

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GEORGE AUGUSTO VELOSO DE OLIVEIRA

**EQUILÍBRIO QUÍMICO E CINÉTICA ENZIMÁTICA DA INTERAÇÃO DE
 α -AMILASE COM COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS EM CERVEJA.**

Alfenas/MG

2017

GEORGE AUGUSTO VELOSO DE OLIVEIRA

**EQUILÍBRIO QUÍMICO E CINÉTICA ENZIMÁTICA DA INTERAÇÃO DE
 α -AMILASE COM COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS EM CERVEJA.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química. Orientador: José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Oliveira, George Augusto Veloso de.
Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de alfa-amilase
com compostos fenólicos encontrados em cerveja / George Augusto Veloso
de Oliveira. -- Alfenas/MG, 2017.
68 f.

Orientador: José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. alfa-Amilases. 2. Polifenóis. 3. Termodinâmica. 4. Cinética.
5. Cerveja. I. Silva, José Maurício Schneedorf Ferreira da.
II. Título.

CDD-541.3

George Augusto Veloso de Oliveira

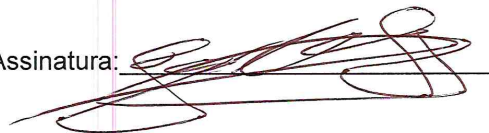
“Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de alfa-amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovado em: 16/12/2016

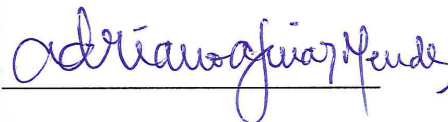
Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Sidney Jurado de Carvalho
Instituição: Universidade Estadual Paulista -
UNESP

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, por guiar meu caminho, pelas oportunidades oferecidas, e forças para superar as dificuldades.

Ao Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, pela excelente orientação, por toda disponibilidade de tempo e dedicação dispensada ao nosso trabalho, e por todos os ensinamentos compartilhados. Sua orientação e amizade foram essenciais para minha formação enquanto discente na pós-graduação e pesquisador.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas, em especial, ao departamento de Bioquímica e seus docentes, as professoras Denise, Lira, Maísa e Terezinha, os professores Gabriel e Plínio. Agradeço ao Laboratório de bioquímica, seus técnicos e amigos Gabriel Moraes e Rose Peron pelos ensinamentos, convívio e ajuda sempre que necessário, e aos colegas e amigos de jornada de laboratório.

Estendo meus agradecimentos a UNIFAL-MG por me acolher enquanto técnico laboratório/área química e permitir o desenvolvimento das minhas atividades de pós-graduação.

Não poderia esquecer de agradecer a minha família, minha mãe que sempre acreditou em mim, minha irmã que sempre colocou minha educação em primeiro lugar, as duas não mediram esforços para me auxiliar no que fosse necessário. Por último, mas não menos importante, a minha esposa Marinalva, agradeço pela compreensão, pelo amor, pelo apoio, pela parceria, paciência e pela amizade, enfim, por tudo que você representa para a minha vida.

RESUMO

A α -amilase é uma enzima chave na produção das cervejas por ser responsável pela clivagem do amido em açúcares fermentáveis. Durante o processo de preparação do mosto que ocorre de 40 a 80°C, essa enzima pode ser afetada por polifenóis presentes na mistura. O objetivo foi avaliar a cinética e o equilíbrio da interação de α -amilase com polifenóis usualmente presentes em cerveja e nas faixas de temperatura empregadas no processo. Para tanto, polifenóis comumente encontrados em cerveja (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina) foram incubados com α -amilase em 298, 313 e 323K, a atividade da enzima foi determinada por absorção molecular pelo método de triiodina, e os resultados tratados pela equação integrada de Michaelis-Menten. O equilíbrio químico da interação foi abordado por titulação espectrofluorimétrica em 293, 303, 313, 323 e 333 K. Os resultados apresentaram valores dos parâmetros cinéticos de α -amilase a 323K de K_m $1,37 \pm 0,19$ mg.mL⁻¹ e V_{max} $0,66 \pm 0,08$ mg.mL⁻¹.min⁻¹, e um modelo de inibição competitiva apresentando K_i entre $2,00 \times 10^{-5} \pm 4,50 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ e $4,52 \times 10^{-5} \pm 2,24 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Foram encontrados valores de energia de ativação da enzima para ácido clorogênico > ácido ferúlico > ácido cafeico > quercetina. O ácido clorogênico foi o que apresentou maior estabilidade na formação dos complexos, com menor valor de K_i , maior sensibilidade com a temperatura e maior inibição na temperatura ótima da enzima (323K), antagonicamente aos valores apresentados para a quercetina. Os resultados da interação ligante-enzima revelaram valores de K_b crescente com a temperatura, sugerindo maior estabilidade na formação do complexo próximo a 323 K, e coincidentes com os resultados de inibição enzimática. Os valores para ΔH e ΔS sugerem um mecanismo entropicamente dirigido da associação. Estudo da relação estrutura-atividade demonstrou uma correlação positiva entre a atividade biológica (ligação e catálise) da α -amilase com os descritores de natureza polar dos polifenóis (número total de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, polarizabilidade, TPSA, Pka). Ensaio de interação da enzima com ácido clorogênico em diferentes valores de pH e força iônica apoiam os dados de estrutura-atividade, e sugerem a participação do íon carboxilato do ligante na interação com grupos básicos na vizinhança do sítio catalítico da enzima.

Palavras chave: α -amilase. polifenóis. interação. termodinâmica. cinética. cerveja.

ABSTRACT

α -amylase is a key enzyme in the production of beer due to the hydrolysis of starch into fermentable sugars. During the preparation of its brewing mash (40 to 80 °C), this enzyme can be affected by polyphenols present in the mixture. Our aim was to evaluate the kinetics and equilibrium of the interaction of α -amylase with polyphenols usually present in beer at common temperature range employed in the process. Hence, polyphenols commonly found in beer (chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid and quercetin) were incubated with α -amylase at 298, 313, 323K, enzyme activities were followed by molecular absorption using the triiodine method, and the results treated by the integrated Michaelis-Menten equation. The chemical equilibrium of the interaction was addressed by spectrofluorometric titration at 298, 303, 313, 323, 333K. The results showed values of the kinetic parameters of α -amylase at 323 K of K_m 1.37 ± 0.19 mg.mL⁻¹ and V_{max} 0.66 ± 0.08 mg.mL⁻¹.min⁻¹, and a competitive inhibition model exhibiting inhibition constants (K_i) between $2.00 \times 10^{-5} \pm 4.50 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ and $4.52 \times 10^{-5} \pm 2.24 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Enzyme activation energy values were in order of chlorogenic acid > ferulic acid > caffeic acid > quercetin. Chlorogenic acid showed the highest stability in the complex formation, exhibiting the lowest K_i value, the more pronounced temperature sensitivity and the highest inhibition at optimum temperature (323K), in contrast to the values presented for quercetin. The results of the ligand-enzyme interaction revealed increasing values of the binding constant of the protein with the ligands (K_b) with temperature, suggesting a greater complex stability near 323 K, similar to that found from the enzyme inhibition data. The values for ΔH and ΔS suggest an entropy-driven force present in the association mechanism. The results for structure-activity relationship demonstrated a positive correlation between the biological activity (both binding and catalysis) of the α -amylase with the polar nature descriptors of the polyphenols (total number of hydrogen donors and acceptors of, polarizability, TPSA, pKa). Binding assays of the enzyme with chlorogenic acid at different pH values and ionic strength support the structure-activity results and suggest a plausible interaction of the carboxylate ion of the ligand with basic groups in the vicinity of the catalytic site of the enzyme.

Keywords: α -amylase. polyphenols. binding. thermodynamic. kinetic. beer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

K _b	constante de ligação proteína com ligante
K _{sv}	constante de supressão de Stern-Volmer
K _m	constante de Michaelis-Menten
K _{ic}	constante de inibição competitiva
K _{iu}	constante de inibição não-competitiva
V _{max}	velocidade máxima
ΔG	energia Gibbs
ΔH	variação de entalpia
ΔS	variação de entropia
F	fluorescência na presença de ligante
F ₀	fluorescência na ausência Ligante
k	constante de velocidade de Arrhenius
A	constante pré-exponencial ou fator de frequência
τ ₀	tempo de vida do fluoróforo
k _q	constante de interação bimolecular
kDa	kilodaltons
mg	miligramas
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetros
pH	potencial hidrogeniônico
T	temperatura
t	tempo
Tab.	tabela

Fig.	figura
Tyr	tirosina
Trp	triptofano
Glu	glutamato
Asp	aspartato
His	Histidina
UV	Ultravioleta
VIS	visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação em cartoon da α -amilase de <i>Aspergillus oryzae</i> e seu o domínio catalítico (α/β) ₈	17
Figura 2 – Etapas catalíticas na clivagem da ligação glicosídica pela α -amilase . . .	18
Figura 3 – Sequência primária da α -amilase de <i>Aspergillus oryzae</i>	19
Figura 4 – Processo simplificado de produção de cerveja	21
Figura 5 – Exemplo de rampa de temperatura para o processo de mosturação . . .	21
Figura 6 – Amilose e Amilopectina	22
Figura 7 – Atividade de α -amilase e da β -amilase	23
Figura 8 – ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina.	24
Figura 9 – Diagrama de inibição enzimática. E, enzima; ES, complexo enzima/substrato; EIS, complexo inibidor/enzima/substrato; EI, complexo enzima/inibidor; P, produto; K_m , constante de Michaelis-Menten; K_{ic} , constante de inibição competitiva; K_{iu} , constante de inibição incompetiva, k_{cat} , constante de velocidade.	28
Figura 10 – Estrutura molecular dos aminoácidos fluoróforos.	31
Figura 11 – Curva analítica de concentrações pré-definidas de amido em função da absorvância em tampão fosfato 0,05M pH 5,9 ($R=0,995$), obtida por reação do polímero com triiodina em 25°C.	38
Figura 12 – A - Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase em concentrações crescentes de $2,16 \times 10^{-5}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 25°C, B - Produto da concentração da enzima pelo tempo(min) contra a quantidade de produto liberado (Teste de Selwyn).	39
Figura 13 – Decaimento da concentração de amido por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 25°C. A linha contínua representa o ajuste não linear da equação integrada de Michaelis-Menten aos dados experimentais.	40
Figura 14 – Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ em temperatura crescente de 25°C a 70°C em tampão fosfato pH 5,9.	41
Figura 15 – Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 50°C. A linha contínua representa o ajuste não linear da equação integrada de Michaelis-Menten aos dados experimentais.	42

Figura 16 – Dependência da constante de velocidade (k) da reação da α -amilase e sobre o substrato com a temperatura. A seta indica valor de temperatura não utilizado no ajuste.	43
Figura 17 – Espectrogramas e determinação de ácido clorogênico e ácido cafeico. A - Espectrograma de absorção molecular de ácido clorogênico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ . B - Curva analítica de ácido clorogênico em 324 nm R=0,99. C - Espectrograma de absorção molecular de ácido cafeico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ . D - Curva analítica do ácido cafeico em 324 nm. R=0,99.	44
Figura 18 – Espectrogramas e determinação de ácido ferúlico e quercetina. A - Espectrograma de absorção molecular de ácido ferúlico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ . B - Curva analítica de ácido ferúlico em 320 nm R=0,99. C - Espectrograma de absorção molecular da quercetina a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ . D - Curva analítica da quercetina em 370 nm. R=0,99.	45
Figura 19 – Avaliação de inibição enzimática com compostos fenólicos, ácido clorogênico, ácido cafeico. Figura 21A- à temperatura de 25°C, Figura 25B- à temperatura de 50°C.	46
Figura 20 – Gráficos do ajuste não linear dos dados de inibição dos compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina) sobre a catálise de amido por α -amilase em pH 5,9 a 50°C para determinação de valor do K _{ic}	48
Figura 21 – Dependência da constante de velocidade (k) da reação inibitória da α -amilase sobre o substrato com a temperatura. A seta indica valores de temperatura não utilizados nos ajustes.	49
Figura 22 – Emissão de fluorescência da α -amilase na ausência e presença de compostos fenólicos em várias concentrações, A-F: de 0 a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ com incrementos de $2,8 \times 10^{-6}$. Fig.A: ácido clorogênico, Fig.B: ácido cafeico. (T=323K e λ_{ex} =280nm)	50
Figura 23 – Emissão de fluorescência da α -amilase na ausência e presença de compostos fenólicos em várias concentrações, A-F: de 0 a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ com incrementos de $2,8 \times 10^{-6}$. Fig.A: ácido ferúlico, Fig.B: quercetina. (T=323K e λ_{ex} =280nm)	51
Figura 24 – Gráfico de Stern-Volmer da interação α -amilase com os polifenóis. T=323K	53
Figura 25 – Dependência da constante de formação do complexo (K _b) com a temperatura.	54
Figura 26 – Mecanismos de interações TAKA-amilase com acarbose. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas e moléculas de água por esferas sombreadas.	55

Figura 27 – Relação de parâmetros encontrados nos ensaios de cinética e equilíbrio (IC50 e Kb) com descritores reportados para os polifenóis.	57
Figura 28 – Interação de α -amilase com ácido clorogênico em 323K sob a variação de pH.	58
Figura 29 – Interação de α -amilase com ácido clorogênico em 323K sob a variação de força iônica.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de valores V_{max} e K_m diferentes α -amilases	40
Tabela 2 – Tabela de valores de ajuste simultâneo (controle e teste) para inibição competitiva, inibição incompetitiva e inibição não competitiva pura do ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina em 50°C. . .	47
Tabela 3 – Energia de ativação do estado de transição da reação inibitória da α -amilase sobre o substrato.	49
Tabela 4 – Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação de α -amilase e polifenóis	53
Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH e ΔS) da interação α -amilase com polifenóis	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	<i>α-amilase</i>	17
2.2	Constituintes da cerveja	20
2.2.1	Amido cervejeiro	22
2.2.2	Polifenóis da Cerveja	23
2.2.3	Proteínas e polipeptídios da cerveja	25
2.3	Interação de ligantes com proteínas	26
2.3.1	Cinética enzimática	26
2.3.2	Inibição enzimática	28
2.4	Equilíbrio de ligantes e proteínas	29
2.4.1	Determinação experimental de parâmetros de interação de ligantes com proteínas	30
2.4.2	Fluorescência de proteínas	30
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivos específicos	34
5	METODOLOGIA	35
5.1	Materiais	35
5.2	Cinética enzimática de α-amilase por espectrofotometria e efeito da temperatura	35
5.3	Teste de inativação de Selwyn	36
5.3.0.1	Ensaio de inibição enzimática de α -amilase com compostos fenólicos	36
5.3.1	Espectrofluorimetria da interação de α -amilase com compostos fenólicos	36
5.4	Análise de dados	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1	Cinética Enzimática	38
6.1.1	Curva calibração do substrato	38
6.1.2	Teste de inativação de Selwyn	39
6.1.3	Parâmetros Enzimáticos	39
6.1.4	Efeito da temperatura	41
6.2	Inibição Enzimática	44

6.2.1	Determinação dos compostos fenólicos por absorção molecular	44
6.2.2	Cinética de α -amilase na presença de compostos fenólicos	46
6.2.3	Determinação dos parâmetros cinéticos de inibição de polifenóis sobre a α -amilase	47
6.2.4	Efeito da temperatura	48
6.3	Interação de α-amilase com os compostos fenólicos por Espectro- fluorimetria	50
6.3.1	Determinação da constante de ligação (K_{sv})	52
6.3.2	Efeito da temperatura	53
6.3.3	Determinação de parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH e ΔS	54
6.4	Relação estrutura-atividade dos complexos	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

As α -amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, são amplamente utilizadas em indústrias na produção de maltodextrinas, indústrias de panificação, álcool, detergentes, têxteis e em especial para fabricação de cerveja ([BAKKIALAKSHMI; SHANTHI; BHUVANAPRIYA, 2012](#)).

Segundo dados do Serviço Brasileiro de Apoio às Micros e Pequenas Empresas (SEBRAE) e Sindicato Nacional das Industrias de Cerveja (SINDCERV) o Brasil é o 3º maior mercado consumidor de cerveja, com produção de 13 bilhões de litros e consumo de 14 bilhões de litros, resultando em 62 litros per capita (([SEBRAE](#)), 2014). Dados de 2015 da Associação Brasileira de Industrias de Cerveja (CERVBRASIL) reporta que o setor é responsável por 16% do PIB nacional, empregando 2,2 milhões de pessoas que geram R\$27 bilhões em salários e R\$21 bilhões em impostos (([CERVBRASIL](#)), 2015). Porém, ao mesmo tempo em que as maiores empresas cervejeiras do mundo estão inseridas nesse mercado, produzindo basicamente cervejas altamente populares como as American Lager, têm surgido como opção, as cervejas especiais, também conhecidas como artesanais ou *Premium*. Enquanto as grandes empresas crescem 7% ao ano, as microcervejarias produtoras de cervejas especiais alcançam crescimento anual superiores a 14% ao ano ([MATOS et al., 2012](#)).

A produção da cerveja a partir do malte de cevada consiste em um exemplo complexo de enzimologia aplicada. Durante a preparação da cerveja, a ação enzimática que ocorre no preparo do mosto aquecido sob influência de diversos compostos pode levar a um produto final diversificado em propriedades organolépticas, em paralelo aos processos industriais de refinamento e controle de fermentação da cerveja. A ação enzimática desta etapa promove a degradação do amido em açúcares fermentáveis. Interferências físicas (ex: alterações de rampas de aquecimento, ordem na adição de produtos) ou químicas (inibição de enzimas hidrolíticas) podem alterar a disponibilidade de açúcares fermentáveis e posteriormente as características finais da cerveja ([BAMFORTH, 2016](#)).

Pesquisas com abordagem terapêutica, revelam o potencial inibitório de vários compostos fenólicos sobre a ação de enzimas amilases ([SUN et al., 2016b](#); [XIAO et al., 2013](#)), porém são escassos os trabalhos envolvendo a inibição enzimática no contexto de produção de cerveja. Assim, compostos fenólicos presentes durante a mosturação podem interferir na liberação de açúcares fermentáveis pela α -amilase.

Diante do exposto, este trabalho avaliou as possíveis interações moleculares e interferência inibitória de polifenóis usualmente presentes no mosto com α -amilase e em temperaturas compatíveis como o processamento desse. Para tanto foram realizados en-

saios de cinética e inibição enzimática da α -amilase, bem como o equilíbrio químico com polifenóis em temperaturas variando de 25° a 70°C, e os resultados avaliados a partir de parâmetros cinéticos e termodinâmicos relacionados à estrutura dos polifenóis e da enzima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão bibliográfica a seguir relata a ação enzimática envolvida no preparo do mosto cervejeiro, bem como, interferências físicas e químicas envolvidas durante seu processo. Referencial teórico sobre a cinética enzimática e fluorescência de proteínas, também são abordados.

2.1 α -amilase

A α -amilase da cevada *Hordeum vulgare* é uma enzima monomérica de 52 kDa que está envolvida na degradação do amido durante a germinação das sementes de cevada, disponibilizando os açúcares que irá fornecer energia ao embrião da planta para o crescimento (VALLÉE et al., 1998).

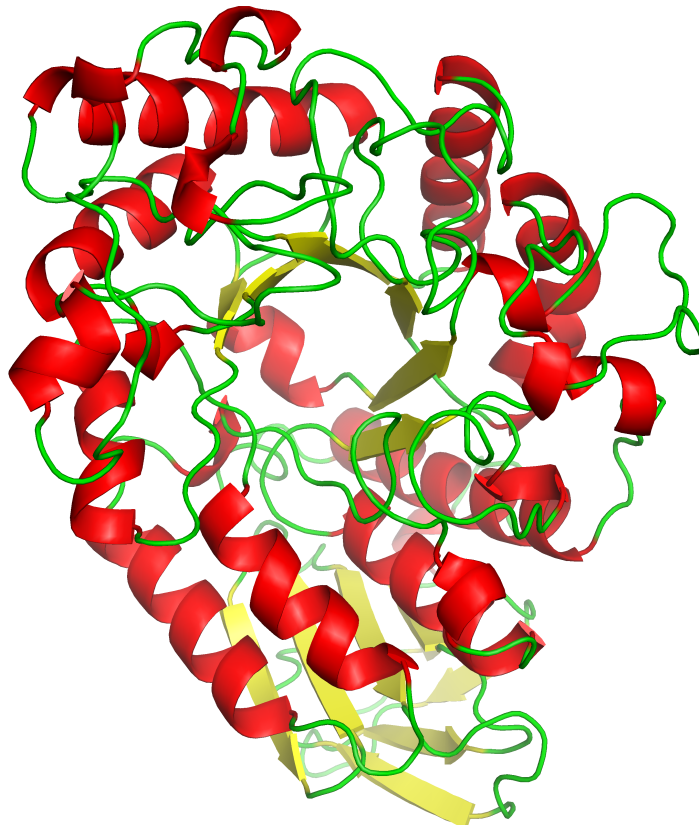


Figura 1 – Representação em cartoon da α -amilase de *Aspergillus oryzae* e seu o domínio catalítico $(\alpha/\beta)_8$.

