colorimétricas tradicionais e análises eletroquímicas, a fim de validar a eficiência enzimática e investigar diferentes estratégias de imobilização em matrizes de interesse biotecnológico.

2.1 ATIVIDADE AMILÁSICA

A determinação da atividade amilásica constitui etapa fundamental para avaliar o desempenho da alfa-amilase em diferentes condições experimentais. Esse parâmetro permite compreender a eficiência da enzima na hidrólise do amido e a formação de açúcares fermentáveis, sendo essencial tanto em aplicações biotecnológicas quanto industriais. Assim, a caracterização da atividade enzimática neste trabalho busca não apenas validar os métodos empregados, mas também estabelecer parâmetros comparativos entre abordagens colorimétricas e eletroquímicas.

2.2 ABSORÇÃO MOLECULAR

Entre as técnicas aplicadas para avaliar a atividade enzimática, a absorção molecular apresenta-se como uma estratégia simples e acessível, capaz de monitorar variações espectrofotométricas causadas pela ação da alfa-amilase. Utilizada tradicionalmente em ensaios de hidrólise de amido, essa abordagem correlaciona a intensidade de absorbância com a presença de substratos ou produtos da reação, funcionando como um método complementar às análises eletroquímicas. Nesse contexto, foram empregados reagentes cromogênicos clássicos, destacando-se o Lugol.

2.2.1 Lugol

Na primeira etapa experimental, o tampão fosfato $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 5,9) foi preparado a partir da pesagem de 5,416 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 0,0373 g de fosfato de sódio monobásico (NaHPO_4), dissolvidos em balão volumétrico de 1 L com água destilada. A solução foi mantida sob agitação magnética até completa dissolução. O pH foi ajustado com auxílio de pHmetro, garantindo estabilidade da solução tampão. Após o preparo, a solução foi transferida para frasco âmbar e armazenada sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) para preservar suas

características físico-químicas. A utilização de tampão fosfato se justifica por sua ampla capacidade de manter o pH estável em soluções biológicas, condição essencial para a atividade da alfa-amilase, cuja faixa ótima de ação ocorre em meio levemente ácido a neutro.

Após a preparação do tampão fosfato foram feitas as possíveis soluções dos reagentes a serem utilizados. O reagente de Lugol foi preparado pela dissolução de 0,05 g de iodo (I_2) e 0,5 g de iodeto de potássio (KI) em 10 mL de água destilada. Essa solução forma o complexo triiodeto, utilizado como indicador da presença de amido, uma vez que promove coloração azul característica devido à interação com as hélices de amilose. Além disso, a solução de amido a 1% foi obtida pela dissolução de 0,1 g de amido em 10 mL de água destilada, sob aquecimento leve e agitação, a fim de favorecer a solubilização.

Para o início aos ensaios, alíquotas de 500 μ L de tampão fosfato foram transferidas para tubos de ensaio, às quais foram adicionados diferentes volumes de solução de amido (100 μ L, 500 μ L, 700 μ L e 1000 μ L). O volume final foi ajustado para 2000 μ L com água destilada. Após estabilização da mistura (1 min), adicionou-se 30 μ L de alfa-amilase, dando início à reação enzimática. Em seguida, foram acrescentados 100 μ L de solução de Lugol e 100 μ L de HCl, promovendo acidificação e estabilização da mistura para leitura espectrofotométrica. Um tubo de referência (branco) foi preparado contendo 500 μ L de tampão fosfato, 100 μ L de Lugol, 1000 μ L de HCl e 1000 μ L de água destilada, utilizado para calibração do espectrofotômetro.

As leituras iniciais de absorbância refletem a variação na concentração de amido disponível e sua interação com o reagente de Lugol. Observou-se, entretanto, que as medidas apresentaram valores superiores aos esperados, possivelmente devido à influência da alta concentração de HCl na reação, interferindo na estabilidade do complexo iodo-amido.

Com o objetivo de corrigir essa limitação, o volume de HCl adicionado foi reduzido em novos ensaios, a fim de minimizar a interferência na detecção espectrofotométrica e aumentar a sensibilidade à atividade enzimática. Nessas condições, foram realizadas novas leituras, permitindo monitorar o perfil temporal da reação enzimática e identificar o ponto de maior atividade detectável.

2.2.2 Ácido 3,5-dinitrossalicílico

Nesta etapa experimental, utilizou-se o tampão fosfato $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e a solução de amido 1%, previamente preparados (seção 1.1). Em seguida, preparou-se uma solução de maltose

(0,0180 g em 10 mL de água destilada) e a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), composta por 0,5 g de ácido DNS em 25 mL de água destilada, acrescida de 15 g de tartarato de potássio e sódio tetra hidratado em 10 mL de NaOH 2 mM, sob agitação e leve aquecimento, conforme descrito por Miller (1959). O método do DNS baseia-se na redução do grupo nitro do reagente por açúcares redutores, como a maltose, gerando um composto colorido cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcar redutor.

Para o ensaio, adicionaram-se 1000 μ L da solução de DNS e diferentes volumes de maltose (300–1500 μ L) em tubos de ensaio, completando-se para 2000 μ L com água destilada. As amostras foram aquecidas em banho fervente por 5 min, resfriadas com 10 mL de água destilada e avaliadas em espectrofotômetro em duplicata, permitindo a correlação da absorbância com a atividade enzimática.

2.3 ELETROANÁLISE

A aplicação de técnicas eletroquímicas constitui uma abordagem moderna e sensível para a avaliação da atividade enzimática. No contexto da alfa-amilase, a eletroanálise permite monitorar, em tempo real, a geração de produtos da hidrólise do amido por meio de correntes elétricas proporcionais à concentração de glicose e maltose liberadas. Essa estratégia complementa os métodos espectrofotométricos, oferecendo maior precisão, reprodutibilidade e aplicabilidade em matrizes complexas, além de possibilitar a comparação entre diferentes suportes de imobilização enzimática.

2.3.1 Preparo de sensor de carbono grafitado

Neste experimento, foi construída uma célula eletroquímica de baixo custo, empregando béqueres de 25 mL conectados por uma ponte salina confeccionada com algodão envolto em fita crepe e embebido em solução de KCl. Cada béquer representou uma câmara distinta.

A câmara anódica foi preparada com 400 μ L de tampão fosfato pH 7,0, 500 μ L de solução de amido a 0,5%, 500 μ L de ácido ascórbico (2 mg/mL) e 500 μ L de solução de Lugol, todos previamente preparados e mantidos sob agitação constante para assegurar homogeneização. A câmara catódica, por sua vez, foi composta por 6000 μ L de tampão fosfato pH 7,0.

A atividade eletroquímica foi inicialmente monitorada por meio de um multímetro,

durante aproximadamente 15 minutos, até a estabilização dos valores. Em seguida, os dados obtidos foram analisados utilizando um potenciostato, visando maior precisão na caracterização da resposta eletroquímica do sistema.

