

**THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA**

**ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO* SOBRE BASES ESTRUTURAIS DE  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DO LEITE  
BOVINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira

Coorientadores: Marcelo Depólo Polêto  
Jane Sélia dos Reis Coimbra

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48e  
2020  
Oliveira, Thomás Valente de, 1989-  
Estudos *in silico* e *in vitro* sobre bases estruturais de  
propriedades tecnológicas de proteínas e peptídeos do leite  
bovino / Thomás Valente de Oliveira. – Viçosa, MG, 2020.  
181 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. 2. Modelos moleculares.  
3. Dinâmica molecular. 4. Simulação de Acoplamento  
Molecular. 5. Lactalbumina. 6. Peptidil Dipeptidase A.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia  
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

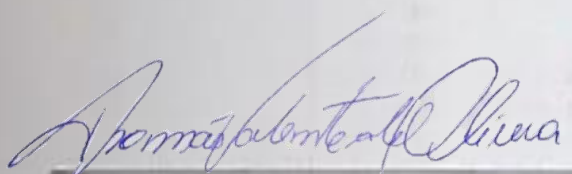
THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA

**ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO* SOBRE BASES ESTRUTURAIS DE  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DO LEITE  
BOVINO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, para a obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2021.

Assentimento:



Thomás Valente de Oliveira  
Autor



Eduardo Basílio de Oliveira  
Orientador

*A meu pai Edimilson (in memorian), meu eterno motivador,  
minha filha Beatriz e minha esposa Janaína,  
minha mãe Rose e meu irmão Samuel,  
com muito amor e carinho, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa benção de chegar até aqui, e porque sem Ele eu nada seria.

À minha esposa Janaína e à minha filha Beatriz, pela força nos momentos mais difíceis, pelo amor e carinho sempre presentes, pelo apoio em minhas decisões sempre, por serem compreensivas nos momentos de ausência demandados por este trabalho e por fazer parte ativamente da minha vida.

Aos meus pais Edimilson (*in memoriam*) e Rose Elaine, pelo amor incondicional, pelos exemplos, pelos conselhos e pelo incentivo constante.

Ao meu irmão Samuel, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, por toda orientação profissional, por compartilhar seus conhecimentos científicos sem hesitar e pela dedicação e cuidado que teve com o nosso trabalho. Agradeço também pela amizade e orientações pessoais, pelos conselhos e experiências compartilhadas e, sem dúvida, pela confiança depositada em mim ao aceitar este desafio junto comigo.

Ao Dr. Marcelo Depólo Polêto, pela educação, simpatia e acolhida como um parceiro de equipe, abraçando nosso projeto e fornecendo todo treinamento e acompanhamento necessário para que ele se tornasse realidade. Obrigado pela disponibilidade e paciência.

À professora Jane, pelas sugestões e discussões levantadas ao longo do trabalho, sendo sempre muito amável e atenciosa.

Às professoras Ana Paula Guimarães e Elaine Rose Maia e ao professor Gustavo Bressan, pela simpatia e disposição em contribuir ativamente em minha qualificação, compartilhando seus valiosos conhecimentos e experiências em uma área tão nova para mim.

Ao professor Teodorico Ramalho, por aceitar meu convite para compor minha banca de defesa de tese e compartilhar sua vasta experiência na área, sem ao menos me conhecer. Muito obrigado pela gentileza, professor!

Aos amigos do Laboratório de Laboratório de Operações e Processos – LOP e do Laboratório de Estudos de Materiais Alimentares – LEMA, pela amizade e pelo excelente clima de trabalho. Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela oportunidade e pelos recursos investidos durante o curso.

Aos amigos da PPG, por toda motivação, amizade e apoio durante esse período. Um agradecimento especial à amiga Heloíza Rios, pela força e pelo companheirismo no trabalho, e por ter “segurado a barra” nos momentos em que eu mais precisei. Com certeza você foi essencial para a realização desse sonho. Tenho medo que isso “saia caro” no futuro, mas valeu o risco. Muito obrigado!

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente à Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação e à Diretoria de Registro Escolar, por reconhecer que a capacitação e os sonhos de seus servidores são necessários para a prestação de um serviço de excelência e para a sua satisfação profissional. Obrigado, professor Raul e Edson pelos esforços em viabilizar alternativas para que eu conseguisse desenvolver meus experimentos sem prejudicar a UFV.

Às vovós, vovô, tias e padrinho, especialmente à madrinha Jamila, por estarem sempre disponíveis para cuidar da Bia naqueles dias em que a sobrecarga de trabalho ficava um pouco pesada.

Aos demais amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e deste sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“...se nós nomeássemos a suposição mais poderosa de todas, que nos leva adiante na tentativa de entender a vida, é que todas as coisas são feitas de átomos, e, portanto, que todas as coisas vivas podem ser compreendidas a partir do “chacoalhar” de seus átomos...”*

*Richard Feynman*

## BIOGRAFIA

THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA, filho de Rose Elaine Valente de Oliveira e Edimilson Alves de Oliveira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 04 de abril de 1989. Casado com Janaína Soares Vilela e pai da Bia, adora passar o tempo livre com sua família, assistir filmes, cozinhar (e comer), jogar xadrez e aprender sobre assuntos diversos, principalmente relacionados à ciência. Um de seus maiores hobbies é tocar piano acompanhado de seu irmão, Samuel, exímio cantor (principalmente no chuveiro).

Em março de 2007, iniciou sua graduação em Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Lavras – UFLA, sendo transferido para o mesmo curso em 2008 na Universidade Federal de Viçosa – UFV, concluído em agosto de 2013.

Em agosto do mesmo ano, iniciou atividades como Analista de Gestão no Grupo Agroindustrial Mantiqueira, mantendo-se no cargo até agosto de 2014, quando ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de sua dissertação em 19 de agosto de 2016. Durante esse período, também teve experiências profissionais empreendedoras, onde foi sócio de duas empresas: “RG Projetos e Consultoria Agrícola” e a “Libélula Acessórios”.

Em janeiro de 2017, iniciou como servidor da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, onde desenvolve atividades profissionais até o momento. Em agosto de 2017, ingressou no Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de sua tese em 15 de dezembro de 2020.

## RESUMO

DE OLIVEIRA, Thomás Valente, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Estudos *in silico* e *in vitro* sobre bases estruturais de propriedades tecnológicas de proteínas e peptídeos do leite bovino.** Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Marcelo Depólo Polêto.

Algumas proteínas alimentares, além de suas funções nutricionais, possuem propriedades tecnológicas de grande interesse na composição e formulação de alimentos, como, por exemplo, propriedades biofuncionais, com ação anti-hipertensiva, e de interface, com ação espumante e emulsificante. Para se estudar a origem de tais propriedades tecnológicas, é necessário estabelecer de forma clara uma relação entre a função tecnológica e sua estrutura molecular e como essa se comporta na matriz alimentar. Em Ciência e Tecnologia de Alimentos (CTA), algumas técnicas experimentais *in vitro* bastante criteriosas têm sido utilizadas com esse objetivo, como, por exemplo, difração de raios X, dicroísmo circular, espectroscopias de fluorescência, e microcalorimetrias, porém esses métodos possuem limitações intrínsecas quanto à caracterização da dinâmica destas biomoléculas. Assim, abordagens alternativas para um estudo estrutural mais refinado da relação “estrutura-função” se fazem necessárias, e as simulações de *docking* e dinâmica molecular, métodos com reconhecida validade científica nas áreas de farmacologia, medicina e ciência dos materiais, mas ainda raramente utilizadas em CTA no Brasil, despontam como ferramentas para um estudo mais racional e menos empírico das aplicações tecnológicas das proteínas alimentares. O objetivo desta tese foi aplicar métodos *in silico*, especificamente simulações de *docking* e de dinâmica molecular, para compreender as bases moleculares de propriedades biofuncionais e tecnológicas de biomoléculas alimentares. As propriedades estudadas foram a atividade anti-hipertensiva de peptídeos obtidos da hidrólise da caseína do leite bovino e propriedades espumantes da  $\alpha$ -lactoalbumina do soro de leite bovino, como sua capacidade espumante e estabilidade da espuma. A utilização dessas ferramentas nos permitiu atingir um nível de detalhamento e refinamento raramente encontrados em trabalhos de CTA, esclarecendo, em suma, que: i) a atividade anti-hipertensiva dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína está correlacionada a uma maior desestruturação dos três resíduos (His383, His387 e Glu411) coordenados ao íon de  $Zn^{2+}$  da enzima conversora de angiotensina-I, desde que também estabeleçam interações do tipo ligação de hidrogênio como os resíduos do sítio S1 (Ala354, Glu384 e Tyr523); ii) à temperatura de 75 °C o íon de  $Ca^{2+}$  não se mantém complexado à estrutura da  $\alpha$ -lactoalbumina, e que após ser depletado, uma série de eventos de desestabilização estrutural são iniciados, resultando na perda completa das estruturas

2<sup>as</sup> h2b, h3c, S1, S2 e S3, e a desestruturação parcial das  $\alpha$ -hélices H1, H2 e H3, aumentando sua capacidade de recobrir a interface e, conseqüentemente, aumentando sua capacidade espumante. A inserção gradual e a consolidação de tais ferramentas de modelagem molecular em pesquisas relacionadas à CTA nos permitirá esclarecer uma série de outros questionamentos acerca da relação “estrutura-função” de diversas biomoléculas alimentares, que foram empiricamente reportadas na literatura, mas que ainda não se foi capaz de esclarecer a nível molecular.

Palavras-chave: Modelagem molecular. Dinâmica molecular. *Docking* molecular.  $\alpha$ -lactoalbumina. Enzima conversora de angiotensina.

## ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Thomás Valente, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. ***In silico* and *in vitro* studies about structural bases of technological properties of bovine milk proteins and peptides.** Adviser: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisers: Jane Selia dos Reis Coimbra and Marcelo Depólo Polêto.

Some food proteins, farther to their nutritional functions, have technological properties of interest in food formulations, such as foaming and emulsifying actions, and biofunctional properties, such as the antihypertensive capacity. To study the origin of these technological properties, it is necessary to set up a clear relationship between the technological function and its native structure, comprising how it behaves in the food matrix. In food science and technology (FST), some *in vitro* techniques have been used for this purpose, such as X-ray diffraction, circular dichroism spectroscopy, fluorescence spectroscopies, and microcalorimetry, however, these methods have limitations concerning the characterization of these biomolecules dynamics. Thus, alternative approaches for a refined “structure-function” study are necessary, and docking and molecular dynamics simulations, tools with recognized scientific validity in pharmacology, medicine and material science, but still uncommon at FST researches in Brazil, appear as alternatives for a more rational and less empirical study of the food proteins technological applications. This thesis aimed to apply *in silico* method, such as docking and molecular dynamics simulations, to understand the molecular bases of biofunctional and technological properties of food biomolecules, such as the antihypertensive activity of peptides obtained from bovine milk casein hydrolysis, and the foamability of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. These tools allowed us to reach a level of detail and refinement rarely found in FST works, clarifying, briefly, that: i) the antihypertensive activity from peptides obtained of casein hydrolysis is increased with the destabilization increasing of the three residues coordinated with the  $Zn^{2+}$  ion (His383, His387 and Glu411) from angiotensin-I converting enzyme (ACE), whereas it also establishes h-bonds with ACE S1 active site residues (Ala354, Glu384 and Tyr523); ii) at 75 °C the  $Ca^{2+}$  ion does not remain stable to the  $\alpha$ -lactalbumin structure, and, after to be depleted, a sequence of de-structural events are initiated, resulting in the complete loss of the 2as structures h2b, h3c, S1, S2 and S3, and the partial de-structuring of the  $\alpha$ -helices H1, H2 and H3, with the four disulfide bridges avoiding the complete protein unfolding. The gradual introduction and consolidation of molecular modeling tools in FST researches will allow us to clarify a wide range of other questions about the “structure-function” of several food biomolecules, which are observed empirically, but which we have not able to (yet) clarify at a molecular level.

Keywords: Molecular modeling. Molecular dynamics. Molecular *docking*.  $\alpha$ -lactalbumin. Angiotensin converting enzyme.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Representação esquemática dos termos ligados e não ligados que compõem um campo de forças: estiramento de uma ligação covalente (A), desvio angular (B), ângulo diedral ou de torção (C), diedro impróprio (D), interação eletrostática (E) e interação de van der Waals (F). Elaborado pelo autor. .... 31
- Figura 2 – Demonstração de uma cela de simulação cúbica: a) com a proteína sob vácuo, e b) com a proteína solvatada e com íons (representados esquematicamente por esferas verdes) adicionados ao sistema. Molécula: lisozima do ovo. Fonte: Lemkul (2018). .... 40
- Figura 3 - Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação de DM. Fonte: Verli, (2014). .... 40
- Figura 4 – Representação esquemática do número de interações não-ligadas (setas vermelhas) estabelecidas por um átomo em um sistema complexo: a) sem a implementação de uma distância de corte (*cut-off*), e b) com a implementação de uma distância de corte representada pelo círculo azul. Fonte: elaborada pelo autor. .... 41
- Figura 5 – Representação esquemática da superfície de energia potencial de uma proteína em função das conformações possíveis. Fonte: adaptado de Guizado (2008). .... 43
- Figura 6 - Representação esquemática dos métodos de minimização de energia *Steepest descent* e *Conjugate gradient* em uma mesma função. Fonte: Chan & Ewins, 2010 ..... 44
- Figura 7 - Esboço da estrutura do algoritmo *leapfrog*. Fonte: Young, 2013 ..... 47
- Figura 8 – Primeiro proposta gráfica publicada para cálculo de superfície acessível ao solvente (molécula: enzima Ribonuclease Pancreática-S). Fonte: LEE; RICHARDS, 1971. .... 49
- Figura 9 - Primeira Superfície de Connolly gerada computacionalmente publicada (molécula: insulina): a) representação gráfica vetorial; b) representação gráfica como superfície. Fonte: CONNOLLY (1983). .... 50
- Figura 10 - Linha do tempo evolutiva com destaque para os principais eventos que contribuíram para o desenvolvimento dos algoritmos de busca, desde o *docking* rígido até o *docking* flexível. Fonte: Tessaro & Scapozza (2020). .... 51

Figura 11 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona para controle da pressão arterial. Fonte: Elaborado pelo autor. ....	55
Figura 12 - Estrutura tridimensional da enzima conversora de angiotensina (código PDB: 1O86), obtida por difração de raios X. Fonte: Protein Data Bank (PDB, www.pdb.org) .....	56
Figura 13 - Estrutura tridimensional da $\alpha$ -lactoalbumina bovina (código PDB: 1HFZ), obtida por difração de raios X. Fonte: Protein Data Bank (www.rcsb.org).....	67

## CAPÍTULO 2

Fig. 1 - Chromatographic profiles obtained using a C <sub>4</sub> analytical column (detection at 214 nm): (a) Blank (containing only buffer), (b) Trypsin control, (c) Casein control, and (d) chromatographic fractions obtained by bovine casein hydrolysate. Dashed lines represent the % of solvent B (acetonitrile) in the mobile phase.....	95
Fig. 2 - Mass spectra (MS/MS) referent to peptides whose amino acid composition and sequence was determined by de novo sequencing in manual mode: (a) NAVPITPTLNR (Fraction F <sub>1</sub> ; m/z=1195.6) and (b) FALPQYLK (Fraction F <sub>4</sub> ; m/z = 979.5).....	97
Fig. 3 - Peptides FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK and ALNEINQFYQK docked within the ACE catalytic pocket: first column: ACE pocket containing the peptides; second column: 3D view of ACE amino acid residues interacting directly with the docked peptides; third column: schematic 2D depiction of these interactions (hydrogen bonds are depicted as green dashed lines; electrostatic interactions, as orange dashed lines; hydrophobic interactions, as purple dashed lines).....	99

## CAPÍTULO 3

Figure 1 - ACE active site containing the tetracoordinated Zn <sup>2+</sup> cation.....	104
Figure 2 - Molecular structures of the six peptides (built using the ChemDraw software). .....	106
Figure 3 - ACE site within which the peptides were docked (inside the red surface). .....	107
Figure 4 - Poses N-oriented (yellow sticks) and C-oriented (purple sticks) obtained by the docking assays: A) ALNEINQFYQK, B) NAVPITPTLNR, C) FALPQYLK, D) FFVAPFPEVFGK, E) YLGYLEQLLR, and F) HQGLPQEVLENLLR. ACE catalytic pocket are depicted with light red; active site residues are depicted with cyan sticks; Zn <sup>2+</sup> ion is depicted with grey sphere; and Clions are depicted with green spheres. .	108

Figure 5 - Schematic representation of interactions between ACE and peptides poses (N- and C-oriented). The black arrows indicate residues from ACE active sites interacting with the peptide pose. Hydrogen bonds are depicted with green dashed lines; electrostatic interactions, as orange dashed lines; hydrophobic interactions, as purple dashed lines.....	109
Figure 6 - RMSD variation of backbone for complex ACE-peptides and for peptides only during MD trajectories. N-oriented poses are depicted with black lines and poses C-oriented poses with red lines.....	111
Figure 7 - RMSF of heavy atoms of ACE-peptides complexes. RMSF of ACE complexed with N-oriented poses are depicted with black lines; RMSF of ACE complexed with C-oriented poses are depicted with red lines; difference between RMSF of ACE heavy atoms complexed with N-oriented pose and RMSF of ACE heavy atoms complexed with C-oriented pose are depicted with blue lines.....	112
Figure 8 - Heat map of RMSF values of heavy atoms from the peptides during MD trajectories.....	113
Figure 9 - Behavior of ACE-ALNEINQFYQK C-oriented complex during MD trajectory: A) ACE residues fluctuations; B) Hydrogen bonds between ALNEINQFYQK:Glu4 and ACE:His387; and C) RMSF of ALNEINQFYQK peptide only; and D) Region with high fluctuation on the ACE surface. The complex conformation at t = 0 ns is depicted with green ribbons, and the complex conformation at t <sup>1</sup> / <sub>4</sub> 50 ns is depicted with orange ribbons. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.....	114
Figure 10 - (A) Behavior of ACE-NAVPITPTLNR N-oriented and (B) C-oriented complexes interacting with Zn <sup>2+</sup> coordinated residues during MD trajectories. (C) Number of hydrogen bonds between NAVPITPTLNR and all ACE active sites, and (D) distances distribution of hydrogen bonds. The complex conformations: at t = 10 ns is depicted with green sticks, at t = 30 ns with cyan sticks, and the complex conformation at t = 50 ns with purple sticks. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.....	115
Figure 11 - Analysis of the hydrogen bond between the C-oriented FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1 residues: A) hydrogens bond number between Glu411 and Ala2 during MD trajectory; B) distance (nm) between ACE:Glu411:OE1 and Zn <sup>2+</sup> cation during MD trajectory, C) distance between ACE:Glu411:OE1 and FALPQYLK:Ala2:HN during MD trajectory, and D) FALPQYLK conformation evolution during MD trajectory. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.....	116

Figure 12 - FFVAPFPEVFGK N-oriented pose behavior during MD trajectory: A) distance between FFVAPFPEVFGK:Glu8:OE1 atom and Zn<sup>2+</sup> ion, and B) peptide N-oriented pose in 30 ns of simulation (orange) and 42 ns of simulation (green). For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden..... 117

Figure 13 - Distances between the YLGYLEQLLR:Arg10 atoms of N-oriented pose and the ACE active sites residues during MD trajectory: distance between YLGYLEQLLR:Arg10:HE and ACE:Ala354:O is depicted with black line; distance between YLGYLEQLLR:Arg10:2HH2 and ACE:Glu384:OE1 with red line, and distance between YLGYLEQLLR:Arg10:1HH1 and ACE:Glu411:OE1 with green line. .... 117

#### **CAPÍTULO 4**

Figure 1 - Structural behavior indicators over simulation time: a) RMSD variation of apo structure heavy atoms; b) RMSF of apo structure heavy atoms; c) Radius of gyration of apo structure; d) RMSD variation of holo structure heavy atoms; b) RMSF of holo structure heavy atoms; c) Radius of gyration of holo structure. RMSF x-axes mean i. the secondary structures, ii. the sub-domains and iii. the disulfide bridges. 4 °C systems are depicted with black lines; 25 °C systems are depicted with red lines and 75 °C systems are depicted with green lines..... 131

Figure 2 - Secondary structure assignments by residue over simulation time for each system (a-f) and trajectory frames superposition at 0 ns, 100 ns and 200 ns highlighting natives secondary structures for each system (g-l). .... 133

Figure 3 - Ca<sup>2+</sup> binding site behavior: a) distances between Ca<sup>2+</sup> and Asp84 residue at 4, 25 and 75 °C; b) opening of Ca<sup>2+</sup> biding from holo-La at 75 °C before (0 and 25 ns) and after cation leave (50 ns); c) opening of Ca<sup>2+</sup> biding site from apo-La in 0, 150 and 200 ns at 75 °C; d) distances between apo-La and holo-La residues Lys79 and 82; e) Lys79 and Asp84; f) Lys79 and Asp87; g) Asp82 and Asp84; h) Asp82 and Asp88; and i) Asp84 and Asp87. .... 135

Figure 4 - Solvent accessible surface area (SASA) behavior: a) Hydrophilic SASA from apo and holo structures over simulation time; b) Hydrophobic SASA from apo and holo structures over simulation time; c) Connolly surface of holo structure in 0 and 200 ns at 75 °C, highlighting the polar (green) and nonpolar (purple) residues that lost its native secondary structure; d) Holo-La hydrophobic cluster organization at 75 °C. .... 137

Figure 5 - Loss of stability between alpha and beta subdomains, promoted by the lost of hydrogen bonds between the Gln54, Asn56 and Tyr103 residues, for a) apo and b)

holo structures, at 75 °C in 0, 100 and 200 ns of simulation, and distances between the Gln54, Asn56 and Tyr103 residues for c) apo-La and d) holo-La. The  $\alpha$ -domain is depicted in orange and the  $\beta$ -domain is depicted in cyan..... 138

Figure 6 - Systems *in vitro* behavior: a) foam capacity of apo and holo structures at 4, 25 and 75 °C; b) interfacial tension of apo and holo structures at 4, 25 and 75 °C; c) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 4 °C; d) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 25 °C; e) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 75 °C; foam microscopic images of apo and holo structures in different time moments at f) 4 °C, g) 25 °C and h) 75 °C..... 139

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Equações de potencial de energia para os campos de forças CHARMM, GROMOS e AMBER.....	35
Tabela 2 - Estudos envolvendo a obtenção e caracterização de peptídeos bioativos derivados de caseínas com atividade anti-hipertensiva <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> .....	61
Tabela 3 - Estudos de inibição da ECA por peptídeos de origem alimentar utilizando simulações de <i>docking</i> ou dinâmica molecular. ....	64
Tabela 4 - Estudos referentes à influência de temperatura, pH e presença do cátion $Ca^{2+}$ , nas propriedades técnico-funcionais da $\alpha$ -La.....	70
Tabela 5 - Estudos acerca do comportamento dinâmico da $\alpha$ -La bovina por meio de simulações de dinâmica molecular. ....	74

### CAPÍTULO 2

Table 1 - Values of percentage of ACE-inhibitory activity <i>in vitro</i> , area percentage relative to the sum of the areas of all peaks, amino acid sequences and hydrophathy values of peptides contained in chromatographic fractions ( $F_1$ to $F_6$ ) of the bovine casein hydrolysate .....	96
Table 2 - Complex ACE-peptides binding energy (kcal/mol) obtained by molecular docking and information about interactions involved the peptides and ACE residues from S1, S2 and S'1 active sites and coordinates with Zn(II) .....	98

### CAPÍTULO 3

Table 1 - Position restraints applied to the protein atoms before the production MD trajectories (Polêto et al., 2019). ....	105
Table 2 - Information about systems submitted to the molecular dynamics, in terms of amounts of water molecules and $Na^+$ and $Cl^-$ ions. ....	107
Table 3 - $I_{ACE}(\%)$ of peptides chromatographic fractions, binding energy ( $kcal.mol^{-1}$ ) of ACE-peptides complexes obtained by docking assays, and intermolecular interactions involving the peptides and ACE residues from S1, S2 and S'1 active sites and residues coordinated with $Zn^{2+}$ .....	110
Table S3 – Supplementary Material – Equilibration protocol (adapted from Polêto <i>et al.</i> , 2019). ....	127

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	21
2.	OBJETIVOS .....	26
2.1.	Objetivo Geral.....	26
2.2.	Objetivos Específicos.....	26
	<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>27</b>
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	28
3.1.	Abordagens <i>in silico</i> para análise de estruturas proteicas .....	28
3.1.1.	Mecânica Molecular .....	29
3.1.2.	Campos de Forças.....	30
3.1.2.1.	<i>Campo de Forças GROMOS53A6</i> .....	37
3.1.3.	Simulação de Dinâmica Molecular .....	38
3.1.4.	Minimização de energia / otimização geométrica da estrutura.....	42
3.1.5.	Equilibração do sistema .....	44
3.1.6.	Produção .....	45
3.1.6.1.	<i>Algoritmo de Integração de Verlet e Verlet Leap-Frog</i> .....	46
3.1.6.2.	<i>Estratégias de análise</i> .....	47
i.	<i>Desvio Médio Quadrático (RMSD)</i> .....	47
ii.	<i>Flutuação Média Quadrática (RMSF)</i> .....	48
iii.	<i>Raio de Giro (Rg)</i> .....	48
iv.	<i>Análise de Superfície Acessível ao Solvente (SASA)</i> .....	48
3.2.	Simulação de <i>Docking</i> Molecular .....	50
3.2.1.	Algoritmos de busca .....	51
3.2.2.	Funções de <i>Score</i> .....	53
3.3.	Hipertensão Arterial e a Enzima Conversora de Angiotensina .....	54
3.4.	Fenômenos de superfície e espumas em alimentos.....	57
3.5.	Proteínas do leite bovino e suas aplicações tecnológicas .....	58
3.5.1.	Peptídeos de caseína e a Hipertensão Arterial .....	60
3.5.2.	Alfa-lactalbumina e suas propriedades de interface .....	67
3.5.3.	Questões em aberto .....	78
3.6.	REFERÊNCIAS .....	80

<b>CAPÍTULO 2</b> .....	90
4. Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Potential: Production, Identification and Assessment of Complex Formation with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) through Molecular Docking Studies .....	90
4.1. Abstract.....	91
4.3. Introduction .....	92
4.4. Material and Methods.....	92
4.4.1. Enzymes, Substrates and Other Chemicals .....	92
4.4.2. Preparation of Bovine Casein Hydrolysates .....	93
4.4.3. Separation of Peptides in Bovine Casein Hydrolysates by Ultrafiltration .....	93
4.4.4. Fractioning of Peptides Permeates by RP-HPLC .....	93
4.4.5. Assessment of the ACE-Inhibitory of Peptides of the Chromatographic Fractions.....	93
4.4.6. Peptide Identification, Sequencing, and Characterization by Mass Spectrometry .....	94
4.4.7. Molecular Docking Study .....	94
4.5. Results and Discussion.....	95
4.5.1. Separation and Fractioning of Peptides .....	95
4.5.2. Identification and Molecular Characterization of Peptides .....	95
4.5.3. Molecular Docking Study .....	97
4.6. Conclusions .....	100
4.7. References .....	100
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	102
5. Structural and molecular bases of angiotensin-converting enzyme inhibition by bovine casein-derived peptides: an <i>in silico</i> molecular dynamics approach.....	102
5.1. Introduction .....	103
5.2. Materials and methods.....	105
5.2.1. Computational resources .....	105
5.2.2. Structure preparation .....	105
5.2.3. Molecular docking procedure .....	107

5.2.4. Molecular dynamics (MD) procedure.....	107
5.3. Results.....	107
5.3.1. Molecular docking .....	107
5.3.2. Molecular dynamics (MD) .....	108
5.4. Discussion .....	112
5.5. Conclusions .....	118
5.6. References .....	119
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>121</b>
6. The loss of Ca <sup>2+</sup> at 75°C destabilizes α-lactalbumin secondary structures and affects its foamability – insights from computational molecular dynamics.....	121
6.1. Abstract.....	123
6.2. Introduction .....	124
6.3. Materials and methods.....	125
6.3.1. Materials .....	125
6.3.2. Computational resources .....	126
6.3.3. Molecular dynamics (MD) .....	126
6.3.4. Interfacial tension.....	128
6.3.5. Foamability .....	129
6.3.6. Statistical analyses .....	129
6.4. Results.....	129
6.5. Discussion .....	140
6.5.1. Molecular characterization of α-La molten globule state.....	140
6.5.2. Foamability vs α-La conformational changes .....	143
6.6. Conclusion .....	145
6.7. References .....	146
7. CONCLUSÕES GERAIS .....	150
APÊNDICIES .....	152
ANEXOS .....	155

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham papel fundamental na nutrição dos seres vivos, provendo aminoácidos essenciais para o crescimento e manutenção da vida (LI-CHAN; LACROIX, 2018). Além de sua função biológica, algumas proteínas possuem propriedades tecnológicas desejáveis em uma ampla gama de alimentos, podendo agir como emulsificantes, gelificantes, espumantes e espessantes (ZHANG *et al.*, 2015). Essas propriedades de cunho tecnológico, também conhecidas como propriedades técnico-funcionais, dependem diretamente da sequência e dos tipos de aminoácidos, além da conformação tridimensional da proteína, sendo que, esta última, sofre influência direta da composição e das propriedades físico-químicas dos demais componentes da matriz em que está inserida, além de ser diretamente impactada pelas condições de processamento ao qual o alimento será submetido (FOEGEDING; DAVIS, 2011).

As proteínas lácteas e peptídeos derivados de sua hidrólise merecem destaque neste contexto, pois várias delas possuem propriedades biológicas e técnico-funcionais já experimentalmente constatadas e consolidadas em décadas de estudos e de aplicação industrial. Por exemplo, a  $\alpha$ -lactoalbumina já é utilizada como ingrediente alimentício devido às suas propriedades espumantes, gelificantes e emulsificantes (ELLOUZE *et al.*, 2020; JIANG, ZHANMEI *et al.*, 2020; QAYUM *et al.*, 2020). Cabe ainda mencionar os peptídeos derivados da hidrólise de caseínas, que têm sido amplamente estudados devido às suas diferentes biofuncionalidades, como ação anti-inflamatória (PURUP *et al.*, 2019; SOWMYA *et al.*, 2019; GU; WU, 2016) antioxidante (BUENO-GAVILÁ *et al.*, 2019; IBRAHIM; ISONO; MIYATA, 2018; GU; WU, 2016) e anti-hipertensiva (CHEN *et al.*, 2020; GIROMINI *et al.*, 2019; XUE *et al.*, 2018).

A compreensão estrutural dessas biomoléculas é a chave para o entendimento de suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, funções fisiológicas e tecnológicas (HOSPITAL *et al.*, 2015). Atualmente, informações estruturais experimentais de proteínas podem ser obtidas experimentalmente por meio de técnicas como difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de dicroísmo circular (DC). Todavia, apesar de bastante criteriosas, essas técnicas possuem limitações intrínsecas, notadamente no que se refere à caracterização da dinâmica dessas biomoléculas, além de demandarem equipamentos de difícil acesso e possuírem elevado custo operacional. Neste contexto, abordagens alternativas para um estudo estrutural mais refinado das proteínas se fazem necessárias, e os métodos *in silico*, como as simulações dinâmicas e o *docking* moleculares, têm se revelado ferramentas poderosas e de reconhecida validade

científica (ZHANG *et al.* 2020; DAVIS *et al.*, 2010; HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996; BROOKS *et al.*, 1983).

O cientista Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física em 1965, em sua obra “*Feynman Lectures on Physics*” publicada em 1963, 14 anos antes do primeiro estudo de simulação de modelagem molecular (MCCAMMON; GELIN; KARPLUS, 1977), já preconizava que:

*“... se nós nomeássemos a suposição mais poderosa de todas, que nos leva adiante na tentativa de entender a vida, é que todas as coisas são feitas de átomos, e, portanto, **que todas as coisas vivas podem ser compreendidas a partir do “chacoalhar” de seus átomos...**”*

*(Feynman, 1963 apud Karplus & McCammon, 2002)*

Com o aumento do número de estruturas cristalográficas proteicas disponibilizadas no PDB (Protein Data Bank – [www.pdb.org](http://www.pdb.org)) a partir das décadas de 80 e 90, foi possível conhecer as posições espaciais de cada átomo em uma estrutura proteica, que são o ponto de partida para as simulações de modelagem molecular computacional. Adicionalmente, devido ao aprimoramento das ferramentas computacionais, o desenvolvimento de novos campos de forças e a otimização daqueles já existentes, tem sido possível, por meio da modelagem molecular computacional, compreender profundamente a estrutura, a dinâmica e as interações intra e intermoleculares de proteínas e outras biomoléculas. Desta forma, pode-se prever, em nível atômico, o comportamento de uma proteína imersa em um solvente, estimar energias médias envolvidas em cada interação entre esta proteína e outras biomoléculas e, por fim, explorar esses resultados para explicar a origem molecular de suas propriedades biológicas e técnico-funcionais (SALSBURY; LEMKUL, 2019; MENEKSEDAG-EROL; TANG; ULUDAĞ, 2014).

Pode-se considerar que este tipo de abordagem já está consolidada em três áreas clássicas da ciência, sendo elas: o estudo de propriedades dos materiais (HABASAKI; NGAI, 2018; KRISHNA; VAN BATEN, 2018); a busca pela compreensão dos mecanismos de ação enzimática (GISSINGER; JENSEN; WISE, 2017) e o desenvolvimento de fármacos (ONO *et al.*, 2020; PANDEY *et al.*, 2020). A recente pandemia da Covid-19, considerada o maior problema de saúde pública do mundo dos últimos 100 anos, pode nos exemplificar como as metodologias de modelagem molecular estão consolidadas na ciência moderna e quão rápidas e precisas elas são. Em fevereiro de 2020, há pouco mais de um mês após a identificação do primeiro caso em dezembro de 2019 na China, a estrutura da endoribonuclease do SARS-Cov-2 teve sua estrutura publicada no Protein Data Bank (KIM *et al.*, 2020). Logo em

seguida, no início de março de 2020, o periódico Cell (impact fator > 36) publicava um estudo completo de modelagem da “spike glycoprotein” do SARS-CoV-2, em que discutia sua estrutura, suas funções e sua antigenicidade (WALLS et al., 2020). Com tais informações disponíveis à comunidade científica, milhares de pesquisas envolvendo modelagem molecular ao redor do mundo foram iniciadas em busca de possíveis ligantes que poderiam agir como fármaco contra a Covid-19 (GRIFONI *et al.*, 2020; JIANG; YIN; XU, 2020). Tudo isso em um intervalo de três meses. Tomando conhecimento do potencial dessas ferramentas, no dia 24 de março de 2020, o governo americano criou o maior “Consórcio de Computação de Alto Desempenho” do mundo, reunindo instituições acadêmicas, como o Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) e o Instituto Politécnico Rensselaer; empresas privadas, como a IBM, Amazon, Hewlett Packard, Google e Microsoft; e agências federais, como o Departamento de Energia dos EUA e a Nasa, que cederam seus supercomputadores para execução de uma quantidade maciça de cálculos de bioinformática para pesquisadores do mundo inteiro.

Porém, apesar de sua utilização exaustiva nas ciências biológicas e bioquímicas, nas áreas de CTA as ferramentas *in silico* de DM e docking ainda não estão bem difundidas e, conseqüentemente, o número de estudos envolvendo modelagem computacional é relativamente baixo, principalmente no Brasil. Apenas recentemente, pesquisadores de diferentes ramos dentro da CTA vêm aplicando ferramentas de modelagem molecular com grande êxito, discutindo a nível atômico a origem de algumas propriedades tecnológicas e as alterações estruturais de algumas moléculas alimentares, como as propriedades gelificantes da ramnose da casca de maçã (PIECZYWEK *et al.*, 2020), as propriedades espessantes da goma xantana após degradação enzimática (JENSEN *et al.*, 2019) e a toxicidade de 26 possíveis substitutos para o bisfenol A em embalagens (CAVALIERE; LORENZETTI; COZZINI, 2020). Esses exemplos mostram que, ainda que de forma tímida, as metodologias *in silico* de *docking* e de dinâmica moleculares estão começando a ser utilizadas em diferentes linhas de pesquisa dentro da área da CTA. A qualidade desses trabalhos impressiona quanto à riqueza de informações extraídas e à profundidade das discussões geradas. Acredita-se, portanto, que a promoção de estudos que visem à aplicação destas poderosas ferramentas científicas na área de CTA seja essencial para que se compreenda de forma racional e menos empírica a origem molecular de propriedades tecnológicas e biofuncionais de biomoléculas alimentares.

Esta tese teve como finalidade, portanto, apresentar aos pesquisadores brasileiros em CTA o enorme potencial de aplicação das simulações de *docking* e de dinâmica moleculares na investigação científica do comportamento tecnológico de biomoléculas alimentares, assim como promover a utilização de tais ferramentas para

a geração e divulgação de conhecimento refinado nessa área de conhecimento. Para tal, dois estudos de caso foram empreendidos (Figura 1). O primeiro consistiu no estudo de mecanismos promotores da inibição da enzima conversora de angiotensina I por peptídeos hidrolisados de caseína; e, o segundo, teve como objetivo investigar como a estrutura da  $\alpha$ -lactalbumina do soro de leite bovino se altera em função da temperatura e como isso afeta suas propriedades espumantes. Pragmaticamente, buscou-se responder às seguintes questões: i) “Quais os mecanismos de atuação de peptídeos bioativos de caseína do leite bovino na inibição ou redução da atividade da enzima conversora de angiotensina e consequente redução da pressão arterial?”; e ii) “Como a estrutura da  $\alpha$ -lactoalbumina do leite bovino, com e sem o íon cálcio complexado se correlaciona com sua termoestabilidade e suas propriedades espumantes?”. Os resultados deste estudo nos permitiram elucidar tais questionamentos e correlacionar características estruturais destas biomoléculas alimentares à suas funções tecnológicas. Além disso, foi possível dar o primeiro passo para a estruturação de uma nova linha de pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, com o foco na aplicação de simulações moleculares computacionais para a elucidação da relação estrutura-função de diferentes biomoléculas alimentares.