Fonte: (BRZOZOWSKI; DAVIES, 1997).

Em sementes germinadas de cevada, estão presentes duas isoenzimas α -amilase denominadas AMY1 e AMY2 (ROBERT et al., 2003). Apesar de possuírem 80% de homologia sequencial, essas enzimas mostram-se distintamente diferentes em propriedades físico-químicas e propriedades bioquímicas. AMY1 tem afinidade mais elevada para os íons de cálcio e é a mais estável em pH ácido, porém é menos estável a temperaturas elevadas do que AMY2 (KADZIOLA et al., 1994).

As hidrolases e transferases que constituem a família das α -amilases são proteínas de vários domínios, com cada uma apresentando domínio catalítico formado por uma estrutura super-secundária em barril apresentando 8 dobramentos β circundados por 8 α hélices (α/β)₈ (Fig.1) (SAHNOUN et al., 2016). Essa estrutura é constituída de uma cadeia polipeptídica de cerca de 475 resíduos, apresentando dois grupos tiol livres, quatro ligações de dissulfeto, e um sítio de alta afinidade para ligação de íons Ca^{2+} (BUSH et al., 1989; GRANGER; ABADIE; MARCHIS-MOUREN, 1975; ROBERT et al., 2003).

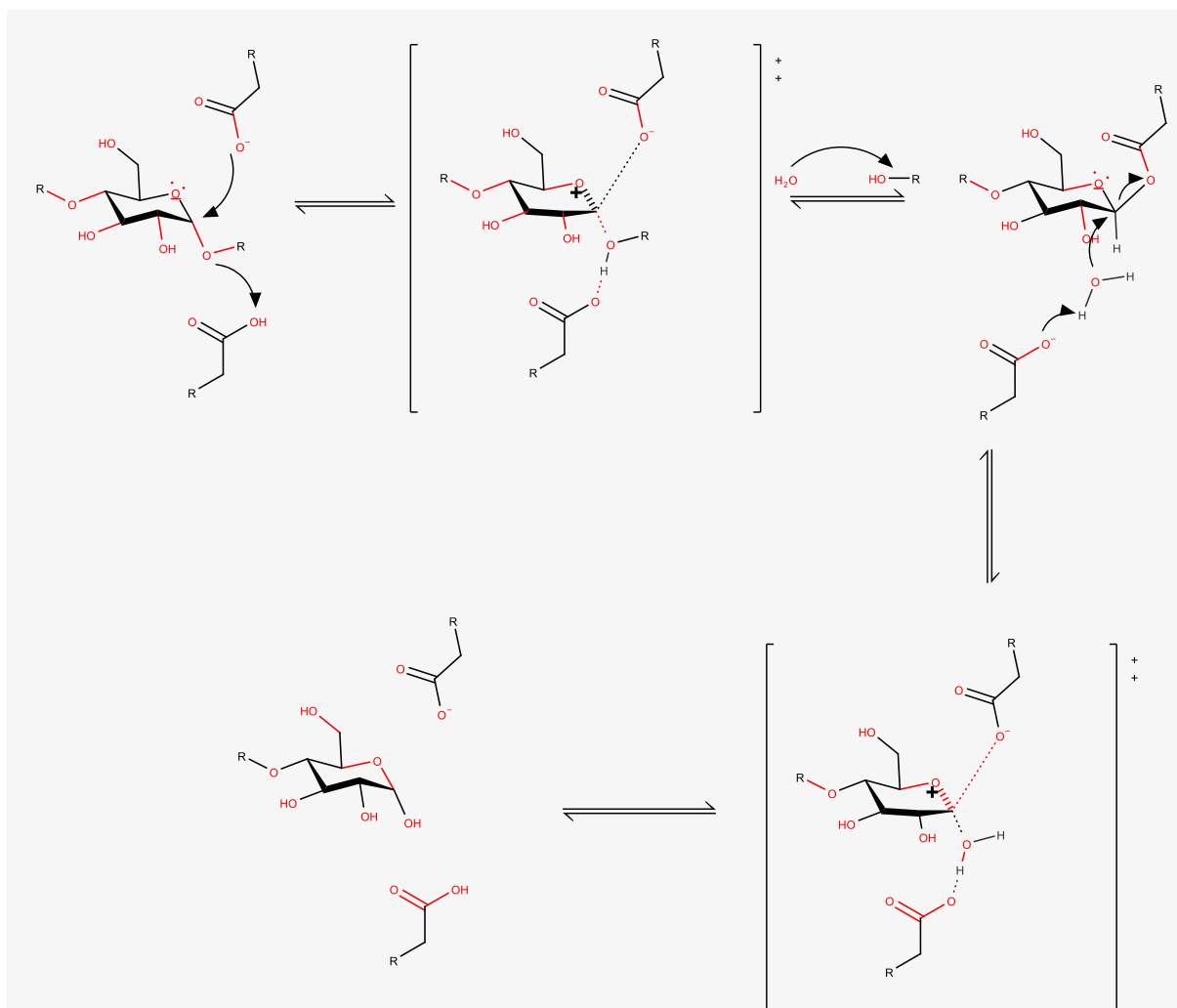


Figura 2 – Etapas catalíticas na clivagem da ligação glicosídica pela α -amilase

Fonte: Do autor, adaptado de (MACGREGOR; JANEČEK; SVENSSON, 2001).

A α -amilase catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-glucano internas em polissa-

cáridios contendo três ou mais unidades de D-glicose, dando origem a uma mistura de maltose e glicose. Embora essas enzimas compartilhem os mesmos resíduos do sítio catalítico (Glu, Asp) e um mecanismo de ação comum, as suas sequências de aminoácidos têm alta variabilidade, sendo agrupados em três famílias separadas de sequências semelhantes em animais, plantas e microrganismos (JANECEK, 1994).

Na composição dessas enzimas, são encontrados 4,7% de prolina representado por 19 resíduos, configurando potencial para neblina coloidal (KADZIOLA et al., 1994).

A inibição da α -amilase pode ocorrer por fatores internos ou externos ao meio, tais como variações da temperatura, variações de pH, o aumento da concentração de açúcares redutores (maltose e glicose) e por fim, a interação com outros compostos (GONÇALVES; MATEUS; FREITAS, 2011; GREENWOOD; MACGREGOR, 1965; HE; LV; YAO, 2007; HILL; MACDONALD; LANG, 1997).

```

      10      20      30      40      50
MMVAWWSLFL YGLQVAAPAL AATPADWRSQ SIYFLLTDRF ARTDGSSTAT

      60      70      80      90     100
CNTADQKYCG GTWQGIIDKL DYIQGMGFTA IWITPVTAQL PQTAYGDAY

      110     120     130     140     150
HGYWQQDIYS LNEYGTADD LKALSSALHE RGYMLMVDVW ANHMGYDGAG

      160     170     180     190     200
SSVDYSVFKP FSSQDYFHPF CFIQNYEDQT QVEDCWLGDN TVSLPDLDTT

      210     220     230     240     250
KDVKNEWYD WVGSLVSNYS IDGLRIDTVK HVQKDFWPGY NKAAGVYCIG

      260     270     280     290     300
EVLGDGPAYT CPYQNVMDGV LNYPIYYPLL NAFKSTSGSM DDLYNMINTV

      310     320     330     340     350
KSDCPDSTLL GTFVENHDNP RFASYTNDIA LAKNVAAFII LNDGIPIIYA

      360     370     380     390     400
GQEQHYAGGN DPANREATWL SGYPTDSELY KLIASANAIR NYAISKDTGF

      410     420     430     440     450
VTYKNWPIYK DDTTIAMRKG TDGSQIVTIL SNKGASGDSY TLSLSGAGYT

      460     470     480     490
AGQQLTEVIG CTTVTVGS DG NVPVPMAGGL PRVLYPTEKL AGSKICSSS

```

Figura 3 – Sequência primária da α -amilase de *Aspergillus oryzae*

Fonte: UniProtKB/Swiss-Prot (P0C1B3).

O mecanismo catalítico de α -amilases segue um padrão similar entre várias espécies (MACGREGOR; JANEČEK; SVENSSON, 2001), entre as quais α -amilase pancreática e salivar humana, de *Aspergillus niger*, *Hordeum vulgare* (cevada), e a *Aspergillus oryzae*, esse último utilizado neste trabalho. Cada enzima possui um resíduo de glutamato (Glu) e dois resíduos de aspartato (Asp) necessários para a atividade, enquanto a maioria das enzimas da família também contêm dois resíduos de histidina (His) críticos para a estabilização do estado de transição (MACGREGOR; JANEČEK; SVENSSON, 2001).

De modo geral, a catálise enzimática segue um mecanismo ácido-básico em que um grupo ácido da enzima protona o oxigênio da ligação glicosídica, geralmente um resíduo de Glu da α -amilase (Fig.2). Em seguida, há um ataque nucleofílico pelo carboxilato do Asp catalítico, ao carbono C1 da glicose. Posteriormente, ocorre uma ativação de uma molécula de água pelo Glu catalítico, que está desprotonado. A molécula de água ativada hidrolisa então a ligação covalente entre o oxigênio do nucleófilo e o carbono C1 da glicose, completando assim o ciclo catalítico (Fig. 2) (BRZOWSKI; DAVIES, 1997; KADZIOLA et al., 1998).

Em particular, a estrutura de α -amilases de *Aspergillus oryzae* e *Hordeum vulgare* possuem uma homologia de 22 % na sequência primária da enzima, com conservação dos resíduos de Asp-204, Glu-229 e His-314 do domínio catalítico de *Hordeum vulgare* alinhados com a tríade catalítica de *Aspergillus oryzae* de Asp-227, Glu-251 e His-317 (Fig. 3) conforme avaliado pelo banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot ((EMBL-EBI), 2016). Complementarmente, as α -amilases de *Aspergillus oryzae* e *Hordeum vulgare* coincidem o valor de pH ótimo em 5,0 e temperatura ótima de trabalho em torno de 50°C (CHANG; TANG; LIN, 1995; MACGREGOR, 1978; RAVIYAN; TANG; RASCO, 2003).

2.2 Constituintes da cerveja

A cerveja pode ser definida como uma bebida carbonatada de teor alcoólico entre 3 e 8 % (v/v) preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, fermento e água potável, permitindo-se ainda o uso de outras matérias primas como arroz, milho, trigo e adjuntos especiais (MATOS et al., 2012). A cerveja como produto é influenciada por diversos fatores que culminam em suas diferentes propriedades físico químicas e organolépticas, dentre esses, a ação enzimática que ocorre durante o processo de malteação. (MACGREGOR et al., 1999).

Dentre as várias etapas de fabricação da cerveja (Fig. 4), o preparo do mosto é responsável por grande parte das atividades bioquímicas da produção da cerveja. Durante esse processo, denominado mosturação que ocorre a quente (40°C a 80°C), as enzimas presentes no malte são ativadas para a hidrólise dos constituintes da matéria prima, liberando monômeros e oligômeros de carboidratos, resíduos de aminoácidos, compostos fenólicos, dentre outros. Após essa etapa, a solução obtida é clarificada utilizando a própria casca do malte como camada filtrante ou filtros industriais, sendo posteriormente fervida na presença de lúpulo para aquisição das características de amargor e aromaticidade (SILVA, 2005). Esse processo ocorre anteriormente ao processo fermentativo, e engloba desde a moagem até o tratamento do mosto cervejeiro. A mosturação pode ser resumida para a obtenção do malte de cevada, oriundo da germinação de grãos de cevada em condições especiais, seguido de morte do embrião, moagem e mistura com água obedecendo a um aumento gradativo de temperatura. Esse aumento ocorre sob a forma de rampas de aque-

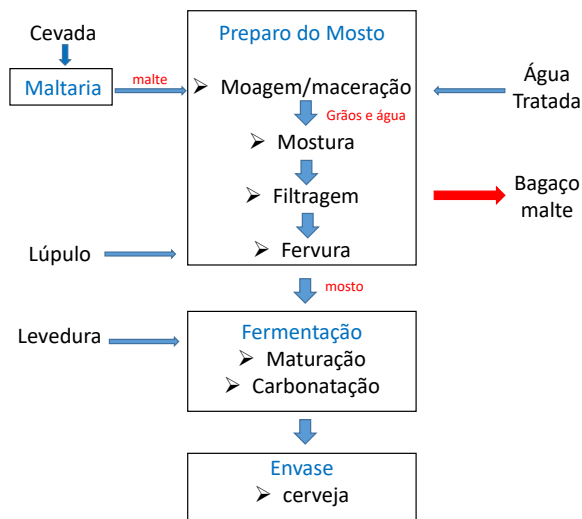


Figura 4 – Processo simplificado de produção de cerveja

Fonte: Do autor.

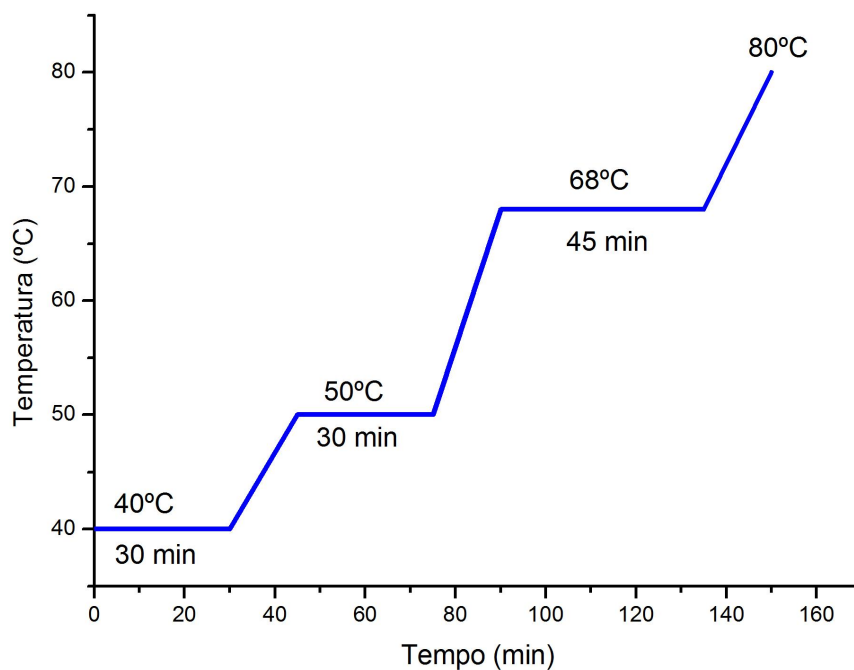


Figura 5 – Exemplo de rampa de temperatura para o processo de mosturação

Fonte: Do autor, a partir (FISHER; FISHER, 2016).

cimento (Fig.5), com a ação da α -amilase estabelecida entre 50°C a 72°C (BAMFORTH, 2016).

A manutenção da qualidade da cerveja em seus estágios de maturação, distribuição e armazenamento na prateleira continua sendo um desafio para os produtores da bebida (BAMFORTH, 1985; STEINER; BECKER; GASTL, 2011). Embora vários atributos sejam usados para estabelecer qualidade global de uma cerveja, os aspectos particulares da estabilidade coloidal da cerveja e o sabor têm recebido atenção considerável (ARON; SHELLHAMMER, 2010).

2.2.1 Amido cervejeiro

O amido originado da cevada é composto principalmente de amilose e amilopectina. Enquanto a amilose (Fig. 6a) possui estrutura helicoidal não ramificada com ligações

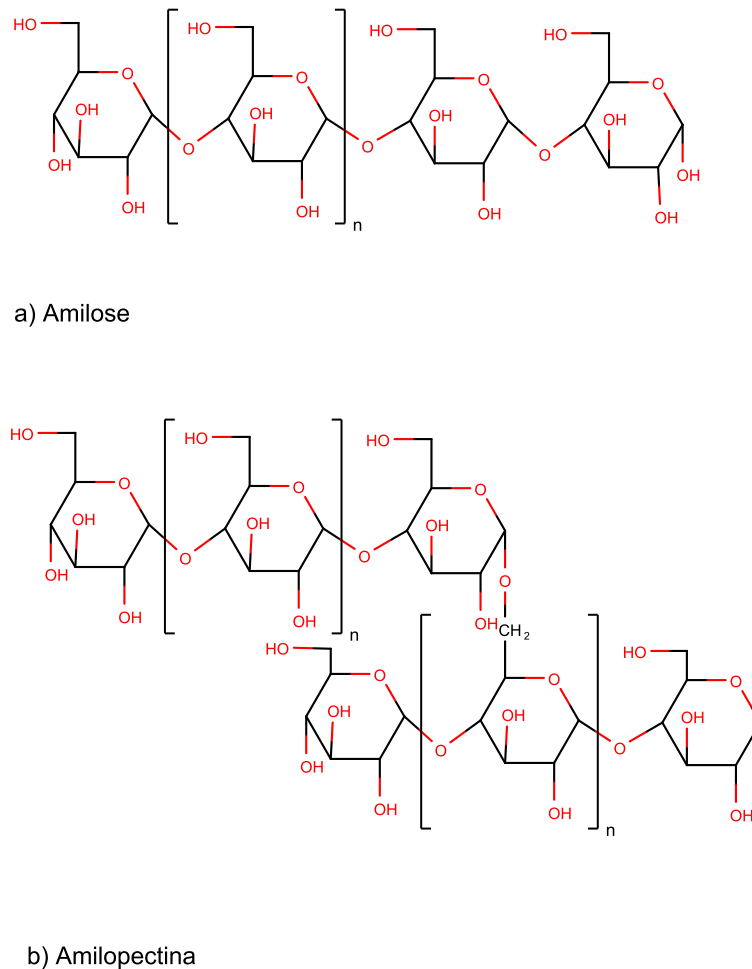


Figura 6 – Amilose e Amilopectina

Fonte: Do autor.

glicosídicas α -1,4, a amilopectina (Fig. 6b) é altamente ramificadas a cada 10-12 resíduos de glicose por ligações α -1,6 (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Durante o preparo do

mosto a amilose é degradada pela α -amilase e β -amilase a uma mistura de maltose e quantidades menores de glicose e maltotriose. A hidrólise da amilopectina produz uma mistura de dextrinas ramificadas além de açúcares fermentáveis. A enzima desramificadora ou dextrinase de limite faz-se necessária para converter essas dextrinas em maltossacarídeos lineares, que podem ser hidrolisados pela β -amilase em maltose. A fase final da hidrólise do amido é catalisada por α -glicosidase, que hidrolisa a maltotriose em maltose e glicose (STENHOLM; HOME, 1999).

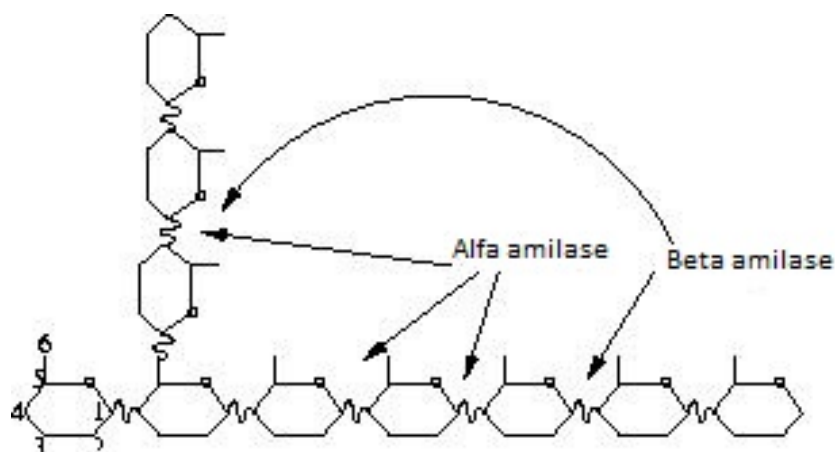


Figura 7 – Atividade de α -amilase e da β -amilase

Fonte: (BRIGGS et al., 2004).

O malte de cevada contém três principais enzimas degradantes do amido: α -amilase, β -amilase e dextrinase limite. As enzimas α -amilase e β -amilase são as principais responsáveis pela formação de açúcares fermentáveis durante a produção de mosto. Ambas as enzimas quebram as ligações α -1,4 das cadeias de glicose que formam o amido. A α -amilase hidrolisa as ligações em pontos aleatórios na cadeia de amido. Em contraste, a β -amilase atua sobre a ligação entre os últimos dois e três resíduos de glicose na cadeia de amido, liberando maltose conforme a Fig. 7 (BRIGGS et al., 2004).