2.3.2 Calibração do sistema

A fim de iniciar a calibração do sistema, foi preparada a solução de ferri/ferro, sendo amplamente utilizada como sistema padrão em eletroquímica devido à sua resposta reversível e bem definida, servindo como referência para avaliar a eficiência de transferência eletrônica nos eletrodos. Para isso, pesou-se 0,1646 g de ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ e 0,2111 g de ferrocianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]$, os quais foram diluídos em 3,33 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, a mistura foi completada com água destilada em balão volumétrico de 100 mL e transferida para frasco âmbar, a fim de evitar degradação por exposição à luz.

Após a preparação do reagente, realizou-se um teste preliminar para avaliação da funcionalidade dos eletrodos, comumente denominado “teste do patinho”. Nesse procedimento, a solução de ferri/ferro foi adicionada a um frasco de vidro de 5 mL, no qual foram imersos três eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl), um eletrodo de trabalho (pasta de carbono ou eletrodo de fase sólida) e um contra eletrodo de carbono. As medições eletroquímicas foram conduzidas na faixa de potencial entre $-0,4$ e $+0,6$ V.

Na etapa seguinte, realizou-se a calibração do eletrodo utilizando uma solução de glicose, uma vez que, sua oxidação eletroquímica em meio alcalino ocorre em potenciais positivos, permitindo a observação das variações diretamente proporcionais à concentração presente. Para tanto, preparou-se uma solução contendo 0,3788 g de glicose $[C_6H_{12}O_6]$ dissolvida em 25 mL de NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir dessa solução, foram preparados diferentes béqueres contendo volumes entre 0 e 3 mL, com incrementos de 0,5 mL, sendo cada um completado com NaOH até o volume final de 5 mL.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados conforme o procedimento descrito anteriormente, com variação de potencial entre $-0,2$ e $+2,0$ V. O objetivo foi avaliar a resposta eletroquímica em função da presença de glicose no meio, esperando-se a obtenção de curvas voltamétricas com picos crescentes de acordo com o aumento da concentração.

2.3.3 Determinação de atividade amilásica em solução de amido

Ao final do processo de calibração, procedeu-se à verificação do comportamento enzimático sobre o amido. Para isso, foi preparada uma solução contendo 0,1 g de amido (1%) dissolvido em 10 mL de tampão fosfato $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 6,9), aquecida por aproximadamente 5 minutos a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, a fim de favorecer a homogeneização, uma vez que o amido apresenta baixa solubilidade em condições normais.

A escolha do amido como substrato deve-se ao fato de ser o principal alvo da alfa-amilase, enzima responsável pela clivagem de ligações α -1,4 glicosídicas. Dessa forma, a resposta eletroquímica observada reflete não apenas a presença do polímero, mas também a atividade catalítica da enzima no meio. O ensaio então foi conduzido utilizando os mesmos parâmetros empregados na solução de glicose, com variação de potencial de $-0,2$ a $+2,0 \text{ V}$. O objetivo foi observar a resposta eletroquímica da enzima frente ao substrato, buscando identificar curvas voltamétricas com tendência crescente, indicativas da taxa de atividade enzimática ao longo do tempo.

2.4 SENSORES ALTERNATIVOS

Para o desenvolvimento dos biossensores, foram selecionadas diferentes plataformas de eletrodos com o objetivo de comparar abordagens que variam em custo, praticidade e disponibilidade de insumos. O eletrodo de carbono vítreo foi utilizado como referência clássica em imobilização enzimática, enquanto o eletrodo de pasta de carbono, construído a partir de grafite e ligante oleoso, permite avaliar uma alternativa com materiais amplamente disponíveis e de baixo custo. Além disso, os eletrodos de fase sólida (SPE) foram empregados por serem descartáveis, econômicos e de fácil manuseio, características que favorecem a reprodutibilidade e reduzem o risco de contaminação. Essa diversidade de plataformas permite explorar diferentes estratégias de imobilização da alfa-amilase, avaliando seu desempenho eletroquímico e a eficiência na detecção da atividade enzimática.

2.4.1 Carbono vítreo

Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo (marca BAS) foi submetido à limpeza ultrassônica por 15 minutos, seguida de abrasão da superfície com óxido de alumina, a fim de

remover impurezas e garantir uma superfície homogênea para a imobilização enzimática. Em seguida, foram desenvolvidas duas metodologias distintas:

Na primeira, o eletrodo foi imerso em uma solução enzimática de alfa-amilase, preparada em tampão fosfato na proporção 1:1, com o objetivo de promover a adsorção controlada da enzima sobre a superfície do eletrodo. A incubação foi conduzida a 4 °C por 15 horas, assegurando a estabilização conformacional da alfa-amilase e a preservação de sua atividade catalítica. Posteriormente, o eletrodo foi submetido a análises amperométricas, permitindo a quantificação das variações na atividade enzimática e a avaliação de parâmetros cinéticos relevantes, como a corrente máxima e a afinidade substrato-enzima, fornecendo informações sobre a eficiência da imobilização enzimática e o desempenho eletroquímico do biossensor.

Na segunda metodologia, o eletrodo foi imerso na mesma solução enzimática de alfa-amilase em tampão fosfato (proporção 1:1), porém à temperatura ambiente, por um período de 2 a 3 horas, sob agitação magnética suave. Após a incubação, foram realizadas medições da atividade enzimática com o eletrodo sensibilizado, permitindo a construção de um gráfico de resposta linear crescente, representativo da cinética enzimática sobre o biossensor.

2.4.2 Pasta de carbono

O experimento consistiu na construção de um eletrodo de pasta de carbono, que envolve a preparação de uma mistura homogênea de pó de grafite e óleo Nujol, utilizado como ligante. Inicialmente, uma quantidade adequada de grafite foi misturada com Nujol até formar uma pasta consistente e maleável, permitindo sua manipulação e moldagem sobre o suporte do eletrodo. Em seguida, a pasta de carbono foi cuidadosamente introduzida no compartimento do eletrodo ou aplicada sobre a superfície do suporte, formando o eletrodo ativo. A superfície do eletrodo foi então alisada, tornando-o apto para imersão em uma solução enzimática de alfa-amilase preparada em tampão fosfato na proporção 1:1. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação magnética suave, promovendo a adsorção controlada da enzima sobre a superfície do eletrodo.

Após esse processo, o eletrodo sensibilizado foi utilizado em medições amperométricas da atividade enzimática, permitindo a avaliação de parâmetros cinéticos relevantes, como a corrente máxima e a afinidade substrato-enzima, fornecendo informações detalhadas sobre a eficiência da imobilização enzimática e o desempenho eletroquímico do biossensor.

2.4.3 Eletrodo de fase sólida (SPE)

O ensaio proposto envolveu a utilização de um eletrodo de fase sólida (SPE) para a análise da atividade enzimática. A reação foi conduzida em uma solução contendo tampão fosfato, amido a 1% e alfa-amilase, mantida sob agitação constante por 30 minutos com o auxílio de um agitador magnético, permitindo a completa interação entre a enzima e o substrato. Após esse período, uma alíquota de 20–30 μL foi cuidadosamente retirada e depositada sobre o SPE, possibilitando a realização de medições amperométricas controladas.