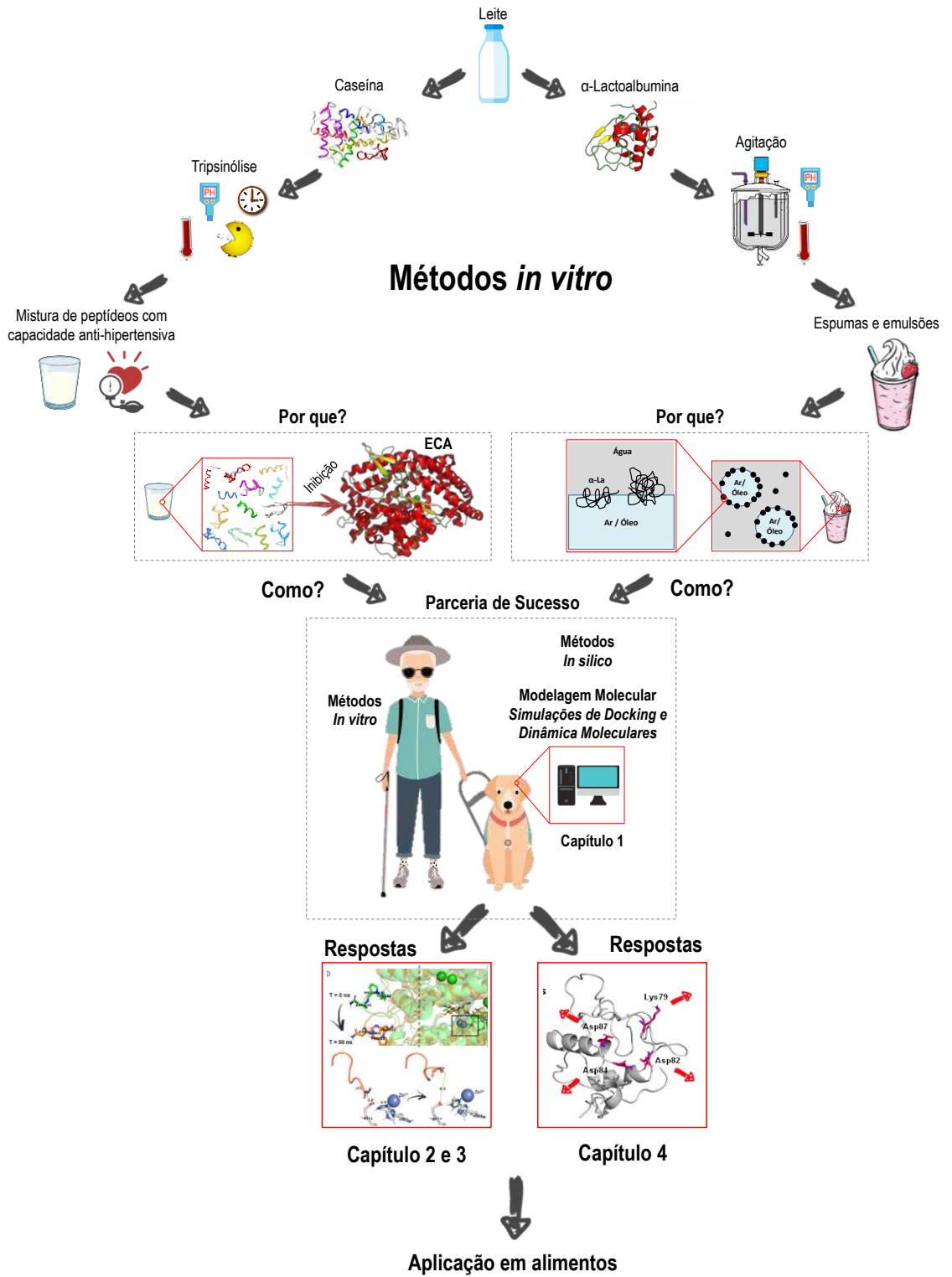


Figura 1 - Representação esquemática das motivações para o desenvolvimento desta tese.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Aplicar metodologias *in silico*, como simulações de *docking* e de dinâmica molecular, para compreender as bases moleculares de propriedades biofuncionais e tecnológicas de biomoléculas alimentares, como, por exemplo, a atividade anti-hipertensiva de peptídeos obtidos da hidrólise da caseína do leite bovino e a capacidade espumante da  $\alpha$ -lactoalbumina do soro de leite bovino.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Obter por meio de um processo de tripsinólise controlado da caseína do leite bovino, peptídeos com capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina, assim como fracioná-los e identificá-los.
- Modelar *in silico* possíveis interações intermoleculares formadas entre a enzima conversora de angiotensina (ECA) e os diferentes peptídeos utilizando-se *docking* (ancoragem) molecular.
- Elucidar os mecanismos de inibição da ECA por esses peptídeos por meio de simulações de dinâmica molecular, avaliando-se o comportamento das interações peptídeos-enzima ao longo do tempo, a orientação dos peptídeos complexados ao sítio ativo da enzima e possíveis alterações conformacionais geradas durante a formação dos complexos.
- Avaliar experimentalmente a capacidade espumante da  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) em diferentes temperaturas às quais o leite e/ou soro são normalmente expostos durante seu processamento e armazenamento (4 °C, 25 °C e 75 °C), com e sem o cátion  $\text{Ca}^{2+}$  complexados à sua estrutura, assim como a estabilidade da espuma e a variação na tensão interfacial promovida pela proteína.
- Avaliar *in silico*, por meio de simulações de dinâmica molecular, a estabilidade conformacional da  $\alpha$ -La nas condições de temperatura avaliadas *in vitro*.
- Correlacionar os resultados obtidos por meio das análises *in silico* com dados experimentais obtidos *in vitro*, a fim de esclarecer racionalmente, em escala molecular, a relação entre a estrutura conformacional da  $\alpha$ -La e suas propriedades técnico-funcionais, principalmente, espumante.

---

# **CAPÍTULO 1.**

## **REFERENCIAL TEÓRICO E UM ESTADO DA ARTE**

---

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Abordagens *in silico* para análise de estruturas proteicas

É sabido que as propriedades técnico-funcionais das proteínas são uma expressão macroscópica dos eventos que ocorrem em nível molecular, envolvendo as moléculas proteicas e as demais espécies químicas presentes no meio, em particular as moléculas de água e os contra íons (LI-CHAN; LACROIX, 2018). Desta forma, importantes correlações entre estrutura e funcionalidade tecnológica podem ser estabelecidas com base (i) na organização espacial dos resíduos de aminoácido, (ii) nas interações que eles estabelecem entre si no interior da molécula de proteína e (iii) em sua acessibilidade à superfície para interagir com outras moléculas e íons presentes no meio. Além disso, como as moléculas não são entidades estáticas, a compreensão da dinâmica das proteínas é imprescindível para a obtenção de informações sobre como a flexibilidade de suas cadeias, em diferentes temperaturas, pHs ou solventes, afetam a estabilidade das interações intramoleculares e intermoleculares que elas podem formar. Com estas informações em mãos é possível propor modificações estruturais que permitam alterar de forma controlada suas propriedades técnico-funcionais.

Informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas podem ser obtidas por meio de algumas técnicas experimentais, como difração de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) e dicroísmo circular (DC). Todavia, apesar de bastante criteriosas, estas técnicas possuem limitações intrínsecas, notadamente no que se refere à caracterização da dinâmica destas biomoléculas (JEGASOTHY; BENNETT; STOCKMANN, 2015). Neste contexto, novas abordagens complementares para um estudo mais afinado dos detalhes estruturais das proteínas se fazem necessárias.

Associada a técnicas experimentais, a modelagem molecular computacional tem sido aplicada cada vez mais para explorar de maneira mais detalhada as bases moleculares das propriedades físicas macroscópicas das proteínas (PIECZYWEK *et al.*, 2020; JENSEN *et al.*, 2019; PERAMO, 2018). Nestes estudos, criam-se modelos simplificados de um sistema físico real a fim de reproduzir as características estruturais e o comportamento dinâmico dessas biomoléculas, por meio de simulações embasadas em sólidos conceitos da físico-química teórica.

Em suma, as simulações de dinâmica molecular envolvendo proteínas compreendem as seguintes etapas: inicialmente, obtém-se a estrutura tridimensional da proteína já determinada por difração de raios-X, RMN ou por modelagem comparativa. Em seguida, escolhe-se um campo de forças para que seja criada a topologia do sistema, fornecendo as informações referentes aos parâmetros estruturais de equilíbrio de cada molécula como comprimento das ligações covalentes,

ângulos de valência, intensidade das interações entre átomos não ligados, etc., assim como as cargas elétricas, tamanho e massas de cada átomo. Posteriormente, define-se o tamanho e a forma do sistema (“cela de simulação”), assim como o solvente em que a molécula será simulada. Procede-se, então, com as etapas de minimização, equilibração da temperatura e pressão do sistema, e retirada gradual das restrições de movimento para que a proteína não perca sua memória cristalográfica. Por fim, são definidos os algoritmos de integração e os passos de integração (intervalos de tempo  $\Delta t$  em que o sistema fará os cálculos das novas posições  $x, y$  e  $z$  de cada átomo do sistema). Feito isso, é possível iniciar a simulação da dinâmica da proteína, e o resultado obtido será um conjunto de configurações do sistema que, quando analisadas sequencialmente, mostrarão as flutuações da molécula (e do sistema como um todo) durante o tempo da simulação. A análise destas flutuações nos permite fazer inferências qualitativas e quantitativas sobre as interações intramoleculares e intermoleculares, a flexibilidade e a estabilidade temporal da estrutura da proteína. Estas informações representam a base para a compreensão – e conseqüentemente para a manipulação e o controle – das propriedades tecnológicas destas macromoléculas.

Apesar das estruturas tridimensionais de diversas proteínas alimentares como, por exemplo, a ECA (NATESH *et al.*, 2003) e a  $\alpha$ -La (PIKE; BREW; ACHARYA, 1996), terem sido determinadas em alta resolução e estarem disponíveis no Protein Data Bank há quase 15 e 22 anos, respectivamente, a análise da literatura científica nesta área revela que são poucos os estudos em que simulações de dinâmica molecular foram aplicadas especificamente a essas proteínas, sendo mais raros ainda, estudos envolvendo as propriedades técnico-funcionais da  $\alpha$ -La em alimentos. Sabe-se, no entanto, que a utilização de técnicas de *docking* e dinâmica molecular têm sua aplicação majoritária nos setores de desenvolvimento de fármacos, e têm levado à elucidação de aspectos moleculares que dirigem a seletividade das proteínas ao carrear compostos, assim como as principais interações responsáveis por estabilizar os complexos formados ao longo do tempo (ZAREI; ABIDIN; *et al.*, 2019; MIRZAEI; MIRDAMADI; EHSANI, 2018; QI *et al.*, 2018).

### 3.1.1. Mecânica Molecular

Do ponto de vista físico e matemático o comportamento dinâmico das moléculas e dos átomos que as compõem pode ser abordado por meio da mecânica quântica ou mecânica molecular. A mecânica quântica representa explicitamente os elétrons de um átomo durante o cálculo, sendo possível determinar propriedades que dependam de sua distribuição eletrônica ou, até mesmo, investigar reações químicas em que ligações covalentes são quebradas e formadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009;

LEACH, 2001). Desta forma, muitos dos problemas que gostaríamos de abordar na modelagem computacional são grandes demais para serem considerados pela mecânica quântica, pois demandariam grande poder computacional e consumiriam muito tempo, mesmo para moléculas pequenas.

Por outro lado, a descrição molecular conformacional oferecida pela mecânica molecular, baseia-se na 2ª Lei de Newton (ALLINGER, 2011) e, por este motivo, apresenta simplificações da mecânica quântica permitindo determinar a energia potencial de um sistema molecular em função, apenas, de suas posições nucleares, ignorando os movimentos eletrônicos. Neste caso, a influência dos elétrons é expressa por parâmetros empíricos baseados em dados experimentais ou em resultados de cálculos de química quântica de alto nível. Eles são válidos para o estado fundamental de uma determinada estrutura covalente, e a aproximação por mecânica molecular é, geralmente, suficientemente precisa para processos no estado fundamental nos quais a conectividade geral entre os átomos no sistema permanece inalterada (ABRAHAM *et al.*, 2005).

Para tal, a mecânica molecular assume alguns conceitos da mecânica clássica a fim de permitir a modelização do sistema molecular, sendo eles (ALLINGER; YUH; LII, 1989; KARPLUS; MCCAMMON, 2002; OOSTENBRINK *et al.*, 2004):

- núcleos e elétrons são agrupados em partículas únicas semelhantes a átomos;
- essas partículas semelhantes aos átomos são esféricas, dotadas de um raio e de uma carga elétrica constante;
- cada ligação covalente é considerada como uma mola;
- os átomos não ligados covalentemente podem interagir entre si por meio de interações eletrostáticas e de van der Waals;
- as propriedades dos átomos dentro das moléculas são transferíveis a outras moléculas quimicamente correlacionadas.

A partir destas considerações, a mecânica molecular, por meio das equações de campo de forças, é utilizada para calcular sistemas com elevado números de átomos, sendo que, em alguns casos, os campos de forças fornecem respostas tão precisas quanto os cálculos da mecânica quântica de mais alto nível, em uma fração do tempo muito menor.

### 3.1.2. Campos de Forças

Um campo de forças consiste em uma expressão matemática capaz expressar a energia potencial total do sistema em função da posição de todos os átomos que o compõe e das interações que ocorrem entre eles (ALLINGER, 2011; DE VIVO *et al.*, 2016). Assim, por meio do campo de forças, durante as simulações de dinâmica

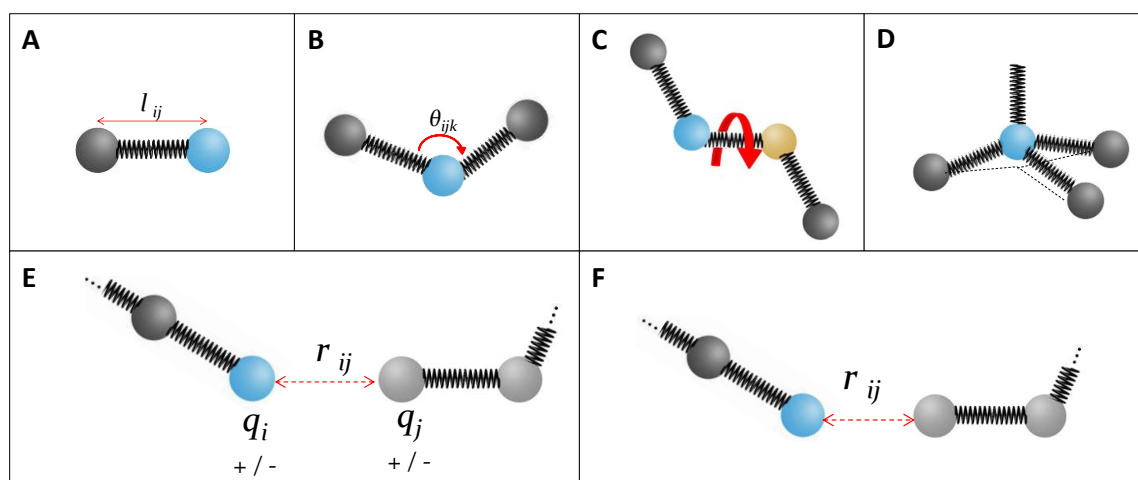
molecular as integrações das leis de Newton geram configurações sucessivas do sistema em evolução, fornecendo trajetórias que especificam posições e velocidades das partículas ao longo do tempo.

Na expressão matemática de um campo de força clássico, a energia potencial total do sistema  $V$  é expressa como a soma das componentes das forças de interação entre os termos ligados e, também, entre os termos não ligados (Equação 1).

$$V_{total} = V_{ligados} + V_{n\grave{a}o\ ligados} \quad \text{Equação 1}$$

Na Figura 1 é apresentado de forma esquemática esses termos. Os termos ligados correspondem às ligações covalentes entre os átomos, ângulos de valência, ângulos de torção e diedros impróprios, enquanto os termos não ligados correspondem às interações eletrostáticas e interações de Van der Waals (Equação 2).

$$V_{total} = V_{ligações\ covalentes} + V_{\text{ângulos de valência}} + V_{\text{ângulos de torção}} + V_{\text{diedros impróprios}} + V_{\text{eletrostáticas}} + V_{\text{van der Waals}} \quad \text{Equação 2}$$



**Figura 1 - Representação esquemática dos termos ligados e não ligados que compõem um campo de forças: estiramento de uma ligação covalente (A), desvio angular (B), ângulo diedral ou de torção (C), diedro impróprio (D), interação eletrostática (E) e interação de van der Waals (F). Elaborado pelo autor.**

A energia proveniente da ligação covalente entre os átomos é expressa pelo potencial de Morse. No entanto, é raro nos cálculos de mecânica molecular que as ligações covalentes desviem significativamente de seus valores de equilíbrio. Desta forma, uma expressão mais simples como a lei de Hooke (Equação 3) é comumente utilizada para exprimir a contribuição das ligações covalentes, em que a energia varia

com o quadrado do deslocamento em relação à posição inicial  $l_0$  (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; LIFSON; WAESHEL, 1968):

$$V_{\text{ligação covalente}} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N k_l (l - l_0)^2 \quad \text{Equação 3}$$

em que  $N$  representa o número total de pares de átomos ligados,  $k_l$  representa a constante de força de cada um dos pares,  $l$  representa a distância entre os átomos que constituem cada par e  $l_0$  representa o comprimento de equilíbrio da ligação entre os pares.

Os desvios entre os ângulos formados pelos átomos são descritos, também, pela lei de Hooke ou potencial harmônico, em que a contribuição de cada ângulo é caracterizada por uma força constante e um valor de referência (Equação 4). Testes empíricos já demonstraram que é necessária muito menos energia para distorcer um ângulo em relação sua posição de equilíbrio do que para esticar ou comprimir uma ligação covalente (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; LIFSON; WAESHEL, 1968):

$$V_{\text{ângulo}} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Equação 4}$$

em que  $N$  representa a quantidade total de trios de átomos,  $k_{\theta}$  representa a constante de força do ângulo,  $\theta$  representa o ângulo entre o cada trio de átomos e  $\theta_0$  representa

Os termos de alongamento ou compressão da ligação covalente e flexão angular, geralmente, são considerados como “graus rígidos de liberdade”, uma vez que é necessária quantidade de energia substancial para causar deformações significativas em seus valores de referência. Desta forma, as maiores alterações na dinâmica de uma molécula são provenientes das contribuições torcionais e de interações eletrostáticas e de van der Waals entre átomos não ligados (LEACH, 2001). O potencial de torção ou diedral é expresso pela Equação 5, em que  $\omega$  representa o ângulo de torção:

$$V_{\text{diedral}} = \sum_{n=1}^N \left[ \frac{V_n}{2} + \cos(m\omega - \gamma) \right] \quad \text{Equação 5}$$

em que  $N$  representa o número de diedros próprios,  $V_n$  representa a constante diedral,  $m$  representa a multiplicidade de mínimos,  $\omega$  representa a variação angular do diedro e  $\gamma$  representa o ângulo de diferença de fase.

Algumas moléculas como o ciclobutano possuem arranjo geométrico diferenciado, em que há a possibilidade de que o átomo de oxigênio ligado ao anel altere sua angulação em relação ao plano do anel de carbonos. Desta forma, é necessário incorporar um termo adicional ao campo de forças correspondente aos diedros impróprios, como descrito na Equação 6 (LEACH, 2001).

$$V_{\text{diedros impróprios}} = \sum_{n=1}^N \frac{k_n}{2} (\omega_n - \omega_{on})^2 \quad \text{Equação 6}$$

em que  $N$  representa o número total de diedros impróprios,  $k_n$  é representa a constante de força angular do diedro impróprio,  $\omega_n$  representa o ângulo do diedro impróprio e  $\omega_{on}$  representa o ângulo de equilíbrio.

Os termos não-ligados são separados em dois grupos: interações eletrostáticas e interações de van der Waals. As interações eletrostáticas são provenientes da diferença de eletronegatividade entre átomos, resultando em uma distribuição desigual de cargas no interior da molécula. Essas cargas conferem propriedades eletrostáticas à molécula sendo a interação eletrostática entre duas moléculas (ou entre diferentes partes de uma mesma molécula) calculada como a soma das interações entre cada par de átomos carregados, de acordo com a lei de Coulomb (Equação 7) (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; LIFSON; WAESHEL, 1968):

$$V_{\text{eletrostática}} = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{Equação 7}$$

em que  $N_A$  e  $N_B$  são o número de pontos com carga entre as duas moléculas,  $r_{ij}$  a distância entre elas,  $q_i$  e  $q_j$  representam as cargas para os átomos  $i$  e  $j$ , e  $\epsilon_0$  representa a constante dielétrica do meio.

As interações de van der Waals, por sua vez, são representadas pela equação de potencial de Lennard-Jones 12-6 (Equação 8), em que a distância entre os dois átomos  $i$  e  $j$  é representada por  $r_{ij}$ , e os termos  $\epsilon$  e  $\sigma$  representam, respectivamente, a amplitude do mínimo energético e a distância interatômica (finita) para o qual potencial interpartícula é zero (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; LIFSON; WAESHEL, 1968):

$$V_{van\ der\ Waals} = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{Equação 8}$$

De forma geral, portanto, a função da energia potencial simplificada para um campo de forças pode ser descrita pela Equação 9.

$$\begin{aligned} V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} \frac{k_l}{2} (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{diedral}} \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \\ & + \sum_{\text{diedros impróprios}} \frac{k_n}{2} (\omega_n - \omega_{on})^2 + \sum_{\text{eletrostática}} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \\ & + \sum_{\text{van der Waals}} 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \end{aligned} \quad \text{Equação 9}$$

Os softwares computacionais utilizados em estudos de dinâmica molecular possuem diferentes campos de forças implementados, cada um com suas vantagens e limitações e, portanto, ao se iniciar um estudo por dinâmica molecular, deve-se ter em mente qual o tipo de molécula com o qual pretende-se trabalhar e qual o melhor campo de força para descrevê-la. Outros aspectos também devem ser levados em consideração nesta escolha, como o nível de simplificação dos átomos, característica que reflete diretamente na necessidade computacional da simulação. Alguns campos de forças descrevem todos os átomos do sistema (*all atom*), demandando elevada capacidade computacional para o cálculo; já outros simplificam o cálculo, agrupando os átomos de hidrogênio aos átomos de carbono, dando origem a um pseudo átomo, sendo estes campos de forças classificados como sendo de “átomo unido” (*united atom*); por fim, temos um terceiro nível de simplificação, denominado “*coarse grained*” (CG), em que vários átomos são agregados em uma única partícula (em alguns casos aminoácidos inteiros são agrupados), resultando em uma grande redução no custo computacional em relação ao modelo *all atom* (FRIEDMAN; BOYE; FLATMARK, 2013).

Estas simplificações, infelizmente, trazem consigo algumas limitações como perda na capacidade de descrever o elementos da estrutura secundária, mantendo-se apenas a forma global da molécula em estudo. Por outro lado, são análises computacionais rápidas, podendo ser utilizados quando o objetivo é apenas descrever movimentos entre diferentes domínios de uma data proteína.

Embora os principais campos de forças empregados atualmente (AMBER, CHARMM GROMOS e OPLS) sejam compostos por equações bastante semelhantes, eles diferem consideravelmente em sua filosofia de parametrização e nos valores dos parâmetros. Como se sabe, os valores dos parâmetros podem ser obtidos de várias maneiras, por meio do ajuste de uma variedade de propriedades moleculares de pequenas moléculas (geométricas, energéticas, dinâmicas, dielétricas, etc.) contra diferentes conjuntos de dados quântico-mecânicos e experimentais sobre essas mesmas moléculas. Portanto, diferentes conjuntos de parâmetros podem produzir resultados significativamente diferentes quando aplicados a sistemas biomoleculares complexos (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

Além das diferenças nos valores dos parâmetros, outras diferenças na construção da função de potencial entre esses campos de forças podem ser observadas na Tabela 1. Dentre elas, observa-se que campo de forças CHARMM emprega uma equação adicional na descrição dos ângulos de ligação, chamada Urey-Bradley, que busca preservar a distância entre o primeiro e o terceiro átomos de um ângulo (ZHU; LOPES; MACKERELL, 2012). Outra diferença se refere aos termos que descrevem os diedros impróprios, pois, enquanto o campo de forças AMBER descreve os diedros impróprios da mesma forma que os demais diedros, os campos de forças CHARMM e GROMOS aplicam uma equação diferente, que se assemelha àquela empregada para distâncias e ângulos. Além disso, enquanto os campos de forças AMBER, CHARMM e OPLS são do tipo *all atom*, os campos de forças GROMOS são do tipo *united atom*.

**Tabela 1 - Equações de potencial de energia para os campos de forças CHARMM, GROMOS e AMBER.**

Campo de Forças	Equação do potencial de energia	Referência
AMBER	$  \begin{aligned}  V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\  & + \sum_{\text{diedral}} k_\phi [1 + \cos(n\phi + \delta)] \\  & + \sum_{\text{não ligados}} (A_{ij} r_{ij}^{-12} - B_{ij} r_{ij}^{-6} \\  & + C q_i q_j r_{ij}^{-1})  \end{aligned}  $	(WANG, JUNMEI <i>et al.</i> , 2004)

CHARMM	$ \begin{aligned} V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{UB} k_{UB} (S - S_0)^2 \\ & + \sum_{\text{diédral}} k_\omega [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \\ & + \sum_{\text{impróprios}} k_{imp} (\phi - \phi_0)^2 \\ & + \sum_{\text{não ligados}} \left( \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_l r_{ij}} \right) \end{aligned} $	(BROOKS <i>et al.</i> , 1983)
GROMOS	$ \begin{aligned} V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{4} k_b (l - l_0)^2 \\ & + \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} k_\theta (\cos \theta - \cos \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{diédral}} k_\phi [1 + \cos(\delta) \cos(m\phi)] \\ & + \sum_{\text{impróprios}} \frac{1}{2} k_\xi (\xi - \xi_0)^2 \\ & + \sum_{\text{não ligados}} \left( \left[ \frac{C12_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C6_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_l r_{ij}} \right) \end{aligned} $	(OOSTENBRINK <i>et al.</i> , 2004)

OPLS	$  \begin{aligned}  V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} K_r (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\  & + \sum_{\text{diédral}} \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\phi_i + f_{1i})] + \frac{V_2^i}{2} [1 \\  & + \cos(2\phi_i + f_{2i})] + \frac{V_3^i}{2} [1 \\  & + \cos(3\phi_i + f_{3i})] \\  & + \sum_{\text{não ligados}} f_{ij} \left( 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right. \\  & \left. + \frac{q_i q_j e^2}{r_{ij}} \right)  \end{aligned}  $	(JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996)
------	---	---

### 3.1.2.1. Campo de Forças GROMOS53A6

A GROMOS é um acrônimo do pacote de programas de computador *GRO*ningen *MO*lecular *Si*mulation, que vem sendo aprimorado desde 1978 para a modelagem dinâmica de biomoléculas, por equipes de pesquisas holandesas (Universidade de Groningen), suíças (Instituto Federal de Tecnologia, em Zurique), austríacas (Universidade de Recursos Naturais e Ciências da Vida em Viena) e alemãs (Universidade de Stuttgart) (VAN GUNSTEREN, 2020).

A família de campos de forças GROMOS foi projetada para a simulação de uma ampla gama de biomoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Os dados para esta família de campos de forças não são obtidos por modelagem *ab initio*, mas a partir dos dados cristalográficos e das polarizabilidades atômicas. A primeira versão deste campo de força, GROMOS96, usou o conjunto de parâmetros 43A1, o que significa que essa abordagem utilizou 1 conjunto de parâmetros com 43 tipos de átomos na fase condensada. Seguindo a mesma abordagem, posteriormente foram publicadas novas versões, projetadas com os parâmetros 53A5 e 53A6. Essas versões mais recentes já estão consolidadas e validadas pela comunidade científica, e possuem elevada confiança para reproduzir interações e a dinâmica de proteínas, complexos proteína-ligante, e também proteínas em membrana (VLACHAKIS *et al.*, 2014).

Em contraste com a parametrização de outros campos de forças biomoleculares, a parametrização do campo de força GROMOS53A6 é baseada principalmente na reprodução das entalpias livres de hidratação e solvatação apolar para uma variedade de compostos. Essa otimização é um marco importante na

evolução dos campos de forças, pois a entalpia livre de solvatação relativa entre ambientes polares e apolares é uma propriedade essencial em muitos processos biomoleculares, como o enovelamento de proteínas, a formação de complexos biomoleculares, e a formação e transporte através de membranas (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

Em uma simulação de dinâmica molecular clássica, todos os graus de liberdade tratados explicitamente são propagados no tempo, de acordo com as leis físicas apropriadas. Para isso, é necessária uma descrição Hamiltoniana do sistema, em que se todas as contribuições energéticas nas quais esses graus de liberdade participam são compreendidas. No campo de força GROMOS53A6, todo sistema molecular é tratado em nível atômico, todo átomo tem três graus de liberdade e o *momentum* conjugado associado. Além disso, os átomos de carbono alifáticos são tratados como *united atoms*, ou seja, o carbono e os hidrogênios que estão ligados a ele são tratados como um único átomo, reduzindo assim os graus de liberdade que são simulados explicitamente (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). Com essa simplificação reduz-se o esforço computacional significativamente (em até nove vezes), à custa de se negligenciar os leves efeitos direcionais e de volume da presença desses hidrogênios (OOSTENBRINK *et al.*, 2005). Alguns pesquisadores de renome na área de simulação de dinâmica molecular, como Justin Lemkul, um dos membros da equipe de desenvolvimento do *software* GROMACS, acredita que essa é uma grande vantagem do GROMOS53A6 em relação aos campos de forças CHARMM, AMBER e OPLS, sendo extremamente recomendado para simulações temporalmente longas e para grandes conjuntos de simulações, que são rotineiramente empregadas para análises *in silico* de novos fármacos (LEMKUL, JUSTIN A; ALLEN; BEVAN, 2010).

### 3.1.3. Simulação de Dinâmica Molecular

De acordo com a IUPAC, a “dinâmica molecular” é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases de acordo com as leis de movimento de Newton, ou seja, a dinâmica molecular (DM) descreve a variação do comportamento molecular como função do tempo (VERLI, 2014). Em outras palavras, simulações de dinâmica molecular podem ser utilizadas para estudar o comportamento atomístico de qualquer sistema molecular, baseado na relação entre uma determinada configuração de átomos e sua energia para propagar a dinâmica (LEMKUL, JUSTIN, 2018).

A base teórica da dinâmica molecular é a equação de movimento de Newton (Equação 10) em que  $V$  é a função de energia potencial (nesse caso, de um campo de força),  $m$  é a massa do átomo, e  $r_i$  representa a posição espacial  $(x_i, y_i, z_i)$  de cada

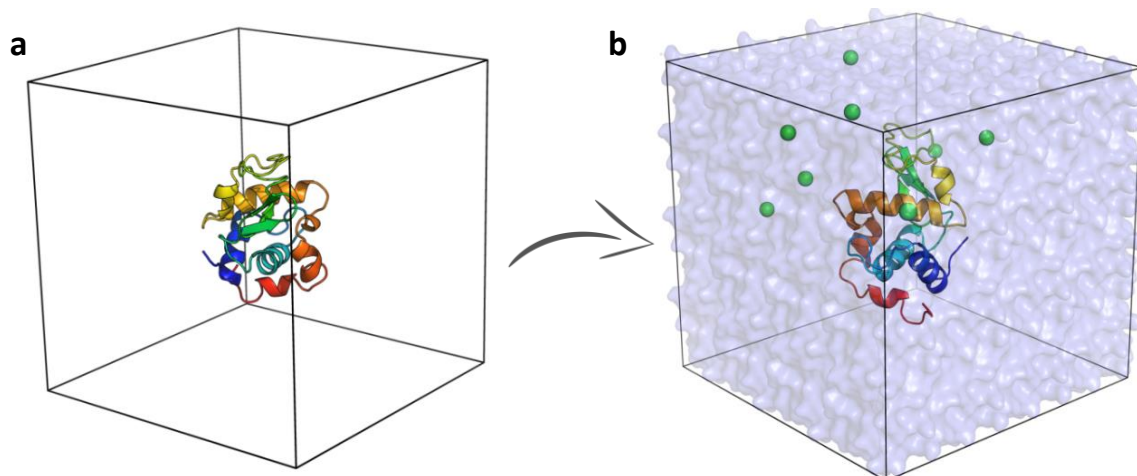
átomo  $i$  do sistema. Esta equação deixa claro que as alterações na energia potencial de um sistema estão correlacionadas às alterações nas posições dos átomos ao longo do tempo (LEACH, 2001).

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2(\vec{r})}{dt^2} \quad \text{Equação 10}$$

A escolha do campo de força é apenas uma das etapas de preparo de uma simulação de dinâmica molecular, devendo esta considerar alguns aspectos metodológicos importantes como a escolha da cela de simulação, a solvatação da molécula, a adição de íons ao sistema, as condições periódicas de contorno, a equilibrção da temperatura e pressão, o tamanho do passo de integração, a distância de corte para as interações não ligadas (*cut-off*) e, por fim, o tempo total de simulação. A escolha inadequada destas propriedades pode resultar em um aumento desnecessário do custo computacional ou, até mesmo, a obtenção de resultados muito distantes da realidade dos sistemas que se buscou simular.

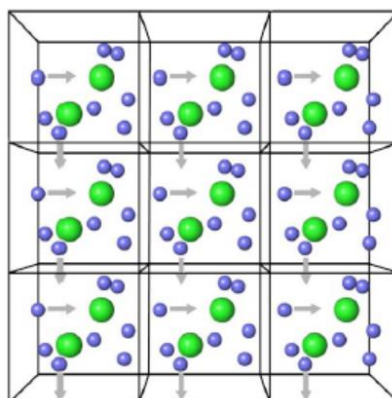
Como se sabe, a simulação de proteínas no vácuo (Figura 2a) não é de interesse biológico e, dessa forma, o próximo passo na construção do sistema consiste na definição de um volume ao redor da proteína que será preenchida com água ou outro solvente. Para se reduzir o custo computacional, busca-se sempre adicionar ao sistema o menor número de moléculas possível, desde que este sistema seja capaz de descrever as condições experimentais ou fisiológicas de referência. Normalmente, a proteína não costuma ser a parte mais cara no cálculo computacional, mas sim o solvente. Portanto, a otimização do número de moléculas de água (ou de outro solvente) pode representar uma grande redução no tempo de máquina para a conclusão da simulação, permitindo aumentar o tamanho da amostragem do estudo (VERLI, 2014). Uma das formas de controlar a quantidade de átomos no sistema, é dimensionando a “caixa” onde a simulação ocorrerá de forma otimizada, ou seja, que tenha um tamanho suficiente para a mobilidade e flexibilidade da proteína, sem que seja necessário número excessivo de moléculas de solvente para preenchê-la.

Sistemas biológicos e *in vitro*, geralmente, contêm certa quantidade de sal e, além disso, as simulações de dinâmica molecular são tipicamente realizadas em condições eletroneutras, ou seja, o sistema não deve possuir carga líquida (LEMKUL, JUSTIN, 2018). Por esse motivo, o último passo na construção do sistema de coordenadas (topologia) consiste na adição de íons monoatômicos ao sistema (Figura 2b).



**Figura 2 – Demonstração de uma cela de simulação cúbica: a) com a proteína sob vácuo, e b) com a proteína solvatada e com íons (representados esquematicamente por esferas verdes) adicionados ao sistema. Molécula: lisozima do ovo. Fonte: Lemkul (2018).**

Uma situação possível, independente do tamanho da “caixa”, é que uma das moléculas ultrapasse o limite previamente estabelecido e, assim, saísse do sistema, alterando o número de moléculas inicial e interrompendo a continuidade da simulação. Uma forma de contornar este problema é a aplicação das condições periódicas de contorno, em que a “caixa” de simulação é replicada identicamente e periodicamente em todas as suas dimensões (Figura 3), de forma que o movimento molecular em uma será idêntico ao movimento da mesma molécula na outra, e, caso uma molécula escape da caixa central, uma de suas imagens entrará pela face oposta, mantendo-se constante o número de moléculas do sistema (DE VIVO *et al.*, 2016).



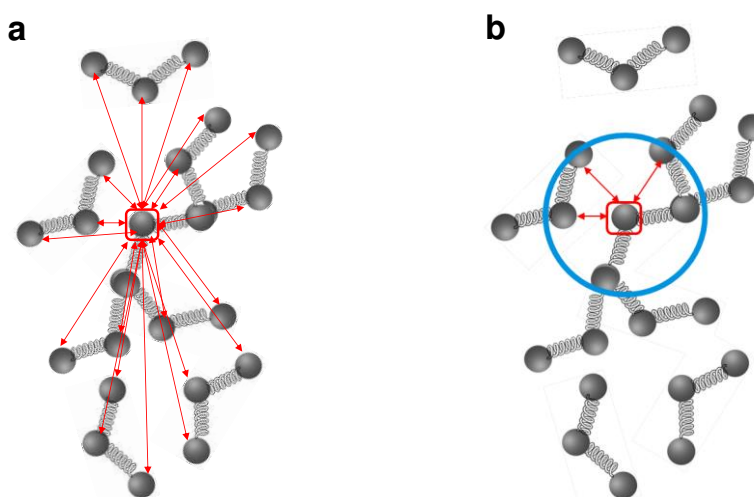
**Figura 3 - Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação de DM. Fonte: Verli, (2014).**

Outra etapa importante se trata da equilibração de uma simulação, que se refere à estabilização de suas propriedades de temperatura e pressão, ou seja, que estas alcancem um estado de equilíbrio. Para isso, é necessário que o tempo de simulação seja suficientemente longo, para que as propriedades em estudo estejam adequadamente equilibradas. A busca por tempos de simulação “suficiente longos”

para a equilibração das propriedades de interesse pode ser desafiadora, pois nem todas as propriedades moleculares equilibram a mesma velocidade (VERLI, 2014).