2.2.2 Polifenóis da Cerveja

Componentes fenólicos são adicionados à cerveja por lúpulo e malte. Eles exercem uma influência sobre vários atributos de qualidade da cerveja, tais como cor, sabor, adstringência e estabilidade coloidal da cerveja (ARON; SHELLHAMMER, 2010; COLLIN et al., 2013; GRAMSHAW, 1967; STEINER; BECKER; GASTL, 2011).

A estrutura dos compostos fenólicos é baseada em benzeno mono-hidroxilados, abrangendo o termo todas as moléculas com dois ou mais anéis fenólicos (BAMFORTH, 1999).

Todos os flavonoides (oligômeros de flavanols) têm a mesma estrutura básica de dois anéis aromáticos ligados por um a três unidades de carbono, e muitas vezes são

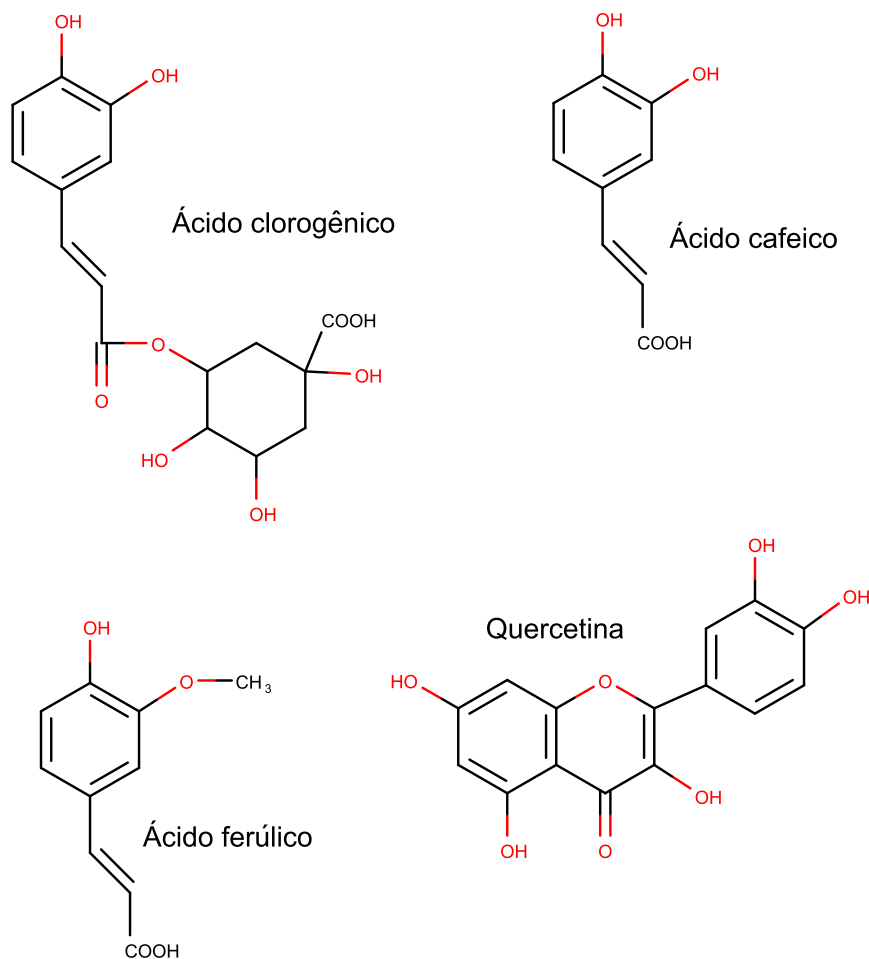


Figura 8 – ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina.

Fonte: Do autor.

hidroxiladas em diferentes graus e por vezes, glicosiladas ou metilado (DONER; BECARD; IRWIN, 1993).

Durante a brassagem, flavonoides originados do malte são progressivamente dissolvidos no mosto (monômeros se dissolvem muito mais rapidamente do que os oligômeros). Dos intervalos entre a filtração do mosto até a ebulição, uma grande parte deles é perdida por oxidação, adsorvida, ou coagulada através de interações com proteínas.

Os polifenóis que ocorrem naturalmente na cerveja são membros das proantocianidinas, oligômeros e polímeros de catequinas, epicatequina, e galocatequina, ou monômeros,

como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e quercetina, esses últimos analisados neste trabalho (Fig. 8) (MAROVA et al., 2011). A literatura reporta concentração de tais polifenóis presentes em cerveja com valores de 23,1 mg.L⁻¹ para ácido cafeico, 51,4 mg.L⁻¹ ácido ferúlico, 537,1 mg.L⁻¹ ácido clorogênico e 18,3 mg.L⁻¹ para a quercetina (RODRIGUES et al., 2016). Também podem ser encontradas na cerveja proantocianidinas diméricas e triméricas como procianidina B3 (catequina-catequina) e prodelfinidina B3 (galocatequina-catequina). Durante o envelhecimento da cerveja, os polifenóis presentes podem se polimerizar, aumentando seu peso molecular e sua capacidade de interação com compostos proteicos (DIENSTBIER et al., 2011).

2.2.3 Proteínas e polipeptídios da cerveja

Aproximadamente 300 a 500 mg.L⁻¹ dos constituintes da cerveja são de material proteico, incluindo uma variedade de polipeptídios com massas moleculares variando entre 5 a 100 kDa. Porém, apenas 2 mg.L⁻¹ de proteína parece ser suficiente para formar a neblina coloidal (BISHOP, 1975). Polipeptídios de cerveja decorrem principalmente de cevada, bem como de adjuntos de cereais e lúpulo. Apenas um terço do conteúdo total das proteínas chega ao final da produção da cerveja, sendo a maioria degradada durante a maltagem pela atividade de enzimas proteolíticas transformadas em polipeptídios, e amina livre, e aminoácidos individuais (LEIPER; MIEDL, 2008).

Cerca de 20% das proteínas totais encontradas no mosto cervejeiro são solúveis em água (STEINER; BECKER; GASTL, 2011). Essas proteínas solúveis são resistentes à proteólise e coagulação por calor e, portanto, passam pelas etapas de produção da cerveja, intactas ou com pouca modificação. Esses polipeptídios, que se originam, principalmente, a partir de proteínas da cevada, constituem o produto de modificações proteolíticas e químicas que ocorrem durante a infusão (STEINER; BECKER; GASTL, 2011).

O material proteico da cerveja é originário da proteína Z da cevada e está presente em duas isoformas, a proteína Z4 e proteína Z7, sendo que na cevada e no malte a proteína Z4 constitui cerca de 80% (HEJGAARD; KAERSGAARD, 1983). Resultados indicam que a proteína Z é muito resistente à degradação e a desnaturação durante a maltagem e fabricação de cerveja (HEJGAARD, 1977).

A cerveja é composta por várias substâncias, tais como proteínas, hidratos de carbono, polifenóis, ácidos graxos, ácidos nucleicos, aminoácidos, dentre outras substâncias. Essas substâncias podem precipitar e formar uma turvação/neblina em condições variáveis de temperatura e composição de produtos da cerveja (STEINER; BECKER; GASTL, 2011). A formação da neblina coloidal pode ser de natureza biológica (contaminação microbiana) e não biológica.

As turvações não-biológicas podem ocorrer quando polipeptídios ricos em prolina combinam com polifenóis específicos, em particular dímeros de flavonol procianidina B3

e prodelphinidina B3. Essa reação de formação de névoa pode ser impedida por remoção do componente proteico com gel de sílica, ou do componente polifenólico com PVPP (polivinilpirrolidona) (LEIPER; STEWART; MCKEOWN, 2003; SIEBERT, 1999). As interações de proteína em polifenol parecem ocorrer por ligação de hidrogênio entre os átomos de oxigênio de ligações peptídicas e os grupos hidroxila dos polifenóis. Complementarmente, pode ocorrer ligação entre aminoácidos hidrofóbicos (prolina, triptofano, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina e valina) e o anel hidrofóbico de polifenol, bem como ligação iônica entre proteínas carregadas positivamente (grupos α -amino de lisina) com grupos hidroxilo negativos de polifenóis (SIEBERT, 1999).

Embora sejam bem conhecidos os efeitos de compostos fenólicos inerentes da cerveja na estabilidade coloidal que ocorre durante a maturação e armazenamento a frio (COLLIN *et al.*, 2013), pouco se sabe sobre a interação desses compostos com constituintes da cerveja durante o processo inicial de brassagem em rampas de temperatura e em especial sobre a atividade de α -amilase.

2.3 Interação de ligantes com proteínas

A combinação de substâncias com enzimas normalmente afeta sua ação biológica. Essa ligação pode ser analisada quantitativamente sob os aspectos cinéticos (atividade biológica) e termodinâmica (energia de ligação) do binômio proteína-composto envolvido. Dessas análises é possível estabelecer se, como, onde e quanto um composto qualquer é capaz de interagir com uma proteína, alterar sua ação biológica e conformação nativa (GORE *et al.*, 2000).

2.3.1 Cinética enzimática

A atividade de uma enzima é comumente determinada por seus parâmetros cinéticos. Esses parâmetros foram inicialmente deduzidos a partir dos trabalhos de Henry e cols (BISSWANGER, 2008).

Em 1913, Michaelis e Menten propuseram uma série de mecanismos e hipóteses às reações enzimáticas que levaram a um modelo de cinética bem estabelecido experimentalmente conforme a Eq. 7.

$$v = \frac{V_{max}[S]_t}{K_m + [S]_t} \quad (2.1)$$

Onde v é a velocidade inicial da reação, V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]_t$ é a concentração do substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten para afinidade da enzima pelo substrato.

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão do substrato em produto pela ação da enzima.

Considerando $v = \frac{d[P]}{dt}$ e $[S]_t = [S]_0 - [P]$, a Eq. 9 pode ser integrada por separação de variáveis.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}([S]_0 - [P])}{K_m + ([S]_0 - [P])} \quad (2.2)$$

$$\int \frac{K_m + ([S]_0 - [P])}{[S]_0 - [P]} d[P] = \int V_{max} dt \quad (2.3)$$

$$-K_m \ln([S]_0 - [P]) + [P] = V_{max} t + \alpha \quad (2.4)$$

Usando a condição inicial $[P]=0$ quando $t=0$, fica $\alpha = -K_m$, e rearranjando tem-se a equação integrada de Michaelis-Menten (Eq. 2.5).

$$V_{max} t = [P] + K_m \ln\left(\frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}\right) \quad (2.5)$$

Onde V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]_t$ é a concentração do substrato no tempo t , P é a concentração do produto formado, t é o tempo, K_m é a constante de Michaelis-Menten para afinidade da enzima pelo substrato e $[S]_0$ é a concentração do substrato no tempo zero.

Rearranjando a Eq. 2.5, pode-se obter uma expressão que foi utilizada neste trabalho para a determinação de parâmetros cinéticos (Eq. 2.6).

$$t = -\frac{1}{V_{max}} * (K_m * \log([S]_t/[S]_0) + ([S]_t - [S]_0)) \quad (2.6)$$

A equação integrada de Michaelis-Menten (Eq. 5) e suas variações (Eq. 06) permitem a determinação de parâmetros catalíticos a partir de um único ensaio, otimizando tempo, reagentes e substratos. Essa determinação se dá por ajuste não linear de modelos cinéticos aos dados de uma curva progressiva de formação do produto ou de decaimento do substrato ao longo do tempo. Ajustes não lineares possuem vantagens sobre o tratamento linear de dados de catálise enzimática (ex: Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, entre outros, (HALPERN; ADÃO; QUINTAS, 1997)), uma vez que não há transformação das variáveis originais (t , S_t), não se fere premissas de independências de variáveis para ajustes lineares (ex: Eadie-Hofstee), e tampouco produzem dispersões assimétricas dos erros (ex: Lineweaver-Burk).

Métodos de regressão devem ser avaliados criticamente, especialmente tendo em vista a detecção de desvios da curva hiperbólica esperado pela Eq. 2.1. A confiabilidade dos

métodos de regressão não-linear e, portanto, das constantes derivadas de tais tratamentos é frequentemente mais elevada do que a dos métodos de linearização. Além disso, tem a vantagem adicional de apresentar os resultados de forma direta, e juntamente com a dispersão do erro (BISSWANGER, 2008).

2.3.2 Inibição enzimática

Um grande número de substâncias pode inibir a atividade enzimática. Os inibidores podem ser reversíveis ou irreversíveis, de acordo com a estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima. Os inibidores irreversíveis se ligam as enzimas levando a inativação definitiva desta. Os inibidores reversíveis podem ser basicamente divididos em competitivos, incompetitivos e não-competitivos (MARANGONI, 2003).

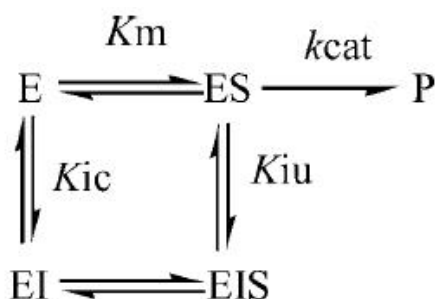


Figura 9 – Diagrama de inibição enzimática. E, enzima; ES, complexo enzima/ substrato; EIS, complexo inibidor/enzima/substrato; EI, complexo enzima/inibidor; P, produto; K_m , constante de Michaelis-Menten; K_{ic} , constante de inibição competitiva; K_{iu} , constante de inibição incompetitiva, k_{cat} , constante de velocidade.

Fonte: (BEZERRA; DIAS, 2005).

Esses modelos de inibição podem ser observados a partir do diagrama de inibição representado na Fig. 9, e no qual as diferentes constantes (K_{ic}, K_{iu}) tendem ao infinito (BEZERRA; DIAS, 2005). Desse modo, se K_{ic} e K_{iu} são insignificantes ($K_{ic}=\infty$, $K_{iu}=\infty$), obtemos um modelo sem inibição. Se somente K_{iu} for insignificante ($K_{iu}=\infty$), o modelo obtido é de inibição competitiva. Quando K_{ic} for insignificante ($K_{ic}=\infty$) o modelo obtido é de inibição incompetitiva. Um terceiro tipo de inibição pode ocorrer quando $K_{ic}=K_{iu}\neq\infty$, originando-se uma inibição não-competitiva pura. Finalmente, ainda existe a possibilidade de uma inibição não-competitiva mista, onde $K_{ic}\neq K_{iu}\neq\infty$.

Os inibidores competitivos normalmente se assemelham ao substrato, ocupando o sítio ativo e impedindo que o substrato se ligue à enzima. Quando o inibidor for competitivo, o que muda nas constantes cinéticas é o valor de K_m determinado experimentalmente. Nesse caso, a equação integrada de Michaelis-Menten será conforme a Eq. 2.7 onde v é a velocidade inicial da reação, V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]_t$ é a concentração

do substrato, I é a concentração do inibidor, K_{ic} é a constante de inibição competitiva e K_m é a constante de Michaelis-Menten para afinidade da enzima pelo substrato.

A equação integrada de Michaelis-Menten que define o modelo de inibição competitiva pode ser deduzida a partir da Eq. 2.6 anterior, onde o termo $(1 + \frac{I}{K_{ic}})$ representa a contribuição do efeito inibitório.

$$t = -\frac{1}{V_{max}} * (K_m * (1 + \frac{I}{K_{ic}}) * \ln([S]_0/[S]_t) + ([S]_0 - [S]_t)) \quad (2.7)$$

Inibidores incompetitivos, por sua vez ocupam o sítio ativo complexados ao substrato. No caso de inibidores incompetitivos, a V_{max} não é atingida. Como o inibidor não afeta o sítio ativo como um todo, a afinidade da enzima pelo substrato é mantida e o valor de K_m não se altera conforme a Eq. 2.8, onde K_{iu} é a constante de inibição incompetitiva.

Assim, a equação integrada que define o modelo de inibição incompetitiva Eq. 2.8 pode ser deduzida a partir da Eq. 2.6 anterior.

$$t = -\frac{1}{V_{max}} * ((K_m * \ln([S]_0/[S]_t) + (1 + \frac{I}{K_{iu}}) * ([S]_0 - [S]_t)) \quad (2.8)$$

Já os inibidores não-competitivos puros (Eq. 2.9) alteram tanto o valor de K_m (aumenta) como o valor de V_{max} (diminui) (BISSWANGER, 2008).

A equação integrada de Michaelis-Menten para o modelo não competitivo pode ser deduzida a partir da Eq. 2.6 anterior.

$$t = -\frac{1}{V_{max}} * ((K_m * (1 + \frac{I}{K_{ic}}) * \ln([S]_0/[S]_t) + (1 + \frac{I}{K_{iu}}) * ([S]_0 - [S]_t)) \quad (2.9)$$

2.4 Equilíbrio de ligantes e proteínas

A interação de um ligante (L) a uma proteína (P) resulta no complexo



proteína-ligante (PL), e pode ser descrita a partir da lei de ação de massas pela constante de dissociação (K_d) ou o valor do seu recíproco, a constante de associação (K_b) (BISSWANGER, 2008), e que juntamente com o número de sítios de interação, representa o conjunto de parâmetros de equilíbrio para uma associação desse tipo.

$$K_d = \frac{1}{K_b} = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (2.11)$$

2.4.1 Determinação experimental de parâmetros de interação de ligantes com proteínas

A determinação experimental de parâmetros termodinâmicos, constantes de afinidade e a estequiometria da formação de complexos é uma importante ferramenta para os estudos envolvendo processos de reconhecimento molecular (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012). Tais medidas adicionam informação a estudos teóricos e experimentais auxiliando na construção de modelos que permitam a elucidação de mecanismos bioquímicos, função de proteínas, relação entre propriedades de compostos e sua atividade biológica, entre outros. Com base no conhecimento da interação de determinadas moléculas com uma proteína alvo é possível, por exemplo, desenhar compostos capazes de controlar sua atividade, interrompendo ou estimulando as rotas metabólicas das quais a proteína alvo participa. Existe um amplo espectro de técnicas e entre essas, as espectroscópicas para tais determinações, incluindo luminescência, espectroscopia IR-Raman, dicroísmo circular, dispersão óptica rotatória ressonância magnética nuclear, raio-x, entre outros (HARVEY, 2014). Nesse trabalho utilizamos a espectroscopia de absorção UV-VIS e a espectroscopia de fluorescência para determinação, respectivamente, de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação de α -amilase com compostos fenólicos.

2.4.2 Fluorescência de proteínas

Uma área de pesquisa que tem se beneficiado de extensas investigações de fluorescência é o campo de estudos de estrutura-função de proteínas. Existem três fluoróforos intrínsecos – triptofano, tirosina e fenilalanina na estrutura de uma proteína (Fig. 10). A fluorescência de cada um deles pode ser distinguida por valores distintos de comprimentos de onda para excitação e conseqüente emissão para os compostos. (GORE et al., 2000).

Na prática, o triptofano é o fluoróforo intrínseco dominante, devido a diferenças no rendimento quântico de fluorescência e na transferência de energia de ressonância. Os resíduos de triptofano presentes nas proteínas representam cerca de 90% da fluorescência total das proteínas, e este tem alta sensibilidade ao seu ambiente local. As alterações nos espectros de emissão do triptofano podem estar ligadas a transições conformacionais, associação de subunidades, ligação ao substrato ou desnaturação. Essas interações podem afetar o ambiente local na circunvizinhança do anel indol (LIMPOUCHOVÁ; PROCHÁZKA, 2016).

A intensidade de fluorescência de uma proteína pode ser diminuída como resultado de uma ampla variedade de processos. Tais declínios na intensidade podem ser resultados de diferentes interações moleculares entre a proteína e o ligante (GORE et al., 2000).

Os mecanismos de interação entre a proteína e o ligante podem ser geralmente classificados entre extinção da fluorescência dinâmica, extinção da fluorescência estática, ou ainda mista, estática e dinâmica.