Esses ensaios permitiram avaliar parâmetros cinéticos relevantes, como a corrente máxima e a afinidade substrato-enzima, fornecendo informações detalhadas sobre a eficiência catalítica da alfa-amilase e o desempenho eletroquímico do biossensor.

2.5 APLICAÇÃO EM MOSTURAÇÃO CERVEJEIRA

Após as etapas de teste mencionadas anteriormente, foi possível identificar o método mais eficiente de imobilização, que ocorreu por meio do eletrodo de fase sólida. Para garantir a confiabilidade dos dados, o procedimento foi repetido três vezes, confirmando a replicabilidade e validando a hipótese, permitindo, assim, a progressão para a etapa de aplicação.

Com a replicabilidade confirmada, o ensaio experimental avançou para as etapas de calibração do eletrodo e do equipamento, conforme descrito nos anteriores. Concluída essa fase, iniciou-se o ensaio de aplicação. Inicialmente, o sistema foi aquecido em banho-maria a 70 °C (temperatura ótima para alfa-amilase II na cevada), onde 10 g de grãos de malte de cevada clara (Pilsen Agrária - 76 °Lintner) ensacados em voal, moídos em moinho de rolos (razão 1:4, ideal para atividade das enzimas amilolíticas na mostura). A mistura foi mantida sob agitação manual com um bastão de vidro a cada 2 minutos, durante um período total de 30 minutos.

Após esse intervalo, o saco de grãos moídos foi espremido para a retirada de alíquotas, procedimento repetido a cada 5 minutos para a obtenção de novas leituras. Ao término dos 30 minutos, realizou-se o teste do iodo para avaliação visual da conversão do amido. Uma gota de solução de Lugol foi misturada a uma gota da solução da mostura em um tubo de ensaio; a coloração azul ou roxa indicava a presença de amido residual e, portanto, atividade enzimática incompleta, enquanto tonalidades esverdeadas ou amareladas evidenciaram a hidrólise do amido

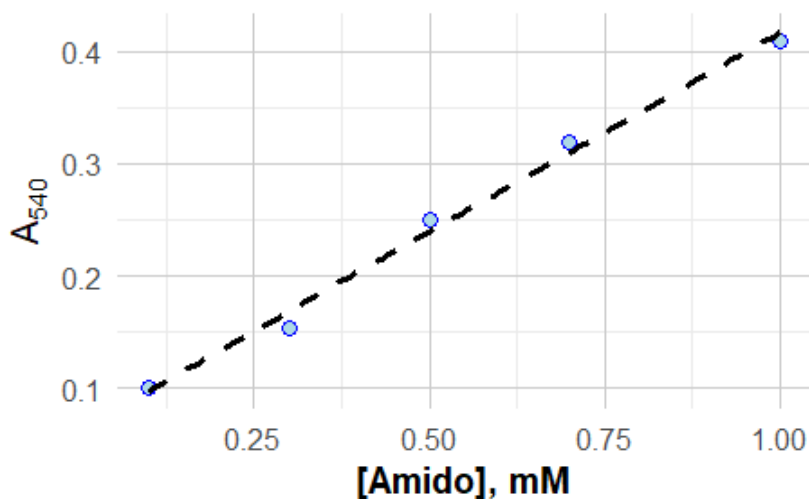
e o correto funcionamento da enzima.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE AMILÁSICA POR ABSORÇÃO MOLECULAR

O monitoramento da reação enzimática com Lugol permitiu acompanhar a diminuição da coloração azul característica do complexo iodo-amido, indicando hidrólise progressiva do substrato pela ação da alfa-amilase. A Figura 2 mostra a curva de absorbância média em 540 nm obtida nas condições experimentais, evidenciando que o pico de detecção ocorreu nos primeiros 10 minutos de reação. Esse comportamento está de acordo com o descrito na literatura, onde a rápida perda da coloração azulada é atribuída à hidrólise da estrutura helicoidal da amilose pela ação da enzima (Mafakher *et al.*, 2023). O método, apesar de simples e visualmente acessível, apresenta baixa sensibilidade e sofre interferência em matrizes complexas, o que limita seu uso para análises quantitativas, mas confirma sua utilidade como indicador qualitativo da atividade amilásica.

Figura 2 - Curva de absorbância média (A_{540}) de solução de triiodeto (KI/I_2) em meio de reação contendo amido solúvel a $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizada para monitorar a atividade da enzima alfa-amilase



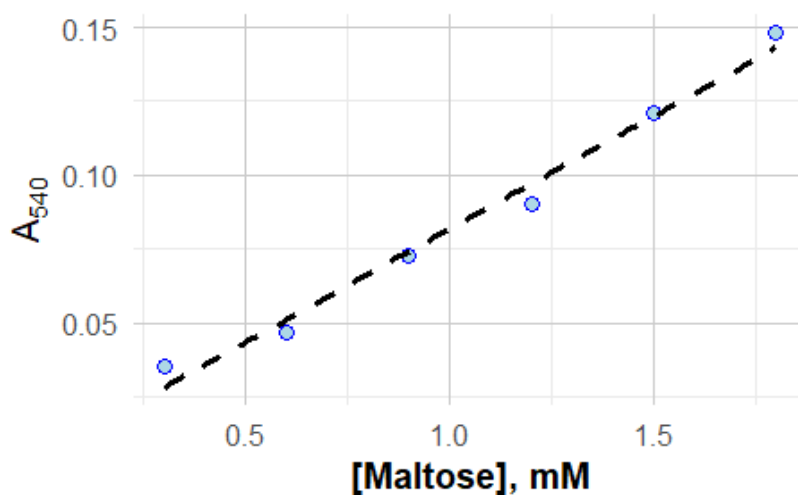
Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento da absorbância em função da concentração segue a equação $I \text{ (nA)} = 0,354 \cdot t - 0,06$, com $R^2 = 0,99$, evidenciando forte correlação entre a absorbância e a concentração de amido durante a reação.

A aplicação do método DNS para quantificação de açúcares redutores está representada na Figura 3, onde se observa correlação linear entre a concentração de maltose (0,3–1,8 mg/mL) e a absorvância a 540 nm. Esse resultado permitiu a construção de curvas de calibração consistentes.

O aumento proporcional da absorvância em função da concentração de maltose confirma a confiabilidade do método do DNS como ferramenta quantitativa, em consonância com o originalmente descrito por Miller (1959) e em estudos posteriores que consolidaram essa metodologia como referência (Rauf *et al.*, 2021). O comportamento observado nos primeiros minutos é compatível com a rápida hidrólise inicial do amido, corroborando achados da literatura e reforçando o método DNS como padrão para comparação com abordagens modernas.