O passo de integração consiste no intervalo de tempo entre as integrações de cálculo, uma vez que a simulação de dinâmica molecular não é contínua. A sucessão destes passos, normalmente na escala de fentossegundos (*fs*), dá origem ao nosso entendimento da trajetória da molécula de forma que, quanto maior o passo de integração, menor custo computacional. A desvantagem de passos de integração longos é a possibilidade de que sejam perdidas informações importantes para o pesquisador. Os tempos de integração comumente utilizados em campos de forças atomísticos são de 1 fs, 2 fs e 5 fs. Utiliza-se 1 fs quando se pretende tratar as moléculas e suas ligações como flexíveis durante a simulação; 2 fs quando pretende-se tratar as ligações químicas como rígidas; e 5 fs quando pretende-se tratar toda a molécula como rígida, ou seja, sem modificação em ângulos e diedros, sendo uma alternativa pouco utilizada em sistemas biológicos (VERLI, 2014).

Por fim, uma das partes mais custosas computacionalmente em simulações por dinâmica molecular envolve o cálculo das interações não ligadas (Figura 4a), uma vez que elas aumentam em função do quadrado do número de átomos do sistema. Ao mesmo tempo, a intensidade destas interações decresce em função do quadrado da distância entre os átomos. Desta forma, para se economizar esforço computacional, são procedidos nestas interações, ou seja, define-se uma distância chamada *cut-off* em que, a partir dela, nenhuma interação não ligada será calculada (Figura 4b) (DEVIVO *et al.*, 2016).



**Figura 4 – Representação esquemática do número de interações não-ligadas (setas vermelhas) estabelecidas por um átomo em um sistema complexo: a) sem a implementação de uma distância de corte (*cut-off*), e b) com a implementação de uma distância de corte representada pelo círculo azul. Fonte: elaborada pelo autor.**

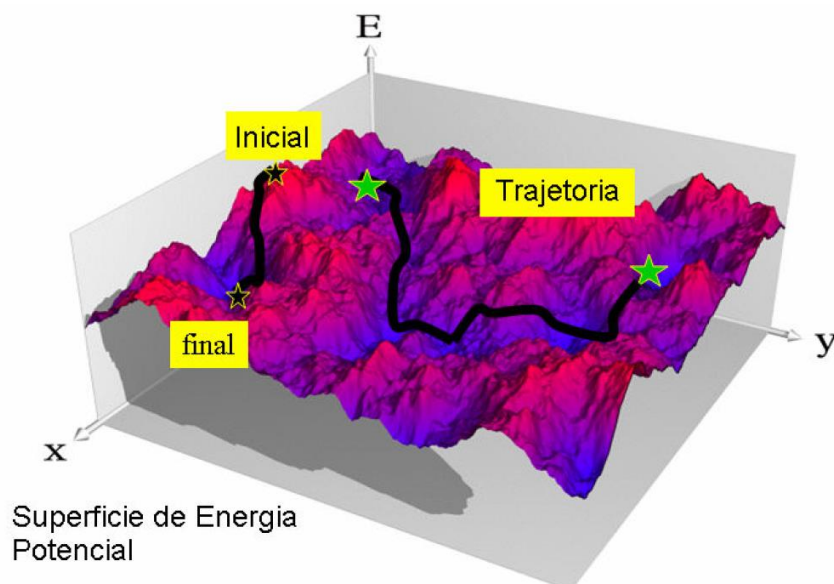
### 3.1.4. Minimização de energia / otimização geométrica da estrutura

As estruturas utilizadas durante uma simulação de dinâmica molecular podem ser obtidas por modelos teóricos, por experimentos de cristalografia de raios-X, RMN ou de modelagem comparativa. Independentemente de sua origem, ao serem solvatadas, essas estruturas criam interações soluto-solvente até então inexistentes e o solvente precisa se adaptar ao redor de seu soluto, sendo necessária uma correção antes que a simulação ocorra, de fato (VERLI, 2014). Esta correção visa encontrar o conjunto de coordenadas otimizadas para cada átomo em que o sistema apresente menor nível energético e é chamada de etapa de “minimização energética” ou “otimização geométrica” (LEACH, 2001; DE OLIVEIRA, 2009). Se a minimização energética não for executada previamente à simulação de dinâmica, a liberação instantânea da estrutura cristalográfica no ambiente de simulação poderá promover uma série de alterações conformacionais na proteína ao ponto de desnaturá-la ou, em outras palavras, perder sua “memória” cristalográfica irreversivelmente.

De maneira mais clara, podemos entender o problema da minimização da seguinte forma: dada uma função  $f$  que depende de uma ou mais variáveis independentes  $x_1, x_2, \dots, x_i$ , encontre seus valores de forma que  $f$  apresente seu valor mínimo. Do ponto de vista matemático, este problema pode ser resolvido calculando-se e a primeira derivada da função  $f$  em relação a cada uma das variáveis e igualando-a a zero e, posteriormente, calculando-se as segundas derivadas positivas de cada uma dessas funções (Equação 11) (LEACH, 2001).

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0; \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad \text{Equação 11}$$

Como um sistema real é composto por um elevado número de átomos (variáveis) que ocupam diferentes posições no espaço (coordenadas), para a solução da Equação 11 utilizamos os chamados “algoritmos de minimização”, algoritmos numéricos que executam o cálculo de forma interativa iniciando pela conformação de maior energia em direção àquela de menor energia mais próxima, sem identificar se esse mínimo é local ou global, como pode ser observado, esquematicamente, na Figura 5.



**Figura 5 – Representação esquemática da superfície de energia potencial de uma proteína em função das conformações possíveis. Fonte: adaptado de Guizado (2008).**

Dois algoritmos de primeira ordem são comumente utilizados para se obter uma conformação otimizada da proteína, são eles: *steepest descent* e *conjugate gradient*. Ambos alteram de forma gradual as coordenadas de cada átomo de forma que o sistema se aproxime cada vez mais de um estado de menor energia. O ponto de partida de cada interação ( $k$ ) é a configuração molecular obtida no passo imediatamente anterior, que pode ser representado por um vetor multidimensional  $x_{k-1}$ , sendo a primeira configuração informada pelo usuário.

O algoritmo *steepest descent* (descida íngreme, em português) altera as configurações do sistema em direção paralela à força resultante, que em nossa analogia gráfica corresponde a passar perto de um ponto estacionário (ponto de sela) de menor energia (LEACH, 2001). Decidido o ponto de partida e a direção a ser tomada, é, então, necessário decidir o quão longe se mover ao longo do gradiente, ou seja, quando o sistema deverá entender que estamos perto o suficiente da solução (SHEWCHUK, 1994).

Por outro lado, o método de minimização de energia *conjugate gradient* é um algoritmo de otimização iterativa com foco em encontrar o mínimo da função por meio de passos iterativos proporcionais ao gradiente negativo da função. Assim como no *steepest descent*, no método *conjugate gradient* o gradiente em cada ponto é ortogonal, porém a direção é conjugada (AVIAT; LAGARDÈRE; PIQUEMAL, 2017). Em outras palavras, enquanto as integrações do *steepest descent* produzem um conjunto de direções oscilatórias em torno de um mínimo local de energia de forma rápida, as integrações do *conjugate gradient* direcionam os cálculos de forma conjugada em direção a um mínimo local de energia da função (Figura 6).

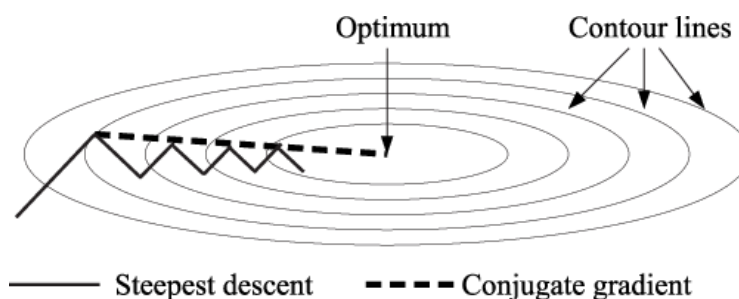


Figura 6 - Representação esquemática dos métodos de minimização de energia *Steepest descent* e *Conjugate gradient* em uma mesma função. Fonte: Chan & Ewins, 2010

Para melhorar a eficiência da otimização da estrutura, de modo a encontrar um “bom mínimo local de energia”, ou seja, que se aproxime do mínimo global da função e reduzir o custo computacional, em simulações de dinâmica molecular usualmente utiliza-se os dois métodos. O *steepest descent*, normalmente, é utilizado primeiro a fim de se encontrar um “poço” de energia e o *conjugate gradient* é utilizado, em seguida, para encontrar o mínimo de energia dentro deste poço.

### 3.1.5. Equilibração do sistema

Após atingirem seu estado de menor energia, inicia-se a etapa de equilibração do sistema, que tem como objetivo principal a estabilização de suas propriedades como temperatura e pressão, além da solvatação gradual e lenta da estrutura proteica, de modo que não seja perdida sua memória cristalográfica. Considera-se, portanto, que, antes de estarem equilibradas, as propriedades em estudo apresentam comportamentos não representativos das situações de interesse, sendo necessário que o tempo de simulação seja suficientemente longo para que as propriedades em estudo estejam adequadamente equilibradas (VERLI, 2014).

Como a maioria das estruturas proteicas 3D utilizadas são obtidas em ambientes com elevada concentração de proteínas, muito maior do que aquela observada em condições biológicas, ou, até mesmo, em estados oligoméricos, a remoção destes contatos e sua substituição por moléculas de água, pode acarretar uma grande instabilidade inicial na simulação, envolvendo: i) a perda dos contatos cristalográficos, e ii) a formação de interações com moléculas de água (VERLI, 2014).

A maioria dos protocolos de equilibração encontrados na literatura, como, por exemplo, aquele demonstrado por Polêto *et al.* (2019), seguem uma sequência de passos lentos e com imposição de restrições ao movimento dos átomos da proteína que são retiradas gradualmente, na seguinte ordem:

- i) adição de temperatura e pressão ao sistema, elevada restrição de movimento em todos os átomos da proteína, controlando ou não o volume da cela de simulação;

- ii) manutenção das restrições de movimento em toda a proteína com exceção dos hidrogênios;
- iii) manutenção das restrições de movimento na cadeia principal e nos carbonos- $\beta$  dos resíduos de aminoácidos;
- iv) manutenção das restrições de movimento apenas na cadeia principal da proteína;
- v) manutenção das restrições de movimento apenas nos carbonos- $\alpha$ ;
- vi) redução gradual da energia de restrição imposta;
- vii) proteína livre para simulação.

### 3.1.6. Produção

A etapa de produção consiste na dinâmica molecular em si, em que os átomos do sistema poderão se movimentar livremente nas condições propostas para o estudo. Para cada simulação de dinâmica molecular, deve ser estabelecido o chamado “Ensemble Estatístico”, que consiste no conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton, sendo três os mais importantes (SORIN; PANDE, 2005):

i) **Ensemble Microcanônico (NVE):** em que são mantidos constantes o número de átomos do sistema (N), o volume (V) e a energia (E). Dessa forma, o sistema em estudo é considerado adiabático, sem trocas sob a forma de calor. Além disso, esse tipo de trajetória pode ser enxergado como uma troca de potencial e de energia cinética entre os átomos, mas a energia total do sistema é conservada.

ii) **Ensemble Canônico (NVT):** em que são mantidos constantes a quantidade de átomos (N), o volume (V) e a temperatura do sistema (T). Em uma simulação em NVT, a energia envolvida nos processos endotérmicos e exotérmicos é trocada com um termostato. Algumas alternativas para o controle da temperatura incluem a utilização de termostatos como, por exemplo, o termostato de Nosé-Hoover, o termostato de Berendsen e o termostato de Andersen.

iii) **Ensemble Isotérmico-Isobárico (NPT):** em que são mantidos constantes o número de átomos do sistema (N), a pressão (P) e a temperatura (T). Dessa forma, além de um termostato para controle de temperatura, também é necessária a adição de um barostato, como, por exemplo, o barostato de Berendsen e Parrinello-Rahaman. Estas condições são as que mais correspondem às condições laboratoriais de um recipiente aberto à temperatura e pressão ambiente.

### 3.1.6.1. Algoritmo de Integração de Verlet e Verlet Leap-Frog

Como mencionado anteriormente, as simulações de dinâmica molecular são regidas pela Lei de Movimento de Newton para cada átomo (Equação 12), em que  $\vec{F}_i$  é dado pelo gradiente da função de potencial, ou campo de forças,  $V(\vec{r})$  em relação à coordenada do átomo  $\vec{r}_i$  (Equação 13).

$$m_i \frac{d^2(\vec{r}_i)}{dt^2} = \vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad \text{Equação 12}$$

$$\vec{F}_i = -\nabla_i V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad \text{Equação 13}$$

Independente do campo de forças a ser escolhido, existem diferentes algoritmos de integração numérica disponíveis para resolver a Equação 12, com diferentes precisões e custos computacionais. Um dos procedimentos de integração mais utilizados é o Algoritmo de Verlet (Equação 14), em que a equação diferencial é discretizada em um passo de tempo  $\Delta t$  e  $\vec{a}_i = (1/m_i) \vec{F}_i$  corresponde à aceleração “sofrida” pelo átomo  $i$  (VERLET, 1967).

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \vec{a}_i(t)\Delta t^2 + \mathcal{O}(\Delta t^4) \quad \text{Equação 14}$$

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{r}_i(t + \Delta t) - \vec{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + \mathcal{O}(\Delta t^2) \quad \text{Equação 15}$$

Interessante observar que, neste momento, as velocidades (Equação 15) não são necessárias para calcular a trajetória, mas são imprescindíveis para calcular a energia cinética do sistema. No entanto, no algoritmo de Verlet, as velocidades podem ser calculadas uma vez que  $\vec{r}_i(t + \Delta t)$  estiver sido calculado, por exemplo, em um instante de tempo anterior. Além disso, a atualização das posições de acordo com a Equação 14 dá origem à imprecisão numérica, pois um termo de pequena ordem  $\Delta t^2$  é adicionado a uma diferença de termos  $\mathcal{O}$  (SCHILLER, 2008).

Para minimizar a imprecisão numérica do algoritmo de Verlet, podemos utilizar o algoritmo “leapfrog” (pulo do sapo) associado ao algoritmo de Verlet, desde que tenhamos uma velocidade e posição para iniciar as interações. No algoritmo de *Verlet Leapfrog* as posições (Equação 16) e as velocidades (Equação 17) são atualizadas em intervalos iguais à metade do passo de tempo  $\Delta t$  (YOUNG, 2013).

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) - \Delta t \vec{v}_i \left( t + \frac{\Delta t}{2} \right) \quad \text{Equação 16}$$

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{v}_i \left( t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \vec{v}_i \left( t + \frac{\Delta t}{2} \right)}{2} \quad \text{Equação 17}$$

Um esboço da estrutura do método *leapfrog* é mostrado na Figura 7, onde pode ser observado que, uma vez iniciado a integração com  $r_0$  e  $v_0/2$ , podemos continuar com  $r$  e  $v$  ultrapassando um ao outro ao longo da integração.

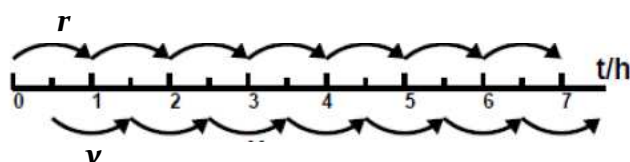


Figura 7 - Esboço da estrutura do algoritmo *leapfrog*. Fonte: Young, 2013

Além de combinar simplicidade com precisão em uma equação de segunda ordem, o algoritmo de *Verlet leapfrog* possui outros recursos desejáveis como:

- inversão de tempo invariante: as equações de movimento de Newton são invariantes durante a reversão do tempo;
- conservação do momento angular: em um campo de força esfericamente simétrico, o momento angular é conservado exatamente pelo algoritmo.

### 3.1.6.2. Estratégias de análise

Como resultados, a simulação de dinâmica molecular nos fornece dados suficientes para analisar o comportamento da estrutura proteica ao longo da simulação. As ferramentas mais comumente empregadas com esta finalidade são o desvio médio quadrático (RMSD), a flutuação média quadrática (RMSF), o raio de giro ( $R_g$ ), superfície acessível ao solvente (SASA), além de possibilitar uma gama de outras análises mais específicas, como, por exemplo, a medida de distâncias entre átomos ou grupos específicos ao longo do tempo.

#### i. Desvio Médio Quadrático (RMSD)

O RMSD (Equação 18), desvio médio quadrático, é uma das principais estratégias de análise empregada no estudo de proteínas por dinâmica molecular. Esta medida indica o quanto a estrutura da proteína ou do complexo se modifica ao longo de uma simulação em relação à estrutura de partida (normalmente a estrutura cristalográfica). Neste momento, não é considerada a difusão da molécula, mas apenas as alterações em sua conformação (LEACH, 2001).

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n ((\hat{r}_i - r_i)^2 + (\hat{r}_j - r_j)^2 + (\hat{r}_k - r_k)^2)}{n}} \quad \text{Equação 18}$$

Em que  $n$  é o número de átomos do sistema e  $r$  é a posição de cada átomo nas coordenadas  $i, j, k$ .

### **ii. Flutuação Média Quadrática (RMSF)**

O RMSF (Equação 19), flutuação média quadrática, representa o quanto cada átomo da molécula de interesse se move ao longo da análise em relação à estrutura de referência. Como é uma média, não é uma função temporal (LEACH, 2001). É possível proceder este tipo de análise da molécula inteira ou apenas de parte dela.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^n (r_i - r_i^{ref})^2} \quad \text{Equação 19}$$

Em que  $T$  é o tempo total da análise e  $r_i^{ref}$  é a posição de referência da partícula  $i$ .

### **iii. Raio de Giro (Rg)**

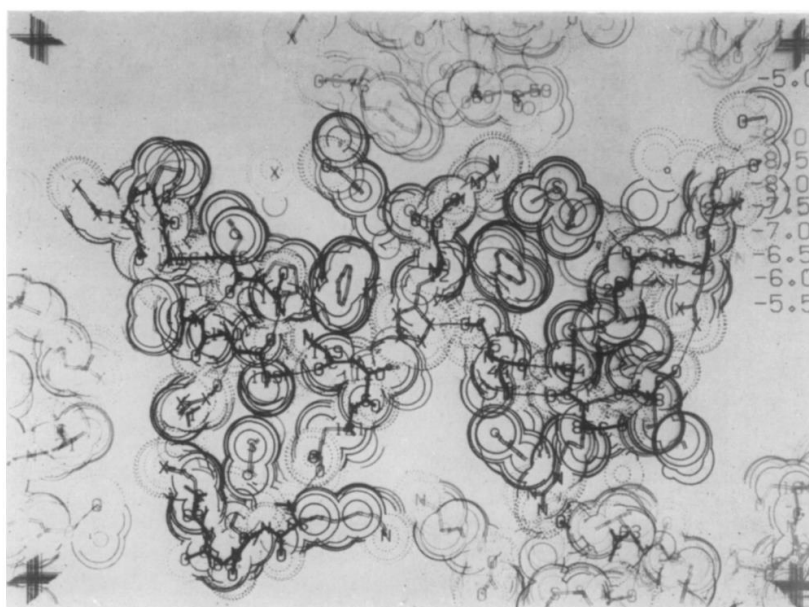
O raio de giro (Equação 20) mede a compactação de um determinado sistema globular, ou seja, avalia em coordenadas  $x, y$  e  $z$  a distância do centro geométrico da sua molécula até a ponto mais distante na mesma molécula (borda da proteína) (FIXMAN, 1962). Esta medida, normalmente, pode sofrer alterações consideráveis quando há alteração no pH. Durante uma simulação de dinâmica de uma proteína, é importante observar se o raio de giro aumentou ou diminuiu, pois, se o raio aumenta, é possível que a proteína esteja se desenovelando e, se está diminuiu, conclui-se que ela está se compactando a partir da formação de novas interações.

$$R_g = \left( \frac{\sum_{i=1}^n r_i^2 m_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 20}$$

Em que  $m_i$  representa a massa do átomo  $i$  e  $r_i$  representa a posição do átomo  $i$  em relação ao centro de massa da molécula

### **iv. Análise de Superfície Acessível ao Solvente (SASA)**

A superfície acessível ao solvente (SASA), como o próprio nome indica, é a área de superfície de uma biomolécula que é acessível ao solvente ao qual está inserida (Figura 8) (LEE; RICHARDS, 1971). Para se calcular a SASA, a molécula de solvente é modelada como uma esfera. Essa esfera é, então, “rolada” sobre a molécula para gerar um contorno suave da superfície externa, sendo esse contorno constituído por pedaços de esferas que se juntam formando arcos circulares. Por esse motivo, o algoritmo é conhecido como “*rolling ball*”. As esferas e os arcos são definidos por expressões analíticas em termos de coordenadas atômicas, raios de van der Waals e o raio de “exploração” do solvente (CONNOLLY, 1983). A área de cada fragmento de esfera da superfície pode ser calculada analiticamente e a superfície gerada graficamente é chamada “*Superfície de Connolly*”, levando o nome do pesquisador que programou o algoritmo computacional capaz de calcular e gerar as imagens automaticamente (Figura 9).



**Figura 8 – Primeiro proposta gráfica publicada para cálculo de superfície acessível ao solvente (molécula: enzima Ribonuclease Pancreática-S). Fonte: LEE; RICHARDS, 1971.**

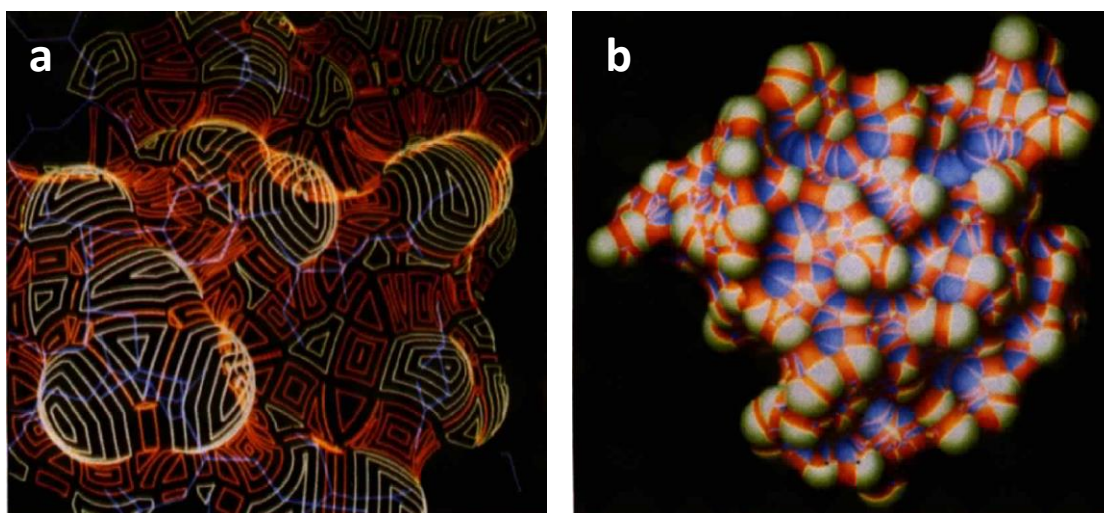


Figura 9 - Primeira Superfície de Connolly gerada computacionalmente publicada (molécula: insulina): a) representação gráfica vetorial; b) representação gráfica como superfície. Fonte: CONNOLLY (1983).

### 3.2. Simulação de *Docking* Molecular

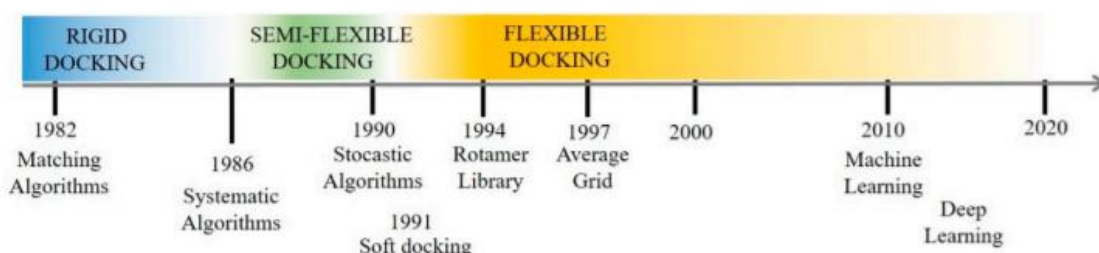
As simulações de *docking molecular* (ancoragem molecular, em português) têm como objetivo prever a estrutura (ou estruturas) de um complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas (KITCHEN *et al.*, 2004), sendo uma metodologia amplamente utilizada na compreensão de interações entre proteínas e inibidores, principalmente, para o desenvolvimento de fármacos (ŚLEDŹ; CAFLISCH, 2018).

Na maioria das pesquisas utilizando essa metodologia, o pesquisador possui uma macromolécula receptora (alvo do *docking*), normalmente uma proteína, em que a estrutura tridimensional já é conhecida e uma pequena molécula (ligante), sendo esse sistema, eventualmente, chamado de *docking proteína-ligante* (KUNTZ *et al.*, 1982). Em outros casos, conhece-se apenas a macromolécula receptora e busca-se um possível ligante em bancos de dados (RYDZEWSKI; NOWAK, 2017). Com a macromolécula receptora e o possível ligante definidos, uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos entra em cena no processo de reconhecimento proteína-ligante, estimando o quanto esta interação é favorável por meio do cálculo da “energia livre de ligação”.

Assim, de forma geral, podemos dividir uma simulação de *docking* em duas partes principais:

- i. Investigação e predição da conformação e orientação de uma molécula ligante no seu sítio de complexação, procedida por meio de algoritmos de busca;
- ii. Predição da afinidade em um complexo receptor-ligante em razão de sua energia livre de ligação, calculado por meio das funções de *score*.

Desde a primeira aplicação de *docking* (LEVINTHAL *et al.*, 1976), há 45 anos, enormes avanços foram feitos tanto em algoritmos de busca quanto em funções de *score*, aumentando as possibilidades de se aplicar tal ferramenta e confiabilidade dos resultados. O desenvolvimento dos algoritmos de busca e das funções de *score*, assim como das simulações de dinâmica molecular, também foi favorecido pela modernização dos computadores e pela possibilidade de paralelização de máquinas, implicando em melhorias de alto nível na velocidade dos cálculos. Para Tessaro & Scapozza (2020), a complexidade dos algoritmos pode ser classificada de acordo com o número de graus de liberdade que eles negligenciam (Figura 1).



**Figura 10 - Linha do tempo evolutiva com destaque para os principais eventos que contribuiram para o desenvolvimento dos algoritmos de busca, desde o *docking* rígido até o *docking* flexível. Fonte: Tessaro & Scapozza (2020).**

### 3.2.1. Algoritmos de busca

Os métodos de *docking* molecular envolvem grandes desafios teórico-computacionais, e se dividem em duas classes de métodos distintos: receptor-ligante e receptor-proteína (VERLI, 2014). A maioria dos algoritmos possui a capacidade de gerar um grande número de possíveis estruturas entre as moléculas que estão sendo avaliadas, identificando as mais energeticamente favoráveis (LEACH, 2001).

Atualmente, existem diversos programas de *docking* molecular disponíveis, distinguindo-se, principalmente, pelo método de busca e pela função de avaliação de afinidade empregada. Podem ainda, diferir quanto à possibilidade de serem utilizados através de portais ou localmente, de serem gratuitos ou pagos e na integração com bancos de ligantes e proteínas.

Com relação ao sítio de ligação em uma proteína alvo, é necessário primeiramente que se tenha a informação da localização do mesmo. Em um segundo momento, é muito importante estudar as características físico-químicas e estruturais deste sítio. Como a localização do sítio receptor de uma proteína nem sempre é conhecida, métodos computacionais podem ser utilizados para prever os possíveis sítios de ligação. Estes métodos podem se basear em análises geométricas e de volume para identificar cavidades (tais como FINDSITE, SURFNET e LIGSITE), em energias de interação (Q-SITEFINDER e GRID) e no uso de propriedades de sítios de

ligação conhecidos para efetuar uma busca por padrões (webPDBinder). Um segundo aspecto de grande relevância na preparação do sítio receptor é estabelecer o estado de protonação correto dos resíduos que participam da interação com o ligante (PROPKA) (RYDZEWSKI; NOWAK, 2017).

Em seguida, com a ajuda de algoritmos computacionais de *docking*, altera-se diversas vezes as conformações, posições e orientações (poses) do ligante (ou ligantes) a fim de se obter as configurações em que a interação proteína-ligante é mais favorável (OLIVEIRA, EDUARDO BASÍLIO DE, 2009). A geração de várias conformações para o ligante é importante no caso de metodologias de *docking* que não levam em conta a flexibilidade do mesmo e fazem o encaixe do ligante rígido para cada conformação representativa (VERLI, 2014). O LIGPREP e o eHiTS são exemplos de programas baseados em algoritmos que geram tautômeros, diferentes conformações de estruturas cíclicas, diferentes estados de protonação de acordo com o pH e diferentes estereoisômeros para um determinado ligante.

Os diferentes algoritmos de *docking* consideram a flexibilidade das moléculas interagentes de forma diferente. Três principais estratégias são utilizadas: i) a proteína é considerada rígida, e apenas os graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante são considerados; ii) a proteína é considerada rígida, mas todos os graus de liberdade do ligante (translacionais, rotacionais e conformacionais) são levados em conta; iii) a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível, e todos os graus de liberdade do ligante também são considerados (VERLI, 2014). A estratégia “i” é classificada como *docking* de corpo rígido, pois não levam em consideração a flexibilidade nem do ligante nem do receptor, limitando a especificidade e a precisão dos resultados, considerando complementaridades essencialmente geométricas entre duas moléculas. No entanto, mesmo sem levar em consideração a flexibilidade, essa estratégia é capaz de identificar de forma satisfatória sítios de ligação para ligantes em diferentes proteínas (DIAS; AZEVEDO JR., 2008). Já as estratégias número “ii” e “iii”, são classificadas como *docking* flexível, e têm sido utilizadas para refinamento e otimização dos resultados obtidos por procedimento inicial de *docking* de corpo rígido, pois tais estratégias exigem elevado custo computacional. Os métodos de *docking* flexível podem considerar várias conformações possíveis de ligante ou do receptor, bem como para ambas as moléculas ao mesmo tempo.

Os algoritmos de busca nos programas de *docking* ligante-receptor podem ser classificados basicamente em três categorias:

- métodos de busca sistemática, em que se objetiva explorar de forma combinatória todos os graus de liberdade – DOCK, FLEXX, Glide, EUDOC e Surflex (ALLEN *et al.*, 2015);

- métodos de busca determinística, em que se simula a dinâmica do complexo ligante-receptor – CDOCKER (VERLI, 2014);
- métodos de busca estocástica, que envolve movimento aleatórios associados aos graus de liberdade, possibilitando a obtenção de resultados como saída para um mesmo estado inicial de entrada – Glide, ICM, Prodock, AutoDock e LigandFit (MORRIS *et al.*, 2009).

### 3.2.2. Funções de Score

Como mencionado, os algoritmos de *docking* simulam uma grande quantidade de conformações do ligante e, também, diferentes formas de “atracamento” à proteína. Com estas informações em mãos, é necessário, então, selecionar os complexos gerados na etapa anterior quanto à afinidade ligante-proteína, identificando, assim, as poses em que os complexos apresentaram menor energia livre, ou seja, em que as interações são mais prováveis de acontecer. Para isso, utilizam-se as “funções de Score” que, segundo Li *et al.* (2020), continuam sendo a principal limitação para a aplicação dos procedimentos de *docking* com elevada confiabilidade.

Uma função de *score* deve ser capaz de distinguir o modo de ligação experimental dos outros encontrados pelo algoritmo de busca, ordenar corretamente uma lista de ligantes com relação às suas afinidades pela macromolécula receptora e prever as respectivas energias livres de ligação. Estas funções são modelos matemáticos, geralmente lineares, formados por diferentes termos relacionados às propriedades físico-químicas envolvidas na interação de uma pequena molécula ligante com seu sítio de ligação a um receptor (VERLI, 2014).

Atualmente, as funções de *score* são divididas em dois grandes grupos, as clássicas e aquelas que envolvem aprendizado de máquina (ou inteligência artificial) (LI *et al.*, 2020). Dentre as funções de *score* clássicas, pode-se estratificá-las em três tipos (FERREIRA *et al.*, 2015): i) baseadas em campo de força: que se constituem em uma soma de termos advindos de algum campo de força molecular clássico, cuja parametrização pode ser feita utilizando dados experimentais ou provenientes de cálculos quânticos (podendo também ser a combinação de ambos); ii) empíricas: que são desenvolvidas utilizando complexos receptor-ligante com estruturas tridimensionais e afinidades conhecidas, sendo seus termos automaticamente ajustados de forma a reproduzir os dados experimentais de afinidade de ligação com a maior acurácia possível; e iii) baseadas em conhecimento: que são construídas a partir de análises estatísticas entre os pares de átomos dos complexos receptor-ligante resolvidos experimentalmente.

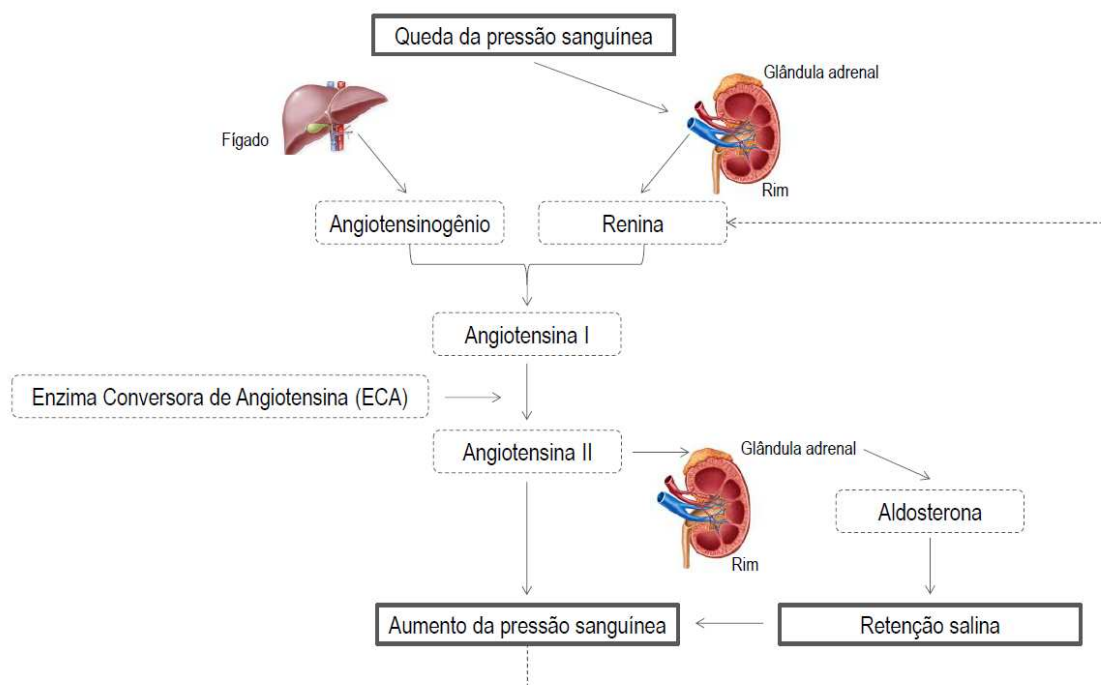
Em contraste às funções de *score* clássicas, as abordagens baseadas em aprendizado de máquina (ou inteligência artificial) contornam a limitação de se impor

uma forma fixa para a função de *score*, sendo capazes de, por meio de redes neurais, capturar implicitamente as interações de ligação intermoleculares que são difíceis de modelar explicitamente, e aprimorar os modelos para cálculo da “afinidade” entre a proteína e o ligante. No entanto, o aperfeiçoamento das funções de *score* baseadas em aprendizado de máquina depende de grandes conjuntos de dados para alcançarem previsões cada vez melhores em todas as possibilidades de receptores.

Portanto, o verdadeiro desafio das ferramentas de simulação de *docking* molecular, é conseguir calcular as energias de ligação/interação entre as moléculas em estudo com boa precisão, de modo que seja possível selecionar um pequeno conjunto de moléculas que apresentaram resultados positivos para testes *in vitro*. Por outro lado, o sucesso do estudo depende diretamente de uma boa previsão inicial do modo de ligação entre as moléculas escolhidas.

### **3.3. Hipertensão Arterial e a Enzima Conversora de Angiotensina**

A hipertensão, comumente chamada de “pressão alta” é um grande problema de saúde pública global. É uma enfermidade associada a alterações funcionais e/ou estruturais de vasos sanguíneos, sendo uma das grandes responsáveis pela ocorrência de ataques cardíacos e derrames. A Associação Americana do Coração e a Organização Mundial da Saúde estimam que aproximadamente 40% da população mundial tenha tido sua pressão arterial aumentada, sendo que em 2015, 3,47 bilhões de adultos possuíam indícios de pressão alta (pressão sistólica superior a 115 mmHg) e 874 milhões já poderiam ser considerados indivíduos hipertensivos (pressão sistólica superior a 140 mmHg) (AMERICAN HEART ASSOCIATION *et al.*, 2018; NCD RISK, 2017), sendo a hipertensão responsável por maior número de óbitos que doenças como o câncer e diabetes. Um dos mecanismos de controlar a pressão arterial é pelo sistema renina-angiotensina em que a renina, uma pequena enzima, é liberada pelos rins quando a pressão cai a valores muito baixos, sendo sua função ajudar a corrigir esta queda por meio da elevação da pressão arterial (PATEL *et al.*, 2017). Na Figura 11 está representado o mecanismo vasoconstritor renina-angiotensina-aldosterona para o controle da pressão arterial.