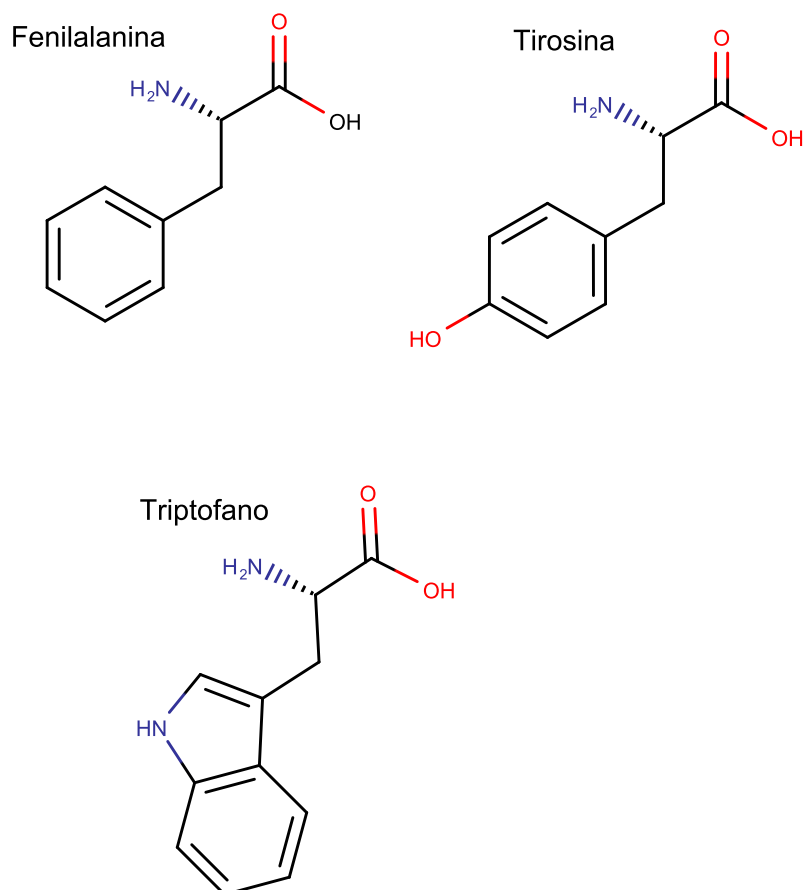


Figura 10 – Estrutura molecular dos aminoácidos fluoróforos.

Fonte: Do autor.

As extinções dinâmicas ocorrem quando o fluoróforo no estado excitado passa para o estado desativado ao entrar em contato com outra molécula (ligante) e nenhuma das moléculas é quimicamente alterada durante o processo. No caso de extinção estática, um complexo não fluorescente é formado. A extinção mista (estática e dinâmica) preserva a ocorrência simultânea dos dois fenômenos (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

Os mecanismos de extinção da fluorescência podem ser avaliados pela relação de Stern-Volmer (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012). No caso das extinções serem puramente estático ou dinâmico, a representação gráfica mostra-se linearmente dependente, entretanto, se a interação ocorrer de forma mista entre estática e dinâmica, o gráfico de Stern-Volmer mostra-se dependente exponencialmente (TRNKOVÁ et al., 2010).

A extinção da fluorescência é descrita pela Eq. 2.12 de Stern-Volmer.

$$\frac{F_0}{F} = K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.12)$$

Nesta equação, F_0 e F são as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença de ligante, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do ligante, k_q é a constante da interação bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do ligante (τ_0 da ordem de $5 \cdot 10^{-9}$ s) e constante de interação de Stern-Volmer será K_{sv} . Em experimentos de interação ligante-macromolécula, o valor de K_{sv} é comumente considerado como a constante de interação do complexo (K_b) (RASHIDIPOUR; NAEEMINEJAD; CHAMANI, 2016; WEERT; STELLA, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O mercado de cervejas especiais vem crescendo a cada ano, ganhando notável espaço frente ao mercado de cervejas populares, obtendo, assim, importância estratégica no mercado nacional. Mediante esse contexto, estudar mais intimamente a bioquímica envolvida no processo de produção da cerveja pode trazer benefícios à qualidade da bebida. A α -amilase é uma enzima chave na produção das cervejas por ser responsável pela hidrólise do amido em açúcares fermentáveis. Durante o processo de preparação do mosto que ocorre de 40°C a 80°C, essa enzima pode ser afetada por polifenóis presentes na mistura. Daí, a origem da presente proposta de pesquisa, a avaliação da interação e do potencial inibitório de polifenóis normalmente encontrados em cerveja sobre a atividade catalítica da α -amilase em temperatura elevada.

4 OBJETIVOS

Avaliar a cinética e o equilíbrio da interação de α -amilase com polifenóis usualmente presentes em cerveja em diferentes temperaturas.

4.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a atividade enzimática de α -amilase;
- b) Estudar a atividade enzimática de α -amilase sob variação de temperatura;
- c) Determinar parâmetros cinéticos de α -amilase (K_m , V_{max});
- d) Avaliar o potencial inibitório de polifenóis sobre α -amilase e eficiência inibitória (K_i);
- e) Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação de α -amilase com polifenóis (K_b , saturação de sítios, variações de energia livre, entalpia, entropia e sua relação com o sistema solvente-proteína);
- f) Avaliar mecanismos na interação de α -amilase com os polifenóis;

5 METODOLOGIA

Nesta sessão são apresentados os materiais, reagentes e procedimentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

5.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico. Foi empregado como substrato o amido solúvel (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os polifenóis escolhidos foram o ácido cafeico, ácido clorogênico, quercetina e ácido ferúlico, todos de grau P.A., fornecidos pela Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, EUA).

A pureza da enzima α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, EUA) foi testada a partir do seu coeficiente de extinção molar e perfil de absorção molecular calculada pela base de dados ProtParam tool ((SIB), 2016), onde $A_{280nm}0,1\% = 1,8 = 89\%$ de pureza para a mesma. Também verificou-se o grau de pureza dos polifenóis através do seu coeficiente de extinção molar e perfil de absorção molecular.

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Unifal-MG em Alfenas, MG.

5.2 Cinética enzimática de α -amilase por espectrofotometria e efeito da temperatura

Utilizamos o método modificado de amido-iodo (BIRD; HOPKINS, 1954) como ensaio de referência. A solução de amido foi preparada em uma concentração de 20 mg.mL^{-1} e diluída em uma proporção de 1:1 com um tampão fosfato de potássio $0,04 \text{ M}$ pH 5,9. O reagente de revelação foi preparado por diluição em 100:1 da solução estoque de lugol (500 mg de iodo e 5,0 g de iodeto de potássio/100 mL de água).

Uma alíquota de 1 mL de solução de amido foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de tampão fosfato de potássio $0,04 \text{ M}$ e incubado durante 10 min em banho-maria modelo HMO128D (Hemoquímica, Minas Gerais, Brasil) com controlador digital de temperatura de ensaio (298K, 313K, 323K e 343K). A enzima ($30 \mu\text{L}$ a concentração de 1 mg.ml^{-1} em água) foi adicionada na solução de substrato e incubada sob as condições do ensaio. Após intervalos de 30 segundos, retirou-se do sistema tampão/amido/enzima alíquotas de $50 \mu\text{L}$, e adicionado-se 1 mL de reagente de interrupção (HCl, $0,05\text{M}$). Após homogenização, adicionou-se $100\mu\text{L}$ de solução de iodo.

O decaimento do sinal do substrato foi monitorado em um espectrofotômetro Libra S22 UV/Vis (Biochrom LKB, St Albans, Reino Unido) em temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura da solução foi aferida por um termômetro digital MT-600 (Minipa, São

Paulo, Brasil).

5.3 Teste de inativação de Selwyn

Testes da atividade da enzima durante o ensaio enzimático foram realizados conforme metodologia de Selwyn, a fim de se aferir uma possível inativação enzimática durante a reação. Mantendo-se a estabilidade da enzima, os pontos experimentais de um gráfico de produto formado por concentração da enzima multiplicado pelo tempo devem se sobrepor (SELWYN, 1965). Os ensaios cinéticos foram realizados como anteriormente descritos, variando as concentrações de α -amilase de $2,16 \times 10^{-5}$ até $1,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹.

5.3.0.1 Ensaio de inibição enzimática de α -amilase com compostos fenólicos

O ensaio de inibição enzimática da α -amilase foi realizada adotando como base o mesmo teste da cinética enzimática (BIRD; HOPKINS, 1954), adaptando-o para a adição de alíquotas da solução dos polifenóis adaptado da literatura (FUNKE; MELZIG, 2005).

Uma alíquota de 1 mL de solução de amido foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,04 M e incubado durante 10 min em banho-maria (298K, 313K e 323K). A enzima (30 μ L a concentração de 1 mg.ml⁻¹) foi previamente incubada com a alíquota do composto fenólico durante 10 minutos, sendo posteriormente adicionada na solução de substrato sob as condições do ensaio. Após intervalos de 30 segundos, retirou-se do sistema tampão/amido/enzima/composto fenólico alíquotas de 50 μ L e adicionado 1 mL de reagente de interrupção (HCl, 0,05M). Após homogeneização, adicionou-se 100 μ L de solução de iodo.

5.3.1 Espectrofluorimetria da interação de α -amilase com compostos fenólicos

Os ensaios para obtenção de parâmetros termodinâmicos da interação da α -amilase com os polifenóis foram realizados em um fluorofotômetro CaryEclipse Spectro (Varian, Austrália) conectado a um banho de circulação de água modelo Q214-SC (Quimis, São Paulo, Brasil) com programação de rampas de temperatura controlada por microprocessador. Os dados coletados foram obtidos a temperaturas de solução constante de 293, 303, 313, 323 e 333K. A temperatura da solução foi aferida por um termômetro digital MT-600 (Minipa, São Paulo, Brasil). Para os ensaios, alíquotas dos polifenóis foram adicionadas à solução enzimática, monitorando-se a o espectro de varredura após 5 minutos de incubação.

As medições de fluorescência foram realizados conforme Freitas, et al. (FREITAS et al., 2012) comprimento de onda de excitação de 280 nm. A emissão de fluorescência, medido em 90 graus em relação ao feixe de excitação, foi registrada em comprimento de

onda 290-500 nm. Os dados obtidos foram corrigidos para o efeito interno segundo Van De Weert e Stella, 2011 (WEERT; STELLA, 2011).

A análise dos dados foi realizada tomando como base a equação de Van't Hoff descrita a seguir (GORE et al., 2000).

Utilizando K_b , a energia de Gibbs (ΔG°) pode ser estimada a partir da Eq. 5.1.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (5.1)$$

A equação de van't Hoff é derivada da Eq. 5.2 para cálculo da energia de Gibbs.

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S \quad (5.2)$$

Igualando e rearranjando as Eq. 5.1 e Eq. 5.2, obtemos a equação de van't Hoff (5.3) (GORE et al., 2000).

$$\ln K_b = -\left(\frac{\Delta H}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S}{R} \quad (5.3)$$

A equação de van't Hoff constitui uma representação linear em que um gráfico $\ln K_b$ versus $\frac{1}{T}$ produz uma linha reta com inclinação $-\frac{\Delta H}{R}$ e intersepto $\frac{\Delta S}{R}$, desde que não haja alteração na capacidade calorífica em função dos limites de temperatura utilizados.

5.4 Análise de dados

Os dados foram obtidos a um mínimo de triplicatas e representados por média \pm desvio padrão. Foram aceitos como significativos os resultados dos ajustes não lineares obtidos com p valor menor que 0,05, após tratamento dos dados com auxílio do pacote estatístico de distribuição livre R (versão 3.21). A qualidade dos ajustes matemáticos lineares foi aferida por comparação simples dos valores de coeficiente de correlação de Pearson (R), bem como dos parâmetros de dispersão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho apresentados a seguir, são referentes ao equilíbrio químico e cinética enzimática da interação da α -amilase com os polifenóis testados.

6.1 Cinética Enzimática

Os resultados a seguir, são referentes a cinética enzimática da interação da α -amilase com os polifenóis testados.

6.1.1 Curva calibração do substrato

A Fig. 11 apresenta os resultados da curva analítica de concentrações pré-definidas de amido solúvel em função da absorvância na região UV-VIS do espectro eletromagnético.

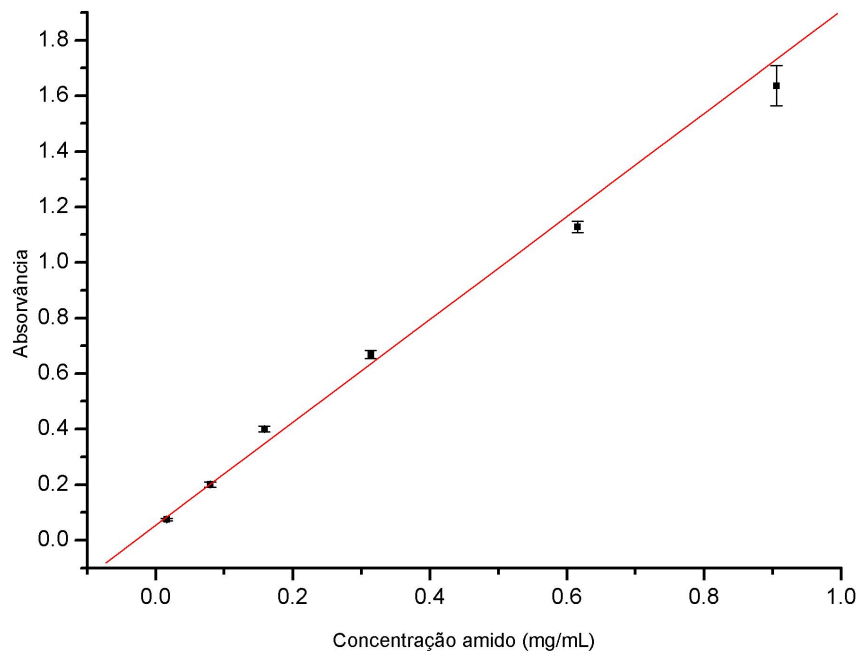


Figura 11 – Curva analítica de concentrações pré-definidas de amido em função da absorvância em tampão fosfato 0,05M pH 5,9 ($R=0,995$), obtida por reação do polímero com triodina em 25°C.

Fonte: Do autor.

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (ŁOBIŃSKI; MARCZENKO, 1992). Pelo

resultado da Fig. 11 é possível assumir uma adequação dos valores de absorvância à Lei de Beer quando da reação de amido com KI/I₂.

6.1.2 Teste de inativação de Selwyn

O teste de Selwyn detecta a inativação da enzima por efeito da diluição da mesma e permite descartar fenômenos que interferem na atividade enzimática (SELWYN, 1965).

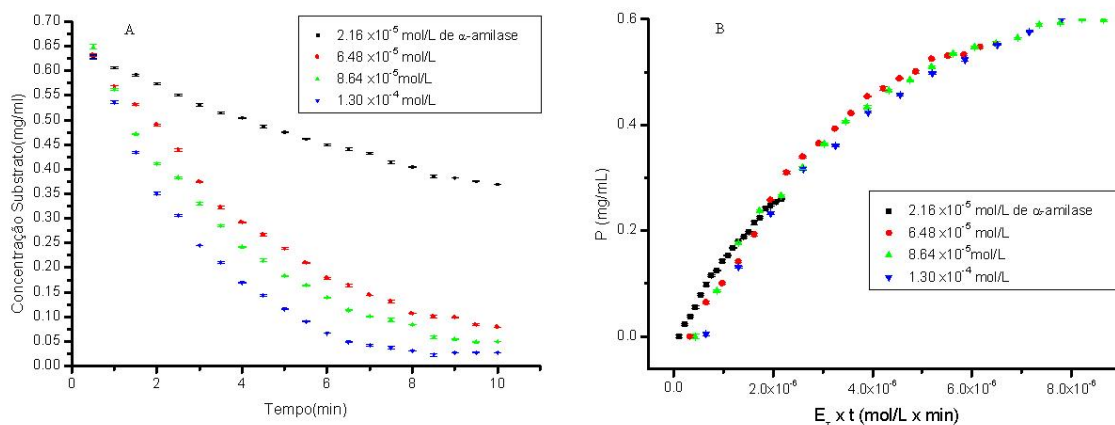


Figura 12 – A - Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase em concentrações crescentes de $2,16 \times 10^{-5}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 25°C, B - Produto da concentração da enzima pelo tempo(min) contra a quantidade de produto liberado (Teste de Selwyn).

Fonte: Do autor.

Os resultados foram analisados através de representação gráfica do produto de concentração da enzima pelo tempo contra a quantidade de produto liberado (Fig. 12). Como os pontos experimentais coincidiram sobre uma única curva, pode-se observar que não houve inativação da α -amilase durante os ensaios (HINTZPETER; MARTIN; MASER, 2015).

6.1.3 Parâmetros Enzimáticos

A ação da enzima pode ser verificada através de uma curva de consumo do substrato no tempo apresentada na Fig. 13. A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada utilizando-se os dados experimentais obtidos a partir da curva de decaimento.

O resultado do ajuste não linear dos dados de tempo *versus* substrato livre está representada pela linha contínua na Fig. 13, tomando como base a equação 2.6. Os resultados obtidos foram de K_m de $2,11 \pm 0,03$ mg.mL⁻¹ e V_{max} de $0,62 \pm 0,29$ mg.mL⁻¹.min⁻¹.

A Tabela 1 apresenta uma significativa dispersão de valores de K_m e V_{max} encontrados na literatura para a ação da α -amilase, justificada por uma série de fatores, como

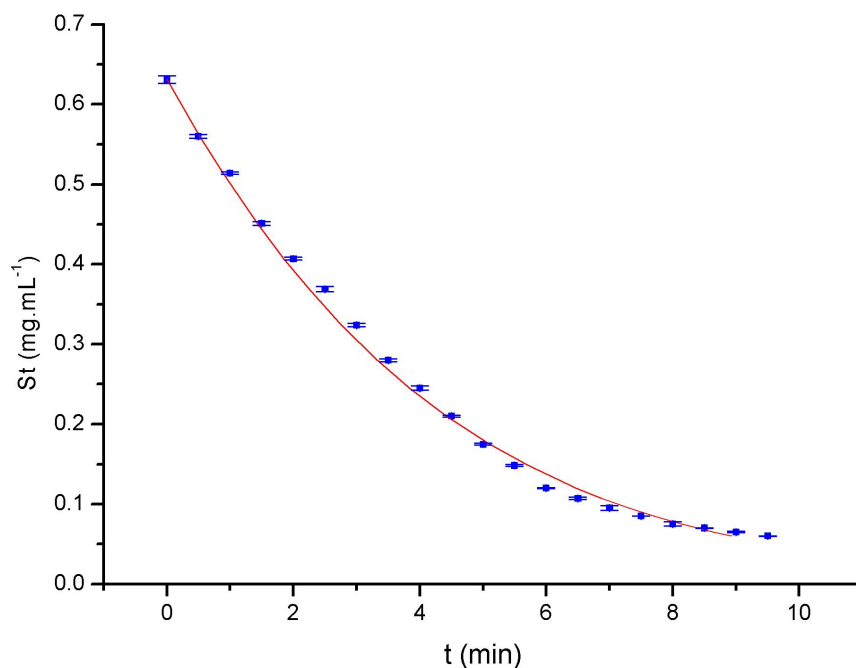


Figura 13 – Decaimento da concentração de amido por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 25°C. A linha contínua representa o ajuste não linear da equação integrada de Michaelis-Menten aos dados experimentais.

Fonte: Do autor.

o organismo, fonte da enzima, grau de purificação da amostra, condições do teste (pH, temperatura, entre outros), e características estrutural e físico-química. Apesar disso, a enzima utilizada neste trabalho apresentou resultados coerentes com a literatura pesquisada.

Tabela 1 – Tabela de valores Vmax e Km diferentes α -amilases

Origem	Km (mg.mL ⁻¹)	Vmax (mg.mL ⁻¹ .min ⁻¹)	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	2,11	0,62	este trabalho
<i>Aspergillus oryzae</i> AmyA	2,60	-	(SAHNOUN et al., 2012)
<i>Aspergillus oryzae</i> AmyB	4,70	-	(SAHNOUN et al., 2012)
<i>Hordeum vulgare</i>	3,25	-	(MASHHDANI; MUHAMMED, 2016)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,44	0,45	(GIRAUD et al., 1993)
<i>Triticum aestivum</i>	1,32	-	(SINGH et al., 2015)

Fonte: Do autor.

6.1.4 Efeito da temperatura

Os resultados do ensaio para o efeito da temperatura na atividade enzimática da α -amilase estão apresentados na Fig. 14. Os resultados indicam a temperatura ótima para a ação da α -amilase em tampão fosfato pH 5,9 no valor de 50°C, e perda da atividade catalítica em 70°C. Tais eventos estão de acordo a literatura que reporta uma temperatura ótima em 50°C e parcial inativação proteica em 70°C para a enzima (CHANG; TANG; LIN, 1995; RAVIYAN; TANG; RASCO, 2003).