Figura 3 - Curva analítica de determinação de maltose por absorção molecular, obtida pela reação com DNS em solução contendo seis alíquotas do dissacarídeo, evidenciando a relação entre a absorvância a 540 nm (A_{540}) e a concentração de maltose (mM)

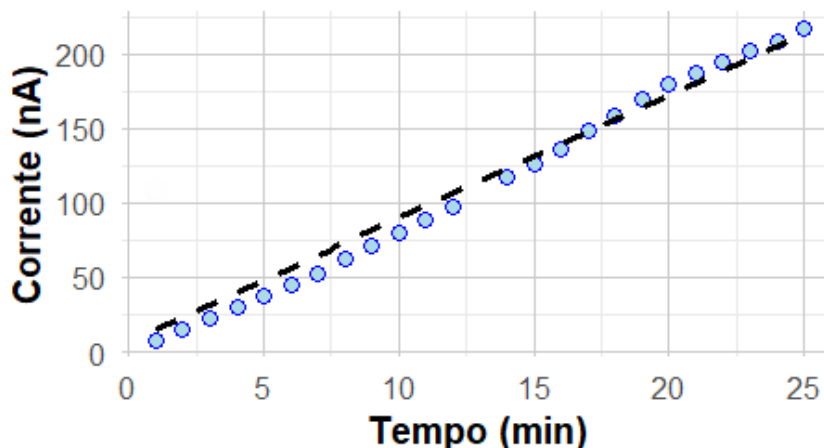


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento da corrente em função da concentração segue a equação $I \text{ (nA)} = 0,077 \cdot t - 0,01$, com $R^2 = 0,98$, evidenciando forte correlação entre a absorvância e a concentração da maltose durante a reação.

Por fim, após a medição preliminar dos dados com o multímetro, e seguindo a metodologia descrita para a célula eletroquímica, os resultados foram obtidos pelo potenciostato ao longo de 25 minutos de monitoramento. Essa análise permitiu monitorar a evolução do sinal eletroquímico gerado no sistema. A figura 4 a seguir apresenta a variação do potencial em função do tempo, demonstrando o comportamento dinâmico da reação e o ponto em que o sistema alcançou estabilidade eletroquímica.

Figura 4 – Registro amperométrico da oxidação de amido solúvel 1% em tampão fosfato (pH 6,9) contendo 2 mg/mL de ácido ascórbico, na presença de solução de KI/I₂



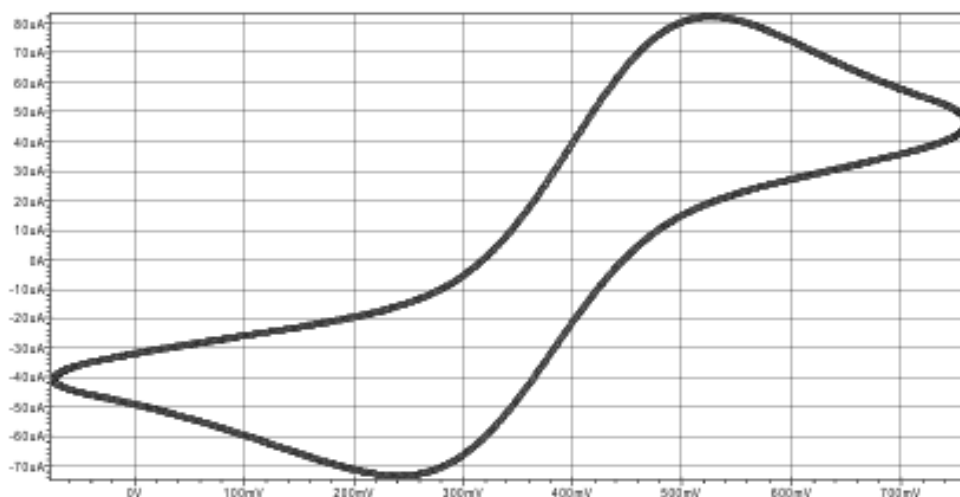
Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento da corrente em função do tempo segue a equação $I \text{ (nA)} = 9,08 \cdot t - 7,67$, com $R^2 = 0,99$, evidenciando forte correlação entre a corrente elétrica e o tempo de medição durante a reação.

3.2 ATIVIDADE AMILÁSICA POR ELETROANÁLISE

Após a calibração com ferricianeto/ferrocianeto de potássio, que apresentou os picos redox esperados e confirmou a eficiência dos eletrodos utilizados (Figura 5), os ensaios eletroquímicos foram conduzidos com glicose em solução de NaOH. A Figura 6 mostra o aumento da corrente anódica em função da concentração de glicose, evidenciando resposta crescente diretamente proporcional ao substrato. Esses resultados confirmam o bom desempenho dos eletrodos e reproduzem achados de estudo prévio (Mello; Kubota, 2008), no qual a oxidação da glicose é utilizada como parâmetro indireto da atividade amilásica. A resposta hiperbólica observada até 20 minutos de reação é compatível com o modelo cinético de Michaelis-Menten, típico de enzimas hidrolíticas (Kandra, 2003).

Figura 5 - Voltamograma cíclico obtido para a reação redox entre ferricianeto e ferrocianeto de potássio em água pura, registrando corrente (μA) em função do potencial aplicado (mV)

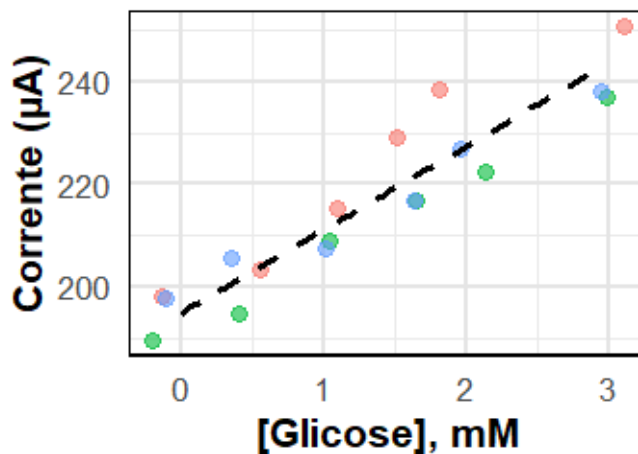


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: Observam-se picos anódico e catódico que caracterizam o comportamento eletroquímico reversível do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Após este, a caracterização enzimática com NaOH e glicose seguiu o mesmo desfecho, evidenciando a ordem crescente nos picos de oxidação conforme a variação na concentração de glicose.