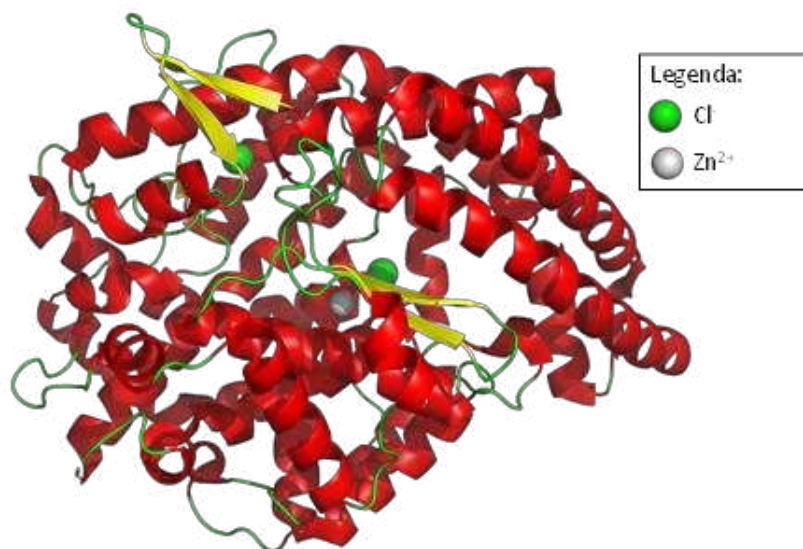


**Figura 11 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona para controle da pressão arterial. Fonte: Elaborado pelo autor.**

O angiotensinogênio é produzido pelo fígado e está presente no sangue, sendo precursor da angiotensina I. Essa conversão é catalisada pela enzima renina, sintetizada e armazenada na forma inativa de pró-renina nos rins. Quando a pressão arterial cai, reações intrínsecas nos rins liberam a renina que atua enzimaticamente sobre outra proteína plasmática, uma globulina, chamada de substrato da renina e assim libera o peptídeo de 10 resíduos de aminoácidos a angiotensina I. Após formação da angiotensina I, dois aminoácidos são separados desta para formar a angiotensina II, peptídeo de oito resíduos de aminoácidos. A enzima de conversão (ECA) presente no endotélio dos vasos pulmonares que executa essa conversão. Angiotensinas (enzimas sanguíneas e teciduais) inativam a angiotensina II, persistindo esta por poucos segundos no sangue. Neste tempo em que está no sangue, a angiotensina II pode elevar a pressão arterial por vasoconstrição, que consiste na constrição das arteríolas com o aumento da resistência periférica. A angiotensina II pode também atuar sobre os rins para diminuir a excreção do sal e da água. Assim aumenta levemente o volume do líquido extracelular, o que então aumenta a pressão arterial ao longo de período de horas e dias. Portanto, a inibição da enzima conversora de angiotensina pode exercer efeito anti-hipertensivo impedindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II (CAREY, 2015).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma dipeptidil carboxipeptidase ancorada à membrana do tipo I, essencial para a regulação da pressão arterial e homeostase dos eletrólitos através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura

12). Existem duas isoformas da ECA que são transcritas do mesmo gene de uma maneira específica em cada tecido: nos tecidos somáticos a ECA corresponde a uma glicoproteína composta por uma cadeia polipeptídica única de 1.277 aminoácidos, enquanto que nos espermatozoides a ECA apresenta baixa massa molecular sendo composta por 701 aminoácidos (NATESH *et al.*, 2003). A forma somática consiste em dois domínios homólogos (domínio N e C), cada um contendo um sítio ativo com um motivo de ligação de zinco conservado, sendo complexado por dois resíduos de histidina e um de glutamato. Os dois domínios diferem em suas especificidades em relação ao substrato, perfis de inibição e ativação e funções fisiológicas (WEI *et al.*, 1992), sendo o domínio C o responsável pelo controle da pressão arterial e da função cardiovascular, ou seja, o domínio C é o local dominante para conversão da angiotensina. O íon de zinco é um importante componente catalítico da ECA, pois está ligado de forma extremamente ordenada ao seu sítio ativo de inibição. Sua estabilização é proveniente de duas fortes interações com as histidinas 383 e 387, no motivo estrutural HEXXH da  $\alpha$ -hélice 13, sendo complementada pelas interações com o glutamato 411 da  $\alpha$ -hélice 14 (NATESH *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 1992).



**Figura 12 - Estrutura tridimensional da enzima convertora de angiotensina (código PDB: 1O86), obtida por difração de raios X. Fonte: Protein Data Bank (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org))**

Para se controlar a “pressão alta” recomenda-se uma alimentação saudável, consumo controlado de sódio e álcool, além do combate ao sedentarismo e ao tabagismo. Todavia, uma vez que o problema tenha surgido, na maioria das vezes é necessário recorrer ao uso de medicamentos (captopril, benazepril, enalapril, quinapril), que possuem efeitos colaterais indesejáveis variados como, por exemplo: fadiga, dor no peito, infecção viral, diarreia, dor abdominal, dor muscular, cefaleia, tosse, tontura, fadiga, secura da boca, amarelecimento dos olhos ou da pele e urina escura (PATEL *et al.*, 2017).

A preocupação com os efeitos colaterais que esses medicamentos apresentam tem motivado pesquisadores de diferentes regiões do mundo a investigarem fontes de substâncias anti-hipertensivos naturais. Neste contexto, proteínas e peptídeos alimentares com capacidades funcionais ou neutracêuticos vem crescendo, pois são considerados mais seguros para a saúde humana.

### 3.4. Fenômenos de superfície e espumas em alimentos

A maioria dos alimentos é composta por mais de uma fase e, portanto, apresentam um grande limite entre tais fases, ou, área interfacial. Podem existir diversos tipos de interfaces entre duas fases, sendo que as principais são: gás-sólido, gás-líquido, líquido sólido e líquido-líquido. Tais interfaces contêm um excesso de energia livre que é proporcional à sua área e, portanto, a interface “procurará” tornar-se a menor possível para minimizar essa energia livre interfacial, por meio de forças atrativas exercidas sobre as moléculas da superfície pelas moléculas do interior. Essa força (N) por unidade de comprimento ( $m^{-1}$ ) pode ser mensurada, e é denominada tensão interfacial ( $\gamma$ ) (DAMODARAN; PARKIN, 2017). A magnitude da tensão interfacial depende da composição de ambas as fases e da temperatura (MURRAY, 2002).

Algumas moléculas de uma suspensão ou dispersão alimentar, chamadas de surfactantes, em contato com a superfície de uma fase podem se adsorver nessa superfície formando uma monocamada. Isso acontece, porque depois de adsorvidas na interface, a energia livre dessas moléculas se torna menor do que quando dispersas livremente na fase. Ao mesmo, esse fenômeno de adsorção também diminui a energia livre presente entre as fases, diminuindo, conseqüentemente, a tensão superficial (ou interfacial) entre elas (DAMODARAN; PARKIN, 2017). Os surfactantes são, normalmente, de dois tipos: moléculas anfifílicas, ou seja, possuem parte hidrofóbica e hidrofílica, podendo ser aniônicos (MEINHART *et al.*, 2011), catiônicos (ZHANG, HUI *et al.*, 2016), não iônicos (RHEINBERGER; WOLF; WURM, 2020) e zwitteriônicos (FISCHER; WU, 2008); e os poliméricos, sendo as proteínas as principais desse tipo para alimentos (BOS; VLIET, 2001; DE OLIVEIRA, ANA PAULA HANKE *et al.*, 2020; IBANOGLU; IBANOGLU, 1999).

Em alimentos, encontramos com frequência dispersões com alta tensão entre as fases, como emulsões, que são dispersões de um líquido em outro (normalmente óleo em água ou água em óleo) e espumas, que são dispersões de um fluido gasoso hidrofóbico em um líquido hidrofílico (normalmente ar  $N_2O$  ou  $CO_2$  em água) (DAMODARAN; PARKIN, 2017). Em outras palavras, espumas e emulsões são sistemas formados por duas fases imiscíveis, gás/líquido e líquido/líquido, respectivamente, elaboradas, normalmente, por meio de operações unitárias de

agitação mecânica, em que uma fase (fase móvel) se dispersa na forma de pequenas gotículas na outra (fase contínua) (MCCLEMENTS, 2007).

Em muitos alimentos, por exemplo, chantilly, mousses, suflês, sorvetes, pães, bolos e bebidas carbonatadas, as espumas são de essenciais para conferir suas características sensoriais como textura e cor. Além disso, do ponto de vista industrial, para alimentos com bolhas de ar, pode-se considerar que o material, ar, é notoriamente barato, leve para transportar e é improvável que resulte em reações alérgicas, pelo menos para ar limpo. Por outro lado, espumas são extremamente difíceis de produzir, estabilizar e controlar em grandes quantidades (MURRAY, 2020), pois se trata de um sistema termodinamicamente instável e, portanto, tende a se desfazer com o tempo devido eventos físico-químicos como (DAMODARAN; PARKIN, 2017; LIANG *et al.*, 2017):

- i. **a separação gravitacional ou escoamento**, em que o líquido da fase móvel escoar a partir e ao longo da camada de espuma em decorrência da gravidade;
- ii. **a coalescência das gotículas**, em que uma ou mais gotículas se unem devido à instabilidade posterior rompimento do filme entre elas, e;
- iii. **a Maturação de Ostwald ou desproporcionalidade**, em que há a difusão de gás de bolhas pequenas para bolhas maiores (ou para a atmosfera) devido ao fato da pressão em bolhas menores ser maior do que em bolhas grandes.

### 3.5. Proteínas do leite bovino e suas aplicações tecnológicas

O leite possui aproximadamente 32 g de proteína/L, que pode variar em função da espécie, raça, alimentação, estações do ano, doenças e do período de lactação. Desta forma, é considerado um alimento fonte de proteínas, pois, além da elevada concentração proteica, vários aminoácidos essenciais são biodisponibilizados por este rico alimento. Dentre as proteínas do leite bovino, as caseínas compreendem a maior parte, respondendo por cerca de 80% das proteínas totais. São divididas em  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, e são comumente estruturadas em micelas, sendo essas partículas coloidais de 50-600 nm de diâmetro. Em relação às suas funções biológicas, a micela de caseína é responsável por: assegurar a excreção segura de elevadas concentrações de cálcio, fosfato e proteínas da caseína para que a glândula mamária não se torne calcificada; reter micelas no estômago de recém-nascidos para que os nutrientes sejam digeridos e absorvidos; transportar o cálcio facilitando o processo de digestão (HOLT *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014).

As caseínas se agrupam em estruturas únicas conhecidas como micelas de caseína, que são essencialmente entidades coloidais esféricas que incluem todas as

quatro espécies de caseína e são mantidas juntas e estabilizadas por propriedades físico-químicas únicas, como a capacidade de resíduos de serina fosforilados de se ligarem ao cálcio, e a presença da  $\kappa$ -caseína parcialmente glicosilada que age como uma camada estabilizadora, devido a seu caráter relativamente anfífilico (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018; LUCEY; HORNE, 2018).

A caseína  $\alpha_{S1}$  representa 40% do total de caseínas do leite bovino. Contém uma cadeia polipeptídica com 199 resíduos de aminoácidos, em que se encontram 16 resíduos de serina, sendo 8 deles fosforilados. Sua massa molecular é de aproximadamente 23 kDa, antes de ser fosforilada, chegando a 23.6 kDa após fosforilação. Possui seis resíduos carregados positivamente (Lys, Arg, His), oito resíduos carregados negativamente (Tyr, Phe, Thr) e 7 resíduos aromáticos (Tyr, Phe, Thr), sendo seu ponto isoelétrico (pI) igual a 4,91 (ou 4,42 considerando a proteína fosforilada) (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

Já a caseína  $\alpha_{S2}$  representa cerca de 10% das caseínas do leite bovino e é constituída por uma cadeia polipeptídica com 207 resíduos de aminoácidos. Algumas de suas particularidades são seu nível heterogêneo de fosforilação e a presença de ligações dissulfeto intermoleculares. Possui seis resíduos positivamente carregados (Lys, Arg, His), 14 negativamente carregados (Glu, Asp, Ser) e quatro resíduos aromáticos. Sua massa molar é de 24.3 kDa quando não fosforilada e 25.2 kDa após fosforilação, porém o maior impacto da fosforilação é no seu ponto isoelétrico, que varia de 8.34 para 4.95 após a fosforilação (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

A  $\beta$ -caseína representa 35% das caseínas do leite bovino e é constituída por uma cadeia polipeptídica de 209 resíduos de aminoácidos. Sua massa molar é 23.6 kDa, chegando a 24.0 kDa após fosforilação de cinco resíduos de serina. Possui quatro resíduos de aminoácidos positivamente carregados (Lys, Arg, His), cinco negativamente carregados (Glu, Asp, Ser) e quatro resíduos aromáticos (Tyr, Phe, Thr). Seu ponto isoelétrico também sofre influência da fosforilação, passando de 5.13 para 4.65 após esta modificação (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

Por fim, tem-se a  $\kappa$  caseína que, ao ser comparada com as demais, possui características únicas como: é a menor das frações de caseína, é muito pouco fosforilada, possui baixa sensibilidade ao cálcio e é a única das frações que pode ser glicosilada. Sua sequência primária consiste em 169 aminoácidos, sendo cinco resíduos positivamente carregados, oito resíduos negativamente carregados, quatro resíduos aromáticos e pode conter até seis grupos glicosilados em diferentes resíduos de treonina. Sua massa é de 19 kDa e seu ponto isoelétrico é de 5.93 (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

Além das caseínas, o leite possui outra classe de proteínas chamadas “proteínas do soro” (CASTRO *et al.*, 2017), que correspondem por até 20% das

proteínas totais do leite (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). Na última década, as proteínas do soro de leite têm recebido atenção especial em razão de suas propriedades nutricionais (conteúdo e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais) (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015) e técnico-funcionais (atividades emulsificante, espumante, espessante e gelificante) (SCHRÖDER *et al.*, 2017). As principais proteínas do soro são:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulina, albumina do soro, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e protease peptona. Dentre essas, a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactalbumina são as que existem em maior proporção, representando 51% e 22%, respectivamente do total de proteína de soro de leite. Acredita-se que a função biológica da  $\beta$ -lactoglobulina seja o armazenamento e transporte de substâncias hidrofóbicas pelo trato gástrico de bezerros. Por essa razão, a  $\beta$ -lactoglobulina é considerada uma lipocaína, grupo de proteínas relativamente pequenas com grande habilidade de interagir com pequenas moléculas lipofílicas em suas cavidades centrais, e tem despertado o interesse de pesquisadores para atuar como carreadora de compostos hidrofóbicos em fármacos e alimentos (SWAIN *et al.*, 2020; FAN *et al.*, 2019; GHEONEA *et al.*, 2018). A  $\alpha$ -lactalbumina, por sua vez, está associada à biossíntese de lactose e também é considerada uma proteína com elevada capacidade nutritiva e técnico-funcional, podendo ser utilizada como ingrediente alimentício devido às suas propriedades espumantes, gelificantes e emulsificantes (QAYUM *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2019; PERMYAKOV *et al.*, 2016). Apesar das outras proteínas do soro de leite estarem presentes em menor proporção, suas funções biológicas principais estão associadas, principalmente, à amamentação e desenvolvimento de filhotes mamíferos. As imunoglobulinas são anticorpos sintetizados em resposta à estimulação de antígenos específicos. A lactoferrina é um inibidor de algumas bactérias, incluindo *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*, através da remoção de íons de ferro,  $Fe^{3+}$ . A lactoperoxidase possui função antibacteriana, inibindo o crescimento viral e é um agente antineoplásico e a transferrina é uma glicoproteína semelhante a lactoglobulina e possui a capacidade de ligação ao ferro. As proteases peptonas são as que estão presentes em menores quantidades e são produtos da degradação enzimática de caseína (PEREIRA, 2014; THOMPSON; BOLAND; SINGH, 2009).

### 3.5.1. Peptídeos de caseína e a Hipertensão Arterial

Dentre as proteínas alimentares, as caseínas são consideradas uma das mais importantes fontes de peptídeos bioativos, que são fragmentos específicos de proteínas capazes de conferir benefícios fisiológicos à saúde humana. Esses peptídeos ficam latentes em proteínas alimentares intactas, mas podem ser libertadas durante o processamento convencional do alimento, tais como a fermentação, o

tratamento térmico e modificação do pH, ou de forma controlada e planejada, como, por exemplo, por meio de hidrólise enzimática *in vitro* ou *in vivo* (WU, JIANPING; LIAO; UDENIGWE, 2017). Estudos a cerca da hidrólise controlada de caseínas já resultaram em peptídeos com diferentes atividades biofuncionais, como anti-inflamatória (DADAR *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019; GU; WU, 2016), antioxidante (BUENO-GAVILÁ *et al.*, 2019; IBRAHIM; ISONO; MIYATA, 2018; GU; WU, 2016) e anti-hipertensiva (CHEN *et al.*, 2020; GIROMINI *et al.*, 2019; XUE *et al.*, 2018).

Uma das características chave que favorece o uso da caseína como fonte desses peptídeos bioativos é o fato dela possuir uma grande região hidrofóbica e de baixo peso molecular, e, além disso, sua sequência aminoacídica permite que a hidrólise em diferentes pontos da proteína obtenha como produto conjuntos de peptídeos com diferentes ações bioativas (HOLT *et al.*, 2013). Sua principal vantagem frente à fármacos sintéticos é sua segurança toxicológica, o que resulta em efeitos colaterais mais brandos (WU, JIANPING; LIAO; UDENIGWE, 2017). Alguns peptídeos como o IPP (Ile-Pro-Pro) e o VPP (Val-Pro-Pro), obtidos da hidrólise enzimática de caseína, já são muito conhecidos por sua atividade anti-hipertensiva comprovada que, por meio da inibição da ECA, promovem o relaxamento dos vasos sanguíneos (HIROTA *et al.*, 2011), no entanto, estudos recentes têm realçado novos peptídeos obtidos de caseína com atividade anti-hipertensiva (Tabela 2).

**Tabela 2 - Estudos envolvendo a obtenção e caracterização de peptídeos bioativos derivados de caseínas com atividade anti-hipertensiva *in vitro* ou *in vivo***

Caseína	Enzima e condições reacionais	Componente ativo identificado	Técnicas usadas para identificação	Referência
Caseína bovina (Fonterra & Anchor)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: protease (alcalase) de <i>Bacillus licheniformis</i></li> <li>▪ T = 50 °C</li> <li>▪ Tempo = 6 h</li> <li>▪ pH = 8,0</li> <li>▪ E:S = 6,5:100 (m/m)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ VLPVPQ</li> <li>▪ VAPFPE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ultrafiltração</li> <li>▪ Espectrometria de massa</li> </ul>	(CHEN <i>et al.</i> , 2020)
Caseína bovina (Calbiochem, CA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: extrato enzimático obtido de flores de (<i>C. scolymsus</i>)</li> <li>▪ T= 50 °C</li> <li>▪ Tempo = 2, 4 e 16 h</li> <li>▪ pH = 6,2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FFVAPFPEVFGK</li> <li>▪ RPKHPIKHQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nano Cromatografia Líquida</li> <li>▪ Espectrometria de massa Tandem</li> </ul>	(BUENO-GAVILÁ <i>et al.</i> , 2019)
Caseinato de cálcio (90%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: pancreatina e bile (digestão <i>in vitro</i>)</li> <li>▪ T= 37 °C</li> <li>▪ Tempo = 3 h</li> <li>▪ pH = 7,0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ TPEVDDEALEK</li> <li>▪ TPEVDDEALEK</li> <li>FDK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cromatografia Líquida</li> <li>▪ Espectrometria de massa Tandem</li> </ul>	(GIROMINI <i>et al.</i> , 2019)

Caseína bovina (Haihe Co, CN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: pepsina e tripsina</li> <li>▪ T= 37 °C</li> <li>▪ Tempo = 3 h</li> <li>▪ pH = 3,0</li> <li>▪ E:S = 1:100 (m/m)</li> </ul>	▪ YQKFPQYLQY	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ultrafiltração</li> <li>▪ Cromatografia</li> </ul>	(XUE <i>et al.</i> , 2018)
Caseína bovina (Sigma, EUA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: extrato proteolítico extraído de latex</li> <li>▪ T= 45 °C</li> <li>▪ Tempo = 10, 30, 60, 90 e 180 min</li> <li>▪ pH = 9,0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ YQEPVLGPVRG</li> <li>▪ PFPIIV</li> <li>▪ RFFVAPFPE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cromatografia líquida de alto desempenho</li> <li>▪ Espectrometria de massa</li> </ul>	(CORRON S <i>et al.</i> , 2017)
Caseína de leite de búfalo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enzima: papaína, pepsina ou tripsina</li> <li>▪ T= 37 °C</li> <li>▪ Tempo = 3 h</li> <li>▪ pH = 3,0</li> <li>▪ E:S = 1:100 (m/m)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FPGPIPK</li> <li>▪ IPPK</li> <li>▪ IVPN</li> <li>▪ QPPQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cromatografia de exclusão</li> <li>▪ Espectrometria de massa</li> </ul>	(ABDEL-HAMID <i>et al.</i> , 2017)

Sabe-se que, normalmente, peptídeos com atividade anti-hipertensiva pronunciada possuem a característica de serem hidrofóbicos e de cadeia curta (de 2 a 12 resíduos de aminoácidos) (CASTRO; SATO, 2015; SHI *et al.*, 2014). Observa-se que peptídeos com ambas as características foram obtidos no trabalho de Chen *et al.* (2020), em que os peptídeos obtidos apresentaram resíduos C-terminal e N-terminal, ambos hidrofóbicos, e de baixa massa molecular. Já Abdel-hamid *et al.* (2017), em seu trabalho, também obteve peptídeos de baixa massa molecular, porém com alguns resíduos hidrofílicos em suas extremidades. Quanto a influencia do tamanho, a maior capacidade inibitória apresentada pelos pequenos peptídeos se deve, muito provavelmente, ao fato de esses terem melhor acesso ao sítio ativo da ECA, porém, essa não parece ser uma característica limitante para que o peptídeo apresente atividade hipertensiva considerável, como apresentado nos trabalhos de Bueno-Gavilá *et al.* (2019), Giromini *et al.* (2019), Xue *et al.* (2018) e Corrons *et al.* (2017).

Como observado, após processo de hidrólise de uma proteína como a caseína, o número de peptídeos distintos dentro de cada hidrolisado, geralmente, é muito grande e variado, pois as condições de hidrólise são diversas. Identificar quais são precisamente os peptídeos dentro de cada hidrolisado que de fato originam a atividade anti-hipertensiva é um dos grandes desafios nesse campo de pesquisa. Por vezes, se identifica quais os peptídeos responsáveis pela inibição da ECA separando-os e testando sua inibição. Dependendo do número de peptídeos produzidos na hidrólise da caseína, os processos de separação, identificação e caracterização por meio de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotômetro de massa e ionização são extremamente dispendiosos em relação a recursos financeiros e de tempo.

Mesmo depois de identificados, avaliar separadamente *in vitro* ou *in vivo* quais, dentre os peptídeos obtidos, são de fato aqueles que exercem atividade inibitória na ECA, ainda sim seria um processo longo e financeiramente caro. Além disso, este tipo de experimento fornecerá apenas resultados empíricos, deixando obscuras as respostas para algumas perguntas como: “De que forma estes peptídeos estão interagindo e inibindo a enzima?”; “Há algum resíduo de aminoácido específico que aumenta a afinidade do peptídeo por alguns dos sítios ativos da enzima?”; “Depois de formado, o complexo entre a enzima e o peptídeo é estável?”; “Quais os tipos de interações químicas foram formadas para estabilizar o complexo entre a enzima e o peptídeo?”. Esses questionamentos são importantes para que, como pesquisadores, seja possível realizar uma busca racional por moléculas com elevada capacidade de inibição à enzima conversora de angiotensina. Na literatura científica, são poucos os estudos que trazem este nível de refinamento em suas discussões e, neste contexto, as metodologias *in silico* como o *docking* (ancoragem) e a dinâmica moleculares emergem como metodologias alternativas e complementares a este tipo de estudo, pois permitem que seus resultados, quando correlacionados com aqueles obtidos *in vitro*, nos auxiliem a responder tais questões e elucidar os mecanismos que promoveram a inibição enzimática. Na Tabela 3 são descritos alguns trabalhos recentes em que o objetivo foi estudar inibição da ECA por peptídeos bioativos utilizando metodologias *in silico* de *docking* ou dinâmica molecular.

**Tabela 3 - Estudos de inibição da ECA por peptídeos de origem alimentar utilizando simulações de *docking* ou dinâmica molecular.**

Origem do peptídeo	Tipo de hidrólise	Peptídeo ativo identificado	Interações estabilizadoras e respectivos sítios ativos na ECA (S1, S2 S'1, Zn <sup>2+</sup> )	Observações	Referência
Massa de Palmito	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enzimática: papaína</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i. YLLLK</li> <li>ii. WAFS</li> <li>iii. GVQEGAGHYALL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i. S1 (Tyr523), S2 (His353, Lys511), S'1 (Glu162) e complexo Zn<sup>2+</sup> (His387, Zn<sup>2+</sup>).</li> <li>ii. S1 (Tyr523, Ala354, Glu384), S2 (His353, Lys511, His513) e complexo Zn<sup>2+</sup> (His387, Zn<sup>2+</sup>).</li> <li>iii. S2 (Gln281, His353), S'1 (Glu162) e complexo Zn<sup>2+</sup> (Zn<sup>2+</sup>).</li> </ul>	O maior número de interações estabelecidas pelo peptídeo YLLLK com os resíduos dos sítios ativos da ECA pode explicar o menor IC <sub>50</sub> desse peptídeo em relação aos demais.	(ZAREI <i>et al.</i> , 2019)
Sintético	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adquirida da Sigma Aldrich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GEF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Domínio C: Int. lig.hidrogênio: Gln245, Gln333, Gln348, Glu375, Lys475.</li> <li>Domínio N: Int. lig.hidrogênio: Gln259, His331, Ala332, Glu362, Lys489, Tyr501 Eletrostática: Zn<sup>2+</sup></li> </ul>	As interações do tipo ligação de hidrogênio foram cruciais para a estabilidade do peptídeo em ambos os domínios (C e N), principalmente com o resíduo Lys475. Além disso, foi observado que a complexação do íon Zn <sup>2+</sup> com os átomos de oxigênios carboxílicos do GEF foi um fator crucial para a atividade inibitória do peptídeo.	(QI <i>et al.</i> , 2018)
Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enzimática: tripsina e quimotripsina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LL-9: LPESVHLDK</li> <li>VL-9: VLSTSFPPK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LL-9 – S2 (His513, His353, Glu281) e S'1 (Glu162)</li> <li>VL9: S2 (Tyr520, Lys511, Gln281) e S1 (Thr 345)</li> </ul>	Apesar de não interagirem diretamente com o Zn <sup>2+</sup> , os peptídeos se coordenaram com o zinco distorcendo sua geometria tetraédrica de seu complexo, possivelmente causando a atividade inibitória na ECA.	(MIRZAEI; MIRDAMADI; EHSANI, 2018)
Caseína α <sub>s2</sub> obtida de leite bovino	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enzimática: tripsina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NMAINPSKE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Int. lig.hidrogênio: Asn66, Lys18, Asp121, Glu123, Arg124, Trp220, Tyr360, Ser516, Ser517, Arg522)</li> <li>Int.sulfídrica: Glu403</li> <li>Int. Hidrofóbica: Trp59, Phe391</li> <li>Int. Eletrostática: Asp121, Glu123, Arg124, Arg522</li> </ul>	Não houve interação direta com nenhum resíduo de aminoácido pertencente a algum dos sítios ativos da ECA. Porém, o elevado número de interações formadas bloqueia o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima, sugerindo elevada capacidade inibitória deste peptídeo.	(TU <i>et al.</i> , 2018)

Origem do peptídeo	Tipo de hidrólise	Peptídeo ativo identificado	Interações estabilizadoras e respectivos sítios ativos na ECA (S1, S2 S'1, Zn <sup>2+</sup> )	Observações	Referência
Sementes de lentilha	▪ Enzimática: savinase	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ct1: PGQLQSF</li> <li>▪ Ct3: LPILRYL</li> <li>▪ Ct4: FLPVLLH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ct1: S2 (Tyr520, Lys511)</li> <li>▪ Ct3: S2 (Tyr520, Lys511, Glu403)</li> <li>▪ Ct4: S2 (Tyr520, Lys511, Gln281, Glu403)</li> </ul>	Os peptídeos interagiram, principalmente, com o sítio S2, principalmente por meio de ligações de hidrogênio.	(GARCÍA-MORA <i>et al.</i> , 2017)
Proteína farelo de arroz	▪ Enzimática: tripsina	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ F2-a: YSK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ S2 (Ala354)</li> <li>▪ S1 (Gln281, His353)</li> <li>▪ S'1 (Glu162)</li> </ul>	A formação do complexo e a inibição da ECA foram atribuídas, principalmente, à formação de interações do tipo ligações de hidrogênio muito fortes com os sítios ativos.	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
Qula caseína de leite de iaque	▪ Enzimática: alcalase, α-quimotripsina, termolisina, tripsina e papaína.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ i. PFPGPIP N</li> <li>▪ ii. QKEPMIGV</li> <li>▪ iii. KYIPIQ</li> <li>▪ iv. LPLPLL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ i. S1 (Tyr523); complexo Zn<sup>2+</sup> (Glu411)</li> <li>▪ ii. Complexo Zn<sup>2+</sup> (Glu411)</li> <li>▪ iii. S1 (Ala354, Glu384, Tyr523); S1' (Glu162); complexo Zn<sup>2+</sup> (His383, Glu411)</li> </ul>	Os peptídeos i e iii são indicados como aqueles com maior capacidade inibitória da ECA, pois interagem fortemente com alguns resíduos dos sítios ativos da enzima e formam interações de hidrogênio com os resíduos complexados ao Zn <sup>2+</sup> .	(LIN <i>et al.</i> , 2017)

ECA possui três subsítios ativos principais S1, S2 e S'1, sendo que: o sítio S1 inclui os resíduos Ala354, Glu384 e Tyr523; o sítio S2 inclui os resíduos Glu281, His353, Lys511, His513 e Tyr520; e o sítio S'1 contém apenas o resíduo Glu162 (WU *et al.*, 2015). Além disso, o local de coordenação do  $Zn^{2+}$  com a ECA também desempenha um papel significativo, sendo o conjunto dos três resíduos (His383, His387 e Glu411) e o cátion de zinco tetracoordenados, considerado o quarto, e principal, sítio ativo da proteína (JALKUTE *et al.*, 2013).

É possível perceber que, nos trabalhos listados na Tabela 3, que na grande maioria dos casos, toda vez que um peptídeo foi identificado como inibidor da ECA, ao se aprofundar a análise por meio das ferramentas *in silico*, observou-se que pelo menos um de seus resíduos de aminoácidos estava interagindo com algum resíduo pertencente a um dos sítios ativos da ECA, ressaltando que essas regiões são essenciais para a formação de um complexo ECA-inibidor. Em seu trabalho, Mirzaei *et al.* (2018) conseguiu observar que, apesar dos peptídeos não interagirem diretamente com o  $Zn^{2+}$  ou algum dos resíduos que o estava complexando, os peptídeos se coordenaram próximo a ele, distorcendo a geometria tetraédrica do complexo e, possivelmente, promovendo a inibição da ECA (MIRZAEI; MIRDAMADI; EHSANI, 2018).

No entanto, é interessante notar que no trabalho de Tu *et al.* (2018), o peptídeo NMAINPSKE, obtido de hidrólise enzimática pela enzima tripsina, não interagiu diretamente com nenhum resíduo de aminoácido pertencente a algum dos sítios ativos da ECA. Porém, o autor conclui que o elevado número de interações formadas entre o peptídeo e a ECA bloqueia o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima, sendo esta uma possível razão para sua elevada capacidade inibitória (TU *et al.*, 2018).

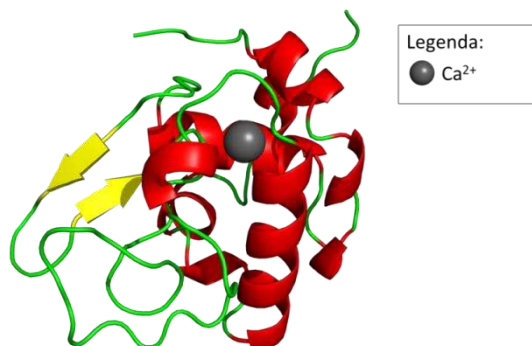
É possível perceber que as análises de *docking* molecular auxiliaram os autores a esclarecer dúvidas e analisar detalhes até então não fornecidos pelas análises *in vitro* e *in vivo*. No entanto, quando utilizado isoladamente, podemos dizer que o *docking* molecular fornece informações ainda incompletas, pois faz a análise do complexo apenas de forma estática, não sendo possível concluir, por exemplo, se as interações observadas entre enzima e os peptídeos são estáveis ao longo do tempo, se novas interações estabilizadoras são formadas ao longo do tempo ou, ainda mais importantes, se a conformação da proteína é adequada para ser utilizada nos cálculos de *docking*. Para isso, podemos utilizar a metodologia de dinâmica molecular, que ainda é raramente utilizada em pesquisa com proteínas alimentares.

Dentre os trabalhos mencionados na Tabela 3, que analisaram a capacidade inibitória da ECA por peptídeos de origem alimentar, apenas Qi *et al.* (2018) simularam por dinâmica molecular os complexos enzima-peptídeo fornecidos pela análise de *docking*, e observaram aspectos mais complexos acerca da capacidade inibitória do

peptídeo em estudo. Os autores conseguiram validar a importância das interações do tipo ligação de hidrogênio para a manutenção dos complexos, identificando ainda que um dos resíduos externos aos sítios ativos, Lys 475, estabelecia interações cruciais para tal. Além disso, elucidaram de forma racional aspectos do mecanismo de inibição da ECA pelo peptídeo, constatando que os oxigênios carboxílicos do resíduo de glutamato do peptídeo se complexaram ao  $Zn^{2+}$  durante a simulação e foram essenciais para a ação inibitória do peptídeo.

### 3.5.2. Alfa-lactalbumina e suas propriedades de interface

A  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) é a segunda proteína mais abundante no soro de leite bovino após a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg). É uma proteína globular com ponto isoelétrico (pI) igual a 4,8 e baixo peso molecular (14,1 kDa), composta por uma sequência de 123 aminoácidos (PIKE; BREW; ACHARYA, 1996), organizados em quatro  $\alpha$ -hélices e três folhas- $\beta$  antiparalelas que estão divididas entre dois domínios estabilizados, essencialmente, por quatro ligações dissulfeto entre os resíduos Cys<sub>6</sub>–Cys<sub>120</sub>, Cys<sub>61</sub>–Cys<sub>77</sub>, Cys<sub>73</sub>–Cys<sub>91</sub>, and Cys<sub>28</sub>–Cys<sub>111</sub>, e um íon  $Ca^{2+}$  complexado a resíduos de lisina e ácido aspártico (Figura 13) (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000; PIKE; BREW; ACHARYA, 1996).



**Figura 13 - Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -lactoalbumina bovina (código PDB: 1HFZ), obtida por difração de raios X. Fonte: Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).**

Sua função biológica no leite está associada à biossíntese de lactose, no entanto, também pode ser considerada uma proteína com elevada capacidade nutritiva e técnico-funcional, podendo ser utilizada como ingrediente alimentício devido às suas propriedades espumantes e emulsificantes (LAM; NICKERSON, 2015; PERMYAKOV *et al.*, 2016).

As proteínas, de forma geral, por serem naturalmente anfifílicas podem agir como agentes tecnológicos de interface, ou seja, como espumantes e emulsificantes, contribuindo na estabilização desses sistemas por meio da redução da tensão interfacial entre as duas fases (HINDERINK *et al.*, 2020). Dentre as diversas proteínas

alimentares, as proteínas do soro de leite bovino têm sido utilizadas com frequência como agentes de interface e apresentado ótimos resultados na estabilização de espumas ar/água e emulsões óleo/água, com destaque para a  $\alpha$ -La.

O interesse científico nas propriedades tecnológicas de interface da  $\alpha$ -La não é apenas recente. Há mais de 30 anos, Bacon *et al.* (1988) apresentou um estudo empírico sobre as propriedades espumantes das  $\alpha$ -La bovina e humana, observando a formação de espumas com características de volume e estabilidade superiores àqueles promovidos pela lisozima do ovo, que se destacava como proteína alimentar detentora de tais propriedades até então. No ano seguinte, Kroman (1989) publicou um longo trabalho em que discutiu em nível molecular cada detalhe estrutural da  $\alpha$ -La, assim como possíveis modificações na estrutura promovidas por alterações no meio como pH, temperatura e presença de íons, disponibilizando informações valiosas para que uma série de estudos posteriores buscando a relação “estrutura x função tecnológica” fossem realizados, e que perduram até os dias atuais, (CORNEC; KIM; NARSIMHAN, 2001; DINIZ *et al.*, 2014; EYNARD *et al.*, 1992; IBANOGLU; IBANOGLU, 1999; LAJNAF *et al.*, 2016; QAYUM *et al.*, 2020).