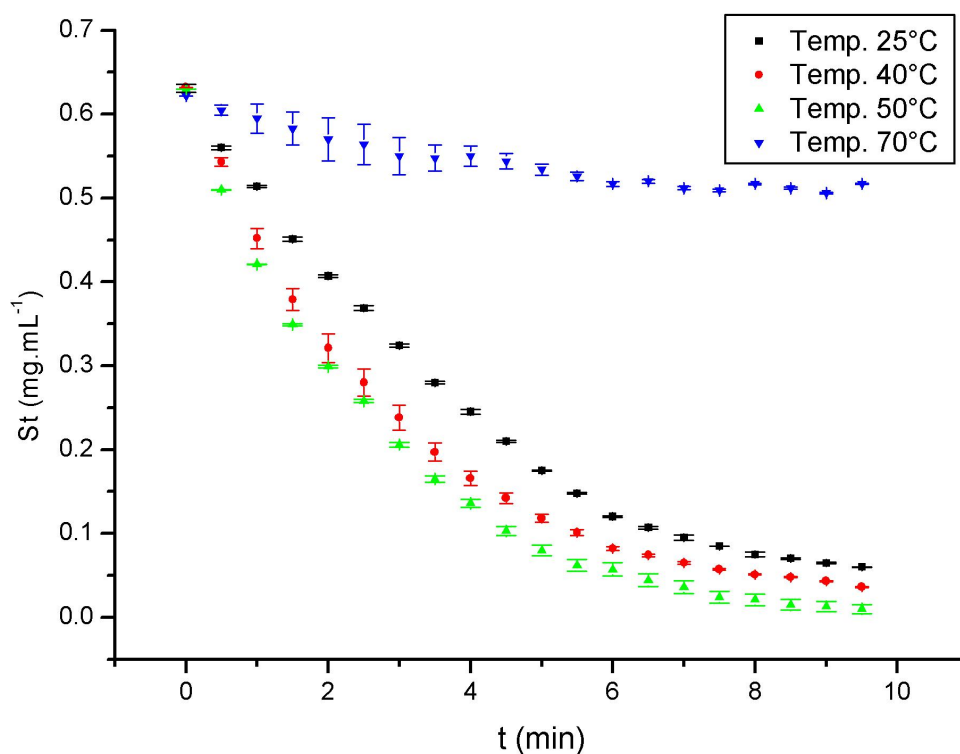


Figura 14 – Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em temperatura crescente de 25°C a 70°C em tampão fosfato pH 5,9.

Fonte: Do autor.

Embora correlata à faixa ótima reportada na literatura, a α -amilase atua na preparação do mosto cervejeiro preferencialmente entre 56°C a 68°C (BAMFORTH, 2016). Essa diferença pode ser originada pelo alto teor de compostos de natureza variada presentes na mostura e originalmente liberados pela moagem, embebição e aquecimento, procedimentos também relacionados à ativação da enzima.

A partir dos dados de decaimento da concentração do substrato por ação da α -amilase a 50°C (Fig. 15), determinou-se os parâmetros cinéticos da enzima como K_m de $1,37 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ e V_{max} de $0,66 \pm 0,08 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

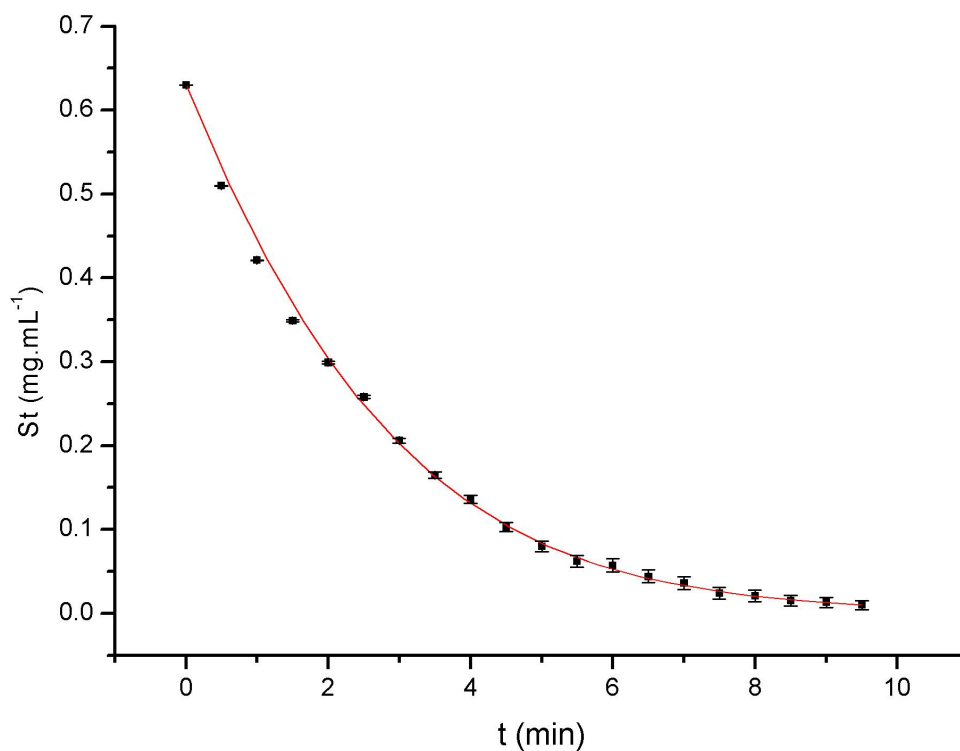


Figura 15 – Decaimento da concentração de substrato por ação da α -amilase a $2,8 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato pH 5,9 a 50°C. A linha contínua representa o ajuste não linear da equação integrada de Michaelis-Menten aos dados experimentais.

Fonte: Do autor.

Os dados cinéticos obtidos também podem ser representados por um decaimento exponencial de 1^a ordem, obtido pela lei de velocidade integradas, como segue (ATKINS; PAULA, 2008).

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] \quad (6.1)$$

Onde k é a constante de velocidade de reação de catálise.

Rearranjando e integrando os termos a partir da Eq. 6.2 obtemos a seguinte equação:

$$[S] = [S_0]e^{-kt} \quad (6.2)$$

Dessa forma, um ajuste exponencial de 1^a ordem pode fornecer o valor da constante de velocidade em cada temperatura experimental. A partir do valor de "k", pode-se analisar

a dependência da velocidade de reação com a temperatura pela relação de Arrhenius (Eq. 6.3) (ATKINS; PAULA, 2008).

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6.3)$$

Onde k a constante de velocidade, A constante pré-exponencial ou fator de frequência, E_a a energia de ativação, R a constante dos gases e T a temperatura.

A partir dos valores da constante de decaimento encontrados por ajuste não linear de uma função exponencial de 1° ordem aos dados da Fig. 14, foi possível estimar o valor da energia de ativação (E_a) do complexo enzima-substrato pela relação de Arrhenius (Eq. 21).

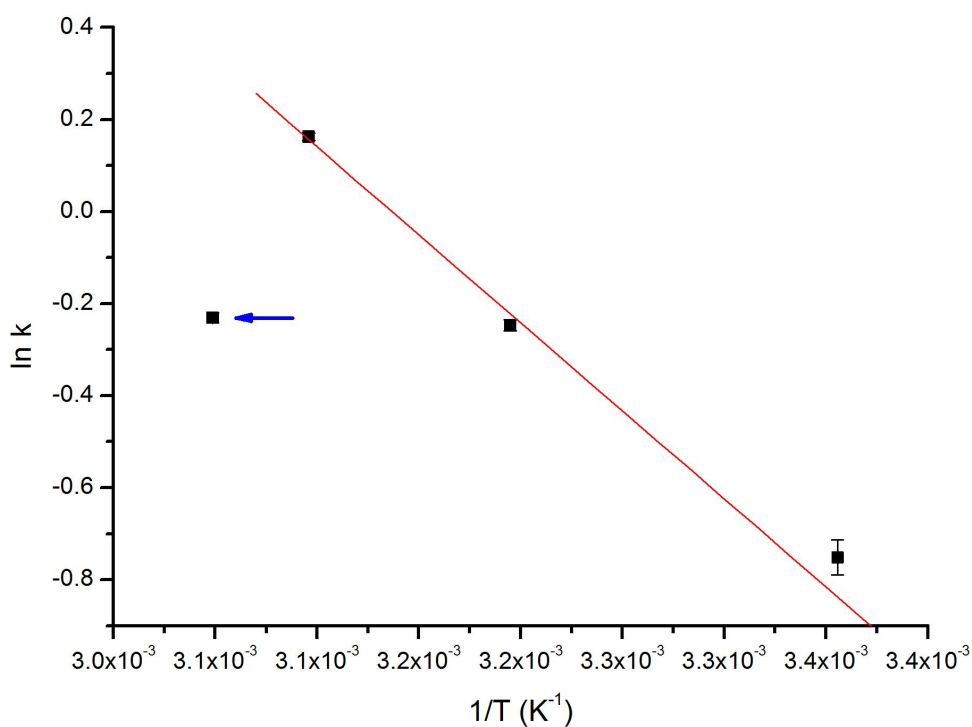


Figura 16 – Dependência da constante de velocidade (k) da reação da α -amilase e sobre o substrato com a temperatura. A seta indica valor de temperatura não utilizado no ajuste.

Fonte: Do autor.

Os resultados apresentados na Fig. 16 sugerem que a enzima aumenta sua velocidade de catálise até 50°C, a partir da qual decresce o valor do parâmetro conforme apresentado na Fig. 14. Pela análise do efeito da temperatura realizado acima (298K a 323K), os dados apresentaram um valor E_a de 31,8 kJ.mol⁻¹ (PAUNOVIĆ et al., 2014),

sugerindo, respectivamente, significativa sensibilidade da reação com a temperatura (AD-NAN, 2010; SIM et al., 2013).

6.2 Inibição Enzimática

Os resultados a seguir, apresentam o comportamento espectroscópico dos polifenóis testados nesse trabalho, a cinética enzimática da enzima em presença dos polifenóis, bem como parâmetros cinéticos e termodinâmicos da inibição.

6.2.1 Determinação dos compostos fenólicos por absorção molecular

A Fig. 17 apresenta os resultados do espectrograma de varredura e da curva analítica do ácido clorogênico e ácido cafeico na concentração de $2,8 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

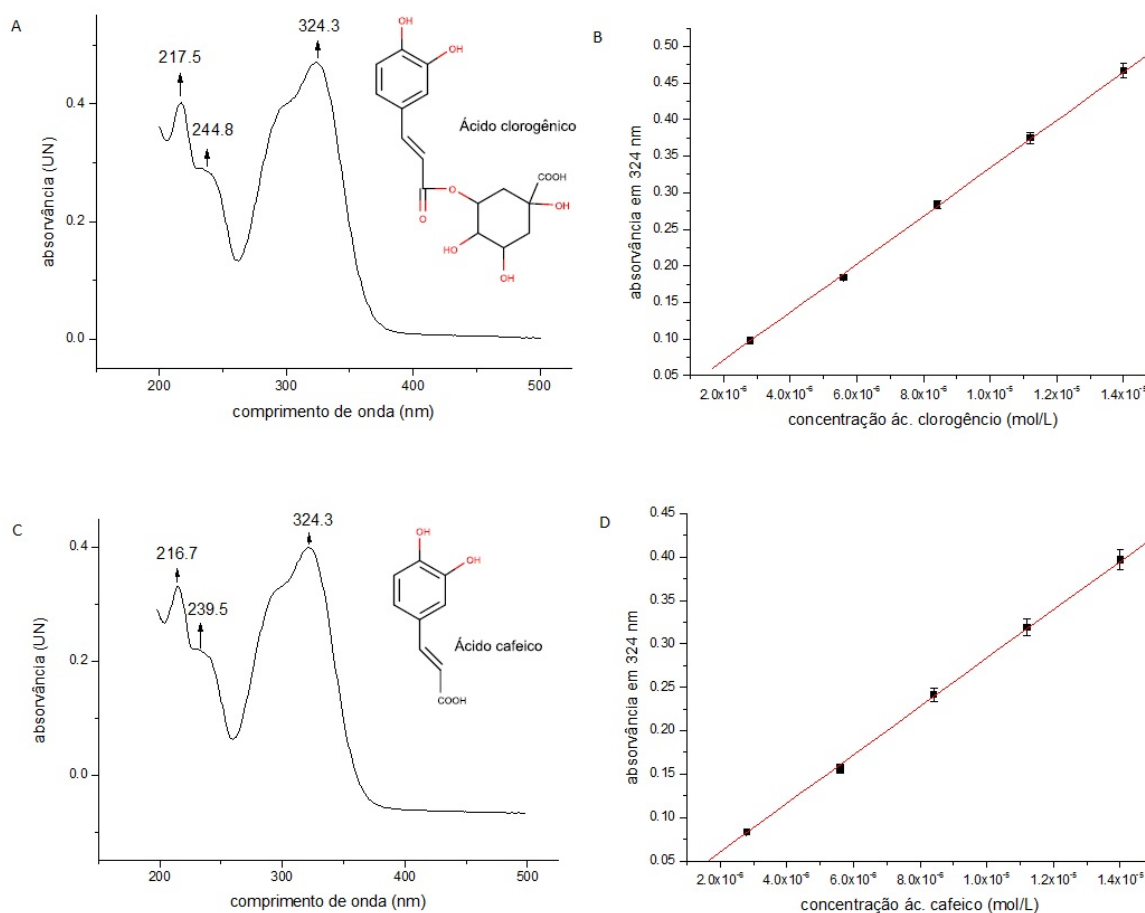


Figura 17 – Espectrogramas e determinação de ácido clorogênico e ácido cafeico. A - Espectrograma de absorção molecular de ácido clorogênico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. B - Curva analítica de ácido clorogênico em 324 nm R=0,99. C - Espectrograma de absorção molecular de ácido cafeico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. D - Curva analítica do ácido cafeico em 324 nm. R=0,99.

Fonte: Do autor.

O comportamento espectroscópico da curva analítica para esses polifenóis (Fig. 17B e

Fig. 17D) apresentam linearidade frente à lei de Beer, enquanto que os seus espectros de varredura (Fig. 17A e Fig. 17C) encontram-se de acordo com a literatura, com o principal pico de absorção em aproximadamente 324 nm (BELAY, 2012; BELAY; GHOLAP, 2009).

Da mesma forma, a Fig. 18 apresenta os resultados do espectrograma de varredura e da curva analítica do ácido ferúlico e da quercetina na concentração de $2,8 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Os comportamentos espectroscópicos das curvas analíticas para esses polifenóis (Fig. 18B e Fig. 18D) apresentam linearidade frente à lei de Beer enquanto que os seus espectros de varredura (Fig. 18A e Fig. 18C) também encontram-se de acordo com a literatura, com o principal pico de absorção para o ácido ferúlico em aproximadamente 320 nm e o principal pico de absorção para a quercetina em 370 nm (ANDRADE-FILHO; RIBEIRO; NERO, 2009; HOLSER, 2012).

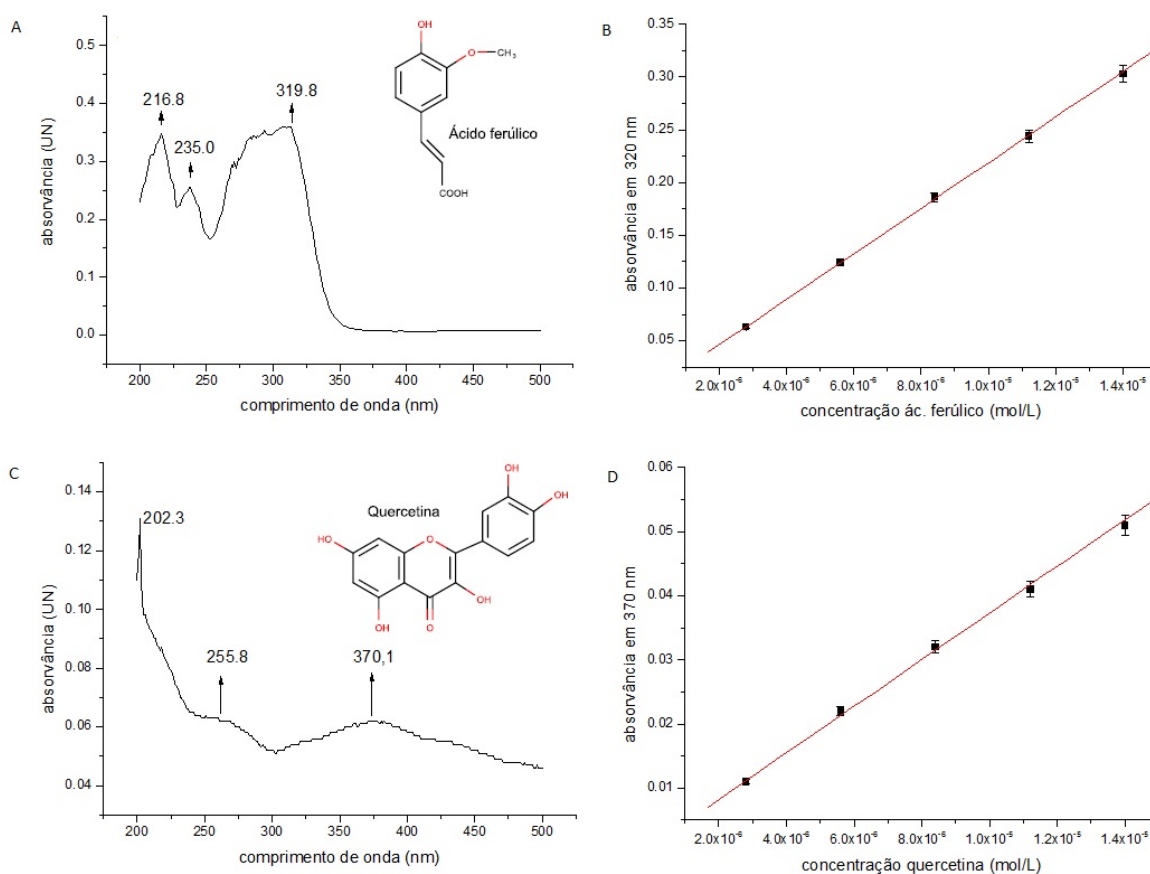


Figura 18 – Espectrogramas e determinação de ácido ferúlico e quercetina. A - Espectrograma de absorção molecular de ácido ferúlico a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. B - Curva analítica de ácido ferúlico em 320 nm R=0,99. C - Espectrograma de absorção molecular da quercetina a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. D - Curva analítica da quercetina em 370 nm. R=0,99.

Fonte: Do autor.

6.2.2 Cinética de α -amilase na presença de compostos fenólicos

A atividade de α -amilase na presença de compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido

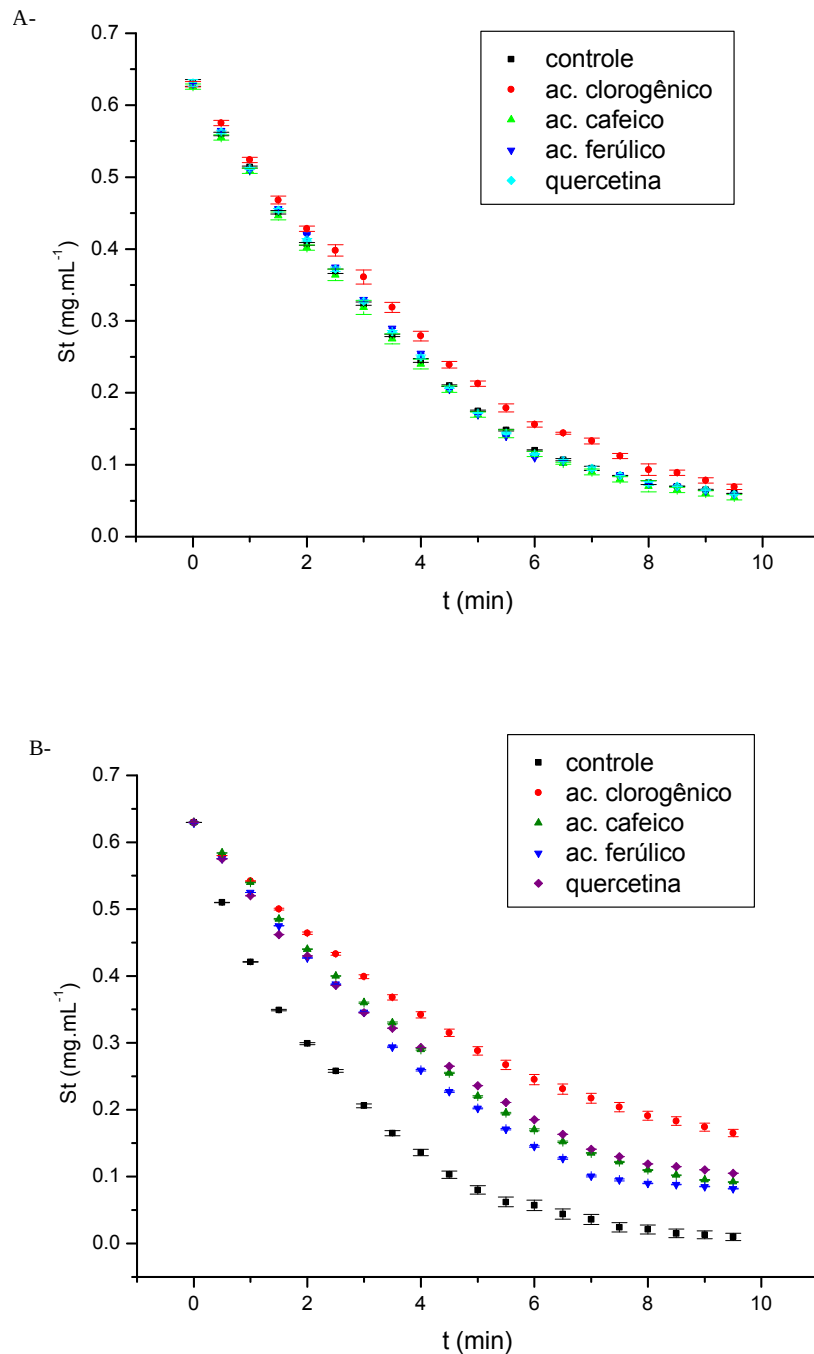


Figura 19 – Avaliação de inibição enzimática com compostos fenólicos, ácido clorogênico, ácido cafeico. Figura 21A- à temperatura de 25°C, Figura 25B- à temperatura de 50°C.