Figura 6 - Curva analítica obtida a partir da resposta amperométrica durante a oxidação de amostras de glicose no vaso de reação. Cada cor representa um dos ensaios experimentais realizados em triplicata, nas mesmas condições experimentais, enquanto a linha tracejada preta indica o ajuste linear dos pontos experimentais

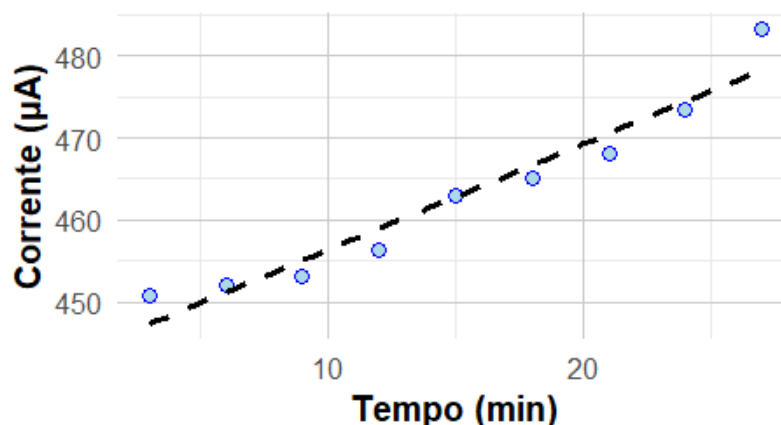


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento da corrente em função da concentração de glicose segue a equação $I (\mu\text{A}) = 198,74 + 16,25 \cdot [\text{Glicose}] (\text{mM})$, com $R^2 = 0,987$, evidenciando forte correlação entre corrente elétrica e concentração de glicose.

A análise com diferentes métodos de imobilização da enzima mostrou comportamentos distintos. No eletrodo de carbono vítreo, a cronoamperometria indicou retenção estável da atividade enzimática, com boa linearidade da resposta (Figuras 7 e 8). A pasta de carbono apresentou menor tempo de atividade estável (Figura 9), enquanto os eletrodos de fase sólida (SPEs) evidenciaram maior sensibilidade e reprodutibilidade (Figura 10). Esses resultados mostram que a escolha do suporte de imobilização influencia diretamente a estabilidade e a reprodutibilidade da resposta eletroquímica. O carbono vítreo apresentou desempenho consistente, em linha com estudos anteriores (Araújo, 2018), mas a lixiviação mais rápida observada nos eletrodos de pasta de carbono reduziu sua estabilidade, fato já descrito na literatura (Mello; Kubota, 2008). Os SPEs, por sua vez, destacaram-se pela resposta linear e pela aplicabilidade prática como plataformas descartáveis e portáteis, em consonância com aplicações emergentes (Afobmics, 2016).

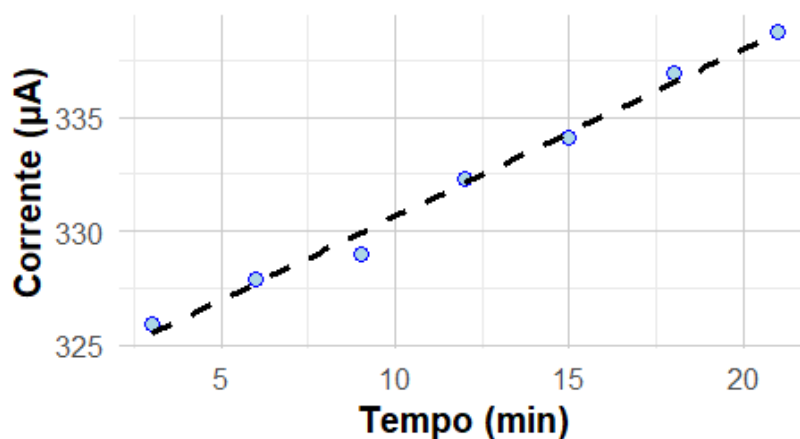
Figura 7 - Resultados da cronoamperometria em circuito aberto (adsorção quiescente em carbono vítreo) para os diferentes tratamentos adsorptivos de alfa-amilase em eletrodos de carbono



Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: A linha tracejada representa a regressão linear dos pontos experimentais, descrita pela equação: $I (\mu A) = 443 + 1,29 \cdot t (\text{min})$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,94$, indicando forte correlação entre corrente e tempo de imobilização da enzima.

Figura 8 - Resultados da cronoamperometria em circuito aberto (adsorção em carbono vítreo) para os diferentes tratamentos adsorptivos de alfa-amilase em eletrodos de carbono

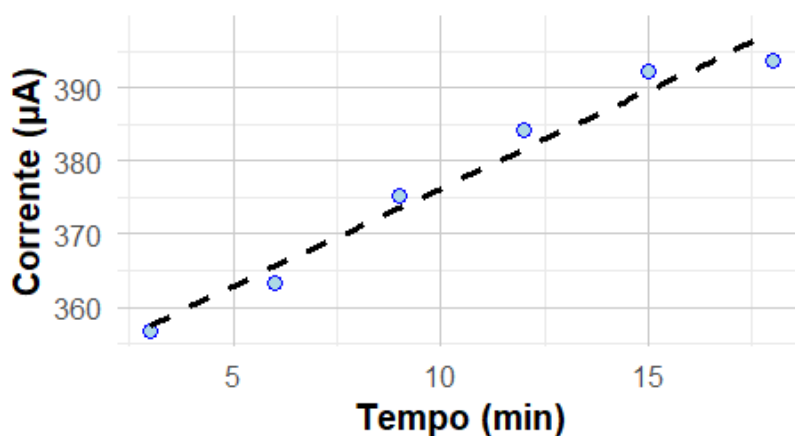


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: A relação entre o tempo de monitoramento e a corrente medida apresentou ajuste linear descrito pela equação: $I (\mu\text{A}) = 323,73 + 0,742 \cdot t (\text{min})$, com $R^2 = 0,99$, evidenciando forte correlação entre o aumento do tempo e a elevação da corrente.

A utilização de pasta de carbono como matriz de imobilização resultou em menor estabilidade da enzima, evidenciada pelo intervalo reduzido de pontos que mantiveram a linearidade. Embora o comportamento corrente-tempo apresente boa correlação ($I = 323,73 + 0,742 \cdot t$; $R^2 = 0,99$), a faixa linear mais curta indica menor eficiência de retenção da alfa-amilase nesse material.

Figura 9 - A cronoamperometria em circuito aberto realizada com eletrodos de pasta de carbono mostra um crescimento consistente da corrente durante o processo de imobilização de alfa-amilase

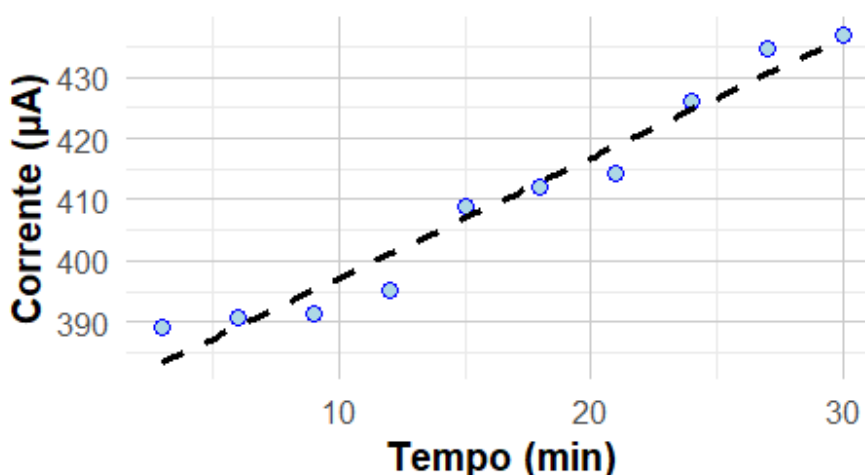


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O conjunto experimental segue uma tendência linear representada pela equação $I (\mu\text{A}) = 346,78 + 2,52 \cdot t (\text{min})$, com $R^2 = 0,969$, confirmando elevada correlação entre o tempo de exposição e a resposta amperométrica obtida.