Uma característica estrutural importante na  $\alpha$ -La do leite bovino é a presença de cátion  $\text{Ca}^{2+}$  fortemente ligado à resíduos de lisina (Lys79) e ácido aspártico (Asp82, Asp84 e Asp 87) fundamental para a manutenção da estrutura nativa da proteína e para a formação das pontes dissulfeto nos “locais corretos” (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000). Além do íon de cálcio, a  $\alpha$ -La possui capacidade de se complexar a outros íons positivos como magnésio, manganês, sódio e potássio, porém, apenas o  $\text{Ca}^{2+}$  é fundamental para a manutenção de sua conformação nativa (BARBANA; PÉREZ, 2011). Alguns autores têm demonstrado que a presença do cátion  $\text{Ca}^{2+}$  complexado à estrutura  $\alpha$ -La reduz sua flexibilidade e aumenta sua estabilidade térmica (HENDRIX; GRIKO; PRIVALOV, 2000; RELKIN; LAUNAY; EYNARD, 1993).

Assim como o cátion  $\text{Ca}^{2+}$ , as condições do solvente como pH e temperatura também influenciam na conformação, estabilidade da proteína e em suas propriedades como agente de interface. Alguns trabalhos mostram que pequenos aumentos na temperatura, ou distanciamento do pH em relação à neutralidade, podem promover alterações conformacionais fazendo com que a proteína atinja estado de *molten globule*, que é um estado intermediário entre a conformação nativa da proteína e seu estado completamente desnaturado (BARONE *et al.*, 2020; ELLOUZE *et al.*, 2020; LAJNAF *et al.*, 2017). Em seu trabalho, LOI; EYRES & BIRCH (2018) mostraram que ao atingir tal estado, a  $\alpha$ -La aumenta seu grau de adsorção na interface de espumas e emulsões em relação a seu estado nativo, melhorando suas propriedades de interface, uma vez que a estabilidade de uma espuma ou emulsão depende diretamente da tensão interfacial entre as duas fases, das características do filme adsorvido na

interface, do tamanho e da carga elétrica dos glóbulos da fase móvel e da viscosidade da fase contínua (LIANG *et al.*, 2017).

É possível observar que todas as variáveis do meio influenciam em diferentes níveis na estrutura da  $\alpha$ -La, afetando sua estrutura e, conseqüentemente, promovendo diferentes comportamentos tecnológicos em sistemas montados a partir de diferentes combinações de temperatura, pH e presença ou ausência do cátion  $\text{Ca}^{2+}$ . Na Tabela 4 são descritos alguns estudos recentes que tiveram como objetivo avaliar a relação estrutura/função tecnológica da  $\alpha$ -La em diferentes situações de temperatura, pH e presença ou ausência do cátion  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Tabela 4 - Estudos referentes à influência de temperatura, pH e presença do cátion  $Ca^{2+}$ , nas propriedades técnico-funcionais da  $\alpha$ -La.**

Variável	Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
- Fonte da $\alpha$ -La - [ $\alpha$ -La] - pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparar as propriedades emulsificantes da <math>\alpha</math>-La bovina e <math>\alpha</math>-La de camelo em diferentes condições.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH: 3,0; 6,0 e 9,0</li> <li>[<math>\alpha</math>-La]: 0,1; 0,2; 0,4% m/m</li> <li>Emulsões O/A: 20% e 80%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>\alpha</math>-La bovina apresentou maior hidrofobicidade superficial, porém os valores de índice de emulsificação máximo foram próximos entre as duas.</li> <li>As emulsões foram mais viscosas em pH 3,0 devido à maior cobertura proteica na interface das gotículas em relação aos pHs 6,0 e 9,0.</li> <li>Quanto mais próximo do PI (5.2), menos estável é a proteína na interface óleo/água, promovendo menor estabilidade à emulsão.</li> <li><math>\alpha</math>-La bovina parece ser menos flexível do que <math>\alpha</math>-La de camelo, sendo adsorvida mais lentamente na interface das gotículas de óleo, principalmente quando o pH é próximo do PI.</li> </ul>	(ELLOUZE <i>et al.</i> , 2020)
- [ $\alpha$ -La] - $Ca^{2+}$ - $CaCl_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analisar alterações nas propriedades físico-químicas promovidas por três sistemas contendo proteína de soro de leite enriquecidas com <math>\alpha</math>-LA e fortificadas com <math>CaCl_2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[<math>\alpha</math>-La] = 1% w/v</li> <li>produzido por filtração por membrana</li> <li>produzido por precipitação seletiva</li> <li>produzido por cromatografia de troca iônica (LAC-IE)</li> <li>pH: 6,8</li> <li>[<math>CaCl_2</math>] = 0 a 5mM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>Ca^{2+}</math> iônico aumentou com o aumento da concentração de <math>CaCl_2</math>.</li> <li>Estruturas enriquecidas com apo-La tiveram maior afinidade de interação com o <math>Ca^{2+}</math> e estabeleceram interações mais fortes.</li> <li>Praticamente 2/3 do <math>Ca^{2+}</math> adicionado se ligou às proteínas.</li> <li><math>Ca^{2+}</math> adicionado promoveu alterações significativas nas propriedades das físico-químicas, dependendo diretamente do método de obtenção da <math>\alpha</math>-La, e da estrutura (apo ou holo).</li> </ul>	(BARONE <i>et al.</i> , 2020)
- pH - Modificações químicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analisar os efeitos nas propriedades funcionais da <math>\alpha</math>-La bovina após modificações químicas na estrutura por meio da adição covalente de ácidos graxos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácidos Graxos (AG): láurico, palmítico e esteárico</li> <li>pH: 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A esterificação aumentou a hidrofobicidade das proteínas e reduziu sua solubilidade.</li> <li>Para a <math>\alpha</math>-La nativa, quanto mais ácido o pH, observou-se aumento no teor de <math>\alpha</math>-hélices, redução na proporção de <i>random coils</i>, e manutenção da proporção de folhas-<math>\beta</math>.</li> <li>O pH 5,0 apresentou as piores características emulsificantes, provavelmente devido à sua proximidade com o PI da proteína.</li> <li>A capacidade espumante foi melhor em pH 3,0 e melhorou com o aumento das cadeias carbônicas lipofilizadas.</li> </ul>	(MENDOZA-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2019)

Variável	Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
- pH - Ca <sup>2+</sup> - Estresse físico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analisar o impacto do estresse de cisalhamento na agregação de <math>\alpha</math>-La e em suas propriedades de interface.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH: 4,3; 4,9; 5,5 e 6,1</li> <li>T: 25 e 90 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os valores de pH foram selecionados por estarem próximos ao PI da <math>\alpha</math>-La, com o intuito de aumentar a tendência de agregação, mas, mesmo assim, não foi observado agregação após estresse físico.</li> <li>A <math>\alpha</math>-La não demonstrou agregação ao entrar em contato com a interface ar/água.</li> <li>A <math>\alpha</math>-La apresentou instabilidade estrutural ao ser submetida a estresse térmico (pós-cisalhamento).</li> </ul>	(DUERKOP <i>et al.</i> , 2018)
- Ca <sup>2+</sup> - [ $\alpha$ -La]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Avaliar o efeito da elevação da concentração de <math>\alpha</math>-La e da presença do íon Ca<sup>2+</sup> na manutenção da estabilidade de fórmula infantil à base de leite submetida a tratamento térmico antes e após a homogeneização.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proporção de <math>\alpha</math>-La sobre o total de proteínas em cada emulsão: 12 %, 30 % e 48 %.</li> <li>pH: 6,8</li> <li>T: 100 °C/30s</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O aumento na concentração de <math>\alpha</math>-La reduziu a viscosidade da emulsão quando as emulsões foram elaboradas antes do tratamento térmico.</li> <li>Apesar da redução da viscosidade, houve uma redução significativa na formação de grandes agregados solúveis e redução do tamanho das gotículas mediante o aumento da concentração de <math>\alpha</math>-La, independente da presença ou não do íon de Ca<sup>2+</sup>, contribuindo para a redução da instabilidade da emulsão.</li> </ul>	(BUGGY <i>et al.</i> , 2017)
- pH - Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>Examinar o impacto de pré-tratamentos em diferentes pHs e temperaturas nas propriedades espumantes e interfaciais da <math>\alpha</math>-La.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH: 4,3 e 6,5</li> <li>T: 70 e 90 °C por 30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Em pH neutro, o tratamento térmico aumentou a capacidade espumante da <math>\alpha</math>-La, enquanto em pH 4,3 reduziu.</li> <li>Após o tratamento térmico, houve formação de agregados na interface ar-líquido, aumentando a estabilidade da espuma em relação à espuma formada a 20 °C.</li> </ul>	(LAJNAF <i>et al.</i> , 2017)
- [ $\alpha$ -La] - Fonte $\alpha$ -La - Presença caseína	<ul style="list-style-type: none"> <li>Avaliar a espumabilidade e atividade interfacial de misturas de caseína bovina e <math>\alpha</math>-La bovina e de camelo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH: 7,0</li> <li>M1: <math>\alpha</math>-La bovina +<math>\beta</math>-caseína</li> <li>M2: <math>\alpha</math>-La camelo +<math>\beta</math>-caseína</li> <li>M3:<math>\beta</math>-lactoglobulina+<math>\beta</math>-caseína</li> <li>Proporções: 100:75; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Melhores propriedades espumantes nos tratamentos com maior proporção de <math>\beta</math>-caseína, que se mostrou mais eficiente em se adsorver na interface ar/água e reduzir a tensão interfacial das espumas.</li> <li><math>\beta</math>-lactoglobulina bovina e BLG e <math>\alpha</math>-La de ambas as fontes apresentaram módulo viscoelástico elevado, atribuído a um efeito de empacotamento denso elevado, com fortes interações proteína/proteína na interface ar/água, resultando em um filme mais rígido e coeso.</li> </ul>	(LAJNAF <i>et al.</i> , 2016)

Variável	Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
- Ca <sup>2+</sup> - pH - Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar o efeito de pré-tratamentos de pH e de temperatura em ALA-1 e ALA-3 nas propriedades emulsificantes da <math>\alpha</math>-La</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fase lipídica: Óleo de canola</li> <li>Pré-tratamentos: <ul style="list-style-type: none"> <li>Apo-La e Holo-La</li> <li>pH: 5,0 e 7,0</li> <li>T: 25, 65 e 95 °C</li> <li>Tempo: 30 min</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O aumento da temperatura aumentou a superfície hidrofóbica exposta da <math>\alpha</math>-La</li> <li>O pH influenciou na carga superficial da proteína, aumentando a repulsão eletrostática em pH 7,0 e resultando em menor agregação</li> <li>Todas as emulsões foram mais estáveis em pH 7,0 do que em 5,0 devido a maior repulsão eletrostática entre as gotículas</li> <li>Apo-La pré-tratada a 65 °C e pH 7,0 apresentou as melhores propriedades emulsificantes.</li> </ul>	(LAM; NICKERSON, 2015)
- Temperatura - pH - Tempo - GMP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar a formação de estruturas supramoleculares entre <math>\alpha</math>-La e um glicomacropéptido (GMP) utilizando técnicas de acidificação e aquecimento e o efeito nas propriedades de espumabilidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Combinação: <ul style="list-style-type: none"> <li>T: 25, 75 e 50 °C</li> <li>pH: 3,5, 5,0 e 6,5</li> <li>tempo: 20, 30 e 40 min</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A estrutura supramolecular <math>\alpha</math>-La-GMP teve maior habilidade para aumentar o volume de espuma formado em temperatura e pH elevados.</li> <li>As propriedades emulsificantes não foram afetadas significativamente pelas variações de pH, tempo e temperatura em relação às estruturas nativas.</li> </ul>	(DINIZ <i>et al.</i> , 2014)
- Temperatura - pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar as alterações conformacionais na apo-<math>\alpha</math>-La induzidas por alterações no pH e na temperatura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>T: 25, 60, 65, 70, 75 e 80 °C.</li> <li>pH: 2,0, 4,5, 7,0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>De fato, a <math>\alpha</math>-La sem o Ca<sup>2+</sup> é sensível à variação de pH e temperatura.</li> <li>A proteína apresentou um estado conformacional mais flexível em valores de pH ácidos, favorecendo a exposição de resíduos hidrofóbicos .</li> </ul>	(STANCIUC <i>et al.</i> , 2012)
- Ca <sup>2+</sup> - Interface O/A	<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar a conformação e as dimensões estruturas da <math>\alpha</math>-La em solução e quando adsorvida em uma interface óleo-água.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fase lipídica: óleo + hexadecano</li> <li>Concentração: 0,3% (m/m)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O ambiente hidrofóbico dos resíduos de aminoácidos do interior da <math>\alpha</math>-La nativa foi significativamente alterado quando a proteína se aderiu à interface O/A, sugerindo um desdobramento devido à adsorção.</li> <li>Houve um aumento na proporção de estruturas <math>\alpha</math>-hélices e uma redução nas folhas-<math>\beta</math>.</li> <li>A <math>\alpha</math>-La alterou suas dimensões de 2,5nm-3,7nm em sua conformação nativa para uma camada densa e compacta de 1,1 nm na interface O/A.</li> </ul>	(ZHAI <i>et al.</i> , 2012)

Os trabalhos listados na Tabela 4 tratam, em suma, do comportamento tecnológico da  $\alpha$ -La com ou sem o cátion  $\text{Ca}^{2+}$  complexado à sua estrutura, submetida a diferentes condições de temperatura e pH, e em diferentes sistemas, como matrizes alimentares ou sistemas simulados *in vitro*, como emulsões e espumas. Para apontar possíveis alterações conformacionais, ou a ausência delas, na estrutura da  $\alpha$ -La e associar ao comportamento tecnológico observado. Todos os trabalhos utilizaram três grupos de metodologias principais: a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular e análises calorimétricas. Os resultados observados deixam claro que quando há variação na temperatura do meio, no pH do meio, na presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  complexado à estrutura da  $\alpha$ -La e, também, na composição salina do meio, houve alteração nas estruturas secundárias e terciárias da  $\alpha$ -La, impactando diretamente em sua conformação e, conseqüentemente, em seu comportamento dinâmico em solução e em seu uso tecnológico.

No entanto, por mais que estas metodologias comprovem as alterações conformacionais da  $\alpha$ -La, elas não são capazes de esclarecer como e onde estas alterações estão ocorrendo na estrutura da proteína, quais os resíduos envolvidos, quais os tipos de interações químicas foram desfeitas e quais foram criadas, por exemplo. Como já apresentado, metodologias *in silico* como a simulação de dinâmica molecular computacional pode ser um caminho para nos esclarecer o que, de fato, está acontecendo quimicamente e termodinamicamente na  $\alpha$ -La ao ponto de alterar suas propriedades técnico-funcionais e nos direcionar na proposição de alternativas que visem melhoria destas propriedades.

Como se sabe, a estrutura tridimensional disponibilizada da  $\alpha$ -La foi cristalizada por PIKE; BREW & ACHARYA (1996) e se encontra disponível no PDB desde 1996. Poucos anos depois, no ano 2000, CHRYSINA; BREW & ACHARYA (2000) disponibilizaram no Protein Data Bank uma nova estrutura da  $\alpha$ -La bovina, com resolução ainda mais refinada do que a anterior, porém, até o momento poucos são os trabalhos de dinâmica molecular envolvendo a  $\alpha$ -La bovina. Na Tabela 5 estão listados todos os trabalhos encontrados após extensa revisão bibliográfica, em que a estrutura da  $\alpha$ -La foi estudada utilizando-se simulações de dinâmica molecular computacional.

**Tabela 5 - Estudos acerca do comportamento dinâmico da  $\alpha$ -La bovina por meio de simulações de dinâmica molecular.**

Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudar o enovelamento incorreto da <math>\alpha</math>-La bovina, sua estabilidade e agregação na presença de diferentes três álcoois monohidratados (MeOH, EtOH, IPA( isopropyl alcohol/isopropanol)) com comprimento de cadeia hidrofóbica crescente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: CHARMM36</li> <li>Software: NAMD</li> <li>Estrutura: 1HFZ</li> <li>Tempo de simulação: 100 ns</li> <li>Temperatura: 25 °C</li> <li>pH 2,0</li> <li>Experimentos <i>in vitro</i>: SAXs, Dicroísmo Circular, Espectroscopia de Fluorescência e Microscopia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Um balanço entre a formação de H-bonds e interações hidrofóbicas guiaram enovelamento.</li> <li>Rg <math>\alpha</math>-La = 14.5 Å; <math>\alpha</math>-La +etanol = 15.2 Å; <math>\alpha</math>-La + outros álcoois = 21.5 Å.</li> <li>O número de H-bonds variou com a proporção do solvente (agua/álcool). As moléculas de água agiram de formas diferentes, como doadores ou receptores nas H-bonds, com aminoácidos polares. Houve uma competição entre o álcool e as moléculas de água para o estabelecimento de H-bonds.</li> <li>Independente do tipo de álcool utilizado, a monocamada de solvatação teve o número de moléculas de água reduzido em até 30% com a adição de qualquer tipo de álcool. Porém, observou-se maior proporção de moléculas de metanol do que de etanol na primeira camada de hidratação.</li> </ul>	(BUCCIARELLI <i>et al.</i> , 2020)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Examinar se o polifenol extraído de chá-verde (EGCG) se complexava à holo e apo-La em pH neutro e ácido, assim como observar se ele estabilizaria o estado de <i>molten globule</i> (MG) da proteína e como afetaria o sítio de ligação do Ca<sup>2+</sup>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: CHARMM27</li> <li>Software: NAMD</li> <li>Estrutura: 1F6S</li> <li>Tempo de simulação: 40 ns</li> <li>Temperatura: 37 °C</li> <li>pH: 1,2; 2,5 e 7,3</li> <li><i>Docking</i>: AutoDock Vina 1.1.2</li> <li>Experimentos <i>in vitro</i>: Espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Em pH 7,3 a EGCG não provocou mudanças na estrutura da apo-La.</li> <li>Em condições ácidas, ambas as estruturas sofreram drásticas alterações em sua estrutura terciária, assumindo a estrutura típica de um MG, mantendo parte de suas estruturas 2<sup>as</sup>, porém com alteração em sua conformação nativa.</li> <li>Complexada com o EGCG a apo-La demonstrou maior estabilidade.</li> <li>A remoção do Ca<sup>2+</sup> resultou em um aumento de flexibilidade na região do sítio ativo, da hélice H3 e da extremidade C-terminal, com aumento de rigidez na região das folhas-<math>\beta</math>.</li> <li>No complexo apo-La-EGCG, o ligante estabilizou a região responsável por complexar o Ca<sup>2+</sup> (removido previamente), indicando que o EGCG pode reverter a perda de estabilidade promovida pela retirada desse cátion.</li> <li>O resíduo Tyr103 mudou sua orientação e as interações mediadas por moléculas de água com os resíduos Gln54 e Asn56 foram substituídas por H-bonds diretas resultando, como consequência, em uma separação dos domínios <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> devido à abertura da cavidade na apo-La. A adição do EGCG e sua complexação nessa região provocou o retorno da cavidade para uma posição mais fechada.</li> </ul>	(RADIBRATOVIC <i>et al.</i> , 2019)

Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
<ul style="list-style-type: none"> <li>Analisar o efeito de alta pressão nas interações entre <math>\alpha</math>-La e a antocianina pelargonidina-3-glucosídeo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: Amber 99sb-ildn</li> <li>Software: Gromacs</li> <li>Estrutura: não mencionada</li> <li>Tempo de simulação: 30 ns</li> <li>Temperatura: 25 °C</li> <li>pH: 6,0; 7,4; 8,0</li> <li>Docking: AutoDock Vina 1.1.2</li> <li>Pressão: 0.1 100, 300 e 500 MPa</li> <li>Experimentos <i>in vitro</i>: Espectroscopia de fluorescência.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A elevada pressão aumentou significativamente as constantes de ligação a pH 7,4 e pH8,0.</li> <li>A principal pose identificada pelo autor interagiu no sítio de ligação do <math>\text{Ca}^{2+}</math> e com resíduos de Tyr103 e Trp104, reduzindo a emissão de fluorescência.</li> <li>Não foram observadas alterações nas alfa-hélices durante as simulações, porém alguns loops se alteraram significativamente com a variação de pressão.</li> <li>Com o aumento da pressão, houve uma redução de Rg, mas com elevada flutuação residual.</li> <li>A alta pressão não alterou o sítio de ligação da antocianina. As interações do tipo H-bonds e <math>\pi</math>-<math>\pi</math> governaram a formação do complexo.</li> <li>As cargas parciais dos resíduos de histidina tiveram foram afetadas pela variação de pH e pela alta pressão, interferindo diretamente nas interações com o ligante, interações essas essencialmente do tipo ligações de hidrogênio e hidrofóbicas.</li> </ul>	(ZOU <i>et al.</i> , 2019)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar a influência da isomerização do resveratrol nas interações com diferentes proteínas, como, por exemplo, a <math>\alpha</math>-La bovina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: Amber 99sb-ildn</li> <li>Software: Gromacs</li> <li>Estrutura: 1F6S</li> <li>Tempo de simulação: 100 ns</li> <li>Temperatura: 25 °C</li> <li>pH: 7,4</li> <li>Docking: AutoDock Vina 1.1.2</li> <li>Experimentos <i>in vitro</i>: Espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e atividade antioxidante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A simulação de dinâmica molecular foi executada apenas para preparar a estrutura da proteína receptora para a etapa de <i>docking</i>.</li> <li>Cis-resveratrol se complexou mais favoravelmente na cavidade entre os domínios <math>\alpha</math> e <math>\beta</math>, interagindo com resíduos Trp60 e Trp104. Uma segunda pose se complexou em outra região, mais próxima ao resíduo Trp118.</li> <li>Trans-Rrsveratrol se complexou mais favoravelmente próximo aos resíduos de Trp104. A segunda pose mais favorável se complexou próximo aos resíduos de Tyr 36 e Trp118.</li> <li>Interações do tipo <math>\pi</math>-<math>\pi</math> com o resíduo de Phe31 foram consideradas as principais interações estabilizadoras do complexo com o trans-resveratrol.</li> </ul>	(CHENG <i>et al.</i> , 2018)

Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar o mecanismo de ação da arginina na conformação e estabilidade da <math>\alpha</math>-La bovina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: CHARMM27</li> <li>Software: Gromacs</li> <li>Estrutura: 1HFX</li> <li>Tempo de simulação: 100 ns</li> <li>Temperatura: 60 °C</li> <li>pH: 7,0</li> <li>Experimentos <i>in vitro</i>: Espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria exploratória diferencial, calorimetria de titulação isotérmica e espalhamento de luz dinâmico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O ITC indicou a formação termodinamicamente favorável de interações exotérmicas entre arginina e <math>\alpha</math>-La.</li> <li>Não foram observadas alterações conformacionais significativas durante a dinâmica molecular. A estrutura 2ª da ALA permaneceu inalterada.</li> <li>Por outro lado, o RDF entre a <math>\alpha</math>-La e as moléculas de arginina, indicou que a arginina interage fortemente com a <math>\alpha</math>-La, por meio de seus grupamentos guanidina, <math>\text{NH}_3^+</math> e <math>\text{COO}^-</math>. O número de H-bonds calculadas entre os grupos <math>\text{NH}_3^+</math>, <math>\text{COO}^-</math> e guanidina com a proteína foram 10, 10 e 44, respectivamente, ressaltando a importância da guanidina para a formação de complexos Arg- <math>\alpha</math>-La.</li> <li>Observou-se que os resíduos carregados negativamente Asp e Glu possuíam elevada tendência para interagir com o grupo guanidina da arginina, enquanto os resíduos hidrofílicos Asn e Gln possuíam tendência intermediária e os resíduos aromáticos como Phe e Trp baixa tendência à interação.</li> </ul>	(KUMAR; KISHORE, 2014)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Investigar possíveis rearranjos da estrutura da <math>\alpha</math>-La bovina sem suas quatro pontes dissulfeto nativas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campo de força: Gromos53a6 com parâmetros de restrição de tamanho para as ligações dissulfeto excluídos</li> <li>Software: Gromos</li> <li>Estrutura: 1HFZ</li> <li>Tempo de simulação: 20 ns</li> <li>Temperatura: 25, 79 e 100 °C</li> <li>pH: neutro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A conformação nativa foi conservada durante todo o período de simulação 25 °C. O valor de RMSD convergiu para aproximadamente 3.8 Å.</li> <li>A 25 °C as folhas-<math>\beta</math> e demais <math>\alpha</math>-hélices se mantiveram estáveis.</li> <li>Para as temperaturas mais elevadas (79 e 100 °C) a estrutura apresentou grandes desvios em relação à conformação inicial, com RMSD superiores a 10 Å para as duas temperaturas.</li> <li>Para a temperatura de 100 °C, a estrutura terciária foi precocemente perdida, entre 5 e 10 ns de simulação.</li> <li>Houve uma manutenção parcial das estruturas secundárias, observadas por meio da manutenção das interações de hidrogênio características.</li> <li>Nas temperaturas de 79 e 100 °C, a estabilidade das <math>\alpha</math>-hélices foi drasticamente reduzida. A hélice H3 foi completamente perdida. As folhas-<math>\beta</math> mostraram elevada estabilidade, sendo perdidas e reestabelecidas por diversas vezes durante a simulação. Após 5 ns de simulação o íon de <math>\text{Ca}^{2+}</math> deixou a estrutura e ficou livre no solvente.</li> </ul>	(SCHMID <i>et al.</i> , 2008)

Objetivo	Condições de análise	Resultados	Referência
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Investigar a dinâmica da <math>\alpha</math>-La bovina dispersa em meio aquoso no estado nativo e no estado de <i>molten globule</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Campo de força: CHARMM22</li> <li>▪ Software: Gromacs</li> <li>▪ Estrutura: 1F6S com e sem o cátion <math>\text{Ca}^{2+}</math></li> <li>▪ Tempo de simulação: 2 ns</li> <li>▪ Temperatura: 27 °C e 227 °C (para atingir o estado de <i>molten globule</i>, segundo o autor)</li> <li>▪ pH: neutralidade</li> <li>▪ Experimento <i>in vitro</i>: espalhamento “quasielastic” de nêutrons.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No geral, houve uma boa correlação em os valores calculados <i>in vitro</i> e simulados.</li> <li>▪ Ao atingir o estado de <i>molten globule</i>, observou-se um aumento de 9% no raio de giro, conservação das <math>\alpha</math>-hélices do domínio <math>\alpha</math> e a perda das folhas-<math>\beta</math>.</li> <li>▪ RMSF: Elevadas flutuações foram observadas para os resíduos da região C-terminal, assim como nas folhas-<math>\beta</math>, atingindo a 27 °C flutuações superiores à 4 Å.</li> </ul>	<p>(TAREK; NEUMANN; TOBIAS, 2003)</p>

Por meio da Tabela 5 é possível notar que as simulações de dinâmica molecular podem ser utilizadas em um amplo espectro de análises e com objetivos diversos para uma mesma proteína. Apenas em relação à  $\alpha$ -La, as simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para estudar o seu enovelamento incorreto em algumas condições, sua estabilidade e também mecanismos de agregação (BUCCIARELLI *et al.*, 2020); sua habilidade em se complexar a diferentes moléculas, os locais onde há maior tendência de se formar complexos de acordo com a natureza do ligante, e como isso afeta sua conformação nativa (CHENG *et al.*, 2018; RADIBRATOVIC *et al.*, 2019); analisar variações conformacionais significativas promovidas por alterações em variáveis físicas do sistema como pressão (TAREK; NEUMANN; TOBIAS, 2003; ZOU *et al.*, 2019); investigar a nível atômico o mecanismo de ação de agentes desnaturantes como, por exemplo, a arginina (KUMAR; KISHORE, 2014); e, até mesmo, analisar como a estrutura se comporta sem suas quatro pontes dissulfeto quando submetidas a diferentes temperaturas (SCHMID *et al.*, 2008).

Interessante notar que com o aumento da capacidade de processamento computacional ao longo dos anos, houve também um aumento da amostragem nos experimentos de dinâmica molecular envolvendo a  $\alpha$ -La, com trajetórias de 2 ns em 2003 (TAREK; NEUMANN; TOBIAS, 2003), 20 ns em 2008 (SCHMID *et al.*, 2008) e, por fim, 100 ns a partir de 2014 (BUCCIARELLI *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2018; KUMAR; KISHORE, 2014). Trajetórias maiores podem nos mostrar resultados melhores para alguns fenômenos que, naturalmente, demandam mais tempo para acontecer, como, por exemplo, o desenovelamento proteico ou mesmo a desestabilização de suas estruturas secundárias e terciárias até atingir um estado de *molten globule*.

### 3.5.3. Questões em aberto

Apesar do grande número de trabalhos referentes às propriedades tecnológicas de interface da  $\alpha$ -La publicados nos últimos 30 anos (Tabela 4) e da grande versatilidade das simulações de dinâmica molecular, que possuem capacidade de descrever em detalhes e em nível molecular o comportamento estrutural de uma proteína submetida a diferentes condições de análise (Tabela 5), não se tem, até o momento, um estudo com esse nível de profundidade em que o objetivo central seja compreender as bases moleculares das propriedades tecnológicas de interface da  $\alpha$ -La. Acreditamos que as simulações de dinâmica molecular podem nos auxiliar a esclarecer alguns questionamentos não esclarecidos pelos resultados obtidos nos trabalhos apresentados na Tabela 4, como, por exemplo: “De que forma a temperatura e a presença ou ausência do cátion  $\text{Ca}^{2+}$  afetaram a termoestabilidade da  $\alpha$ -La?”;

“Conforme indicado pelos experimentos de dicroísmo circular, quando submetida a variações de temperatura e pH, quais são as interações que se desfazem e resultam em perdas de algumas estruturas secundárias?”; “Qual a sequencia de alterações estruturais promovida por pH e temperatura extremos?”; e, por fim, “Qual a correlação entre tais informações e as propriedades tecnológicas de interface da  $\alpha$ -La?”.

### 3.6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, Mahmoud *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 66, p. 91–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.006>>.
- ABRAHAM, Mark *et al.* *GROMACS User Manual*. [S.l.: s.n.], 2005. v. 18. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768541>>.
- ALLEN, William J. *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *Journal of Computational Chemistry*, v. 36, n. 15, p. 1132–1156, 2015.
- ALLINGER, Norman L. Understanding molecular structure from molecular mechanics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 25, n. 4, p. 295–316, 2011.
- ALLINGER, Norman L.; YUH, Young H.; LII, Jenn-Huei. Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 23, n. 1, p. 8551–8566, 1989.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics — 2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, v. 137, n. 12, p. e67–e492, 2018.
- AVIAT, Félix; LAGARDÈRE, Louis; PIQUEMAL, Jean Philip. The truncated conjugate gradient (TCG), a non-iterative/fixed-cost strategy for computing polarization in molecular dynamics: Fast evaluation of analytical forces. *Journal of Chemical Physics*, v. 147, n. 16, p. 161724:1–9, 2017.
- BACON, J. R. *et al.* Characterization of the foaming properties of lysozymes and  $\alpha$ -lactalbumins: a structural evaluation. *Food Hydrocolloids*, v. 2, n. 3, p. 225–245, 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80020-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80020-1)>.
- BARBANA, Chockry; PÉREZ, María Dolores. Interaction of  $\alpha$ -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties - A review. *International Dairy Journal*, v. 21, n. 10, p. 727–741, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.009>>.
- BARONE, Giovanni *et al.* Influence of calcium fortification on physicochemical properties of whey protein concentrate solutions enriched in  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chemistry*, v. 317, p. 126412, 2020.
- BOS, Martin A; VLIET, Ton Van. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 91, p. 437–471, 2001.
- BRANDELLI, Adriano; DAROIT, Daniel Joner; CORRÊA, Ana Paula Folmer. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, v. 73, p. 149–161, 2015.
- BROOKS, Bernard R. *et al.* CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.
- BUCCIARELLI, Saskia *et al.* Disentangling the role of solvent polarity and protein solvation in folding and self-assembly of a  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 561, p. 749–761, 2020.
- BUENO-GAVILÁ, E *et al.* Bioactivity of hydrolysates obtained from bovine casein using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 12, p. 10711–10723, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16596>>.
- BUGGY, Aoife K *et al.* Stabilising effect of  $\alpha$ -lactalbumin on concentrated infant milk formula

- emulsions heat treated pre- or post-homogenisation. *Dairy Science & Technology*, v. 96, p. 845–859, 2017.
- CAREY, Robert M. The Intrarenal Renin-Angiotensin System in Hypertension. v. 22, n. 3, p. 204–210, 2015.
- CASTRO, Ruann Janser Soares De *et al.* Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, v. 14, n. April, p. 17–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>>.
- CASTRO, Ruann Janser Soares; SATO, Hélia Harumi. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, v. 74, p. 185–198, 2015.
- CAVALIERE, Francesca; LORENZETTI, Stefano; COZZINI, Pietro. Molecular modelling methods in food safety: Bisphenols as case study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 137, p. 111116, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111116>>.
- CHAN, Y.-J.; EWINS, D. J. A Comprehensive Procedure to Estimate the Probability of Extreme Vibration Levels Due to Mistuning. *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, v. 132, n. 10, p. 112505:1–8, 2010.
- CHEN, Li *et al.* Collaborative optimization and molecular docking exploration of novel ACE-inhibitory peptides from bovine milk by complex proteases hydrolysis. *Journal Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 48, n. 1, p. 180–187, 2020.
- CHENG, Hao *et al.* Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin or  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, v. 81, p. 242–252, 2018.
- CHRYSINA, Evangelia D; BREW, Keith; ACHARYA, K Ravi. Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine  $\alpha$ -Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions \*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 47, p. 37021–37029, 2000.
- CONNOLLY, Michael L. Analytical molecular surface calculation. *Journal of Applied Crystallography*, v. 16, p. 548–558, 1983.
- CORNEC, Michel; KIM, Dennis A; NARSIMHAN, Ganesan. Adsorption dynamics and interfacial properties of  $\alpha$ -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interface. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 303–313, 2001.
- CORRONS, Maria Alicia *et al.* ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Research International*, v. 93, p. 8–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.003>>.
- DADAR, Maryam *et al.* Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*, v. 68, n. 2, p. 125–145, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1208-x>>.
- DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. *Fennema's food chemistry*. 5. ed. [S.l.: s.n.], 2017.
- DAVIS, Sergio *et al.* Las palmeras molecular dynamics: A flexible and modular molecular dynamics code. *Computer Physics Communications*, v. 181, n. 12, p. 2126–2139, 2010.
- DE OLIVEIRA, Ana Paula Hanke *et al.* Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 603, 2020.
- DE OLIVEIRA, Eduardo B. *et al.* A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 96–105, 2009.
- DE VIVO, Marco *et al.* Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 2016.

- DIAS, Raquel; AZEVEDO JR., Walter Filgueira De. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, v. 9, p. 1040–1047, 2008.
- DINIZ, Renata Silva *et al.* Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. *Food Research International*, v. 64, p. 157–165, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.079>>.
- DUERKOP, Mark *et al.* Impact of Cavitation, High Shear Stress and Air/Liquid Interfaces on Protein Aggregation. *Biotechnology Journal*, v. 13, p. 1–9, 2018.
- ELLOUZE, Maroua *et al.* Camel  $\alpha$ -lactalbumin at the oil-water interface: Effect of protein concentration and pH change on surface characteristics and emulsifying properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 189, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110654>>.
- EYNARD, Lucia *et al.* Surface Hydrophobicity Changes and Heat-Induced Modifications of  $\alpha$ -Lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 1731–1736, 1992.
- FAN, Linlin *et al.* Influences of mannosylerythritol lipid-A on the self-assembling structure formation and functional properties of heat-induced  $\beta$ -lactoglobulin aggregates. *Food Hydrocolloids*, v. 96, p. 310–321, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.033>>.
- FERREIRA, Leonardo G. *et al.* *Molecular docking and structure-based drug design strategies*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 20.
- FISCHER, Peter; WU, Hua. Morphological transitions in dilute solutions of sugar-based zwitterionic dimer betaine surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 326, n. 1–2, p. 103–108, 2008.
- FIXMAN, Marshall. Radius of gyration of polymer chains. *The Journal of Chemical Physics*, v. 36, n. 2, p. 306–310, 1962.
- FOEGEDING, E Allen; DAVIS, Jack P. Food protein functionality: A comprehensive approach. 2011. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0268005X11001640/1-s2.0-S0268005X11001640-main.pdf?\\_tid=7835f385-6d25-4499-b632-dde9a9bcc0b5&acdnat=1527682386\\_748bda92bd43e652fe558ff8bcec91c8](https://ac.els-cdn.com/S0268005X11001640/1-s2.0-S0268005X11001640-main.pdf?_tid=7835f385-6d25-4499-b632-dde9a9bcc0b5&acdnat=1527682386_748bda92bd43e652fe558ff8bcec91c8)>. Acesso em: 30 maio 2018.
- FRIEDMAN, Ran; BOYE, Kjetil; FLATMARK, Kjersti. Molecular modelling and simulations in cancer research. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1836, n. 1, p. 1–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.02.001>>.
- GARCÍA-MORA, Patricia *et al.* Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, v. 221, p. 464–472, 2017.
- GHEONEA, Ionica *et al.* Binding mechanisms between lycopene extracted from tomato peels and bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Luminescence*, v. 203, p. 582–589, 2018.
- GIROMINI, Carlotta *et al.* In vitro-digested milk proteins: Evaluation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities, peptidomic profile, and mucin gene expression in HT29-MTX cells. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 12, p. 10760–10771, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16833>>.
- GISSINGER, Jacob R.; JENSEN, Benjamin D.; WISE, Kristopher E. Modeling chemical reactions in classical molecular dynamics simulations. *Polymer*, v. 128, p. 211–217, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386117309114>>.
- GRIFONI, Alba *et al.* Theory A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2 Theory A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002>>.