Fonte: Do autor.

ferúlico, quercetina e ácido clorogênico) foi investigada nas temperaturas entre 25°C (Fig. 19A) e 50°C (Fig. 19B). Os resultados revelaram o potencial de inibição da atividade da enzima crescente com a temperatura.

Nos mesmos limites de concentração testados, apenas o ácido clorogênico demonstrou interação inibitória com a enzima à temperatura de 25°C, como pode ser ilustrado na Fig. 19A. No ensaio de inibição a 50°C, todos os compostos fenólicos apresentaram inibição contra a α -amilase (Fig. 19B). Qualitativamente, os resultados apresentaram um potencial de inibição para os polifenóis a 50°C, com ácido clorogênico > ácido ferúlico > ácido cafeico > quercetina, sucedendo-se estudos de cinética enzimática e equilíbrio químico de tais compostos fenólicos com a enzima.

6.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de inibição de polifenóis sobre a α -amilase

Depois de se verificar a inibição enzimática pelos compostos fenólicos no experimento anterior, os parâmetros cinéticos foram determinados na temperatura ótima da enzima (50°C), e estão representados na Tab.2.

Tabela 2 – Tabela de valores de ajuste simultâneo (controle e teste) para inibição competitiva, inibição incompetitiva e inibição não competitiva pura do ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina em 50°C.

Polifenol	Parâmetro cinético	Inibição competitiva	Inibição incompetitiva	Inibição não competitiva pura
ácido clorogênico	Km	1,45 ± 0,19	131 ± 719	8,64 ± 2,18
	Vmax	0,69 ± 0,08	54,9 ± 301	3,79 ± 0,91
	Ki	2,00x10 ⁻⁵ ±4,50x10 ⁻⁷	1,40x10 ⁻⁴ ±7,60x10 ⁻⁷	6,20x10 ⁻⁵ ±2,30x10 ⁻⁶
ácido cafeico	Km	1,26 ± 0,24	152 ± 989	8,21 ± 1,75
	Vmax	0,62 ± 0,10	64,3 ± 416	3,62 ± 0,74
	Ki	3,60x10 ⁻⁵ ± 9,70x10 ⁻⁷	8,81x10 ⁻⁵ ±5,4x10 ⁻⁴	4,23x10 ⁻⁵ ± 1,32x10 ⁻⁶
ácido ferúlico	Km	1,27 ± 0,38	83,5 ± 355	8,17 ± 2,70
	Vmax	0,62 ± 0,16	35,2 ± 149	3,60 ± 1,14
	Ki	4,52x10 ⁻⁵ ±2,24x10 ⁻⁶	1,90x10 ⁻⁴ ±9,35x10 ⁻⁷	5,42x10 ⁻⁵ ± 2,31x10 ⁻⁶
quercetina	Km	1,47 ± 0,37	SC	14,5 ± 5,95
	Vmax	0,75 ± 0,15	SC	6,30 ± 2,50
	Ki	3,30x10 ⁻⁵ ±1,44x10 ⁻⁶	SC	5,92x10 ⁻⁴ ±1,63x10 ⁻⁶

*SC= Sem convergência do algoritmo de regressão não linear (Gauss-Newton)

Fonte: Do autor.

A determinação da constante de inibição foi obtida testando os modelos de regressão não lineares para inibição competitiva (Eq. 2.7), inibição incompetitiva (Eq. 2.8) e inibição não-competitiva pura (Eq. 2.9). Avaliou-se o melhor modelo comparando-se os resultados obtidos e o erro inerente a cada um, bem como pela magnitude parâmetros cinéticos encontrados na ausência dos compostos fenólicos (Fig.14). Podemos verificar que o modelo de inibição competitiva (Fig. 20) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, considerando que os resultados de Km variando entre 1.26 ±0,24 a 1,47 ±0,37 mg.mL⁻¹ e Vmax variando entre 0,62 ±0,08 a 0,75 ±0,15 mg.mL⁻¹.min⁻¹ aproximam-se

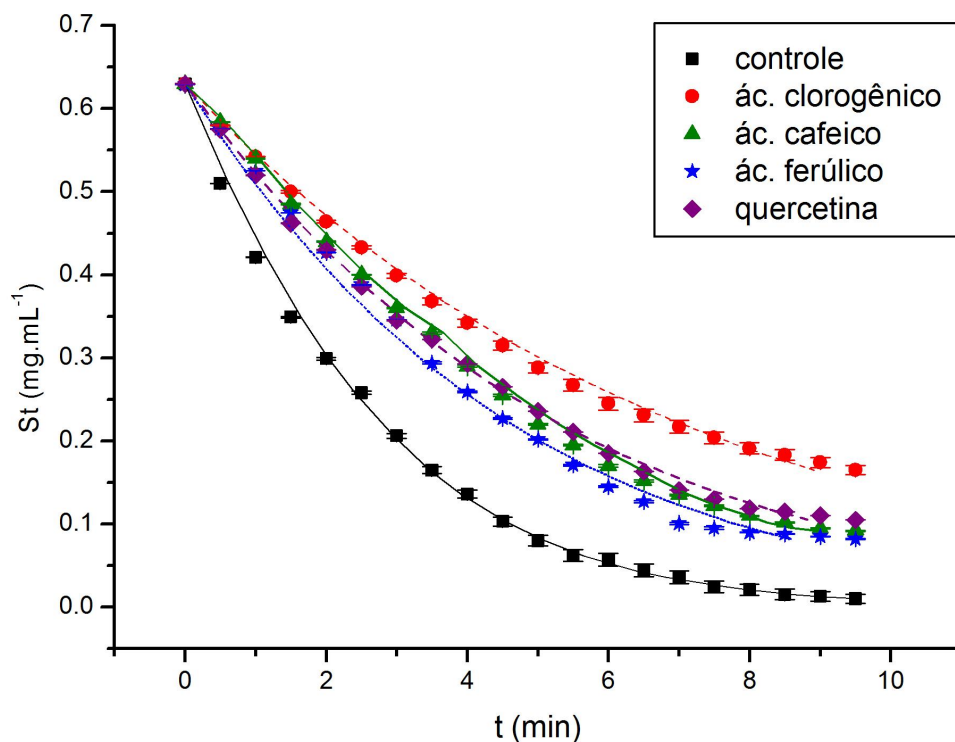


Figura 20 – Gráficos do ajuste não linear dos dados de inibição dos compostos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina) sobre a catálise de amido por α -amilase em pH 5,9 a 50°C para determinação de valor do K_{ic}

Fonte: Do autor.

dos valores obtidos da curva controle (Fig. 15), com K_m $1,37 \pm 0,19$ mg.mL⁻¹ e V_m $0,66 \pm 0,08$ mg.mL⁻¹.min⁻¹.

6.2.4 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase na presença de compostos fenólicos foi avaliado de maneira análoga ao que foi realizado para a enzima sozinha Fig. 21.

A partir dos valores da constante de decaimento encontrados por ajuste não linear de uma função exponencial de 1º ordem aos dados da α -amilase na presença de compostos fenólicos nas temperaturas de 25°C, 40°C, 50°C e 55°C (ATKINS; PAULA, 2008), foi possível estimar a energia de ativação (E_a) do estado de transição (Tab. 3) do sistema enzima-inibidor-substrato pela relação de Arrhenius (Eq. 6.3)(Fig.21).

Esses resultados estão de acordo com a reação encontrada para os compostos fenólicos em 50°C (Fig. 20), e apresentaram valores de energia de ativação para ácido clorogênico > ácido ferúlico > ácido cafeico > quercetina. O ácido clorogênico foi o que

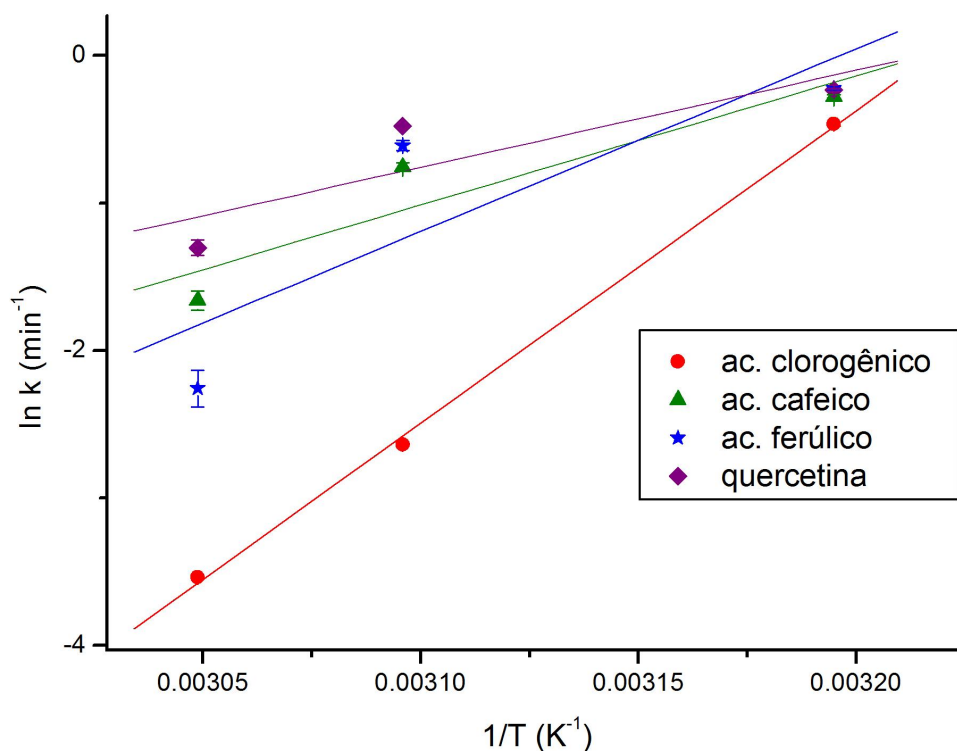


Figura 21 – Dependência da constante de velocidade (k) da reação inibitória da α -amilase sobre o substrato com a temperatura. A seta indica valores de temperatura não utilizados nos ajustes.

Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Energia de ativação do estado de transição da reação inibitória da α -amilase sobre o substrato.

Composto fenólico	E_a (kJ/mol)
Controle (Fig. 16)	$31,8 \pm 3,72$
ác. clorogênico	$176 \pm 5,95$
ác. cafeico	$72,8 \pm 28,9$
ác. ferúlico	$103 \pm 52,4$
quercetina	$54,7 \pm 20,7$

Fonte: Do autor.

apresentou menor valor de K_i (Tab. 2), maior sensibilidade com a temperatura (Tab. 3) e maior inibição na temperatura ótima da enzima (50°C , Fig. 20), antagonicamente aos valores apresentados para a quercetina. Isso poderia ser justificado pela maior área de superfície apolar da quercetina, quando comparado à do ácido clorogênico, e/ou a presença do carboxilato desse. De fato, é referido que a inibição de α -amilase, de modo geral, decorre da interação de grupos polares com o bolso catalítico relativamente pequeno da enzima (BRZOWSKI; DAVIES, 1997).

6.3 Interação de α -amilase com os compostos fenólicos por Espectrofluorimetria

As Fig. 22 e Fig. 23 exibem os espectros de emissão de fluorescência da α -amilase

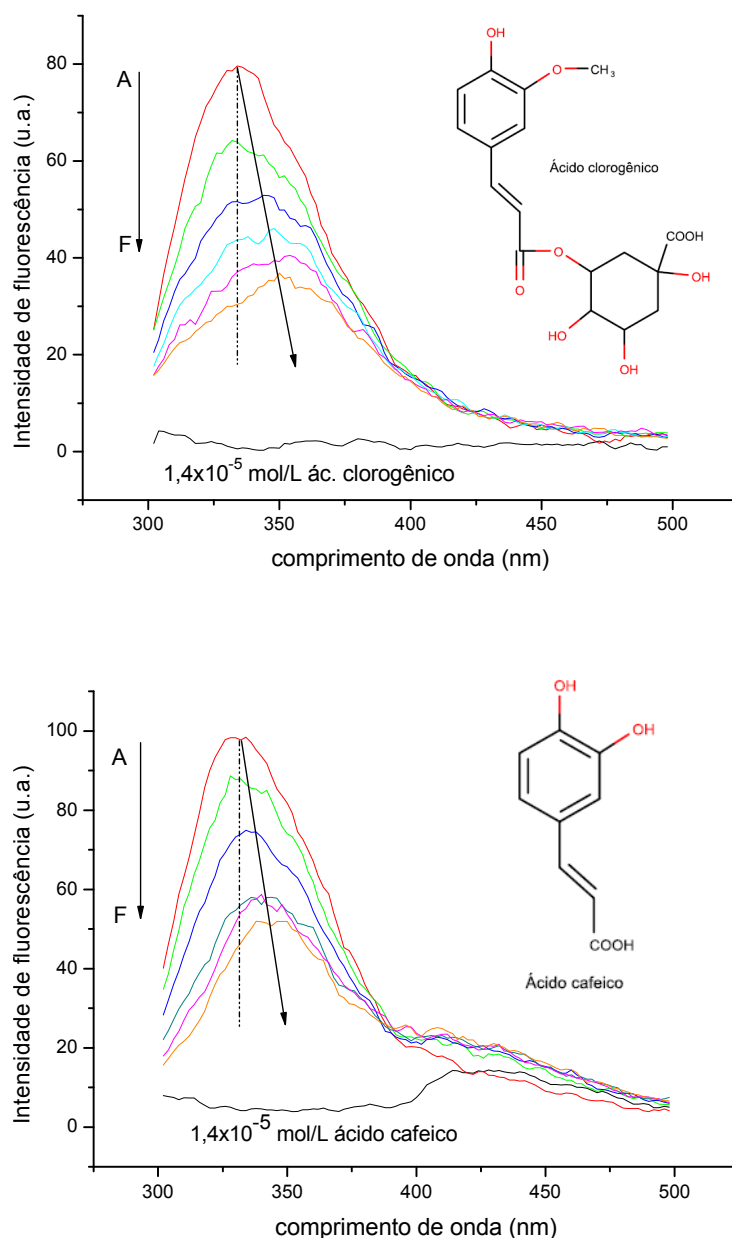


Figura 22 – Emissão de fluorescência da α -amilase na ausência e presença de compostos fenólicos em várias concentrações, A-F: de 0 a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ com incrementos de $2,8 \times 10^{-6}$. Fig.A: ácido clorogênico, Fig.B: ácido cafeico. (T=323K e λ_{ex} =280nm)

Fonte: Do autor.

na ausência e na presença dos compostos fenólicos, onde é observado uma forte banda de

emissão de fluorescência em 334 nm apresentado pela α -amilase. Os ligantes não apresentaram fluorescência intrínseca no comprimento de onda de excitação de 280 nm para a faixa espectral ensaiada.

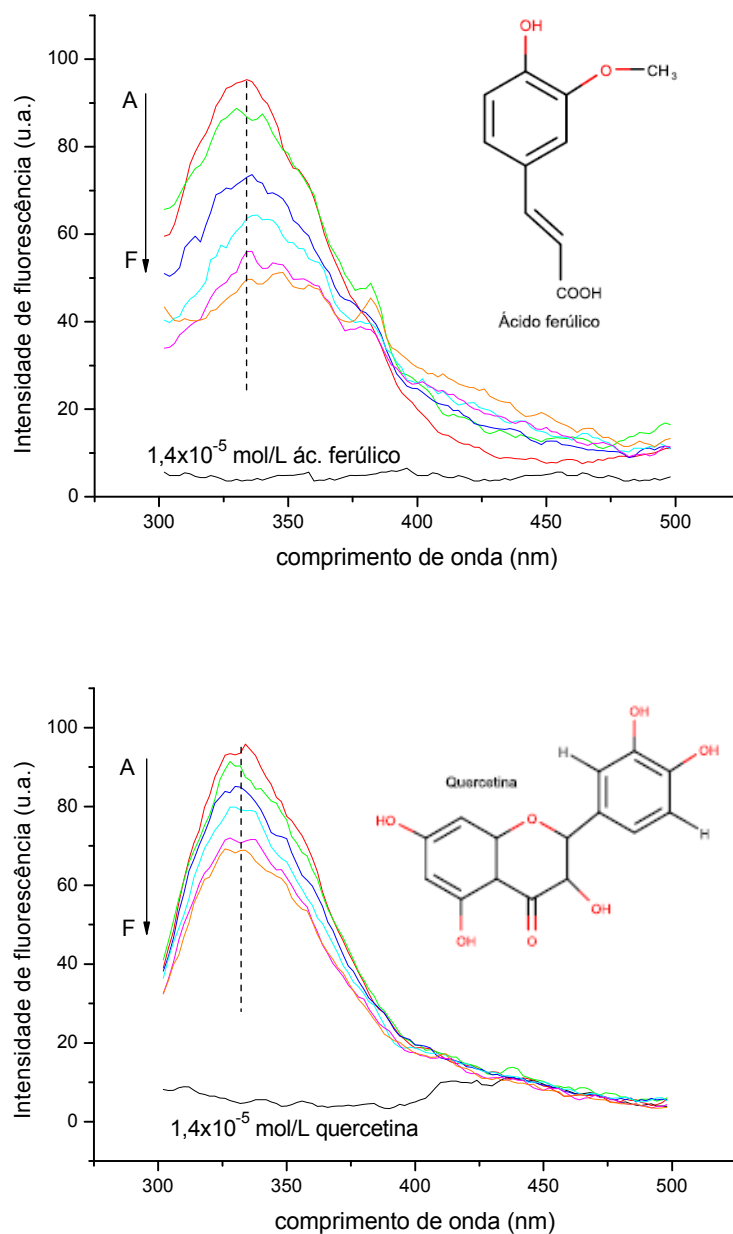


Figura 23 – Emissão de fluorescência da α -amilase na ausência e presença de compostos fenólicos em várias concentrações, A-F: de 0 a $1,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ com incrementos de $2,8 \times 10^{-6}$. Fig.A: ácido ferúlico, Fig.B: quercetina. (T=323K e λ_{ex} =280nm)

Fonte: Do autor.

Essa emissão de fluorescência da enzima é devida à presença de seus resíduos aromáticos, e em especial aos 12 resíduos de triptofano presentes na estrutura da α -amilase (Fig. 3). Em particular, o anel indol do resíduo de Trp-83, no subsítio -3 do domínio catalítico da enzima.

Em todos os espectrofluorogramas, a intensidade de fluorescência da α -amilase sofreu uma gradual diminuição com o aumento da concentração de ligante. A forte diminuição da intensidade fluorescência sugere que ocorreu à formação de complexos entre eles (SUN et al., 2016a), o que é corroborado pelos resultados de inibição da enzima.

Nota-se que houve um deslocamento batocrômico (*redshift*) do espectro de fluorescência do complexo formado indicado pelas setas da Fig. 22 para a interação com ácido clorogênico e ou ácido cafeico com a enzima. O *redshift* do comprimento de onda de emissão máxima de 334 para 348 nm da α -amilase na presença de ácido clorogênico e de 334 para 342 nm da α -amilase na presença de ácido cafeico, respectivamente, pode caracterizar um aumento da polaridade (ou uma diminuição da hidrofobicidade) na região vizinha ao sítio de triptofano, o que também é identificado em interações de outras proteínas com compostos fenólicos (HU et al., 2012).

Esse deslocamento pode ter sido decorrente de alteração conformacional na enzima sob a interação (HU et al., 2012), embora essa confirmação dependa de outros ensaios mais específicos (dicroísmo circular por exemplo).

Não foi verificado nenhum desvio para a interação de α -amilase na presença de ácido ferúlico ou quercetina (Fig. 23). Embora seja especulativo, ambas as estruturas apresentam uma maior característica hidrofóbica (grupo metileno no ácido ferúlico e anéis aromáticos na quercetina) quando comparado aos demais testados, o que pode relacionar-se com uma menor energia de ligação com a enzima.

6.3.1 Determinação da constante de ligação (K_{sv})

O efeito da interação entre a α -amilase e o ligante foi quantitativamente abordado pela Eq. 2.12 de Stern-Volmer, e está representado na Fig. 24.