A análise realizada com o eletrodo de fase sólida evidencia uma ampla faixa de linearidade e maior variação de pontos experimentais, resultado coerente com o que a literatura descreve para SPEs. Esses eletrodos são reconhecidos por sua elevada sensibilidade e excelente reprodutibilidade, atributos associados à sua arquitetura planar, à homogeneidade da superfície condutora e ao baixo ruído de corrente, características destacadas em diversos estudos que apontam os SPEs como plataformas promissoras e de crescente inovação na eletroanálise enzimática (Honeychurch & Hart, 2019). Dessa forma, o comportamento observado está em concordância com relatos prévios que demonstram maior estabilidade do sinal e maior faixa linear quando enzimas são imobilizadas em sistemas de fase sólida.

Figura 10 - Resultados da cronoamperometria em circuito aberto (SPE) para os diferentes tratamentos adsortivos de alfa-amilase em eletrodos de carbono

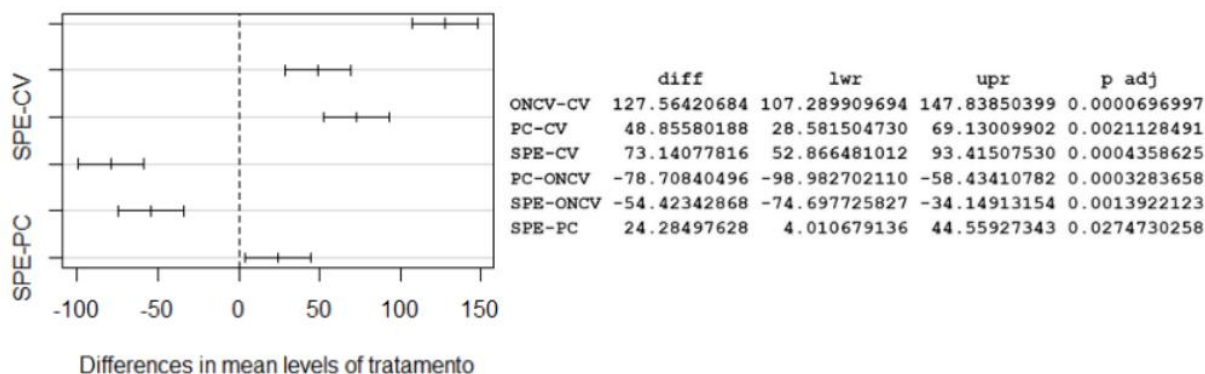


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: A linha tracejada representa a regressão linear dos pontos experimentais, descrita pela equação: $I (\mu A) = 380,21 + 1,895 \cdot t (\text{min})$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9821$, indicando forte correlação entre a corrente e o tempo de imobilização da enzima.

Com base nos resultados obtidos e na análise das comparações pareadas, a partir do teste estatístico “Tukey-HSD”, podemos perceber que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mesmo após o ajuste dos p-valores para múltiplas comparações. Isso confirma que os tratamentos utilizados têm efeitos diferentes sobre a variável medida. No gráfico da Figura 11, cada linha representa uma comparação pareada entre tratamentos. Os pontos marcam a diferença média entre os grupos (diff) e as barras horizontais indicam o intervalo de confiança de 95%. Diferenças são consideradas significativas quando o intervalo de confiança não cruza a linha vertical em zero, confirmando os resultados do teste de Tukey-HSD.

Figura 11 - Comparações estatísticas das médias dos tratamentos adsorptivos de alfa-amilase em eletrodos de carbono, com intervalos de confiança de 95% ajustados para múltiplas comparações (teste de Tukey-HSD; print de resultados - programa R)



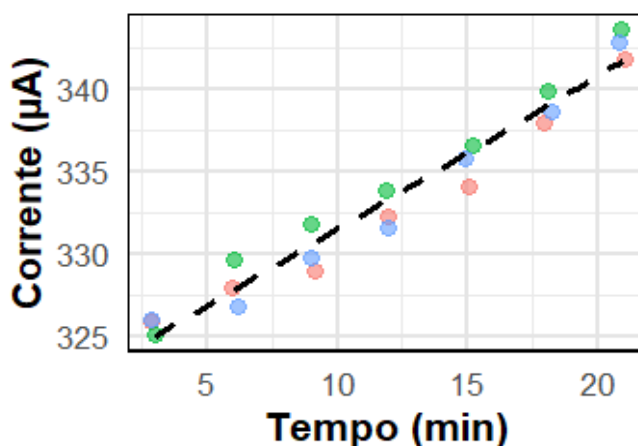
Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: Cada ponto representa a diferença média entre dois tratamentos e as barras horizontais correspondem ao intervalo de confiança. Comparações cujo intervalo não cruza a linha vertical em zero indicam diferença estatisticamente significativa.

3.3 APLICAÇÃO EM MOSTURA CERVEJEIRA

Após a conclusão de todas as análises iniciais, foram realizados testes em triplicata com os métodos considerados mais eficientes para maior precisão dos resultados, a fim de alcançar a imobilização enzimática para aplicação em produção artesanal de cerveja.

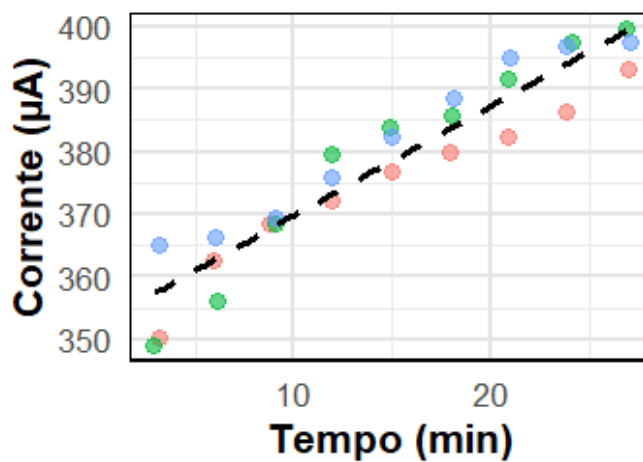
Figura 12 - Resultados da cronoamperometria em triplicata em circuito aberto, realizados em eletrodos de carbono vítreo submetidos aos diferentes tratamentos adsorptivos de alfa-amilase. Cada cor representa um dos ensaios experimentais, nas mesmas condições experimentais, enquanto a linha tracejada preta indica o ajuste linear considerando todos os pontos



Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento dos dados segue a equação $I (\mu\text{A}) = 323,73 + 0,742 \cdot t (\text{min})$, com $R^2 = 0,994$, evidenciando forte consistência entre os ensaios e clara relação linear entre a corrente e o tempo de imobilização da enzima.