- GU, Yuchen; WU, Jianping. The potential of antioxidative and anti-inflammatory peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Food Science*, v. 8, p. 25–32, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.011>>.
- GUIZADO, Teobaldo Ricardo Cuya. *ESTUDOS COMPUTACIONAIS DA INTERAÇÃO DE PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS DE FERRO COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA*. [S.l.: s.n.], 2008.
- HABASAKI, Junko; NGAI, K. L. Heterogeneous dynamics in nanoporous materials examined by molecular dynamics simulations -effects of modification of caged ion dynamics-. *Journal of Non-Crystalline Solids*, n. March, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.03.026>>.
- HENDRIX, Tonya; GRIKO, Yuri V; PRIVALOV, Peter L. A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, v. 84, p. 27–34, 2000.
- HINDERINK, Emma B.A. *et al.* Behavior of plant-dairy protein blends at air-water and oil-water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 192, p. 111015, 2020.
- HIROTA, T *et al.* Milk Casein-Derived Tripeptides , VPP and IPP Induced NO Production in Cultured Endothelial Cells and Endothelium-Dependent Relaxation of Isolated Aortic Rings. *Heart Vessels*, v. 26, n. 5, p. 549–556, 2011.
- HOLT, C. *et al.* Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 1–20, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213005705>>.
- HOSPITAL, Adam *et al.* Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, v. 8, p. 37–47, 2015.
- HU, Xuefei *et al.* Anti-inflammatory activity of extensively hydrolyzed casein is mediated by granzyme B. *Inflammation Research*, v. 68, n. 8, p. 715–722, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01254-8>>.
- HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of molecular graphics*, v. 14, n. October 1995, p. 33–38, 1996. Disponível em: <<https://www.tapbiosystems.com/tap/products/index.htm>>.
- HUPPERTZ, T; FOX, P F; KELLY, A L. *The caseins: Structure, stability, and functionality*. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>>.
- IBANOGLU, Esra; IBANOGLU, Şenol. Foaming behaviour of EDTA-treated  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chemistry*, v. 66, p. 477–481, 1999.
- IBRAHIM, Hisham R; ISONO, Hiroki; MIYATA, Takeshi. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition Journal*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.004>>.
- JALKUTE, Balbhim Chidambar *et al.* Molecular Dynamics Simulation and Molecular Docking Studies of Angiotensin Converting Enzyme with Inhibitor Lisinopril and Amyloid Beta Peptide. *The Protein Journal*, v. 32, p. 356–364, 2013.
- JEGASOTHY, Hema; BENNETT, Louise; STOCKMANN, Regine. Interactions of  $\alpha$ -ionone ,  $\beta$ -ionone and vanillin with the primary genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, v. 47, p. 46–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.006>>.
- JENSEN, Pernille Foged *et al.* Structure and Dynamics of a Promiscuous Xanthan Lyase from *Paenibacillus nanensis* and the Design of Variants with Increased Stability and Activity. *Cell Chemical Biology*, v. 26, n. 2, p. 191–202, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.016>>.

- JIANG, Yi; YIN, Wanchao; XU, H. Eric. RNA-dependent RNA polymerase: Structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. In Press, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.116>>.
- JIANG, Zhanmei *et al.* Comparison of interaction between three similar chalconoids and  $\alpha$ -lactalbumin: Impact on structure and functionality of  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Research International*, v. 131, p. 1–16, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109006>>.
- JORGENSEN, William L; MAXWELL, David S; TIRADO-RIVES, Julian. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 15, p. 11225–11236, 1996.
- KARPLUS, Martin; MCCAMMON, Ja Andrew. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nsb0902-646>>.
- KIM, Youngchang *et al.* Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2 Youngchang. *BioRxiv*, p. 1–18, 2020.
- KITCHEN, Douglas B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews*, v. 3, p. 935–949, 2004. Disponível em: <[https://content.sakai.rutgers.edu/access/content/user/kparis/biomaps\\_513\\_references/10\\_B\\_01\\_NatRevDrugDisc3\\_935.pdf](https://content.sakai.rutgers.edu/access/content/user/kparis/biomaps_513_references/10_B_01_NatRevDrugDisc3_935.pdf)>. Acesso em: 6 abr. 2018.
- KRISHNA, Rajamani; VAN BATEN, Jasper M. Using Molecular Dynamics simulations for elucidation of molecular traffic in ordered crystalline microporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 258, p. 151–169, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.09.014>>.
- KRONMAN, Martin J. Metal-ion binding and the molecular conformational properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, n. 6, p. 565–667, 1989.
- KUMAR, Narendra; KISHORE, Nand. Arginine inhibits aggregation of  $\alpha$ -lactalbumin but also decreases its stability: Calorimetric, spectroscopic, and molecular dynamics studies. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 78, p. 159–166, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2014.06.024>>.
- KUNTZ, Irwin D *et al.* A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *Journal of Molecular Biology*, v. 161, p. 269–288, 1982.
- LAJNAF, Roua *et al.* Foaming and adsorption behavior of bovine and camel proteins mixed layers at the air/water interface. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v. 151, p. 287–294, 2016.
- LAJNAF, Roua *et al.* The effect of pH and heat treatments on the foaming properties of purified  $\alpha$ -lactalbumin from camel milk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 156, p. 55–61, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.002>>.
- LAM, Ricky S H; NICKERSON, Michael T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chemistry*, v. 173, p. 163–170, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.078>>.
- LEACH, Andrew R. *Molecular Modelling - Principles and Applications*. 2. ed. Harlow, England: Pearson Education Limited, 2001.
- LEE, B.; RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *Journal of Molecular Biology*, v. 55, p. 379–400, 1971.
- LEMKUL, Justin. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the

- GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. *Living Journal of Computational Molecular Science*, v. 1, n. 1, p. 0–53, 2018.
- LEMKUL, Justin A; ALLEN, William J; BEVAN, David R. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 50, p. 2221–2235, 2010.
- LEVINTHAL, Cyrus *et al.* Hemoglobin Interaction in Sickle Cell Fibers I: Theoretical Approaches to the Molecular Contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, n. 4, p. 1330–1334, 1976.
- LI-CHAN, E.C.Y.; LACROIX, I.M.E. Properties of proteins in food systems: An introduction. *Proteins in Food Processing*. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 1–25. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081007228000024>>. Acesso em: 30 maio 2018.
- LI, Hongjian *et al.* Machine-learning scoring functions for structure-based drug lead optimization. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, v. 10, n. 5, p. 1–20, 2020.
- LIANG, Yichao *et al.* The heat stability of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions: A review. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 28, p. 63–73, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.007>>.
- LIFSON, S.; WAESHEL, A. Consistent force field for calculations of conformations, vibrational spectra, and enthalpies of cycloalkane and n-alkane molecules. *The Journal of Chemical Physics*, v. 49, n. 11, p. 5104–5107, 1968.
- LIN, Kai *et al.* Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. *Journal of Functional Foods*, v. 32, p. 266–277, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.008>>.
- LOI, Chia Chun; EYRES, Graham T; BIRCH, E John. Protein-Stabilised Emulsions. p. 2002–2007, 2018.
- LUCEY, John A; HORNE, David S. Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, v. 85, p. 56–65, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.010>>.
- MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, Martin. Dynamics of folded proteins. *Nature*, v. 267, n. 16, p. 585–590, 1977.
- MCCLEMENTS, David Julian. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MEINHART, Adriana D. *et al.* Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. *Talanta*, v. 85, n. 1, p. 237–244, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.056>>.
- MENDOZA-SÁNCHEZ, Liliana *et al.* Chemical Lipophilization of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin with Saturated Fatty Acyl Residues: Effect on Structure and Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, p. 3256–3265, 2019.
- MENEKSEDAG-EROL, Deniz; TANG, Tian; ULUDAĞ, Hasan. Molecular modeling of polynucleotide complexes. *Biomaterials*, v. 35, n. 25, p. 7068–7076, 2014.
- MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; EHSANI, Reza Mohamad. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 26, n. 2, p. 696–705, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.008>>.
- MORRIS, Garrett M *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

- Disponível em:  
[https://s3.amazonaws.com/objects.readcube.com/articles/downloaded/wiley/f90dd0263b9286e38a792f31b3c56888dc9270fbbc16976b5b83f8a1c6d99c29.pdf?X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIS5LBPCM5JPOCDGQ%2F20180406%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4\\_request&](https://s3.amazonaws.com/objects.readcube.com/articles/downloaded/wiley/f90dd0263b9286e38a792f31b3c56888dc9270fbbc16976b5b83f8a1c6d99c29.pdf?X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIS5LBPCM5JPOCDGQ%2F20180406%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&). Acesso em: 6 abr. 2018.
- MURRAY, Brent S. Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 7, n. 5–6, p. 426–431, 2002.
- MURRAY, Brent S. Recent developments in food foams. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 50, p. 101394, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.101394>.
- NATESH, Ramanathan *et al.* Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme - lisinopril complex. v. 421, p. 551–554, 2003.
- NCD RISK, Factor Collaboration. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet*, v. 389, n. 10064, p. 37–55, 2017.
- OLIVEIRA, Eduardo Basílio De. *Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonoïdes catalysées par des lipases: influence des structures de la lipase et du flavonoïde sur la régiosélectivité de la bioconversion*. 2009. 203 f. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009.
- ONO, Fumie *et al.* Improvement in predicting drug sensitivity changes associated with protein mutations using a molecular dynamics based alchemical mutation method. *Scientific Reports*, p. 1–10, 2020.
- OOSTENBRINK, Chris *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, p. 1656–1676, 2004.
- OOSTENBRINK, Chris *et al.* Validation of the 53A6 GROMOS force field. *European Biophysics Journal*, v. 34, p. 273–284, 2005.
- PANDEY, Kumar Rajan *et al.* Immunoselective algorithm to devise multi-epitope subunit vaccine fighting against human cytomegalovirus infection. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 82, p. 104282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104282>.
- PATEL, Seema *et al.* ScienceDirect Renin-angiotensin-aldosterone ( RAAS ): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, v. 94, p. 317–325, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>.
- PERAMO, Antonio. Molecular dynamics studies show solvation structure of type III antifreeze protein is disrupted at low pH. *Computational Biology and Chemistry*, v. 73, p. 13–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.01.006>.
- PEREIRA, Paula C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.
- PERMYAKOV, Eugene A *et al.* Disorder in Milk Proteins :  $\alpha$ -Lactalbumin . Part C . Peculiarities of Metal Binding Disorder in Milk Proteins :  $\alpha$  -Lactalbumin . Part C . Peculiarities of Metal Binding. *Current Protein and Peptide Science*, v. 17, n. May, p. 1–11, 2016.
- PIECZYWEK, P M *et al.* Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. *Food Hydrocolloids*, v. 104, p. 105726, 2020.
- PIKE, Ashley CW; BREW, Keith; ACHARYA, K Ravi. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine  $\alpha$ -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure*, v. 4, n. 6, p. 691–703, 1996.

- POLÊTO, Marcelo D. *et al.* Role of structural ions on the dynamics of the *Pseudomonas fluorescens* 07A metalloprotease. *Food Chemistry*, v. 286, n. February, p. 309–315, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.204>>.
- PURUP, Stig *et al.* Wound Healing Properties of Commercial Milk Hydrolysates in Intestinal Cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 25, n. 2, p. 483–491, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10989-018-9692-y>>.
- QAYUM, Abdul *et al.* Characterization and comparison of  $\alpha$ -lactalbumin pre-and post-emulsion. *Journal of Food Engineering*, v. 269, p. 109743, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109743>>.
- QI, Chunyan *et al.* Molecular mechanism of interactions between inhibitory tripeptide GEF and angiotensin-converting enzyme in aqueous solutions by molecular dynamic simulations. *Journal of Molecular Liquids*, v. 249, p. 389–396, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.033>>.
- RADIBRATOVIC, Milica *et al.* Stabilization of apo- $\alpha$ -lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: Experimental and molecular dynamics study. *Food Chemistry*, v. 278, p. 388–395, 2019.
- RELKIN, P; LAUNAY, B; EYNARD, L. Effect of Sodium and Calcium Addition on Thermal Denaturation of Apo-a-Lactalbumin: a Differential Scanning Calorimetric Study. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 1, p. 36–47, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77321-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77321-X)>.
- RHEINBERGER, Timo; WOLF, Thomas; WURM, Frederik R. Nonionic surfactants based on amphiphilic polyphosphonate copolymers prepared via anionic ring-opening copolymerization. *European Polymer Journal*, v. 131, n. March, p. 109700, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109700>>.
- RYDZEWSKI, J.; NOWAK, W. Ligand diffusion in proteins via enhanced sampling in molecular dynamics. *Physics of Life Reviews*, v. 22–23, p. 58–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plrev.2017.03.003>>.
- SALSBURY, Alexa M; LEMKUL, Justin A. Molecular Dynamics Simulations of the c-kit1 Promoter G-Quadruplex: Importance of Electronic Polarization on Stability and Cooperative Ion Binding. *Journal of Physical Chemistry*, v. 123, p. 148–159, 2019.
- SANTOS, Igor J Boggione *et al.* Conjugates of  $\alpha$ -lactalbumin ,  $\beta$ -lactoglobulin , and lysozyme with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. *Food Research International*, v. 116, p. 492–498, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.065>>.
- SCHILLER, Ulf D. An overview of integration schemes for molecular dynamics simulations. n. March, p. 1–10, 2008. Disponível em: <[http://www.mpi-mainz.mpg.de/~andrienk/journal\\_club/integrators.pdf](http://www.mpi-mainz.mpg.de/~andrienk/journal_club/integrators.pdf)>.
- SCHMID, Nathan *et al.* Disulfide bond shuffling in bovine  $\alpha$ -lactalbumin: MD simulation confirms experiment. *Biochemistry*, v. 47, p. 12104–12107, 2008.
- SCHRÖDER, Anja *et al.* Food Hydrocolloids Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O / W emulsion stability. *Food hydrocolloids*, v. 73, p. 129–140, 2017.
- SHEWCHUK, Jonathan Richard. An Introduction to the Conjugate Gradient Method Without the Agonizing Pain. *Science*, v. 49, n. CS-94-125, p. 64, 1994. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.110.418&rep=rep1&type=pdf%5Cnhttp://www.cs.cmu.edu/~quake-papers/painless-conjugate-gradient.pdf>>.
- SHI, Aimin *et al.* Isolation, purification and molecular mechanism of a peanut protein-derived ACE-inhibitory peptide. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. 23–25, 2014.

- ŚLEDŹ, Paweł; CAFLISCH, Amedeo. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 48, p. 93–102, 2018.
- SORIN, Eric J.; PANDE, Vijay S. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 4, p. 2472–2493, 2005.
- SOWMYA, Kandukuri *et al.* Buffalo Milk Casein Derived Decapeptide (YQEPVLGPVR) Having Bifunctional Anti-inflammatory and Antioxidative Features Under Cellular Milieu. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 25, n. 2, p. 623–633, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10989-018-9708-7>>.
- STANCIUC, N *et al.* pH and heat-induced structural changes of bovine apo-a-lactalbumin. *Food Chemistry*, v. 131, p. 956–963, 2012.
- SWAIN, Bikash C *et al.* Biophysical study on complex formation between  $\beta$ -Lactoglobulin and vitamin B12. *Food Chemistry*, v. 312, p. 126064, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126064>>.
- TAREK, Mounir; NEUMANN, Dan A.; TOBIAS, Douglas J. Characterization of sub-nanosecond dynamics of the molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin using quasielastic neutron scattering and molecular dynamics simulations. *Chemical Physics*, v. 292, p. 435–443, 2003.
- TESSARO, Francesca; SCAPOZZA, Leonardo. How “Protein-Docking” Translates into the New Emerging Field of Docking Small Molecules to Nucleic Acids? *Molecules*, v. 25, p. 1–16, 2020.
- THOMPSON, Abby; BOLAND, Mike; SINGH, Harjinder. Book review: Milk Proteins: From Expression to Food. *American Journal of Human Biology*, v. 21, n. 6, p. 852–853, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ajhb.20972>>.
- TU, Maolin *et al.* Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, v. 256, n. October 2017, p. 98–104, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.107>>.
- VAN GUNSTEREN, W. F. *No Title.* Disponível em: <<http://www.gromos.net/page.pl?page=about>>.
- VERLET, Loup. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.
- VERLI, Hugo. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. 1. ed. São Paulo: [s.n.], 2014.
- VLACHAKIS, Dimitrios *et al.* *Current State-of-the-Art Molecular Dynamics Methods and Applications*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2014. v. 94. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00007-X>>.
- WALLS, Alexandra C *et al.* Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>>.
- WANG, Junmei *et al.* Development and testing of a general Amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.
- WANG, Xiuming *et al.* A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein : Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT - Food Science and Technology*, v. 75, p. 93–99, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.047>>.
- WEI, Lei *et al.* The Two Homologous Domains of Human Angiotensin I-converting Enzyme Interact Differently with Competitive Inhibitors \*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 19, p. 13398–13405, 1992.
- WU, Jianping; LIAO, Wang; UDENIGWE, Chibuike C. Revisiting the mechanisms of ACE

- inhibitory peptides from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, v. 69, p. 214–219, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.011>>.
- WU, Qiongying *et al.* Peptides A novel angiotensin-I converting enzyme ( ACE ) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa ( *Bombyx mori* ) protein : Biochemical characterization and molecular docking study. *Peptides*, v. 68, p. 17–24, 2015.
- XUE, Lu *et al.* Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Peptides*, v. 99, n. October 2017, p. 161–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.021>>.
- YOUNG, Peter. The leapfrog method and other “symplectic” algorithms for integrating Newton's laws of motion. *Lecture notes in University of California, Santa Cruz*, n. 1, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+leapfrog+method+and+other+?symplectic?+algorithms+for+integrating+Newton?s+laws+of+motion#1>>.
- ZAREI, Mohammad *et al.* Angiotensin converting enzyme (ACE)-peptide interactions: Inhibition kinetics, in silico molecular docking and stability study of three novel peptides generated from palm kernel cake proteins. *Biomolecules*, v. 9, p. 569, 2019.
- ZHAI, Jiali *et al.* Conformational Changes of  $\alpha$ -Lactalbumin Adsorbed at Oil–Water Interfaces: Interplay between Protein Structure and Emulsion Stability. *Langmuir*, v. 28, p. 2357–2367, 2012.
- ZHANG, Hui *et al.* Solubilization of octane in cationic surfactant-anionic polymer complexes: Effect of ionic strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 461, p. 88–95, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.028>>.
- ZHANG, Yi; ARYEE, Alberta NA; SIMPSON, Benjamin K. Current role of in silico approaches for food enzymes. *Current Opinion in Food Science*, v. 31, p. 63–70, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>>.
- ZHANG, Zhuo; DESDIER, Luis E Maya; SCANLON, Martin G. Ergometric studies of proteins: New insights into protein functionality in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, v. 45, p. 251–263, 2015. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0924224415001491/1-s2.0-S0924224415001491-main.pdf?\\_tid=09cdf250-0f72-49fa-9ef1-87ec8fcd3406&acdnat=1527681313\\_5eebe1a320840c2c70a1d123e9e9aef8](https://ac.els-cdn.com/S0924224415001491/1-s2.0-S0924224415001491-main.pdf?_tid=09cdf250-0f72-49fa-9ef1-87ec8fcd3406&acdnat=1527681313_5eebe1a320840c2c70a1d123e9e9aef8)>. Acesso em: 30 maio 2018.
- ZHU, X; LOPES, PEM; MACKERELL, AD. Recent Developments and Applications of the CHARMM force fields. *Wiley Interdisciplinary Rev Comput Mol Sci.*, v. 2, n. 1, p. 167–185, 2012.
- ZOU, Hui *et al.* Effects of high pressure processing on the interaction of  $\alpha$ -lactalbumin and pelargonidin-3-glucoside. *Food Chemistry*, v. 285, p. 22–30, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.129>>.

---

## CAPÍTULO 2.

Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Potential: Production, Identification and Assessment of Complex Formation with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) through Molecular Docking Studies

---

**Este capítulo encontra-se publicado em:**

**De Oliveira, T. V.**, Polêto, M.P., De Oliveira, M.R., Silva, T.J., Barros, E., Guimarães, V.M., Baracat-Pereira, M.C., Eller, M.R., Coimbra, J.S.R, De Oliveira, E.B. (2020). Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Potential: Production, Identification and Assessment of Complex Formation with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) through Molecular Docking Studies. **Food Biophysics**, 15, 162-172. DOI: 10.1007/s11483-019-09616-9.



# Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Potential: Production, Identification and Assessment of Complex Formation with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) through Molecular Docking Studies

Thomás Valente De Oliveira<sup>1</sup> · Marcelo Depólo Polêto<sup>2,3</sup> · Mara Rose De Oliveira<sup>1</sup> · Thaís Jordânia Silva<sup>1</sup> · Edvaldo Barros<sup>4</sup> · Valéria Monteze Guimarães<sup>5</sup> · Maria Cristina Baracat-Pereira<sup>5</sup> · Monique Renon Eller<sup>1</sup> · Jane Sélia dos Reis Coimbra<sup>1</sup> · Eduardo Basílio De Oliveira<sup>1</sup>

Received: 8 May 2019 / Accepted: 25 October 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Hypertension is nowadays one of the major world concerns in public health. Several food proteins, among which caseins, can be substrates for generating peptides with antihypertensive potential. With the increasingly evolution of computational tools, *in silico* molecular modeling have gained prominence in studies of protein-ligand complexes in different research fields, such as pharmaceuticals and biochemical engineering. However, the application of such methodologies in food-related research can be considered still embryonic. Thus, the central aim of the present work was to apply molecular modelling in order to elucidate the molecular bases of the antihypertensive potential of milk caseins-derived peptides. Firstly, hydrolysates obtained from a controlled trypsinolysis of caseins were fractionated according to their molecular weight, by ultrafiltration and RP-HPLC. The obtained fractions were evaluated with regard to their *in vitro* inhibitory angiotensin-converting enzyme activity (%I<sub>ACE</sub>). Six chromatographic fractions were identified, and three of them displayed high ACE-inhibition (F<sub>1</sub>: 80.68%; F<sub>2</sub>: 79.00%; and F<sub>4</sub>: 62.44%). Finally, intermolecular interactions networks in complexes formed between ACE and the identified peptides were assessed through *in silico* molecular docking. At the molecular level, a correlation between *in vitro* and *in silico* results was found: the peptides FFVAPFPEVFGK (F<sub>6</sub>), FALPQYLK (F<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) and ALNEINQFYQK (F<sub>1</sub>) presented the lowest binding energies and interacted by specific H-bonds, electrostatic and hydrophobic interactions formed within ACE active site S1 residues (Ala354, Glu384, and Tyr 523) and the Zn<sup>2+</sup> coordinated residues (His383, His387, and Glu411). The fraction F<sub>3</sub>, despite its low total peptide concentration, presented a moderate inhibitory activity for ACE (49.2%), likely due to H-bonds between HQGLPQEVLENLLR and the active site S1 residues.

**Keywords** ACE inhibitory activity · Food bioactive peptides · Molecular docking · Protein-ligand interactions

Thomás Valente De Oliveira and Marcelo Depólo Polêto contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11483-019-09616-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Thomás Valente De Oliveira  
thomas.valente@ufv.br

✉ Eduardo Basílio De Oliveira  
eduardo.basilio@ufv.br

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

<sup>2</sup> Grupo de Bioinformática Estrutural, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

<sup>4</sup> Núcleo de Análise de Biomoléculas, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, CEP, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

## Introduction

Hypertension (HT) is responsible for about 55% of deaths caused by cardiovascular diseases in the world [1]. This medical condition is usually treated mainly by means of the administration of antihypertensive (AH) drugs (e.g., captopril and enalapril), which not rarely engender undesirable side effects [2]. In biochemical terms, blood pressure regulation involves the Renin-Angiotensin System (RAS) and the Kallikrein-Kinin System (KKS). In these physiological pathways, angiotensin-converting enzyme (ACE) plays two roles, as it: i) it catalyzes the cleavage of bradykinin, which is a vasodilator, and ii) catalyzes the conversion of the decapeptide angiotensin I to angiotensin II, a potent vasoconstrictor. Then, these two reactions favor the increasing of the blood pressure, reason why ACE inhibitory compounds of natural origin, such as peptides, are promising alternatives as adjuvants and/or substitutes for classical antihypertensive drugs [3].

Peptides derived from food proteins and, in particular, peptides with inhibitory activity towards ACE (thus being putative AH compounds), have been obtained from enzymatic hydrolysis of proteins present in different food materials [3]. Proteins from milk, either whey proteins or caseins, have been recognized as excellent substrates for generating peptides with different bioactivities, including ACE inhibitors [4, 5]. Studies dealing with ACE-inhibitory peptides derived from hydrolysis of milk caseins can be found [5–7], and the AH activity of such peptides has been correlated to their relatively small size (usually from 2 to 20 amino acid residues), but showing differences in hydrophobicity and in amino acid sequence [2, 8].

In studies addressing ACE-inhibitory peptides derived from casein hydrolysis, different proteases and reaction conditions were applied, forming a great number of peptides in each case [4]. Hence, due to the complexity of the medium composition, after such enzymatic hydrolysis reactions strategies for separating and identifying peptides with real antihypertensive potential should be judiciously conceived and executed. Classical separation and purification methods as ultrafiltration [9] and chromatography [10, 11] have been employed, alone or sequentially combined, as strategies to the enrichment and fractionation of peptides in casein hydrolysates. The choice of the chromatographic approach should be guided by the relative size, net electrical charge, and hydrophobicity of targeted compounds [12]. In spite of the considerably amount of available literature reports demonstrating the *in vitro* and/or *in vivo* ACE inhibition by casein-derived peptides, in most of them some questions remain open, such as: “*How do these peptides interact with ACE, at a molecular level, so they are able to inhibit the enzyme activity?*”, “*Which specific amino acid residues of the enzyme catalytic site are involved in the enzyme-inhibitor complex formation?*”, or “*What are the predominant intermolecular interactions in such complexes formation?*”. Such questions

are very hard to address experimentally, and their answers are often useful guides to select – or even to design – new inhibitors or substrates for different enzymes, aimed to numerous biotechnological applications [13].

In this context, computational molecular docking, which aim to calculate and predict the most probable structure (or structures) resulting from the coupling of two or more molecules [14], emerge as an alternative to clarify these previously placed questions. Few studies reporting the use of such computational tools to study peptides/ACE interactions were found. For instance, García-mora et al. [15] and Wang et al. [16] showed that the C-terminal peptides PGQLQSF, LPILRYL and FLPVLLH; and YSK, respectively, obtained from casein hydrolysis interacted with residues belonging to the ACE active sites S1, S'1 and S2, being stabilized mainly by hydrogen bonds. In addition, Mirzaei et al. [11] and Lin et al. [17] identified that the casein peptides LPESVHLDK and VLSTSFPPK; and PFPGPIP and KYIPIQ, respectively, interacted with the Zn<sup>2+</sup> coordinated residues, promoting distortion on their tetrahedral geometry and leading to ACE inhibition. Our present study intended to contribute to this field, and more specifically it aimed: *i*) to obtain ACE-inhibitory peptides from a controlled trypsinolysis bioprocess of bovine caseins, as well as to fractionate and to identify these peptides, and *ii*) to model the interaction networks of ACE/peptides complexes, through computational molecular docking, in order to identify the specific intermolecular interactions stabilizing such complexes.

## Materials and Methods

### Enzymes, Substrates and Other Chemicals

The enzymes used were: trypsin (E.C.: 3.4.21.4 from bovine pancreas; 10.000 U.mg<sup>-1</sup>; Sigma, USA) and angiotensin I converting enzyme (ECA from rabbit lung; E.C.: 3.4.15.1; 0.25 U.mg<sup>-1</sup>; Sigma, USA). Their respective substrates were: pure bovine casein (Synth, Brazil) and N-hippuryl-His-Leu hydrate (HHL; Sigma, USA; purity ≥98%). Matrix assisted laser desorption (MALDI) matrix  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid was furnished by Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Glycerin was purchased from Sigma (USA). Acetonitrile (purity ≥99.9%) was bought from Merck (Germany). Dibasic sodium phosphate (purity ≥99%), monobasic sodium phosphate (purity ≥98%), potassium phosphate (purity ≥98%), citric acid (purity ≥99.5%), sodium chloride (purity ≥99%), hydrochloric acid (HCl; purity ≥37%), and trifluoroacetic acid (TFA; purity ≥99.8%) were obtained from VETEC (Brazil). All solvents were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. Highly purified water (Millipore Inc., Milli-Q, USA; electrical resistivity ~ 18.2 M $\Omega$ .cm at 25 °C) was used for preparing all aqueous solutions and buffers.

## Preparation of Bovine Casein Hydrolysates

The casein hydrolysis was carried out based following the methodology validated in one of our previous works [18]: briefly, a bovine casein dispersion (20 mg.mL<sup>-1</sup>) was prepared in sodium phosphate buffer (0.2 mol.L<sup>-1</sup>) added of citric acid (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) with final pH equal to 8.0. The pH of the reaction medium at about 8.0 ensures high trypsin activity [18]. Furthermore, as the average isoelectric point of caseins is at pH 4.6 [19], at pH 8.0 their proteins' chains carry predominantly negative electric charges, which leads to an increase of electrostatic repulsion between caseins molecules constituting the micelles, hence facilitating their contact with trypsin molecules. To start the reaction, both dispersions were mixed so that the final enzyme:substrate ratio was 1:150 (w/w). The hydrolysis was carried out at 37 °C, under magnetic stirring, for 120 min. After that, trypsin was inactivated by heating the reaction medium up to 95 °C, for 10 min, using a thermostatic bath. The medium was then centrifuged (Eppendorf, 5430, Germany) at 5000 x g for 10 min, and the supernatant was collected. This reaction was carried out three times, separately, and the three corresponding hydrolysates (namely H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>) were mixed and stored at 4 °C. Two control experiments were simultaneously performed under the same reaction conditions: (1) without trypsin (system containing only buffer and casein) and (2) without casein (system containing only buffer and trypsin). The casein control (1) intended to ascertain whether the casein not hydrolyzed by trypsin action or casein fragments produced independently on the enzymatic hydrolysis may have some ACE-inhibitory activity, and the trypsin control (2) aimed at verifying if peptides occasionally formed from trypsin self-hydrolysis may have ACE-inhibitory activity.

## Separation of Peptides in Bovine Casein Hydrolysates by Ultrafiltration

The casein hydrolysates (H) obtained in three independent reactions of hydrolysis were mixed (H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub> + H<sub>3</sub>), and then subjected to ultrafiltration (UF) followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The mixture H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub> + H<sub>3</sub> was subjected to a stirred UF cell (Millipore, Amicon8400, USA) under compressed air (50 psi), kept refrigerated by an ice bath. Polyethersulfone membranes (Millipore, Amicon Bioseparations, USA) were used, firstly a 10 kDa cut-off membrane nominal molecular weight limit (NMWL, PBGC07610) and, then, the obtained permeate was subjected to another filtration in a 5 kDa cut-off membrane NMWL (PBCC07610). Prior to use, membranes were activated by sinking them in 100 mL of distilled water overnight. The last permeate, containing compounds of molecular weight inferior to 5 kDa, was freeze-dried (Terroni, LS3000, Brazil), at -42 °C, under vacuum. The powder

obtained was stored at -20 °C for further purification in HPLC. The same procedure was applied to casein control, trypsin control and a blank containing only buffer.

## Fractioning of Peptides Permeates by RP-HPLC

A sample of the freeze-dried powder was dispersed in Milli-Q water (125 mg.mL<sup>-1</sup>) and the dispersion was subjected to two sequential dilutions, as follows: *i*) System 1 (S1): 50% (v/v) of the dispersion (125 mg.mL<sup>-1</sup>) added of 50% (v/v) of 0.2% (v/v) TFA; *ii*) System 2 (S2): 10% (v/v) of S1 added of 45% (v/v) of 0.2% (v/v) TFA and 45% of Milli-Q water. Each sample (S2) was filtered through a 0.22 µm filter (Polyvinylidene fluoride, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) before to perform the reversed phase chromatography onto a C4 column using HPLC system (C4-RP-HPLC). A volume of 100 µL of each sample was loaded into a YMC-Pack C4 analytical column (250 mm length × 4.6 mm internal diameter, 5 µm particle size, 30 nm porosity; Waters, Massachusetts, USA), attached to a C4 guard column (Delta-Pak™ C4 100Å, Waters). The column was connected to a HPLC system (Waters, USA) equipped with a gradient pump (Binary HPLC Pump, model 25E), a photodiode array detector (Dual λ Absorbance, E05487482M) and a fraction collector (WFC, Waters, Japan). The column was equilibrated using the solution A, composed of 0.1% (v/v) TFA in Milli-Q water. The peptides were eluted at a constant rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> using a gradient formed by mixing solution A and solution B, composed of 0.1% (v/v) TFA and 80% (v/v) ACN in Milli-Q water. The elution gradient was: 0 to 15 min, 0% B; 15 to 17 min, 0 to 30% B; 17 to 30 min, 30% B; 30 to 35 min, 30 to 100% B; 35 to 45 min, 100% B; 45 to 47 min, 100% B; and 47 to 55 min, 0% B. The column temperature was maintained at 23 °C and peptides were detected at the wavelength of 214 nm. The chromatograms were analyzed using the Breeze software (Version 3.30 SPA, 2002, Waters Corporation). In each chromatographic analysis, eluted samples were collected according to each elution peak. The collected fractions (namely F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>,...F<sub>n</sub>) were concentrated under vacuum using a SpeedVac concentrator (Thermo Electron, Integrated Speedvac SPD1010-115, Asheville, NC, USA) and stored at -20 °C.

## Assessment of the ACE-Inhibitory Activity of Peptides of the Chromatographic Fractions

The *in vitro* ACE-inhibitory activity of peptides present in the chromatographic fractions was assessed according to an adaptation of the methodology previously proposed by Cushman [20]. Briefly, the method is based on the hydrolytic action of ACE on the HHL substrate, forming hippuric acid and the dipeptide His-Leu. In presence of an ACE inhibitor, the rate of formation of hippuric acid decreases, reducing the value of

the absorbance at 228 nm. For the ACE inhibition test, 10  $\mu\text{L}$  of a chromatographic fraction  $F_n$  was mixed to 25  $\mu\text{L}$  of a 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HHL solution, in buffer potassium phosphate (0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) added of sodium chloride (0.3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at pH 8.3. This mixture was incubated at 37 °C in a thermostatic bath for 5 min. A volume of 5  $\mu\text{L}$  of ACE solution was prepared using 2.5  $\mu\text{L}$  of glycerin and 2.5  $\mu\text{L}$  of water. These 5  $\mu\text{L}$  of ACE solution were added to the precedent mixture and the resulting system was incubated at 37 °C for 30 min. After this, 37.5  $\mu\text{L}$  of 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl solution was added in order to inactivate the enzyme. Hippuric acid formed by ACE action was extracted by adding 250  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate to the system, which was subsequently submitted to vigorous agitation for 30 s (Vortex, AP56, Brazil). After that, the system was centrifuged at 3000  $\times g$  for 15 min, at 25 °C. The colorless supernatant (organic phase) containing hippuric acid was collected and the solvent was evaporated by heating at 95 °C for 5 min in a thermostatic bath. The remaining hippuric acid was dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of Milli-Q water, agitated using a vortex and samples of these solutions were deposited in wells of a 96-well microtiter plate (180  $\mu\text{L}$ ). The absorbance at 228 nm was then measured using UV-spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO 1510, Vantaa, Finland). Each reaction was carried out in three replicates. The average values were used to calculate the percentage of ACE inhibitory activity ( $\%I_{ACE}$ ), as follows:

$$\%I_{ACE} = \left[ \frac{(A_{control} - A_{system})}{(A_{control} - A_{white})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

In Eq. (1),  $A_{system}$  represents the average absorbance of the medium containing HHL + ACE +  $F_n$ ;  $A_{control}$  represents the average absorbance of the medium containing HHL + ACE + water; and  $A_{white}$  represents the average absorbance of the medium containing HHL + HCl + ACE +  $F_n$ .

### Peptide Identification, Sequencing, and Characterization by Mass Spectrometry

The chromatographic fractions obtained by C4-RP-HPLC were vacuum dried and individually subjected to matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) analyses, in order to gain detailed information about the amino acid composition of the peptides. The structural analysis of peptides was carried out on MALDI-TOF/TOF mass spectrometer model Ultraflex III (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) using  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 50% (v/v) ACN and 0.1% (v/v) TFA) in a ratio of 1:1 (v/v) (sample:matrix). A sample of a given fraction  $F_n$  was applied onto a polished steel target (MTP 384 SP, Bruker Daltonics). The calibration of the method was conducted using the Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Germany). Laser energy and the number of shots

per segment spectrum were manually adjusted. The peaks with the most intense ions were subjected to fragmentation (MS/MS). The MS1 spectra were acquired in positive ion reflector mode, recording ions from 500 up to 3500  $m/z$  values. To perform MS2 analyses using the LIFT in the positive mode, ions with intensity greater than 3000 and mass charge ratio ( $m/z$ ) of more than 700 Da were selected. The equipment operates with the FlexControl Software (Version 3.3, Bruker Daltonics, Germany), being the resulting spectra of MS/MS analyses processed with the aid of the flexAnalysis software. The peak lists of MS/MS were generated in *Generic Mascot Format* (MGF) by BioTools software (Version 3.2, Bruker Daltonics, Germany).

Peptide identification was confirmed using the MASCOT software (Version 2.4.0, Matrix Science, London, UK) using a protein database for the BOVIDAE family obtained as a subset of the UNIPROT database. The database search parameters included no restrictions on the protein molecular weight, maximum of one tryptic missed cleavage, fixed modifications for carbamidomethylation of cysteine residues, and variable modifications for oxidation of methionine residues. The peptide mass tolerance was 0.2 Da for the precursor ions in MS spectra and 0.5 Da for the fragment ions in MS/MS spectra. Significant hits for MASCOT were defined as  $P$  value  $< 0.05$  for peptides showing matches using MS/MS ion search. The statistical validation of results was carried out for score values of  $p > 90\%$  for both protein and peptides in Scaffold software (Version 3.6.4, Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA) [21].