Esses resultados mostram um comportamento linear com a concentração dos polifenóis, sugerindo um comportamento estático (interação) ou dinâmico (colisional) para a extinção observada. Embora essa distinção possa ser apenas comprovada fluorimetricamente por determinação da constante de tempo de vida do fluoróforo (τ_0) em diferentes temperaturas (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012), o potencial inibitório dos polifenóis atesta o caráter estático do fenômeno.

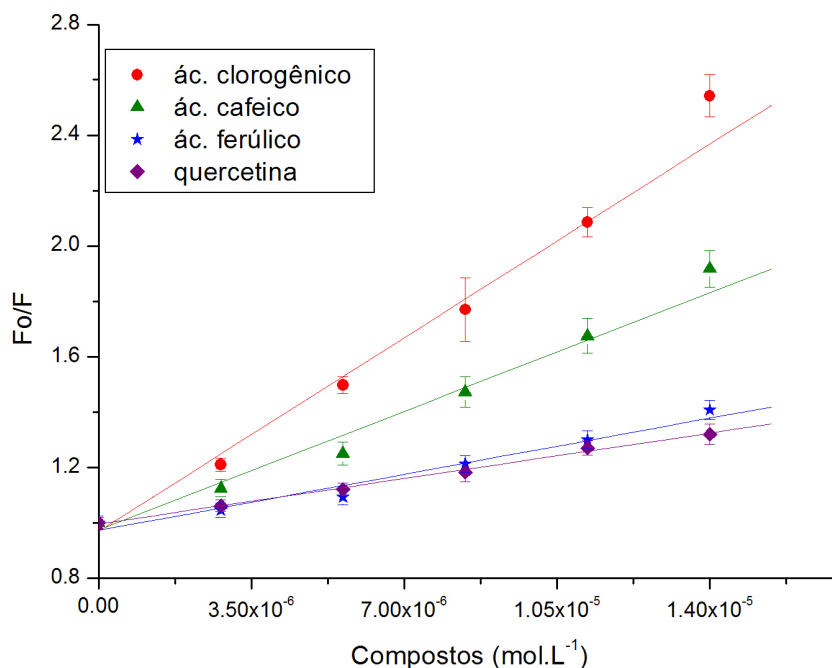


Figura 24 – Gráfico de Stern–Volmer da interação α -amilase com os polifenóis. T=323K
Fonte: Do autor.

6.3.2 Efeito da temperatura

Utilizando-se os resultados obtidos de extinção de fluorescência da interação em cada temperatura, calculou-se as constantes de ligação K_b , apresentadas na (Tab. 4).

Tabela 4 – Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação de α -amilase e polifenóis

T(K)	K_b [x10 ⁴ L.mol ⁻¹]			
	ác.clorogênico	ác.cafeico	ác.ferúlico	quercetina
293K	4.3± 0.30	2.2± 0.18	1.9± 0.20	0.73± 0.35
303K	6.3± 0.37	3.0± 0.20	2.1± 0.18	0.53± 0.60
313K	9.8± 0.60	3.3± 0.35	2.6± 0.33	1.2± 0.25
323K	11.0± 0.66	6.9± 0.60	3.1± 0.15	2.3± 0.42
333K	7.3± 0.58	6.0± 0.48	4.1± 0.12	2.7± 0.34

Fonte: Do autor.

Os valores de K_b apresentados na Tab. 4 sugerem maior estabilidade na formação do complexo próximo a 323 K, coincidentes com os resultados de inibição enzimática.

Esses dados revelam um aumento da formação do complexo com a temperatura até 50°C, para todos os polifenóis ensaiados. Entretanto, acima de 50°C (especificamente em 55°C) a formação do complexo se reduz para o ácido clorogênico e ácido cafeico (Tab. 4), mas não para o ácido ferúlico e quercetina, que continuam exibindo uma constante de

formação crescente com a α -amilase. Esse resultado coincide com os dados observados para a titulação fluorimétrica dos ligantes, no qual os dois últimos polifenóis não apresentaram qualquer deslocamento espectral (Fig. 23), o que pode sugerir uma redução do polifenol na capacidade de transconformação da enzima ou exposição dos resíduos aromáticos do solvente. De fato, os valores de K_b encontrados na Tab. 4 são, de modo geral, menores para o ácido ferúlico e quercetina.

6.3.3 Determinação de parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH e ΔS

Utilizando-se os valores obtidos de K_b em cada temperatura, calculou-se os valores de ΔH e ΔS usando a Eq. 5.3 de van't Hoff. O gráfico de van't Hoff informa dependência linear da constante de ligação com a variação da temperatura em capacidade calorífica constante, e está representado na Fig. 25, com seus parâmetros termodinâmicos na Tab. 5.

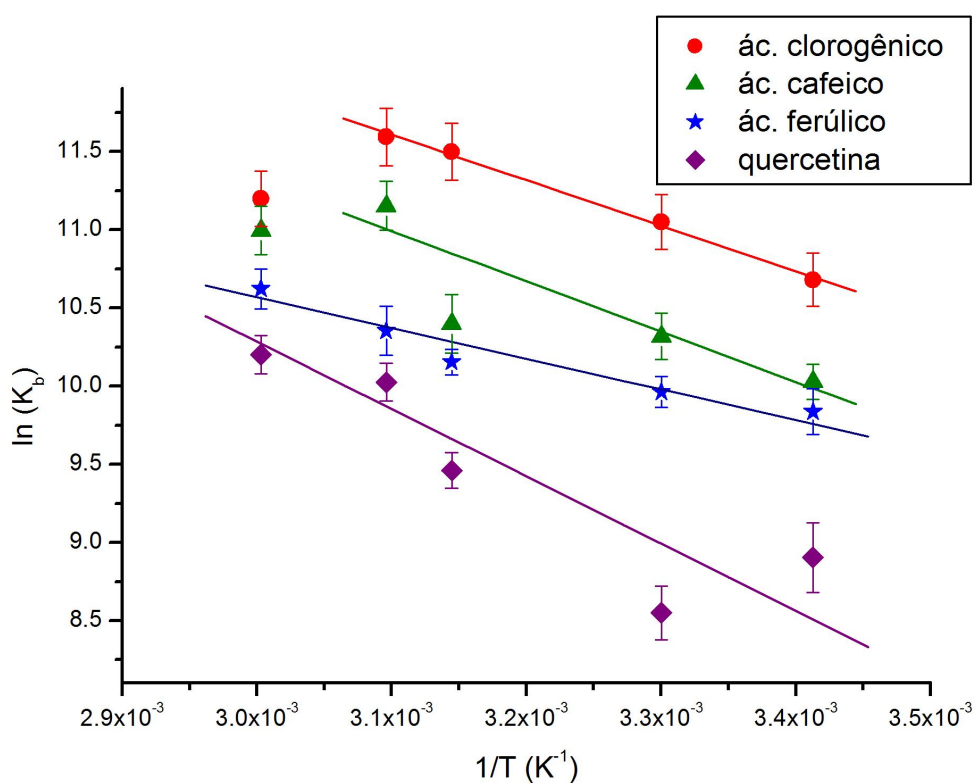


Figura 25 – Dependência da constante de formação do complexo (K_b) com a temperatura. Fonte: Do autor.

A energia de Gibbs dos complexos formados também reforça uma maior interação para o ácido clorogênico, e menor interação para a quercetina, corroborando com os dados cinéticos apresentados (Tab. 2).

Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH e ΔS) da interação α -amilase com polifenóis

Polifenol	ΔG° [kJ.mol ⁻¹]	ΔH [kJ.mol ⁻¹]	ΔS [J.mol ⁻¹ K ⁻¹]
Ác.clorogênico	-31.1 ± 1.91	24.2 ± 4.24	171 ± 19.5
Ác.cafeico	-29.9 ± 2.63	23.2 ± 4.12	162 ± 14.6
Ác.ferúlico	-27.8 ± 1.41	15.1 ± 3.24	133 ± 10.9
Quercetina	-26.8 ± 4.90	36.2 ± 4.20	194 ± 13.3

Fonte: Do autor.

Os valores positivos para ΔS , podem indicar uma desordem parcial na estrutura do solvente, pela exclusão das moléculas de água próximo ao sítio de interação do complexo (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Adicionalmente valores positivos para ΔH e ΔS estão relacionados a interações iônicas e pontes salinas, plausíveis de ocorrer entre os carboxilatos do ácido clorogênico (pK 3,35), ácido cafeico (pK 4,37) (ŠERUGA; TOMAC, 2014) e ácido ferúlico (pK 4,58) (OZKORUCUKLU et al., 2009) no pH de 5,9 dos ensaios, com cadeias laterais de histidina, lisina e arginina na macromolécula. Isto sugere um mecanismo entropicamente dirigido da associação ($|-T\Delta S| > |\Delta H|$) contrapondo-se a contribuição entálpica relacionada a formação e quebra de ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, e efeitos de protonação que podem acompanhar a associação (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). De fato, o domínio catalítico de *Aspergillus oryzae* exhibe resíduos de aminoácidos básicos próximos ao subsítio de clivagem do substrato (-3 a +3)

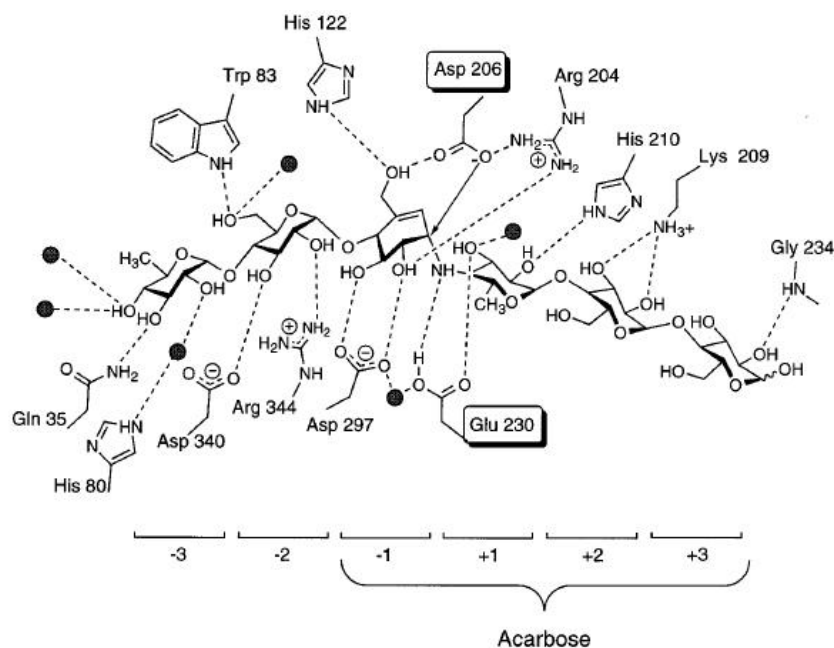


Figura 26 – Mecanismos de interações TAKA-amilase com acarbose. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas e moléculas de água por esferas sombreadas.

Fonte: (BRZOWSKI; DAVIES, 1997).

(BRZOZOWSKI; DAVIES, 1997), como pode ser visto na Fig 26.

A amina primária do resíduo de Lys-209 do subsítio +2/+3, por exemplo (Fig. 26), parece estabilizar a ligação com o substrato, uma vez que é conservado na família de 13 hidrolases de glicosila que atuam sobre a clivagem da ligação α -1,4 de polissacarídios. De forma similar, o grupo guanidínio do resíduo de Arg-344 do subsítio -2, os grupos imino das cadeias laterais de His-80 (subsítio -3) e His-122 (subsítio -2), parecem estabilizar a interação com o oxigênio dos grupos hidroxila de carboidratos poliméricos no sítio ativo da α -amilase (Fig. 26).

Complementarmente, isso poderia sugerir uma interação dos grupos aminados desses resíduos com íons carboxilatos de ácido clorogênico (menor valor de pKa), ácido ferúlico e cafeico (valores intermediários de pKa) e, em menor grau, com quercetina (valores de pKa elevados, 7,4 e 8,2, para os fenóis (ROJAS-ROMO et al., 2016)).

6.4 Relação estrutura-atividade dos complexos

A partir dos resultados de cinética e equilíbrio que sugerem a magnitude do efeito biológico relacionada a determinadas propriedades dos ligantes, buscou-se analisar a relação da atividade biológica e formação dos complexos com alguns parâmetros reportados para os mesmos. Parâmetros como polarizabilidade, lipofilicidade, área total de superfície polar (TPSA), tensão superficial, número total de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e valores de pKa encontrados na literatura e em base de dados dos compostos ((PUBCHEMHOMEPAGE), 2016), foram contrastados com o parâmetro de atividade inibitória da catálise, IC50 (concentração do inibidor que fornece metade da inibição máxima). Os valores de IC50 foram obtidos a partir da Eq. 6.4 para a inibição competitiva (CER et al., 2009).

$$IC50 = Ki * (1 + \frac{[S]_t}{Km}) \quad (6.4)$$

Os resultados que apresentaram correlação significativa (inclinação diferente de 0, teste-t) entre os descritores e os parâmetros biológicos avaliados (IC50 e Kb), estão representados nas Fig. 27 (KNIGHT et al., 2016).

Com base nesses resultados pode-se afirmar que houve uma correlação positiva entre a atividade biológica (ligação e catálise) da α -amilase com os descritores de natureza polar dos polifenóis (número total de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, polarizabilidade, TPSA, Pka). Esses resultados também corroboram com um mecanismo plausível de interação do íon carboxilato dos polifenóis com o sítio ativo da enzima como sugerido.

Afim de se testar essa hipótese, procedeu-se a avaliação espectrofluorimétrica da

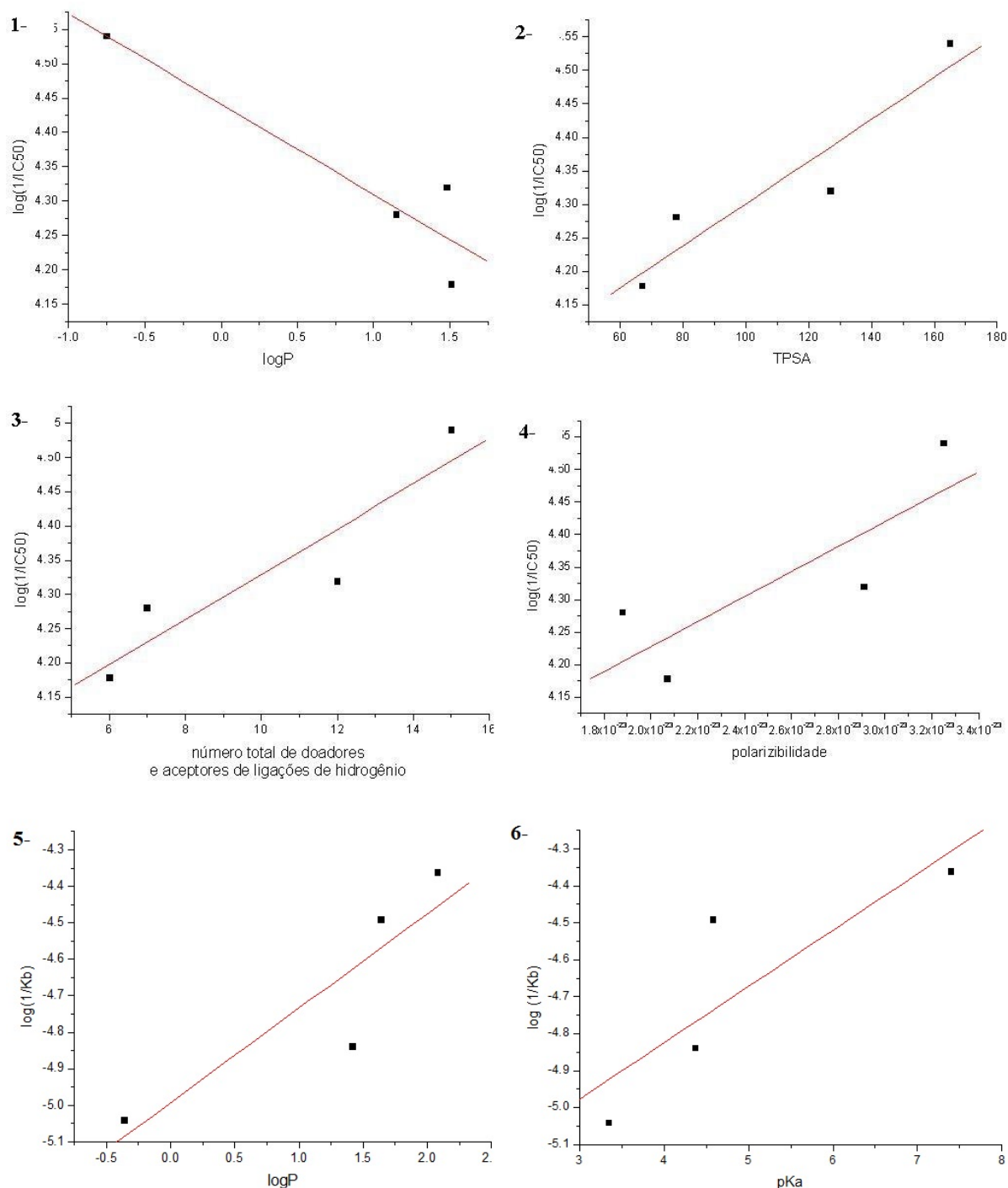


Figura 27 – Relação de parâmetros encontrados nos ensaios de cinética e equilíbrio (IC_{50} e K_b) com descritores reportados para os polifenóis.

Fonte: Do autor.

interação de α -amilase em $50^\circ C$ com o ácido clorogênico como modelo, variando-se pH (3,0 a 10,0) e força iônica (NaCl, 0 a 10%). Os resultados estão apresentados na Fig 28 e Fig 29.

A Fig. 28 apresenta dois comportamentos lineares para a constante K_b em função

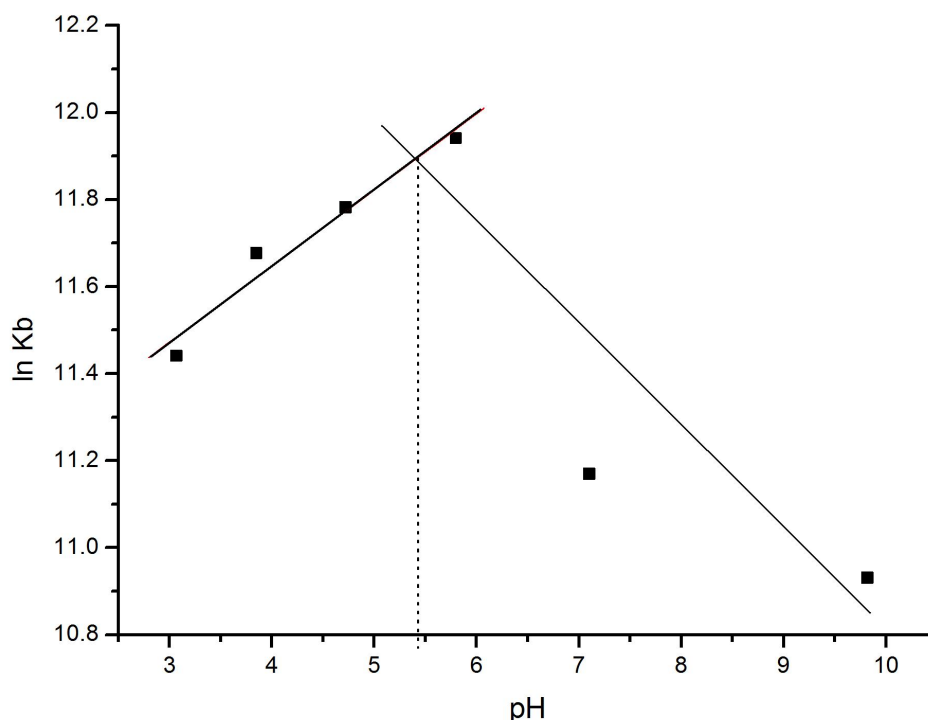


Figura 28 – Interação de α -amilase com ácido clorogênico em 323K sob a variação de pH.

Fonte: Do autor.

do pH, extrapolando-se linhas retas dos menores valores encontrados de K_b pode-se obter uma intersecção próxima do valor de pK_a de Histidina livre (5,6 a 7,0) (MARANGONI, 2003), reforçando-se a Hipótese sugerida. De fato, a enzima possui três resíduos de His nos sub-sítios catalíticos, His 80, His 122 e His 210, todos envolvidos em ligações de hidrogênio com o substrato em pH 7,5 (BRZOWSKI; DAVIES, 1997). No presente trabalho, os ensaios realizados em pH 5,9 sugerem a existência de uma população mínima de espécies carregadas positivamente para esses resíduos. Complementarmente, a Fig 27 sugere que a ligação de maior estabilidade com a enzima (K_b) ocorre para o ligante com maior intervalo entre o descritor pK_a e o pH dos ensaios.