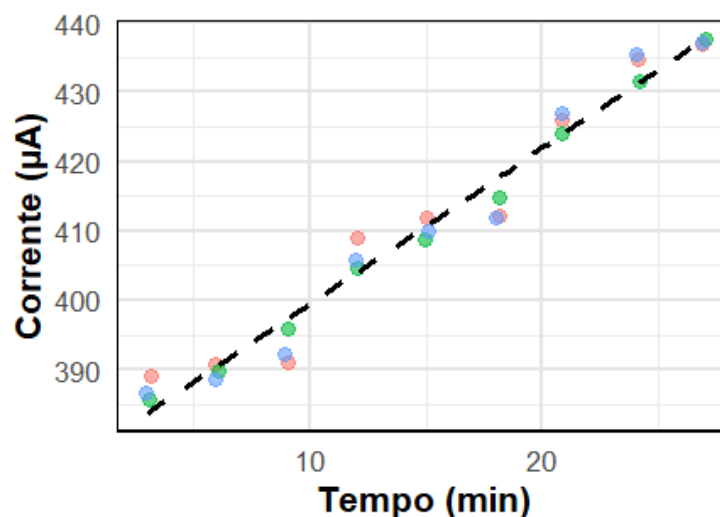
Figura 13 - Resultados da cronoamperometria em triplicata em circuito aberto, realizados em eletrodos de carbono vítreo submetidos aos diferentes tratamentos adsortivos de alfa-amilase. Cada cor representa um dos ensaios experimentais, nas mesmas condições experimentais, enquanto a linha tracejada preta indica o ajuste linear considerando todos os pontos



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: O comportamento dos dados segue a equação $I (\mu\text{A}) = 356,70 + 2,10 \cdot t (\text{min})$, com $R^2 = 0,987$, evidenciando forte consistência entre os ensaios e clara relação linear entre a corrente e o tempo de imobilização da enzima.

Figura 14 - Resultados da cronoamperometria em circuito aberto realizados em triplicata em eletrodos SPE submetidos aos diferentes tratamentos adsortivos de alfa-amilase. Cada cor representa um dos ensaios experimentais, enquanto a linha tracejada preta mostra o ajuste linear considerando todos os pontos

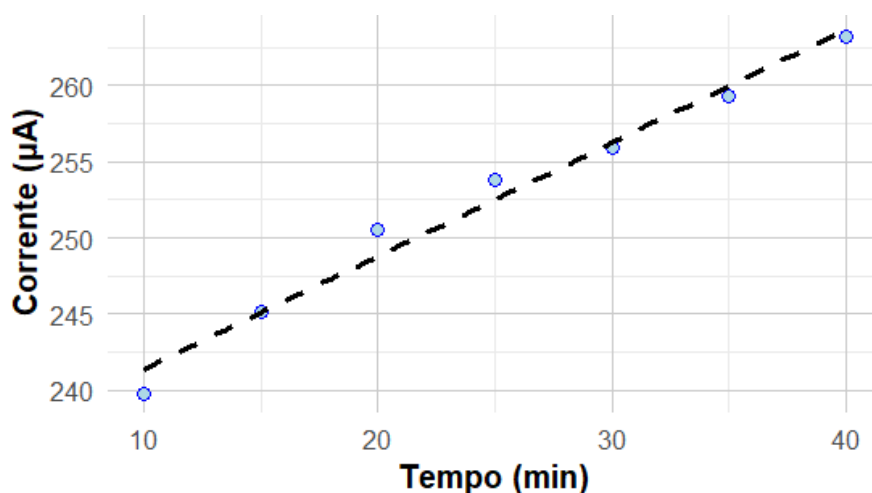


Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: O comportamento dos dados segue a equação $I (\mu\text{A}) = 380,21 + 1,895 \cdot t (\text{min})$, com $R^2 = 0,98$, indicando forte consistência entre as réplicas e uma clara dependência linear da corrente em função do tempo de imobilização da enzima.

Na etapa final, o biossensor desenvolvido foi aplicado em mostura cervejeira. A Figura 15 apresenta os resultados da cronoamperometria em SPEs, que demonstraram evolução clara da conversão de amido em açúcares fermentáveis por um período de 30 minutos de reação. Complementarmente, o teste visual de iodo (Figura 16) confirmou a redução da coloração azulada, evidenciando a hidrólise do amido. A integração dos resultados eletroquímicos e visuais confirma que o biossensor desenvolvido é capaz de atuar em matriz real complexa, na qual proteínas, polifenóis e outros açúcares poderiam interferir. O monitoramento direto da mostura cervejeira mostrou liberação de açúcares redutores em concordância com o teste de Lugol, validando a aplicabilidade do sistema em processos fermentativos. Esses achados estão em consonância com estudos que descrevem a relação direta entre atividade da alfa-amilase e o perfil fermentativo da cerveja (Hillinck *et al.*, 2020), reforçando o potencial do biossensor para controle de qualidade em produção artesanal e industrial.

Figura 15 - Resultados da cronoamperometria em circuito aberto (SPE) para o tratamento de alfa-amilase em mostura cervejeiro



Fonte: Elaborado pelas autoras (2025).

Legenda: A corrente apresentou aumento linear em função do tempo de reação, descrita pela equação da reta I (nA) = $0,742 \cdot t + 243,98$, com $R^2 = 0,9795$. O resultado confirma a eficiência do biossensor em detectar a liberação de açúcares redutores durante a hidrólise do amido ao longo de 40 minutos de reação.

Complementarmente às análises eletroquímicas, o teste com Lugol foi empregado como método qualitativo para avaliar a presença de amido residual no mosto cervejeiro. A coloração azul característica, resultante da interação do reagente de Lugol com as hélices de amilose, diminui à medida que a alfa-amilase promove a hidrólise do substrato, permitindo uma verificação visual da eficiência catalítica da enzima ao longo do ensaio.

Figura 16 - Resultado da análise visual pelo teste de Complexação Amido-Iodo (Lugol) para amido residual em amostras submetidas à aplicação com alfa-amilase



Fonte: Elaborada pelas autoras (2025).

Legenda: Tubo da esquerda representa uma amostra retirada após os 30 minutos iniciais e o tubo da direita representa uma amostra retirada ao final das leituras.