### Molecular Docking Study

#### Preparation of the Target and Ligands

The crystal structure of human angiotensin converting enzyme in complex with lisinopril [PDB ID: 1O86] [22] was obtained from the RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). All water molecules, the inhibitor lisinopril, and a free glycine molecule were removed, whereas the cofactors  $\text{Zn}^{2+}$  and chloride anions were kept in their respective positions within the protein structure. In order to mitigate the impact of crystal packing effects and to minimize the absence of solvation in the receptor structure during the docking, ACE tridimensional structure was submitted to molecular dynamics simulation using the GROMACS 5.1.4 package [23], equipped with the GROMOS53A6 force field [24]. The protein was centered in a dodecahedral box using periodic boundary conditions which was filled with SPC water models [25]. The system was then minimized through a sequence of energy minimizations, using steepest descent and conjugate gradient algorithms [26]. Next, the system was equilibrated for 1 ns in a NVT ensemble in order to reach a temperature equilibrium of 310 K. After that, the system was then equilibrated in 1 bar using several short simulations in a NPT ensemble, to not lose your crystallographic memory, totalizing 15 ns of equilibration, as reported by Polêto et al. [27]. Then, the

system was submitted to a production run of 50 ns using a 2 fs timestep. Finally, *gmx cluster* was applied in order to identify a centroid conformation which could be used as target in docking assays. The tridimensional structures of all nine peptides used as ligands were built manually using Discovery Studio Visualizer tools (v17.2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia).

### Docking and Scoring Procedures

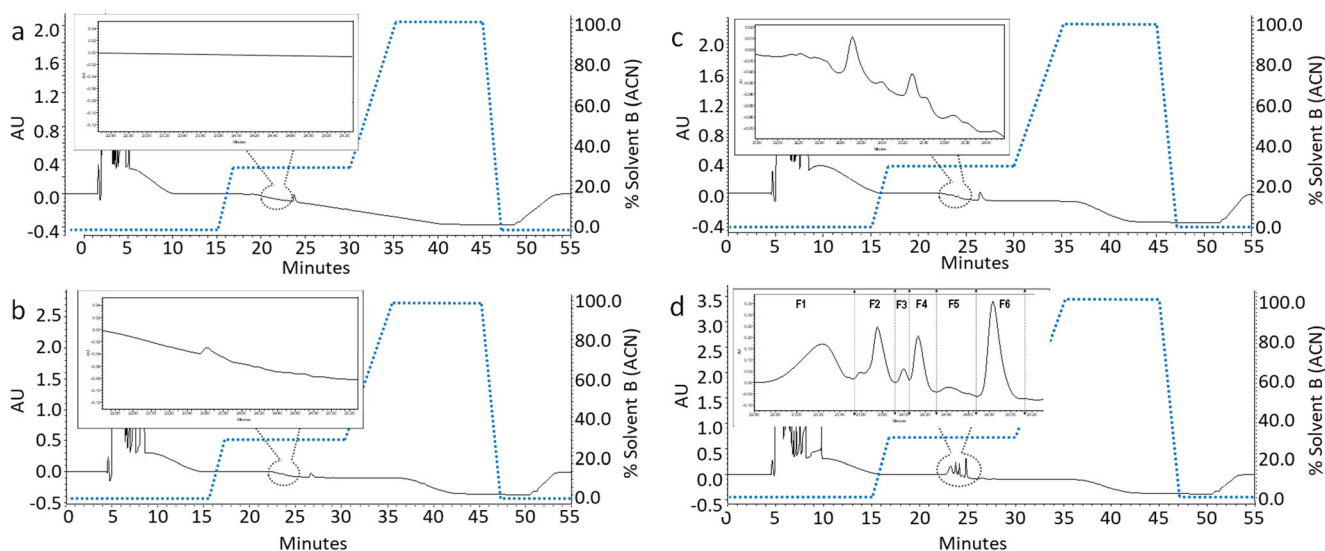
Docking assays of ACE (receptor) and the nine casein-derived peptides (ligands) were performed with Autodock Vina, that works with an optimized score function (hybrid), extracting specific empirical information from the conformational preferences of the receptor-ligand complex and experimental information about the affinity measurements [28]. Residues of ACE active sites S1, S2 and S'1 were defined as flexible, while docking grid size was defined with a number of points in x, y and z-dimension equal to 34, 40 and 42, respectively. The systems were configured with exhaustiveness 64 and a maximum energy range of 2 kcal/mol. The top 20 poses of ligands were submitted to an analysis on the MolProbity server (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) in order to evaluate their  $\psi$  and  $\phi$  angles using the Ramachandran plot, aiming at identifying possible false positives. Among the remaining poses, those with the lowest energy for each peptide-ACE complex were selected and analyzed with Biovia Discovery Studio Visualizer (v17.2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia), aiming to identify ligand-receptor interactions, such as hydrogen bonds, hydrophobic, hydrophilic, electrostatic, and coordination interactions specifically located at the ACE active sites.

## Results and Discussion

### Separation and Fractioning of Peptides

In a previous report by our team [29], the highest ACE-inhibitory activity was observed for casein hydrolysates produced after 120 min of trypsin-catalyzed hydrolysis in aqueous medium. Based on these results, the trypsinolysis of bovine casein was reproduced during 120 min, keeping all the other reaction conditions unchanged. Firstly, peptides contained in the hydrolysates were separated based on their molecular dimensions, by UF. The use of a 10 kDa cut-off NMWL membrane aimed to retain the trypsin and non-hydrolyzed casein molecules. Next, the 5 kDa cut-off NMWL membrane was used to obtain peptides with molecular weight lower than  $\leq 5$  kDa, since it is one of the typical features of peptides with high ACE-inhibitory activity [8, 10], and only this permeate was considered for further investigations. It is important to emphasize that the same procedure was applied for the trypsin and casein controls, as well as for a blank of the reaction (medium containing only buffer). The RP-HPLC profiles of samples are presented in Fig. 1.

Signals exhibited similarities at the beginning of the chromatograms (before 10 min) for all systems, corresponding to the elution of the salts composing the buffer (desalination process). The trypsin control chromatogram (Fig. 1b) did not show any difference when compared with chromatogram of blank sample (Fig. 1a), pointing out the non-occurrence of auto-catalyzed hydrolysis of trypsin under the reaction conditions evaluated. Casein control chromatogram (Fig. 1c) displayed some peaks with low amplitude and resolution,



**Fig. 1** Chromatographic profiles obtained using a C4 analytical column (detection at 214 nm): **(a)** Blank (containing only buffer), **(b)** Trypsin control, **(c)** Casein control, and **(d)** chromatographic fractions obtained

by bovine casein hydrolysate. Dashed lines represent the % of solvent B (acetonitrile) in the mobile phase

compared with that of the casein hydrolysate (Fig. 1d). These peaks were pooled in three fractions, namely  $F_{cc1}$ ,  $F_{cc2}$  and  $F_{cc3}$  (Supplementary Material), collected, concentrated and then evaluated in relation to ACE inhibition. The values of  $\%I_{ACE}$  found for each of them were 1.8%, 17.9% and 5.9%, respectively. These values can be considered negligible, compared to those regarding the ACE-inhibitory activities measured for fractions of the casein hydrolysate (Table 1). Therefore, these results ensure that ACE inhibition identified in the casein hydrolysate came from the peptides generated during the casein trypsinolysis.

The fractioning of the peptides in the casein hydrolysate was performed based on the differences of their hydrophobicity [30], employing a weakly hydrophobic C4 column. A low hydrophobicity column was chosen according to the predominance of hydrophobic peptides in the casein hydrolysate, as previously reported [29]. In the chromatogram of the hydrolysate obtained from casein trypsinolysis (Fig. 1d), one can note that peptides elution occurred between 22.6 and 25.2 min, under isocratic conditions with 70% solvent A (0.1% TFA in Milli-Q water) + 30% solvent B (80% in Milli-Q water). This region of the chromatogram was zoomed, evidencing six peaks for casein hydrolysate, namely  $F_1$ - $F_6$  (Fig. 1d). The fractions corresponding to each of these peaks were collected separately, concentrated and evaluated regarding their ACE inhibitory activity. Fractions  $F_1$  e  $F_2$  had the highest values for  $\%I_{ACE}$  (80.7%, and 79.0%, respectively), whereas fraction  $F_5$  showed the lowest value (16.3%) (Table 1). In terms of process efficiency, the fractions  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_4$  and  $F_6$  were those containing larger amounts of peptides,

contrarily to  $F_3$  and  $F_5$ , as indicated by the % peak areas (Table 1). Overall, the RP-HPLC protocol applied in this study was proven highly efficient in fractioning of peptides derived from casein trypsinolysis and, simultaneously, conserving their putative AH potential.

### Identification and Molecular Characterization of Peptides

As presented in Table 1, a total of nine peptides were identified. The presence of more than one peptide in most of fractions ( $F_1$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ,  $F_5$ , and  $F_6$ ), even with the use of a C4 column, may be indicative that the relative hydrophobicity of peptides in a same fraction is similar. If only fractions containing one peptide were strictly desired, two sound options of adjustment of the fractioning protocol here proposed could be proposed: *i*) the application of a non-isocratic elution between 22.60 and 25.20 min, or *ii*) to re-chromatograph each fraction separately.

In fraction  $F_3$  the existence of missed cleavage (HPIKHQGLPQEVLENLLR) was observed. The presence of this peptide may be due to a reaction kinetics feature, i.e., the reaction time was not long enough to this cleavage to occur [29]. Fraction  $F_6$  contained a peptide derived from a non-specific cleavage (PFPEVFGK). This peptide may have been formed by a protein fragmentation induced not by the regioselective catalytic action of trypsin, but by other non-enzymatic factor, such as agitation, temperature or a conjoint effect of both. For all of other identified peptides, the hydrolysis occurred at expected positions of the caseins chains,

**Table 1** Values of percentage of ACE-inhibitory activity in vitro, area percentage relative to the sum of the areas of all peaks, amino acid sequences and hydropathy values of peptides contained in chromatographic fractions ( $F_1$  to  $F_6$ ) of the bovine casein hydrolysate

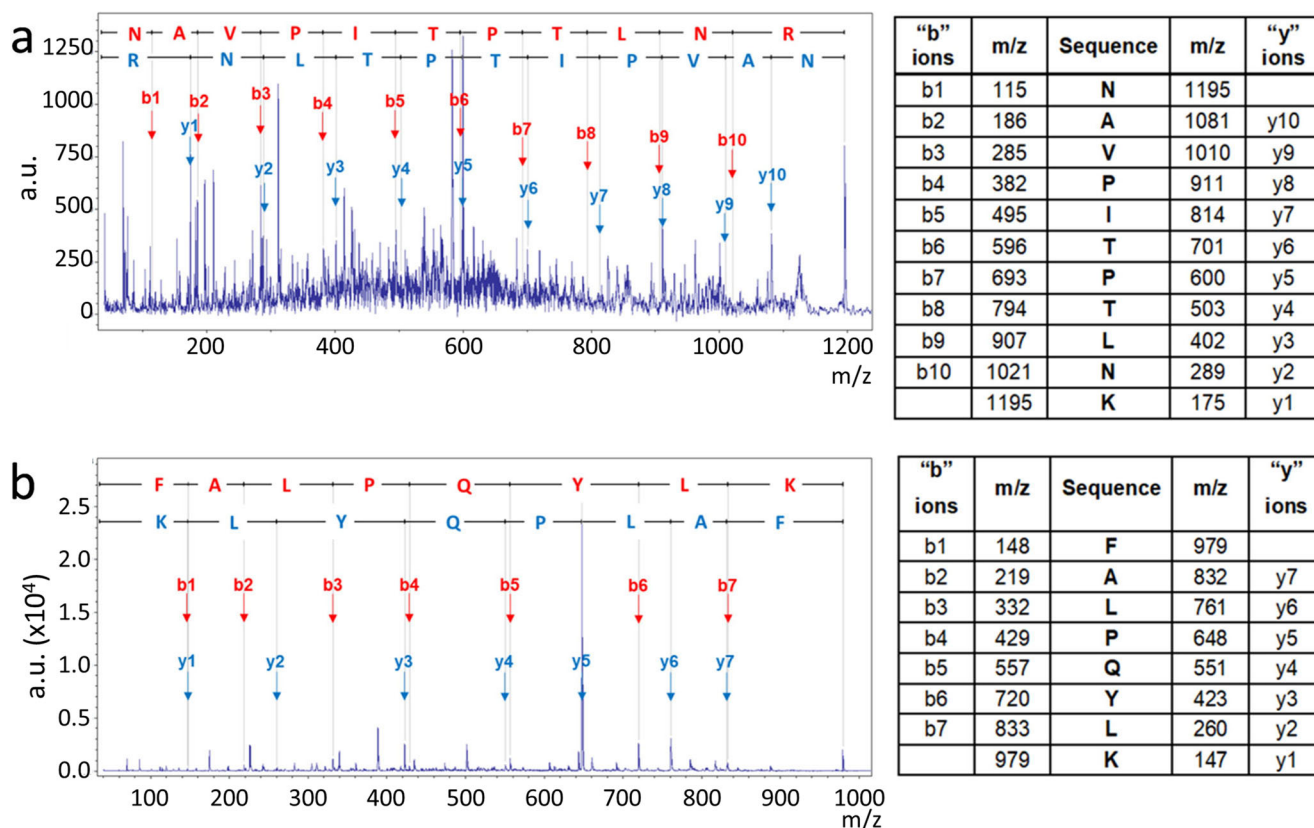
Chromatographic fraction	ACE-inhibitory activity in vitro ( $\%I_{ACE}$ )	Peak area (%)	Observed mass (m/z ratio)	Amino acid sequence	Hydropathy value (GRAVY) <sup>C</sup>	Originated From <sup>D</sup>
$F_1$	80.7	33.9	1195.678	NAVPIPTLNR <sup>B</sup>	-0.164	$\alpha_{S2}$ -casein
			1367.720	ALNEINQFYQK <sup>A</sup>	-0.891	$\alpha_{S2}$ -casein
$F_2$	79.0	21.2	979.578	FALPQYLK <sup>A</sup>	0.237	$\alpha_{S2}$ -casein
$F_3$	49.2	4.4	1759.931	HQGLPQEVLENLLR <sup>A</sup>	-0.753	$\alpha_{S1}$ -casein
			2235.229	HPIKHQGLPQEVLENLLR <sup>A</sup>	-0.816	$\alpha_{S1}$ -casein
$F_4$	62.4	12.4	979.500	FALPQYLK <sup>B</sup>	0.237	$\alpha_{S2}$ -casein
			1759.957	HQGLPQEVLENLLR <sup>A</sup>	-0.753	$\alpha_{S1}$ -casein
$F_5$	16.3	3.2	1251.670	YIPIQYVLSR <sup>A</sup>	0.400	k-casein
			1759.912	HQGLPQEVLENLLR <sup>A</sup>	-0.753	$\alpha_{S1}$ -casein
$F_6$	47.8	25.0	920.442	PFPEVFGK <sup>A</sup>	-0.150	$\alpha_{S1}$ -casein
			1267.678	YLGYLEQLLR <sup>A</sup>	0.070	$\alpha_{S1}$ -casein
			1384.716	FFVAPFPEVFGK <sup>A</sup>	0.867	$\alpha_{S1}$ -casein

<sup>A</sup> Sequence validated by Scaffold

<sup>B</sup> Sequence validated by manual "de novo" method

<sup>C</sup> Values calculated using the ProtParam tool, available at: <http://web.expasy.org/protparam>

<sup>D</sup> Data obtained using search engines of MASCOT



**Fig. 2** Mass spectra (MS/MS) referent to peptides whose amino acid composition and sequence was determined by de novo sequencing in manual mode: (a) NAVPITPTLNR (Fraction F<sub>1</sub>; m/z = 1195.6) and (b) FALPQYLK (Fraction F<sub>4</sub>; m/z = 979.5)

according to the well-known catalytic regioselectivity of trypsin [31]. For the peptides NAVPITPTLNR (Fraction F<sub>1</sub>) and FALPQYLK (Fraction F<sub>4</sub>), identified in MASCOT, the MS/MS data were evaluated by manual de novo sequencing (Fig. 2a-b). For the remaining peptides depicted in Table 1, mass spectra can be found in [Supplementary Material](#).

As the proportion of  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - and k-casein in bovine casein micelles is about 3:1:3:1, respectively [32], it would be reasonable to expect a greater proportion of peptides generated from  $\alpha$ s1-casein and  $\beta$ -casein. However, the majority of generated peptides were derived from  $\alpha$ s1-casein (five peptides) and  $\alpha$ s2-casein (three peptides); only one peptide was formed from k-casein, and any peptide derived from  $\beta$ -casein was detected in the hydrolysate (Table 1). Given these findings, one can infer that the proportion of each casein fraction in the casein micelle is not the determining factor in the nature of the produced peptides, but rather their amino acid sequence and their location within the micelle structure. In fact, the lysine (Lys) contents in  $\alpha$ s1- and  $\alpha$ s2-fractions is higher than those of  $\beta$ - and k-caseins (see their primary amino acid sequences in [Supplementary Material](#)). Moreover Lys and Arg residues along the polypeptide  $\beta$ -casein chain are more spaced than in the other casein fractions, which indeed points out the trend of  $\beta$ -casein to form large peptides when

undergoing trypsinolysis. Such larger peptides ( $\geq 5$  kDa) that may have been formed from  $\beta$ -casein were likely to be retained during the membrane filtration step. At the same time, the location of  $\beta$ -casein fraction (predominantly in the core of casein micelles) may have limited, or even precluded, its physical contact with the trypsin molecules, which also corroborates the absence of hydrolysis products from  $\beta$ -casein in the chromatographic fractions. The amino acid sequence of all peptides identified (Table 1) was compared with fragments predicted in an *in silico* trypsinolysis test ([Supplementary Material](#)), and results showed that 7 predicted peptides, among the 9 identified in this study, were compatible with the known regioselectivity of trypsin in hydrolysis of  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - and k-caseins [31]. This result confirms the accuracy of MALDI-TOF/TOF in identifying the peptides generated in the hydrolysis bioprocess here studied.

Finally, the peptides hydropathy indexes (GRAVY; Grand Average of Hydropathy), in which positive values are correlated to a predominant hydrophobic character of an amino acid or polypeptide chain [33], were also evaluated (Table 1). The GRAVY values did not reveal any clear correlation between peptide hydrophobicity and ACE inhibitory activity. In other words, fractions containing more hydrophobic peptides did not necessarily present higher %I<sub>ACE</sub>, or vice-versa.

## Molecular Docking Study

Prior to docking of peptides within, a careful relaxation of the ACE crystal structure in an aqueous environment was carried out. The RMSD considering all non-hydrogen atoms between the crystal structure and the relaxed structure was only 1.789 Å, indicating a successful relaxation procedure. Thus, the centroid of all sampled structures was taken as target in computational docking assays. Computational docking of all nine peptides experimentally identified was performed within the catalytic cleft [34, 35] of this enzyme. In the crystal structure of ACE (PDB ID: 1086), there was a lysinopropyl molecule docked within this cavity, interacting with the sites S1, S2, and the zinc coordinated residues [22]. As reported by Wu et al. [34], the main interacting residues at the ACE active site are divided into three pockets (S1, S2 and S'1). The S1 pocket includes Ala354, Glu384 and Tyr523 residues, the S'1 pocket contains only the Glu162 residue, and the S2 pocket includes Gln281, His353, Lys511, His513 and Tyr520 residues. Furthermore, ACE has a zinc ion ( $Zn^{2+}$ ) which is coordinated with His383, His387 and Glu411 residues and is considered an active site as well [35].

In order to select those conformations that best anchored to the ACE catalytic site, we used the information of binding energy estimation of each pose, together with the evaluation of  $\psi$  and  $\varphi$  dihedral angles through Ramachandran plots, in order to eliminate poses with low probability torsions. The interaction scores, as well as the ACE sites residues interacting with the peptides are summarized in Table 2. Molecular docking calculations revealed that FFVAPFPEVFGK peptide ( $F_6$ ) presented the lower binding energy ( $-9.7$  kcal/mol) and interacted with S1 ACE active site (Tyr523) and a  $Zn^{2+}$  coordinated residue (His383) (Fig. 3), despite the fact that  $F_6$  presented poor ACE inhibition capacity (Table 1). Maruyama

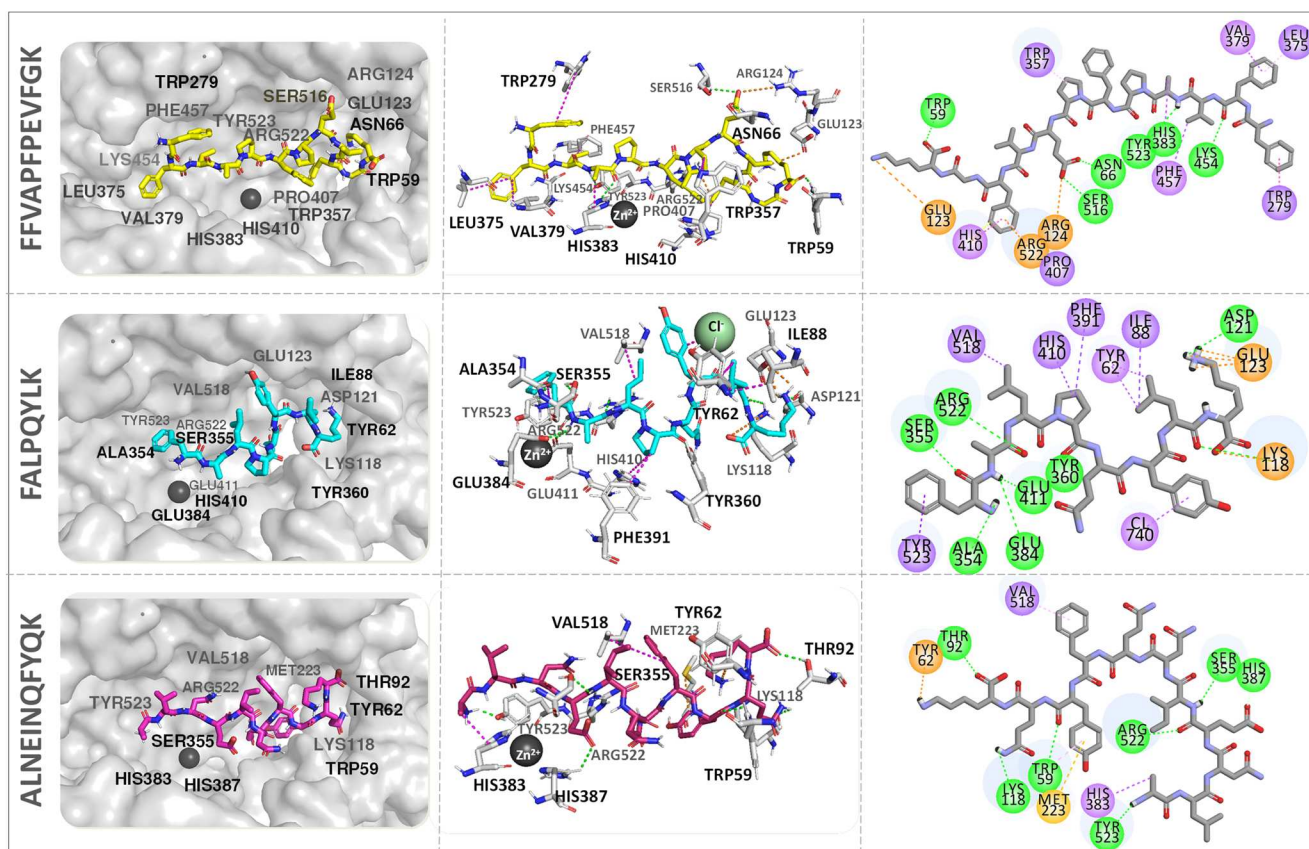
et al. [36] and Yamada et al. [30] also observed the conservation of the sequence FFVAPFPEVFGK after enzymatic hydrolysis of casein. However, these authors did not reported high ACE inhibitory capacity for this peptide, which presented  $IC_{50}$  equal to 77  $\mu$ M and 52  $\mu$ M, respectively. Hence, we hypothesize that FFVAPFPEVFGK concentration in  $F_6$  was considerably low in relation to the other two peptides in the same fraction, thus yielding a low ACE inhibitory capacity.

Some peptides from fractions with high in vitro inhibitory capacities (namely,  $F_1$ ,  $F_2$ , and  $F_4$ ) presented low binding energies as well, especially FALPQYLK ( $-9.2$  kcal/mol) and ALNEINQFYQK ( $-9.1$  kcal/mol) (Table 2). Fig. 3 highlights a similar N- and C-terminal orientation for these two peptides, while occupying the same tridimensional space within ACE pocket, interacting mostly with S1 active site and the Zn complexed residues. The peptide FALPQYLK was found by López-Expósito et al. [37] and Tauzin et al. [38] after enzymatic hydrolysis of  $\alpha$ s<sub>2</sub>-casein, and also presented high ACE inhibitory activity (about 86%), with  $IC_{50}$  equal 11.9  $\mu$ M and 4.3  $\mu$ M, respectively. On the other hand, peptide ALNEINQFYQK was also found by Tauzin et al. [38], but presented a  $IC_{50}$  of 264  $\mu$ M, leading us to think that its concentration was quite high in  $F_1$ .

Although the relationship between structural properties of peptides and their ACE inhibitory activity is still controversial in literature, it has been suggested that two peptides features are correlated to their ACE inhibition property: *i*) short peptide length (2 to 12 amino acids residues), and *ii*) high content of hydrophobic amino acid residues [8, 12]. The presence of positively or negatively charged residues near the C and N-terminal extremities also appears to contribute to the ACE activity inhibition [39]. In fact, the chromatographic fractions with greater % $I_{ACE}$  ( $F_1$ ,  $F_2$  and  $F_4$ , with respectively 80.7% 79.0% and 62.4% of % $I_{ACE}$ ) contained the peptides ALNEINQFYQK and

**Table 2** Complex ACE-peptides binding energy (kcal/mol) obtained by molecular docking and informations about interactions involved the peptides and ACE residues from S1, S2 and S'1 active sites and coordinates with Zn(II)

Peptide	Fraction	Binding Energy (kcal/mol)	Interaction Type	ACE residue	Active Site	Peptide residue	Interaction distance (Å)	H-bonds angles (degrees)
FFVAPFPEVFGK	$F_6$	$-9.7$	Hydrogen bond	Tyr523	S1	Ala4	2.6	155.5
			Hydrogen bond	His383	$Zn^{2+}$	Ala4	2.2	138.5
			Hydrophobic	His383	$Zn^{2+}$	Ala4	3.6	–
FALPQYLK	$F_2, F_4$	$-9.2$	Hydrogen bond	Ala354	S1	Phe1	2.2	149.0
			Hydrogen bond	Glu384	S1	Ala2	2.8	101.2
			Hydrogen bond	Glu411	$Zn^{2+}$	Ala2	2.8	132.6
ALNEINQFYQK	$F_1$	$-9.1$	Hydrogen bond	Tyr523	S1	Ala1	2.0	142.6
			Hydrophobic	His383	$Zn^{2+}$	Ala1	3.9	–
			Hydrogen bond	His387	$Zn^{2+}$	Glu4	2.8	128.2
PFPEVFGK	$F_6$	$-8.9$	–	–	–	–	–	–
YLGYLEQLLR	$F_6$	$-8.9$	Hydrogen bond	Glu384	S1	Tyr1	2.5	128.7
HQGLPQEVLENLLR	$F_3, F_4, F_5$	$-8.7$	Hydrogen bond	Ala354	S1	Pro5	2.8	107.1
			Hydrophobic	Ala354	S1	Leu4	3.2	–
			Hydrogen bond	Tyr523	S1	Gln6	2.3	126.7
YIPIQYVLSF	$F_5$	$-8.7$	–	–	–	–	–	–
NAVPIPTLNR	$F_1$	$-7.8$	–	–	–	–	–	–
HPIKHQGLPQEVLENLLR	$F_3$	$-6.9$	–	–	–	–	–	–



**Fig. 3** Peptides FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK and ALNEINQFYQK docked within the ACE catalytic pocket: first column: ACE pocket containing the peptides; second column: 3D view of ACE amino acid residues interacting directly with the docked peptides; third column:

schematic 2D depiction of these interactions (hydrogen bonds are depicted as green dashed lines; electrostatic interactions, as orange dashed lines; hydrophobic interactions, as purple dashed lines)

FALPQYLK, which share these structural features: both ALNEINQFYQK and FALPQYLK contain residues Lys at their C-terminal end, which interacts with ACE residues Tyr62, Asp121 and Glu123, by electrostatic interactions and hydrogen bonds (Fig. 3). On the other hand, the large peptide HQGLPQEVLENLLR got our attention. Although it is formed by 15 amino acid residues, one can hypothesize that it was the main responsible for the ACE inhibitory activity presented by F<sub>3</sub> (49.2%). Indeed, compared to the other peptide in fraction F<sub>3</sub> (HPIKHQGLPQEVLENLLR), HQGLPQEVLENLLR showed lower binding energy. Additionally, it formed two H-bonds with S1 active site residues – peptide-Pro5:ACE-Ala354 (2.8 Å; 107.1°) and peptide-Gln6:ACE-Tyr523 (2.3 Å; 126.7°) – whereas no H-bond was detected between HPIKHQGLPQEVLENLLR and ACE active sites (Table 2).

For the peptide FALPQYLK, the C-terminal region is stabilized by four electrostatic interactions and two hydrogen bonds. Another electrostatic interaction that possibly contributes to the stability of the complex formed with this peptide is observed between the carboxylic acid of peptide Lys8 and the ACE residue Lys118. For ALNEINQFYQK peptide, similarly, electrostatic interactions between the Lys11 at the peptide C-terminal extremity and ACE residue Tyr62 also appears to contribute to the

complex stability. Similar behavior was observed by other authors, as for instance Mirzaei et al. [11], who showed that the positively charged 3-amine group in lysine at the N or C-terminal extremities and the presence of aspartic and glutamic acids in the peptide sequence may contribute to ACE inhibitory activity. Seemingly, lysine is the charged amino acid predominant in ACE-inhibitory peptides, as some recent studies have shown in other peptides with ACE inhibition capacity as FPGPIPK and IPPK [40], LPESVHLDK and VLSTSFPPK [11], KYIPIQ [17], and NMAINPSK [7].

A consensus among different researchers is related to the importance of the hydrogen bonds in the stabilization of the peptide within the ACE catalytic cavity [7, 15]. The FALPQYLK peptide interacted with ACE through seven hydrogen bonds, three of which involving S1 residues Ala354 and Glu384, and zinc complex residue Glu411 (Fig. 3). Their respective lengths were 2.19, 2.80 Å and 2.77 Å. For ALNEINQFYQK, a network of seven hydrogen bonds was also observed (Fig. 3), and two of them involve the same ACE active sites: one with the Tyr523 (1.96 Å) from the S1 active site, and one with His387 (2.80 Å), which coordinates the Zn<sup>2+</sup> cation. The hydrogen bonds formed between these two peptides and the ACE active sites presented lengths lower than 3.5 Å. According

to [41, 42], it characterizes strong and stable H-bonds that possibly contribute to the stability of the peptides within the enzyme catalytic cavity and, as consequence, the maintenance of their inhibitory capacity. Another feature reported in previous studies is the tyrosine presence in the third position starting from the C-terminal residue [43]. In particular, it has been reported that Tyr residues of peptides can favorably interact with amino acid residues present in the catalytic cleft of ACE through both hydrogen bonds and  $\pi$ - $\pi$  interactions [12]. In our study, as highlighted in Fig. 3, Tyr residues in the third position relative to the C-terminal extremities, in both peptides, interact with ACE through hydrophobic interaction and electrostatic interactions. In addition, several authors have documented that interactions between a ligand and the ACE residues His383, His387 and Glu411 may lead to the distortion of tetrahedrally-coordinated  $Zn^{2+}$  and, as a consequence, enhance the deactivation of the ACE catalytic activity [34, 35]. In our study, such interactions were identified for FALPQYLK, with ACE-Glu411 acting as an H-acceptor in an H-bond (2.77 Å) with Ala2 (Fig. 3), and for ALNEINQFYQK, with ACE-His383 potentially performing a hydrophobic interaction (3.91 Å) with the methyl group of Ala1 from the peptide through ACE-His383 pi-orbital, and ACE-His387 acting as H-donor in a H-bond (2.80 Å) with the Glu4 (Fig. 3).

In summary, our molecular docking studies indicated that the higher  $\%I_{ACE}$  values for F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>4</sub> chromatographic fractions may be attributed to the presence of FALPQYLK and ALNEINQFYQK peptides, because they interacted with both the  $Zn^{2+}$  coordinated residues and S1 active site residues. The F<sub>3</sub> fraction, despite its low total peptide concentration, presented  $\%I_{ACE}$  about 49%, which can be attributed to H-bonds formed between HQGLPQEVLENLLR and the active site S1 residues. However, in order to verify such hypothesis, further experimental studies would be required. Such studies should focus on: i) to synthesize in vitro separately the nine peptides found in fractions F<sub>1</sub>-F<sub>6</sub>; ii) to measure the  $\%I_{ACE}$  of each of them at the same molar concentration.

## Conclusions

In this study, bovine caseins-derived peptides, obtained from a trypsinolysis bioprocess, presented different ACE-inhibition capacity, varying from 16.3% to 80.7%. The fractions with higher ACE activity inhibition, namely F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and F<sub>4</sub>, contained the peptides FALPQYLK (F<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) and ALNEINQFYQK (F<sub>1</sub>). These peptides showed the second and third lowest binding energies, according to in silico molecular docking analyses. Such analyses also revealed that their H-bonds involving the ACE catalytic site S1 residues (Ala354, Glu384, and Tyr 523), as well as those involving the ACE  $Zn^{2+}$ -coordinated residues (His383, His387, and Glu411) were the main intermolecular interactions

related to the ACE inhibition by the peptides FALPQYLK and ALNEINQFYQK. Furthermore, the presence of a Lys residue at its C-terminal extremity and a Tyr residue in the third position starting from the C-terminal extremity were more clearly correlated to the ACE inhibition capacity of a given peptide than its overall hydrophobicity (in terms of the hydropathy index). The fraction F<sub>3</sub> presented a moderate ACE inhibitory activity, likely due to H-bonds between HQGLPQEVLENLLR and the active site S1 residues. Results here reported provided a rational understanding, at the molecular level, for the ACE inhibition by peptides derived from the trypsinolysis of caseins. Such knowledge has strategic scientific relevance, as it can be taken as one departure point for the *de novo* design of new ACE inhibitors (putative anti-hypertensive compounds).

**Acknowledgements** We are grateful to BIOAGRO-UFV, NuBioMol-UFV and UFV Computational Cluster for providing the facilities for carrying out the experiments, and to Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPEMIG, FINEP, FUNARBE and SisNANO/MCTI, for the financial support. Ms. M.R. Oliveira and Ms. T.J. Silva are especially grateful to CNPq for their scholarships.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. World Health Organization (WHO): <http://www.fao.org/3/AC911E/AC911E00.htm>. Accessed 25 Jan 2019
2. J. Torruco-Uco, L. Chel-Guerrero, A. Martínez-Ayala, G. Dávila-Ortiz, D. Betancur-Ancona, LWT - food Sci. Technol. **42**, 1597 (2009)
3. Z.F. Bhat, S. Kumar, H.F. Bhat, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **57**, 566 (2015)
4. M.R. De Oliveira, T.J. Silva, E. Barros, V.M. Guimarães, M.C. Baracat-Pereira, M.R. Eller, J.S. dos Coimbra, E.B. De Oliveira, Appl. Biochem. Biotechnol. **185**, 884 (2018)
5. E.C. de Souza Jr, J.S. dos Coimbra, E.B. de Oliveira, R.C.F. Bonomo, J. Chromatogr. B **973**, 84 (2014)
6. F.G. Amorim, L.B. Coitinho, A.T. Dias, A.G.F. Friques, B.L. Monteiro, L.C.D. de Rezende, T.M.C. Pereira, B.P. Campagnaro, E. De Pauw, E.C. Vasquez, L. Quinton, Food Chem. **282**, 109 (2019)
7. M. Tu, C. Wang, C. Chen, R. Zhang, H. Liu, W. Lu, Food Chem. **256**, 98 (2018)
8. R.J.S. Castro, H.H. Sato, Food Res. Int. **74**, 185 (2015)
9. X. Lan, D. Liao, S. Wu, F. Wang, J. Sun, Z. Tong, Food Chem. **182**, 136 (2015)
10. O. Abdelhedi, R. Nasri, L. Mora, M. Jridi, F. Toldra, M. Nasri, Food Chem. **239**, 453 (2018)
11. M. Mirzaei, S. Mirdamadi, R.M. Ehsani, J. Food Drug Anal. **26**, 696 (2018)
12. A. Shi, H. Liu, L. Liu, H. Hu, Q. Wang, B. Adhikari, PLoS One **9**, 23 (2014)
13. T.M. Menezes, S.M.V. de Almeida, R.O. de Moura, G. Seabra, C.A. de Lima, J.L. Neves, Int. J. Biol. Macromol. **122**, 289 (2019)
14. D.B. Kitchen, H. Decomez, J.R. Furr, J. Bajorath, Nat. Rev. **3**, 935 (2004)

15. P. García-mora, M. Martín-martínez, M.A. Bonache, M. Angeles, R. González-múniz, E. Peñas, J. Frias, C. Martínez-villaluenga, *Food Chem.* **221**, 464 (2017)
16. X. Wang, H. Chen, X. Fu, S. Li, J. Wei, *LWT - food Sci. Technol.* **75**, 93 (2017)
17. K. Lin, L. Zhang, X. Han, D. Cheng, *J. Funct. Foods* **32**, 266 (2017)
18. S.C. Cheison, J. Brand, E. Leeb, U. Kulozik, *Agric. Food Chem.* **59**, 1572 (2011)
19. G.W. Hofland, M. Van Es, L.A.M. Van Der Wielen, G. Witkamp, *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 4919 (1999)
20. D.W. Cushman, H.S. Cheung, *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637 (1971)
21. A. Keller, A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold, **74**, 5383 (2002)
22. R. Natesh, S. L. U. Schwager, E. D. Sturrock, and K. R. Acharya, **421**, 551 (2003)
23. J.M. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Pall, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* **1–2**, 1 (2015)
24. C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren, *J. Comput. Chem.* **25**, 1656 (2004)
25. H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, *J. Phys. Chem.* **91**, 6269 (1987)
26. E.B. De Oliveira, C. Humeau, L. Chebil, E.R. Maia, F. Dehez, B. Maigret, M. Ghoul, J.-M. Engasser, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **59**, 96 (2009)
27. M.D. Polêto, M.P. Alves, R. Ligabue-braun, M.R. Eller, A.F. de Carvalho, *Food Chem.* **286**, 309 (2019)
28. O. Trott, A.J. Olson, *Wiley Period.* **31**, 455 (2010)
29. E.C. de Souza, J.S.D.R. Coimbra, E.B. de Oliveira, R.C.F. Bonomo, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **973C**, 84 (2014)
30. A. Yamada, T. Sakurai, D. Ochi, E. Mitsuyama, K. Yamauchi, F. Abe, *Food Chem.* **172**, 441 (2015)
31. R.J. Bazan, J.F. Fletterick, *Virology* **171**, 637 (1989)
32. T. Aoki, Y. Kako, T. Imamura, *J. Dairy Res.* **53**, 53 (1986)
33. J. Kyte, J. Doolittle, *Mol. Biol.* **157**, 105 (1982)
34. Q. Wu, J. Jia, H. Yan, J. Du, Z. Gui, *Peptides* **68**, 17 (2015)
35. A.S. Pina, A.C.A. Roque, *J. Mol. Recognit.* **22**, 162 (2009)
36. S. Maruyama, H. Mitachi, H. Tanaka, N. Tomizuka, H. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1581 (1987)
37. I. López-Exposito, A. Quirós, L. Amigo, I. Recio, *Lait* **87**, 241 (2007)
38. J. Tauzin, L. Miclo, J. Gaillard, *FEBS Lett.* **531**, 4 (2002)
39. R.J. Fitzgerald, B.A. Murray, D.J. Walsh, *J. Nutr.* **134**, 980S (2004)
40. M. Abdel-hamid, J. Otte, C. De Gobba, A. Osman, *Int. Dairy J.* **66**, 91 (2017)
41. A.T. Girgih, R. He, R.E. Aluko, *J. Agric. Food Chem.* **62**, 4135 (2014)
42. P. Li, J. Jia, M. Fang, L. Zhang, M. Guo, J. Xie, *Process Biochem.* **49**, 898 (2014)
43. J. Tauzin, L. Miclo, G. Jean-luc, *FEBS Lett.* **531**, 4 (2002)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## CAPÍTULO 3.