Os resultados obtidos da titulação espectrofluorimétrica de ácido clorogênico sob variação da força iônica (Fig. 29, (BUNTON; ROBINSON, 1969)) mostraram uma relação inversa na qual a estabilidade do complexo reduz em função do teor salino. O gradiente negativo da Fig. 29 resultante do efeito da adição do sal neutro na taxa de reação (interação ligante-proteína) indica que os íons reagentes (ligante e proteína) exibem sinais contrários, reforçando a hipótese de estabilização dos complexos por interação eletrostática do carboxilato do ácido clorogênico à proteína.

Como a enzima apresenta um valor de ponto isoelétrico (pI) em torno de 4,5 ((ALTIKATOGLU; TAVUKCUOGLU; MUSTAFAEV, 2010)), o pH 5,8 utilizado nos en-

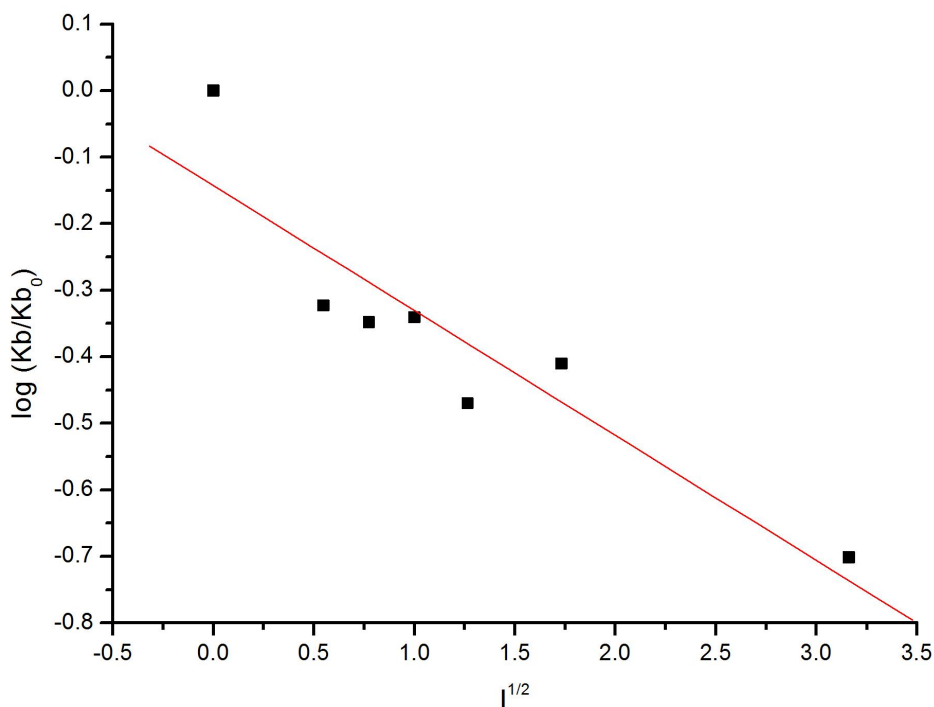


Figura 29 – Interação de α -amilase com ácido clorogênico em 323K sob a variação de força iônica.

Fonte: Do autor.

saios implica que a mesma apresentou-se na forma aniônica ((DESHPANDE; CHERYAN, 1984)). De fato, pela sequência primária observada na Fig. 3, e utilizando-se uma calculadora virtual para propriedades físico-químicas de sequências primárias de peptídios (Innovagen, <http://www.pepcalc.com>), foi contabilizado o valor de -14 para a rede de carga líquida da enzima no pH de ensaio (5,9), e valor de pI de 4,15. Entretanto, são encontrados em torno dos sub-sítios de catálise da enzima (Fig. 26) 6 resíduos de aminoácidos básicos (Arg, Lys e His) e apenas dois resíduos ácidos (Asp), o que pode contribuir para a interação do carboxilato do ácido clorogênico, tendo em vista os valores de pK das cadeias laterais dos aminoácidos livres de 9,4 (ϵ -amino) para Lys e de 12,1 (grupo guanidíno) para Arg ((MARANGONI, 2003), p.83). Esse dado também apoia a possibilidade de interação do ligante ionizado com aminas imidazólicas de resíduos de His (His 80, His 122 e His 210) nos sub-sítios catalíticos da enzima (Fig. 26).

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista o objetivo geral e os objetivos específicos inicialmente propostos para este trabalho, foi possível avaliar a cinética e o equilíbrio da interação de α -amilase com polifenóis usualmente presentes na elaboração do mosto cervejeiro, e em temperaturas típicas do processo.

- a) A enzima α -amilase de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade enzimática coerente com a literatura reportada em 25°C.
- b) A enzima demonstrou catálise sobre o substrato progressiva até 50°C, a partir da qual houve redução na atividade catalítica.
- c) Na temperatura ótima da enzima (50°C) os parâmetros cinéticos de α -amilase foram K_m de $1,37 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ e V_{max} de $0,66 \pm 0,08 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.
- d) Os quatro polifenóis utilizados apresentaram um modelo de inibição competitiva com a enzima.
- e) Os ligantes apresentaram inibição crescente com a temperatura, sendo que seus valores de K_i revelaram uma relação crescente de inibição para ácido clorogênico > ácido ferúlico > ácido cafeico > quercetina.
- f) A titulação da α -amilase com os polifenóis apresentou valores de K_b crescentes com a temperatura até 50°C para ácido clorogênico e ácido cafeico, indicando uma maior estabilidade na formação dos complexos nessa temperatura. Para ácido ferúlico e quercetina, os valores de K_b mantiveram-se crescentes acima de 50°C.
- g) Deslocamentos batocrômicos para a interação da α -amilase com ácido clorogênico e ácido cafeico sugerem alterações conformacionais na enzima, não identificados para os complexos com ácido ferúlico e quercetina.
- h) Dentre os polifenóis testados, o ácido clorogênico foi o que apresentou menor valor de K_i , maior valor de K_b , e maior energia de ativação para a α -amilase, sugerindo maior estabilidade de formação do complexo com essa.
- i) Os valores positivos encontrados para ΔH e ΔS sugerem a participação significativa de interações polares e/ou eletrostáticas envolvidas na formação

dos complexos.

- j) O estudo de relação estrutura-atividade indicou proporcionalidade direta entre descritores polares dos ligantes e a atividade biológica e formação de complexos com a enzima.
- l) A titulação da enzima com ácido clorogênico em 50°C em diferentes valores de pH corroborou com um mecanismo de complexação envolvendo interações iônicas entre o íon carboxilato do ligante e resíduos básicos presentes em sub-sítios catalíticos da enzima em pH 5,9.
- m) A titulação da enzima com ácido clorogênico em 50°C em diferentes valores de força iônica reforçou o caráter eletrostático para a estabilização dos complexos com α -amilase.
- n) Como um todo, os resultados apresentados nessa dissertação sugerem que o procedimento de mosturação para a elaboração de cerveja pode ser alterado pela inibição de polifenóis intrínsecos do malte nas faixas de temperatura empregadas no processo.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, F. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from bacillus licheniformis mutant. *Pak. J. Bot*, v. 42, n. 5, p. 3507–3516, 2010.
- ALTIKATOGLU, M.; TAVUKCUOGLU, Ö.; MUSTAFAEV, M. Characterization of water-soluble complexes of polyacrylic acid with α -amylase from aspergillus oryzae. *The Protein Journal*, Springer, v. 29, n. 2, p. 120–126, 2010.
- ANDRADE-FILHO, T.; RIBEIRO, T.; NERO, J. D. The uv-vis absorption spectrum of the flavonol quercetin in methanolic solution: A theoretical investigation. *The European Physical Journal E*, Springer, v. 29, n. 3, p. 253–259, 2009.
- ARON, P.; SHELLHAMMER, T. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. In: *Journal of the Institute of Brewing*. [S.l.: s.n.], 2010.
- ATKINS, P.; PAULA, J. d. Físico-química, vol. 1. *Editores LTC. Rio de Janeiro, RJ*, 2008.
- BAKKIALAKSHMI, S.; SHANTHI, B.; BHUVANAPRIYA, T. Study of fluorescence quenching of barley α -amylase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 90, p. 12–17, 2012.
- BAMFORTH, C. The foaming properties of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 91, n. 6, p. 370–383, 1985.
- BAMFORTH, C. Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, American Society of Brewing Chemists, v. 57, n. 3, p. 81–90, 1999.
- BAMFORTH, C. *Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence*. [S.l.]: Academic Press, 2016.
- BELAY, A. Spectrophotometric method for the determination of caffeic acid complexation and thermodynamic properties. *International Journal of Biophysics*, Scientific & Academic Publishing, v. 2, n. 2, p. 12–17, 2012.
- BELAY, A.; GHOLAP, A. Characterization and determination of chlorogenic acids (cga) in coffee beans by uv-vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, Academic Journals, v. 3, n. 11, p. 34–40, 2009.
- BEZERRA, R. M.; DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, Springer, v. 126, n. 1, p. 49–59, 2005.
- BIRD, R.; HOPKINS, R. The action of some α -amylases on amylose. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd, v. 56, n. 1, p. 86, 1954.
- BISHOP, L. Haze-and foam-forming substances in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 81, n. 6, p. 444–449, 1975.
- BISSWANGER, H. *Enzyme kinetics: principles and methods*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.

- BRIGGS, D. E. et al. *Brewing: science and practice*. [S.l.]: Elsevier, 2004.
- BRZOZOWSKI, A. M.; DAVIES, G. J. Structure of the aspergillus oryzae α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 36, n. 36, p. 10837–10845, 1997.
- BUNTON, C. A.; ROBINSON, L. B. Electrolyte and micellar effects upon the reaction of 2, 4-dinitrofluorobenzene with hydroxide ion. *The Journal of Organic Chemistry*, ACS Publications, v. 34, n. 4, p. 780–785, 1969.
- BUSH, D. S. et al. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone alpha-amylase. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 264, n. 32, p. 19392–19398, 1989.
- CER, R. Z. et al. Ic50-to-ki: a web-based tool for converting ic50 to ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*, Oxford Univ Press, v. 37, n. suppl 2, p. W441–W445, 2009.
- (CERVBRASIL). *Anuario 2015*. 2015. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/paginas/anuario2015>. Acesso em 18 nov. 2016.
- CHANG, C.-T.; TANG, M.-S.; LIN, C.-F. Purification and properties of alpha-amylase from aspergillus oryzae atcc 76080. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 36, n. 1, p. 185–193, 1995.
- COLLIN, S. et al. Polyphenols and beer quality. In: *Natural Products*. [S.l.]: Springer, 2013. p. 2333–2359.
- DESHPANDE, S.; CHERYAN, M. Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on α -amylase activity. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library, v. 49, n. 2, p. 516–519, 1984.
- DIENSTBIER, M. et al. Prediction of colloidal stability of highly stabilized beers by a modified chapon tannoid content test. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 117, n. 3, p. 329–334, 2011.
- DONER, L. W.; BECARD, G.; IRWIN, P. L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 41, n. 5, p. 753–757, 1993.
- (EMBL-EBI). *UniProtKB/Swiss-Prot*. 2016. Disponível em: <http://www.uniprot.org/align>. Acesso em 20 jul. de 2016.
- FISHER, D.; FISHER, J. *The Homebrewer's Garden: How to Grow, Prepare & Use Your Own Hops, Malts & Brewing Herbs*. [S.l.]: Storey Publishing, 2016.
- FREITAS, P. et al. Mangiferin binding to serum albumin is non-saturable and induces conformational changes at high concentrations. *Journal of Luminescence*, Elsevier, v. 132, n. 11, p. 3027–3034, 2012.
- FUNKE, I.; MELZIG, M. Effect of different phenolic compounds on α -amylase activity: Screening by microplate-reader based kinetic assay. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Govi-Verlag, v. 60, n. 10, p. 796–797, 2005.

- GIRAUD, E. et al. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain a6. *Journal of Applied Bacteriology*, Wiley Online Library, v. 75, n. 3, p. 276–282, 1993.
- GONÇALVES, R.; MATEUS, N.; FREITAS, V. D. Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 125, n. 2, p. 665–672, 2011.
- GORE, M. G. et al. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. [S.l.]: Oxford University Press New York, 2000.
- GRAMSHAW, J. Phenolic constituents of beer and brewing materials. ii. the role of polyphenols in the formation of non-biological haze. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 73, n. 5, p. 455–472, 1967.
- GRANGER, M.; ABADIE, B.; MARCHIS-MOUREN, G. Limited action of trypsin on porcine pancreatic amylase: characterization of the fragments. *FEBS Letters*, Elsevier, v. 56, n. 2, p. 189–193, 1975.
- GREENWOOD, C.; MACGREGOR, A. The isolation of α -amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action-patterns of the enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 71, n. 5, p. 405–417, 1965.
- HALPERN, M. J.; ADÃO, M. H.; QUINTAS, A. *Bioquímica*. [S.l.: s.n.], 1997.
- HARVEY, D. Analytical chemistry 2.0. Saylor.org, 2014.
- HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, Elsevier BV, v. 101, n. 3, p. 1178–1182, Jan 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.020>>.
- HEJGAARD, J. Origin of a dominant beer protein immunochemical identity with a β -amylase-associated protein from barley. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 83, n. 2, p. 94–96, 1977.
- HEJGAARD, J.; KAERSGAARD, P. Purification and properties of the major antigenic beer protein of barley origin. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 89, n. 6, p. 402–410, 1983.
- HILL, G.; MACDONALD, D.; LANG, X. α -amylase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis. *Biotechnology Letters*, Springer, v. 19, n. 11, p. 1139–1141, 1997.
- HINTZPETER, J.; MARTIN, H.-J.; MASER, E. Reduction of lipid peroxidation products and advanced glycation end-product precursors by cyanobacterial aldo-keto reductase akr3g1 a founding member of the akr3g subfamily. *The FASEB Journal*, FASEB, v. 29, n. 1, p. 263–273, 2015.
- HOLSER, R. A. Principal component analysis of phenolic acid spectra. *ISRN Spectroscopy*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.
- HU, Y.-J. et al. The specific binding of chlorogenic acid to human serum albumin. *Molecular Biology Reports*, Springer, v. 39, n. 3, p. 2781–2787, 2012.

- JANECEK, S. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal of Biochemistry*, Wiley Online Library, v. 224, n. 2, p. 519–524, 1994.
- KADZIOLA, A. et al. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier, v. 239, n. 1, p. 104–121, 1994.
- KADZIOLA, A. et al. Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier, v. 278, n. 1, p. 205–217, 1998.
- KNIGHT, N. J. et al. Qsar analysis of substituent effects on tambjamine anion transporters. *Chemical Science*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 2, p. 1600–1608, 2016.
- LEIPER, K. A.; MIEDL, M. Colloidal stability of beer. *Beer: a Quality Perspective*, p. 111–162, 2008.
- LEIPER, K. A.; STEWART, G. G.; MCKEOWN, I. P. Beer polypeptides and silica gel part i. polypeptides involved in haze formation. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 109, n. 1, p. 57–72, 2003.
- LIMPOUCHOVÁ, Z.; PROCHÁZKA, K. Theoretical principles of fluorescence spectroscopy. In: *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*. [S.l.]: Springer, 2016. p. 91–149.
- ŁOBIŃSKI, R.; MARCZENKO, Z. Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Taylor & Francis, v. 23, n. 1-2, p. 55–111, 1992.
- MACGREGOR, A. alpha-amylase from malted barley-physical properties and action pattern on amylose1. *Cereal Foods World*, v. 23, n. 4, p. 212–212, 1978.
- MACGREGOR, A. et al. Modelling the contribution of alpha-amylase, beta-amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *Journal of Cereal Science*, Elsevier, v. 29, n. 2, p. 161–169, 1999.
- MACGREGOR, E. A.; JANEČEK, Š.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, Elsevier, v. 1546, n. 1, p. 1–20, 2001.
- MARANGONI, A. G. *Enzyme kinetics: a modern approach*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2003.
- MAROVA, I. et al. Analysis of phenolic compounds in lager beers of different origin: a contribution to potential determination of the authenticity of czech beer. *Chromatographia*, Springer, v. 73, n. 1, p. 83–95, 2011.
- MASHHDANI, F. A. A.; MUHAMMED, S. S. Utilization of microwave treatments for germination and α -amylase characteristics in some cereals. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 5, n. 5, p. 293–306, 2016.

MATOS, R. A. G. et al. Cerveja: panorama do mercado, produção artesanal, e avaliação de aceitação e preferência. *UFSC*, 2012.

OZKORUCUKLU, S. P. et al. Determination of dissociation constants of some hydroxylated benzoic and cinnamic acids in water from mobility and spectroscopic data obtained by ce-dad. *Journal of Chemical & Engineering Data*, ACS Publications, v. 54, n. 3, p. 807–811, 2009.

PAUNOVIĆ, D. Đ. et al. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols from barley. *Savremene Tehnologije*, v. 3, n. 2, p. 58–63, 2014.

(PUBCHEMHOMEPAGE). *PubChem OPEN CHEMISTRY DATABASE*. 2016. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>. Acesso em 1 nov. 2016.

RASHIDIPOUR, S.; NAEEMINEJAD, S.; CHAMANI, J. Study of the interaction between dnp and dids with human hemoglobin as binary and ternary systems: spectroscopic and molecular modeling investigation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Taylor & Francis, v. 34, n. 1, p. 57–77, 2016.

RAVIYAN, P.; TANG, J.; RASCO, B. A. Thermal stability of α -amylase from aspergillus oryzae entrapped in polyacrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 51, n. 18, p. 5462–5466, 2003.

ROBERT, X. et al. The structure of barley α -amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain c in substrate recognition and binding. *Structure*, Elsevier BV, v. 11, n. 8, p. 973–984, Aug 2003. ISSN 0969-2126. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00151-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00151-5)>.

RODRIGUES, K. L. et al. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, v. 21, p. 58–69, 2016.

ROJAS-ROMO, C. et al. Determination of sb (iii) using an ex situ bismuth screen-printed carbon electrode by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, Elsevier, v. 155, p. 21–27, 2016.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

SAHNOUN, M. et al. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated aspergillus oryzae strain s2. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 47, n. 1, p. 18–25, 2012.

SAHNOUN, M. et al. Aspergillus oryzae s2 α -Amylase domain c involvement in activity and specificity: In vivo proteolysis, molecular and docking studies. *PloS one*, Public Library of Science, v. 11, n. 4, p. e0153868, 2016.

(SEBRAE). *Consumo de cerveja no Brasil e no mundo*. 2014. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/wp-content/uploads/2014.pdf>. Acesso em 18 nov. 2016.

- SELWYN, M. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, Elsevier, v. 105, n. 1, p. 193–195, 1965.
- ŠERUGA, M.; TOMAC, I. Electrochemical behaviour of some chlorogenic acids and their characterization in coffee by square-wave voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 9, n. 11, p. 6134–6154, 2014.
- (SIB). *ProtParamtool*. 2016. Disponível em: <http://expasy.org/tools/protparam.html>. Acesso em 16 out. de 2016.
- SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.*, American Chemical Society (ACS), v. 47, n. 2, p. 353–362, Feb 1999. ISSN 1520-5118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf980703o>.
- SILVA, D. P. da. *Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares*. Tese (Doutorado) — Tese de Doutorado, Lorena, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.
- SIM, J. H. et al. Thermodynamic studies on activity and stability of immobilized thermomyces lanuginosus in producing fatty acid methyl ester (fame). *International Journal of Scientific and Research Publications*, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.
- SINGH, K. et al. α -amylase immobilization onto functionalized graphene nanosheets as scaffolds: Its characterization, kinetics and potential applications in starch based industries. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Elsevier, v. 3, p. 18–25, 2015.
- STEINER, E.; BECKER, T.; GASTL, M. Turbidity and haze formation in beer insights and overview. In: *Journal of the Institute of Brewing*. [S.l.: s.n.], 2011.
- STENHOLM, K.; HOME, S. A new approach to limit dextrinase and its role in mashing*. *Journal of the Institute of Brewing*, Wiley Online Library, v. 105, n. 4, p. 205–210, 1999.
- SUN, L. et al. Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α -amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. *Food chemistry*, Elsevier, v. 208, p. 51–60, 2016.
- SUN, L. et al. 3 or 3-galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine pancreatic α -amylase: The kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, v. 26, p. 144–156, 2016.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, Elsevier BV, v. 39, n. 2, p. 151–165, Mar 2004. ISSN 0733-5210. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>.
- TRNKOVÁ, L. et al. Binding of naturally occurring hydroxycinnamic acids to bovine serum albumin. *Natural Science*, Scientific Research Publishing, v. 2, n. 06, p. 563, 2010.
- VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.

VALLÉE, F. et al. Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor basi: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure*, Elsevier, v. 6, n. 5, p. 649–659, 1998.

WEERT, M. Van de; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, Elsevier, v. 998, n. 1, p. 144–150, 2011.

XIAO, J. et al. A review on structure activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, v. 53, n. 5, p. 497–506, 2013.