A partir dos resultados gráficos, foi possível identificar tendências que indicam taxas de hidrólise enzimática e sua estabilidade ao longo do tempo, contribuindo para a validação do método e a compreensão do comportamento da enzima sob as condições experimentais aplicadas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho demonstrou o desenvolvimento e a caracterização de biossensores para detecção de alfa-amilase, destacando sua sensibilidade e eficácia por meio de análises eletroquímicas e iodimétricas. A utilização do potenciostato possibilitou a obtenção de dados eletroanalíticos precisos e confiáveis por meio de análise iodimétrica, evidenciando a sensibilidade e a eficácia do método para detecção e monitoramento dessas substâncias. Os ensaios eletroquímicos, incluindo os testes com ferricianeto e ferrocianeto de potássio, confirmaram o bom desempenho dos eletrodos, enquanto as análises com glicose e amido permitiram verificar a resposta do sistema frente aos substratos, reforçando a confiabilidade do processo. A comparação estatística entre os métodos testados, utilizando o teste de Tukey, revelou diferenças significativas entre os grupos e validou a escolha dos eletrodos mais eficientes para a imobilização enzimática.

Diversas estratégias de imobilização foram avaliadas, destacando-se a adsorção em carbono vítreo e em eletrodos de fase sólida, que oferecem alta área superficial, excelente condutividade elétrica e estabilidade mecânica. Essas características favorecem a adsorção eficiente das enzimas, otimizando o desempenho das reações bioquímicas e garantindo durabilidade e reutilização dos biocatalisadores. Os eletrodos de fase sólida, por sua robustez e facilidade de manuseio, mostraram-se especialmente adequados, sendo aplicados com sucesso na análise da mostura cervejeira. Os resultados gráficos dessa etapa evidenciaram a conversão do amido ao longo do tempo, demonstrando a eficiência da ação enzimática da alfa-amilase; o teste com Lugol acrescentou confiabilidade nas análises quantitativas, fornecendo uma avaliação visual da conversão.

Dessa forma, o estudo reforça o potencial dos biossensores eletroquímicos para o monitoramento da atividade da alfa-amilase, estabelecendo bases sólidas para aprimoramentos futuros em sensibilidade e seletividade. O contínuo desenvolvimento nessa área não apenas supera os desafios atuais, mas também amplia as perspectivas de aplicação em diagnósticos, monitoramento ambiental, medicina personalizada e em setores produtivos, como a indústria de alimentos e bebidas, consolidando o papel transformador da biotecnologia no avanço tecnológico.

REFERÊNCIAS

AFOBMCIS. **Proceedings of the Asian Federation of Biotechnology – Metabolic Engineering for Cell Factories**. [s.l.]: AFOB, 2016. Disponível em: <https://www.afobmcis.org>. Acesso em: 20 ago. 2025.

ARAÚJO, A. A. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para determinação da**

atividade de alfa-amilase em mosto cervejeiro. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.

ARAÚJO, Aléxia Jhennifer Pereira Amaral. **Imobilização de alfa-amilase em magnetita.** [s.l.]: [s.n.], 2023.

BARBOSA, Eduardo Fernandes. **Prospecção e análises de superfícies para imobilização de biomoléculas.** [s.l.]: [s.n.], 2020.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. **Imobilização enzimática:** uma visão geral sobre técnicas e materiais de suporte. *Biotecnologia*, v. 3, p. 1–9, 2013.

EP0541083B1. **Electrochemical sensor for enzyme activity determination.** European Patent Office, 1993. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/EP0541083B1>. Acesso em: 20 ago. 2025.

FERREIRA, André V. F. et al. **Recent patents on the industrial application of alpha-amylases.** *Recent Patents on Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 251–268, 2020.

GARCIA, Luane Ferreira; SOUSA, Denes Ferraz de; SOUZA, G. I. L. Eric de. **Enzimas vegetais:** extração e aplicações biotecnológicas. [s.l.]: [s.n.], 2017.

GOMAA, Ahmed. **Application of enzymes in brewing.** [s.l.]: Zenodo, 2018. DOI: 10.5281/zenodo.3336203.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. **Electrochemical biosensors** – sensor principles and architectures. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

HANSEN, Betina. **Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores:** caso polianilina. [s.l.]: [s.n.], 2011.

HATTORI, Shizuo; YAMAMOTO, Yoshihir; SOGABE, Yukihiro; EMI, Shigenori. **Method for determination of alpha-amylase activity.** *Biotechnology Advances*, v. 15, 1997.

HILLINCK, F. et al. **Exploring the impact of α -amylase enzyme activity and pH on flavor perception of alcoholic drinks.** *Foods*, v. 9, n. 7, p. 924, 2020.

HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. **Screen-printed electrochemical sensors for biomedical applications.** *Sensors*, v. 19, n. 10, p. 1–30, 2019.

HORNINK, Gabriel Gerber. **Princípios da produção cervejeira e as enzimas na mosturação-2024.** Gabriel Gerber Hornink, 2024.

JANECEK, S.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. **Alpha-amylase:** an enzyme at the interface of structural biology, molecular evolution, and biotechnology. *Biologia*, v. 69, n. 8, p. 1127–1137, 2014.

JANEGITZ, Bruno Campos. **Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro.** [s.l.]: [s.n.], 2012.

KANDRA, L. **α -Amylases of medical and industrial importance.** *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 666–667, p. 487–498, 2003.

MAFAKHER, Ladan et al. **Alpha-amylase immobilization: methods and challenges.** *Pharmaceutical Sciences*, v. 29, 2022.

MAFAKHER, L. et al. **Amylases: properties, production, and applications.** *Plant Science Today*, v. 10, n. 1, p. 144–157, 2023.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. **Biosensors as a tool for the determination of α -amylase activity.** *Sensors*, v. 8, p. 1400–1418, 2008.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

PINHEIRO, Wagner Moreira. **Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia, baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e nanopartículas de ouro associada a doxorubicina.** [s.l.]: [s.n.], 2016.

RAUF, S. et al. **A microplate-based modified DNSA method for the evaluation of α -amylase inhibitors.** *Journal of Nutrition, Food Science and Forecasting*, v. 1, n. 1, p. 21–27, 2021. Disponível em:

https://www.scitcentral.com/article.php?journal=45&article=1006&article_title=A-Microplate-Based-Modified-DNSA-Method-for-the-Evaluation-of-%CE%91-Amylase-Inhibitors. Acesso em: 20 ago. 2025.

SHARMA, R.; AGARWAL, S.; KUMAR, R. **α -Amylase as a diagnostic marker in medical science.** *Biotechnology Research International*, v. 2012, p. 1–8, 2012.

SINGH, R.; DOBRIYAL, A.; SINGH, R.; DE LOS RÍOS-ESCALANTE, Patricio. **Evaluation of inhibitory activity, purification and X-ray crystallography of alpha-amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris cultivars of Uttarakhand, Índia.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, 2022.

SYAFFINAZ, N. M. et al. **A 96-well-plate-based method for the estimation of alpha-amylase activity using miniaturised 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) colorimetric method.** *Malaysian Applied Biology*, v. 51, p. 95–102, 2022.

WANG, J. **Nanomaterial-based electrochemical biosensors.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, p. 1–2, 2005.

ZORZIN, Fabielle Melissa. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de Eugenia dysenterica.** [s.l.]: [s.n.], 2014.