Structural and molecular bases of angiotensin-converting enzyme inhibition by bovine casein-derived peptides: an *in silico* molecular dynamics approach

---



**Este capítulo encontra-se publicado em:**

**De Oliveira, T.V.**, Guimarães, A.P., Bressan, G.C., Maia, E.R., Coimbra, J.S.R, Polêto, M.P., De Oliveira, E.B. (2020). Structural and molecular bases of angiotensin-converting enzyme inhibition by bovine casein-derived peptides: an *in silico* molecular dynamics approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.**

DOI: 10.1080/07391102.2020.1730243.



## Structural and molecular bases of angiotensin-converting enzyme inhibition by bovine casein-derived peptides: an *in silico* molecular dynamics approach

Thomás Valente De Oliveira<sup>a</sup>, Ana Paula Guimarães<sup>b</sup>, Gustavo Costa Bressan<sup>c</sup>, Elaine Rose Maia<sup>d</sup>, Jane Sélia dos Reis Coimbra<sup>a</sup> , Marcelo Depólo Polêto<sup>e</sup> and Eduardo Basílio De Oliveira<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Química (DEQ), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil; <sup>c</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil; <sup>d</sup>Laboratório de Estudos Estruturais Moleculares (LEEM), Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; <sup>e</sup>Departamento de Biologia Geral (DBG), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil

Communicated by Ramaswamy Sarma

### ABSTRACT

The angiotensin-converting enzyme (ACE) plays a key role in blood pressure regulation process, and its inhibition is one of the main drug targets for the treatment of hypertension. Though various peptides from milk proteins are well-known for their ACE-inhibitory capacity, research devoted to understand the molecular bases of such property remain scarce, specifically for such peptides. Therefore, in this work, computational molecular docking and molecular dynamics calculations were performed to enlighten the intermolecular interactions involved in ACE inhibition by six different casein-derived peptides (FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK, YLGYLEQLLR, HQGLPQEVLNENLLR and NAVPITPTLNR). Two top ranked docking poses for each peptide (one with N- and the other C-terminal peptide extremity oriented towards the ACE active site) were selected for dynamic simulations (50 ns; GROMOS53A6 force field), and the results were correlated to *in vitro* ACE inhibition capacity. Two molecular features appeared to be essential for peptides to present high ACE inhibition capacity *in vitro*: i) to interact with the S1 active site residues (Ala354, Glu384, and Tyr523) by hydrogen bonds; ii) to interact with Zn<sup>2+</sup> coordinated residues (His383, His387, and Glu411) by short-length hydrogen bonds, as observed in the cases of ALNEINQFYQK (IACE = 80.7%), NAVPITPTLNR (IACE = 80.7%), and FALPQYLK (IACE = 79.0%). Regardless of the temporal stability of these strong interactions, they promoted some disruption of Zn<sup>2+</sup> tetrahedral coordination during the molecular dynamics trajectories, and were pointed as the main reason for the greatest ACE inhibition by these peptides. On the other hand, peptides with intermediate inhibition capacity (50% < I<sub>ACE</sub> < 45%) interacted mainly by weaker interactions (e.g.: electrostatic and hydrophobic) with the Zn<sup>2+</sup> coordinated residues, and were not able to change significantly its tetrahedral coordination structure. These findings may: i) assist the discrimination *in silico* of “good” and “bad” ACE-inhibitory peptides from other food sources, and/or ii) aid in designing *de novo* new molecules with ACE-inhibitory capacity.

### ARTICLE HISTORY

Received 17 December 2019  
Accepted 11 February 2020

### KEYWORDS

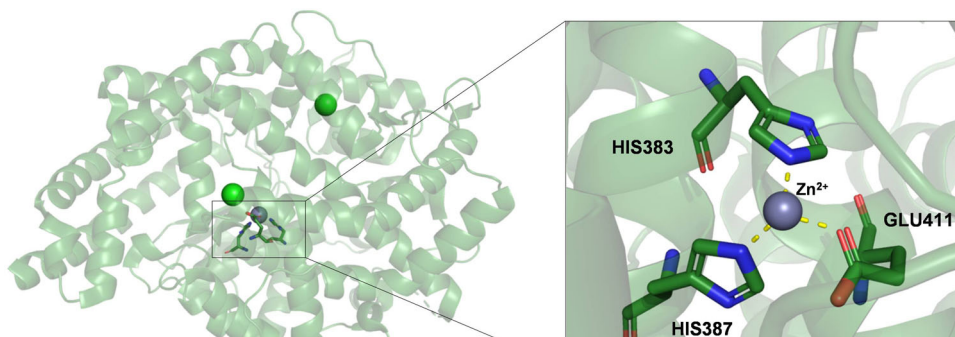
Angiotensin-converting enzyme inhibition; anti-hypertensive compounds; casein-derived bioactive peptides; computational molecular docking; computational molecular dynamics

## 1. Introduction

Raised blood pressure, commonly called hypertension (HT), is a major global public health problem, being greatly responsible for the occurrence of heart attacks, kidney dysfunction and strokes. The number of people affected by hypertension has almost doubled over the past 40 years, and, in 2015, there were 1.13 billion people worldwide living with high blood pressure (NCD Risk Factor Collaboration, 2017). Once hypertension is detected, the use of anti-hypertensive (AH), among which several are ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitors (e.g. captopril, benazepril and enalapril) or body fluid homeostasis regulators (e.g. family of kinases with-no-lysine) (Jonniya & Kar, 2019) is needed. Often, such drugs trigger undesirable side effects such as dry cough, angioedema, and even fetotoxicity (Patel, Rauf, Khan, & Abu-Izneid, 2017). Therefore, to help treating high blood pressure, the search

for natural ACE inhibitors has become a prominent research field and compounds such as foods proteins and peptides derived from their hydrolysis have been investigated. (Abdel-Hamid, Otte, De Gobba, Osman, & Hamad, 2017; Wang, Chen, Fu, Li, & Wei, 2017; Xue et al., 2018).

One of the mechanisms that plays a crucial role in the control of blood pressure involves the renin-angiotensin system (RAS), in which renin is released by the kidneys when the pressure drops to very low values aiming to help to raise the pressure (Patel et al., 2017; Tavassoli, Taghdir, & Ranjbar, 2018). In biochemical terms, when blood pressure drops, kidneys release renin enzyme that acts on another plasma protein called “renin substrate”, releasing the peptide angiotensin I. The angiotensin I is converted to angiotensin II through a reaction catalyzed by the angiotensin-converting enzyme (ACE). Once in the bloodstream, angiotensin II raises blood pressure by vasoconstriction, and acts on kidneys by



**Figure 1.** ACE active site containing the tetracoordinated  $Zn^{2+}$  cation.

decreasing the salt and water excretion, increasing the volume of the extracellular fluid, thus resulting in a rise of the blood pressure. Therefore, ACE inhibitors can prevent the conversion of angiotensin I to angiotensin II, yielding an anti-hypertensive effect (Carey, 2015; De Oliveira et al., 2018; Tavassoli et al., 2018).

ACE is a dipeptidyl carboxypeptidase, found in two isoforms, transcribed in different ways by the same gene, according to the biological tissue. In somatic tissues, ACE (sACE) corresponds to a glycoprotein comprised of two homologous C- and N-domain and composed of a single polypeptide chain of 1277 residues, whereas in the sperm cells, ACE (tACE) is composed by 701 residues and has a single active domain (Natesh, Schwager, Sturrock, & Acharya, 2003). Each domain of sACE contains an active site with a conserved zinc-binding motif complexed by two histidines and one glutamate residues. These two domains differ in their substrate specificities for inhibition and activation profiles, as well as physiological functions (Wei, Clauser, Alhenc-Gelas, & Corvol, 1992). The C-domain is responsible for controlling blood pressure and cardiovascular function, being the dominant site for conversion of angiotensin I. As the sequence of tACE and the C-domain of sACE are almost identical (except for the 36 N-terminal residues), the C- and N-domain structures can be compared by using tACE as reference (Natesh et al., 2003; Woodman et al., 2006). ACE has three major active sites, namely S1, S2 and S'1. The S1 site includes residues Ala354, Glu384, and Tyr523; the S2 site includes the residues Gln281, His353, Lys511, His513, and Tyr520; and the S'1 site corresponds only to the Glu162 residue (Wu, Jia, Yan, Du, & Gui, 2015). Furthermore, the  $Zn^{2+}$  cation is an important catalytic component of ACE. Its stabilization comes from two strong interactions with His383 and His387 on the HEXXH structural motif of the  $\alpha$ -helix 13, being complemented by an interaction with a Glu411 of the  $\alpha$ -helix 14 (Natesh et al., 2003; Wei et al., 1992). This tetracoordinate group of  $Zn^{2+}$  ion plus these three residues is considered by some authors as the fourth ACE active site (Jalkute, Barge, Dhanavade, & Sonawane, 2013) (Figure 1).

It is known that peptides with pronounced antihypertensive activity are often predominantly hydrophobic and have low molecular mass (Cruz-Huerta, Garcia-Nebot, Miralles, Recio, & Amigo, 2015). Indeed, Norris, O'Keeffe, Poyarkov, and FitzGerald (2015) identified peptides IQA and VEP, with both characteristics. On the other hand, Abdel-Hamid et al. (2017) also obtained four anti-hypertensive peptides with

low molecular mass, but formed by hydrophilic residues at their extremities (namely IPPK, IVPN, QPPQ, and FPGPIPK). Although small peptides have higher ACE inhibitory capacity, molecular size does not seem to be a limiting feature, as exemplified by the following larger anti-hypertensive peptides: YQKFPQYLQY (Xue et al., 2018); YQEPVLGPVRGPFPIIV and RFFVAPFPE (Corrons, Liggieri, Trejo, & Bruno, 2017); and YPELFEXERCEU, TTMLPW and TTMLPW (Norris et al., 2015). The presence of positively or negatively charged residues near the C and N-terminal extremities also appears to contribute to the ACE activity inhibition (Fitzgerald, Murray, & Walsh, 2004). Mirzaei, Mirdamadi, Ehsani, and Aminlari (2018) showed that the positively charged 3-amine group in lysine at the N or C-terminal extremities and the presence of aspartic and glutamic acids in the peptide sequence may contribute to ACE inhibitory activity. In these literature reports, however, the interaction mechanisms between peptides and ACE, at a molecular level were not explored.

Other studies, as for instance those reported by De Oliveira et al. (2020, *in press*), Mirzaei et al. (2018), Tu et al. (2018), García-Mora et al. (2017) and Lin, Zhang, Han, and Cheng (2017), have used computational docking simulations, aiming to understand interaction patterns between ACE and peptides with inhibitory capacity towards this enzyme. These authors reported that hydrogen bonds have great importance in the stabilization of the peptide within the ACE catalytic cavity (García-Mora et al., 2017; Tu et al., 2018). However, few studies were found in which the temporal stability of ACE-peptide complexes was evaluated through molecular dynamics (MD). One of them is the work of Qi, Zhang, Liu, Zheng, and Wu (2018), who studied the interactions between ACE and the GEF peptide by combining molecular docking and molecular dynamics simulations (GROMOS 96 force field; 20 ns at 300 K), and observed that hydrogen bonds were crucial for ACE-GEF stability, mainly with the Lys475. In addition, they noted that chelation between  $Zn^{2+}$  and oxygen atoms from carboxylate of GEF were a crucial factor to the peptide inhibitory activity. Fang et al. (2019) applied molecular dynamics simulations (Amber99SB force field; 400 ns, at 300 K) to investigate the stability of intermolecular interactions of ACE complexes with the peptides LIVT, YLVPH or YLVR, but they did not identify stable hydrogen bonds interactions between inhibitors and ACE.

Recently, De Oliveira et al. (2020, *in press*) reported the production (from a controlled trypsinolysis of bovine caseins)

and the experimental identification (through RP-HPLC/MALDI-TOF tandem) of nine potentially AH peptides. In order to identify the interaction networks of ACE-peptides complexes, molecular docking studies were performed with six peptides that presented substantial measured ACE inhibitory capacity ( $I_{ACE}$ ) *in vitro*. However, some gaps remained open, such as: “Are these complexes stable over time?”; “Among intermolecular interactions identified, are there some more relevant for the complex stability?”; and, mainly, “Among intermolecular interactions identified, are there one or more which are essential for an effective peptide inhibitory activity?”. Hence, the present study aimed to gain a deeper understanding of the molecular recognition mechanisms of ACE inhibition by these peptides by using molecular dynamics simulations, to evaluate the temporal behavior of intermolecular interactions in these complexes, as well as to analyze enzyme conformational changes triggered by complexes formation. The starting systems were complexes formed by ACE and peptides, both N- and C-oriented, obtained through molecular docking assays.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Computational resources

Systems preparation and all molecular modelling calculations were carried out using the “Jupiter” Calculation Cluster, at the Universidade Federal de Viçosa, which is equipped with 1 AMD Opteron™ Processor 6376 (16 M cache, 2.3 GHz and 32 cores), 64 GB of RAM, 100 TB of storage capacity and 24 calculation nodes. All analysis were performed on a computer equipped with an Intel® Core™ i7-8700 - 8th generation processor, 16 GB of RAM, equipped with a NVIDIA® GeForce® GTX 1060 video card of 6 GB, GDDR5.

### 2.2. Structure preparation

#### 2.2.1. Protein structure preparation (receptor)

The crystal structure of human sperm angiotensin converting enzyme (sACE) in complex with Lisinopril (resolution of 2 Å) was obtained from the RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 1O86) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) (Natesh et al., 2003). A structure discontinuity between the amino acid residues 435 and 438 was modeling using the Phyre2 web portal (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015). The inhibitor lisinopril, and a free Gly molecule were removed, whereas the  $Zn^{2+}$  and  $Cl^-$  cofactors were kept at their respective positions within the protein structure. The ACE tridimensional structure was submitted to molecular dynamics (MD) simulation using the GROMACS 5.1.4 software package (Abraham et al., 2015) in a dodecahedral box with a distance of 1.4 Å between the protein and the box edges, using the GROMOS53A6 force field. The  $Zn^{2+}$  cation was modeled by using GROMOS53A6 default parameters Oostenbrink, Villa, Mark, and Gunsteren (2004) and with not constraints between  $Zn^{2+}$  and coordinated residues since the ion coordination was correctly reproduced throughout MD simulations. Firstly, hydrogens were added to the crystallographic structure, and the system was filled with 24479 explicit SPC water models

**Table 1.** Position restraints applied to the protein atoms before the production MD trajectories (Polêto et al., 2019).

Position restraint atoms	Position restraint energy (kJ mol <sup>-1</sup> )	Duration of step (ns)
All atoms	1000	1
Heavy atoms	800	2
Mainchain + $\beta$ -carbon	600	2
Mainchain	400	2
Protein backbone	200	2
$\alpha$ -carbons	100	3
$\alpha$ -carbons	50	3

(Berendsen, Grigera, & Straatsma, 1987) and 89 Na<sup>+</sup> and 76 Cl<sup>-</sup> monoatomic ions to neutralize the system while adding a salt concentration of 0.15 mol L<sup>-1</sup>. Accordingly to Cunha, Ramalho, Alencastro, and Maia (2004) and De Oliveira et al. (2009), with modifications, system energy was minimized through a sequence of energy minimizations, using two sets of *steepest descent* algorithm with maximum converging energy smaller than 10 and 1 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>, respectively, and one set of *conjugate gradient* algorithm with maximum converging energy smaller than 0.1 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup>. Next, the system was equilibrated for 1 ns in a NVT ensemble in order to reach a temperature equilibrium of 310 K, using position restraint forces of 1000 kJ mol<sup>-1</sup> for all protein atoms (Andrade, Silva, & Maia, 2007) and a V-rescale thermostat (Bussi, Donadio, & Parrinello, 2007). After that, the system pressure was then equilibrated in 1 bar, with a Parrinello-Rahman barostat (Parrinello & Rahman, 1981), using several short simulations in a NPT ensemble, totalizing 15 ns, to provide a slow equilibration while accommodating the protein to liquid phase. The position restraints were done as described by Polêto, Alves, Ligabue-Braun, Eller, and De Carvalho (2019), summarized in Table 1.

Then, the systems were submitted to production runs of 50 ns with a 2 fs timestep and using the Verlet leapfrog algorithm for integrating Newton’s equations of motion. A long-range interaction *cutoff* of 10 Å and the PME algorithm were used to treat electrostatic and Lennard-Jones interactions (Gonçalves, Senac, Fuchs, Hunenberger, & Horta, 2019). Finally, *gmx cluster* with a *cutoff* limit of 2 Å was applied in order to identify a centroid conformation which could be used as target in docking assays. All simulations were carried out using the resources of the Jupiter Cluster at the Universidade Federal de Viçosa (UFV, Brazil).

#### 2.2.2. Peptides structures preparation (ligands)

In a study previously performed by our team (De Oliveira et al., 2020, *in press*), hydrolysates obtained from a controlled trypsinolysis bioprocess of bovine caseins (enzyme:substrate ratio 1:150 (w/w) at 37 °C, under magnetic stirring, for 120 min) were fractioned according to their molecular weight by ultrafiltration (5 kDa cut-off membrane) and RP-HPLC, and evaluated towards their *in vitro* % $I_{ACE}$  according to an adaptation of the methodology previously proposed by Cushman and Cheung (1971). The sequences of peptides were identified by MALDI-TOF/TOF technique and the model interaction networks of ACE-peptides complexes were proposed by molecular docking calculations performed with Autodock Vina (Trott & Olson, 2010). Six of these peptides were chosen

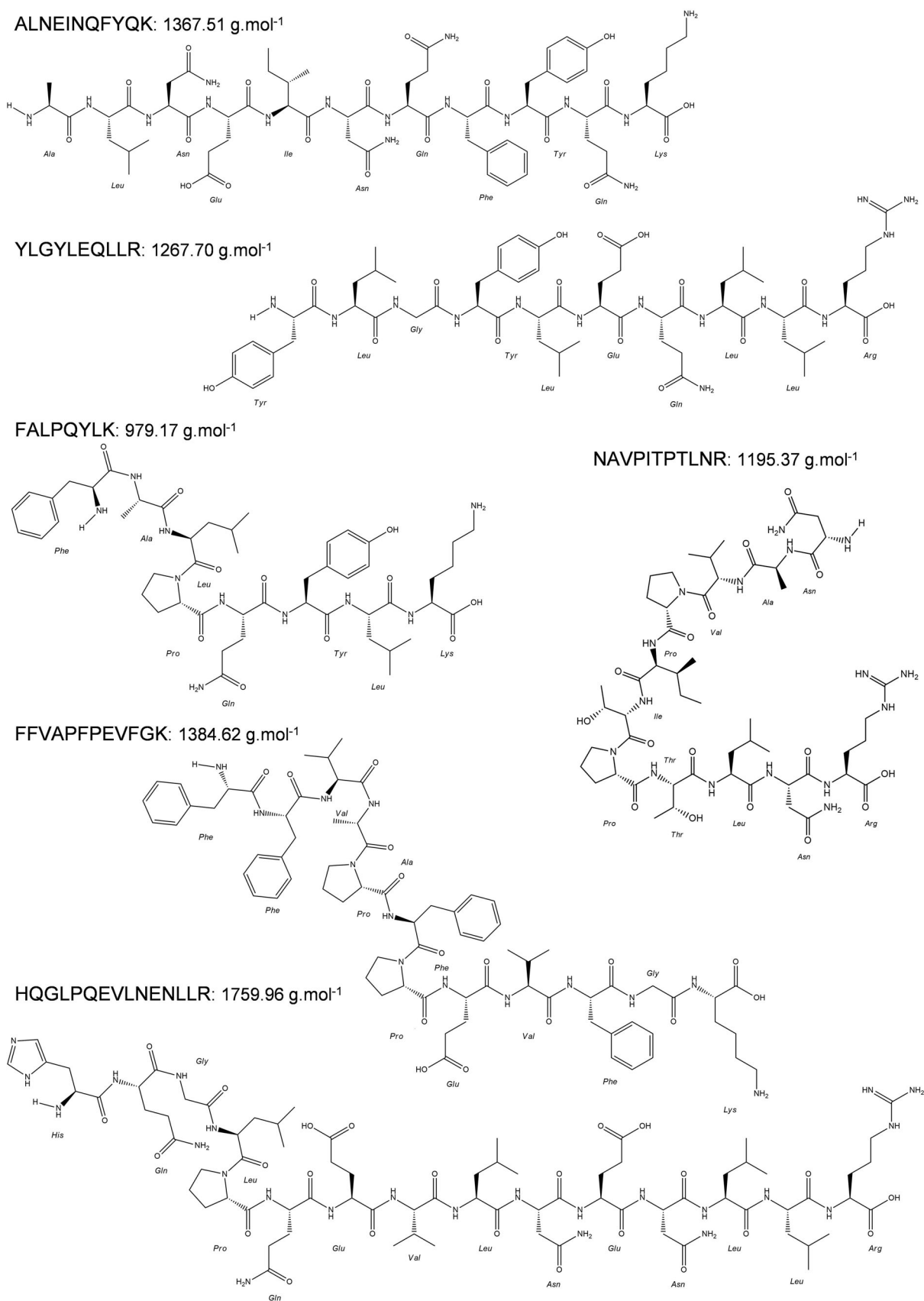
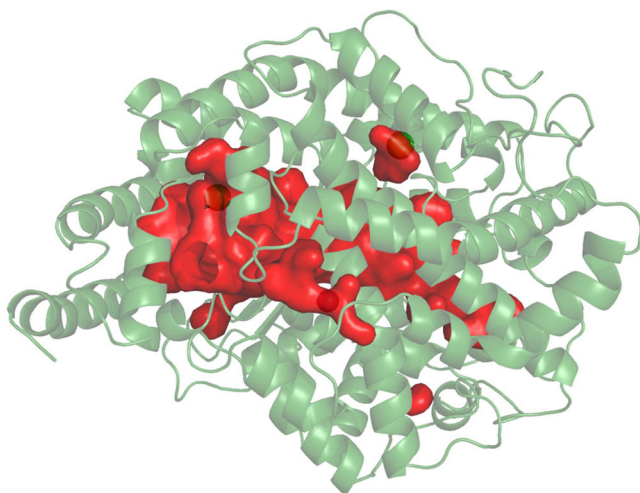


Figure 2. Molecular structures of the six peptides (built using the ChemDraw software).

according to their ability to fill the ACE active sites and the angiotensin inhibition capacity of their chromatographic fractions: ALNEINQFYQK ( $F_1$ ,  $I_{ACE} = 80.7\%$ ), NAVPITPTLNR ( $F_1$ ,  $I_{ACE} = 80.7\%$ ), FALPQYLK ( $F_2$ ,  $I_{ACE} = 79.0\%$ ), FFVAPFPEVFGK ( $F_6$ ,  $I_{ACE} = 47.8\%$ ), YLGYLEQLLR ( $F_6$ ,  $I_{ACE} = 47.8\%$ ) and HQGLPQEVLNENLLR ( $F_3$ ,  $I_{ACE} = 49.2\%$ ) (Figure 2). Their



**Figure 3.** ACE site within which the peptides were docked (inside the red surface).

tridimensional structures were built using Discovery Studio Visualizer (v17.2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia).

### 2.3. Molecular docking procedure

The AutoDock Vina package (Trott & Olson, 2010) with the gradient optimization algorithm was used for docking assays of the six casein-derived peptides (ligands) within the catalytic cavity of ACE (Figure 3). For this, the zinc from binding site, side chains of ACE active sites residues (S1: Ala354, Glu384, Tyr523; S2: Gln281, His353, Lys511, His513, Tyr520; and S'1: Glu162) were set as flexibles, according Joshi, Joshi, Sharma, Chandra, and Pande (2020), and the docking grid was designed to encompass S1, S2, S'1, and zinc-binding site residues (His383, His387 and Glu411), with a number of points in x, y and z dimensions equal to 34, 40 and 42, respectively, with 1 Å spacing. Exhaustiveness was set to 64 and a maximum energy range was set to 2 kcal mol<sup>-1</sup>. The Zn<sup>2+</sup> from ACE binding site was modeled by using the default parameters within AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). For each peptide-ACE complex, the top 20 obtained poses were submitted to an analysis on the MolProbity server (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) in order to evaluate their  $\psi$  and  $\phi$  angles using the Ramachandran plot, aiming at identifying possible false positives. Among the remaining poses, the filling of the active site regions and the N and C terminus orientation was visually observed. For each complex, two poses that fitted the active site region, with both N and C orientations towards the catalytic Zn<sup>2+</sup> cation were selected regarding the lowest binding energy estimation between them. Each complex selected was analyzed with Discovery Studio Visualizer free (v17.2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia), aiming to identify ligand-receptor interactions, such as hydrogen bonds, hydrophobic, electrostatic, and coordination interactions specifically located at the ACE active sites.

### 2.4. Molecular dynamics (MD) procedure

All twelve selected complexes were submitted to molecular dynamics simulations using GROMACS 5.1.4 package

**Table 2.** Information about systems submitted to the molecular dynamics, in terms of amounts of water molecules and Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions.

Peptide	Water molecules	Na <sup>+</sup> ions	Cl <sup>-</sup> ions
ALNEINQFYQK	24648	89	76
NAVPIPTLNR	24651	88	76
FALPQYLK	24657	88	76
FFVAPFPEVFGK	24638	89	76
YLGYLEQLLR	24653	89	76
HQGLPQEVLENLLR	24628	90	76

(Abraham et al., 2015) along with GROMOS53A6 force field (Oostenbrink et al., 2004) in dodecahedral boxes with a distance of 1.4 Å between the protein and the box edges and a volume of 386.99 nm<sup>3</sup>. The systems were solvated by explicit SPC water models and neutralized by Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> while creating a saline concentration of 0.15 mol L<sup>-1</sup>. Each system received a codification according to the peptide and its extremity orientation (N or C terminus). The number of water molecules and of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions for each system, were described in Table 2.

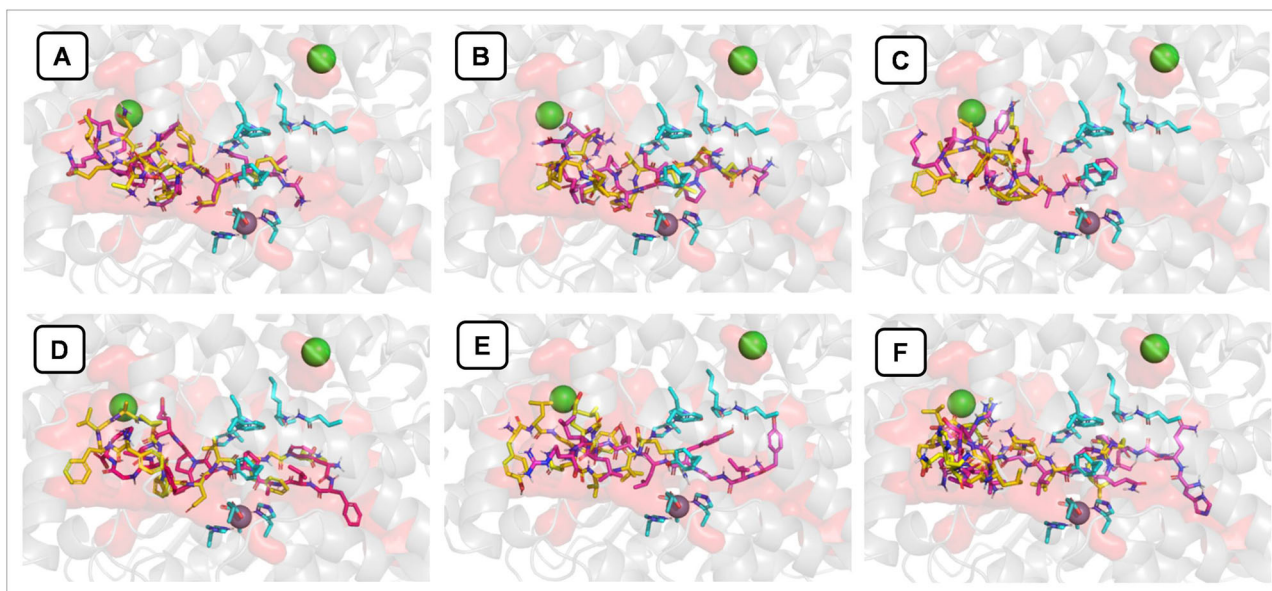
After protocols of energies minimization, equilibration (at 310 K and 1 bar) and production runs followed the same sequence as described for the receptor preparation (Topic 2.2.1). The *cutoff* for Lennard-Jones and electrostatic interactions were set to 10 Å, and the systems were submitted to a production run of 50 ns with a 2 fs timestep, using the Verlet leapfrog algorithm and the PME algorithm to treat Lennard-Jones and electrostatic interactions. The trajectories were analyzed according to their Root Mean Square Deviation (RMSD) and Root Mean Square Fluctuations (RMSF) for enzyme and peptide of each complex. The interactions between the peptides and ACE residues complexed with the Zn<sup>2+</sup> cation had their relative distances measured during the trajectory.

## 3. Results

### 3.1. Molecular docking

In this study, *in silico* molecular modelling tools were applied to gain detailed information about the intermolecular interactions between casein-derived peptides and ACE, focusing on structural features of ligand-receptor complexes, such as binding sites, binding modes, and temporal behavior. Computational docking essays of the peptides FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK, YLGYLEQLLR, HQGLPQEVLENLLR, and NAVPIPTLNR were performed within the ACE catalytic site. In order to eliminate poses with unfavorable backbone torsions, all peptides  $\psi$  and  $\phi$  dihedral angles were evaluated through Ramachandran plots, and poses in which those torsions were assigned as outliers were excluded from the study. Among the remaining poses, for each peptide, a visual analysis was firstly performed, aiming to select poses with both terminal N- and C-oriented in different ways and near to the enzyme active site. Among those meeting these requirements, the poses presenting the lowest binding energy (one for each terminal orientation, N and C), were chosen for further evaluation. The corresponding complexes are shown in Figure 4.

For each selected pose, an analysis of interactions between the peptides and the angiotensin-converting enzyme was



**Figure 4.** Poses N-oriented (yellow sticks) and C-oriented (purple sticks) obtained by the docking assays: A) ALNEINQFYQK, B) NAVPITPTLNR, C) FALPQYLK, D) FFVAPFPEVFGK, E) YLGYLEQLLR, and F) HQGLPQEVLENLLR. ACE catalytic pocket are depicted with light red; active site residues are depicted with cyan sticks;  $Zn^{2+}$  ion is depicted with grey sphere; and  $Cl^{-}$  ions are depicted with green spheres.

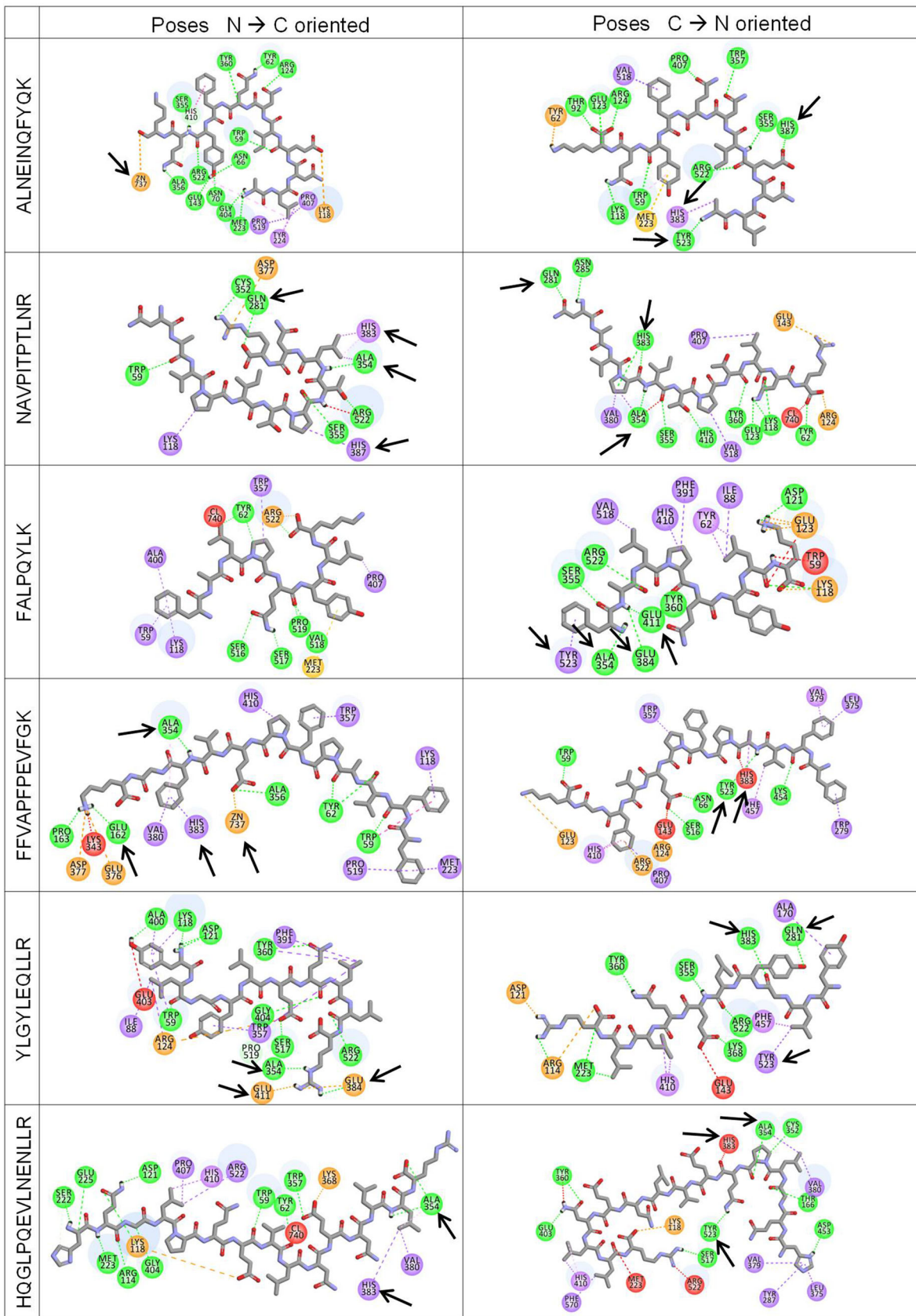
performed and presented through two-dimensional images (Figure 5). In addition, for the interactions between peptides poses and the residues of active sites S1, S2, S'1 and residues coordinated with  $Zn^{2+}$  cation, specific analysis of the interactions types, the distances between atoms and of the angles from hydrogen bond interactions were detailed in Table 3.

Although in all selected poses the ligand (peptide) was located near to the active sites (Figure 4), when examining separately each interaction formed between ACE active sites and these peptides (Figure 5 and Table 3), one can note that only the peptide FALPQYLK, N-oriented pose, did not establish any interaction with ACE, according to docking results. For all of the other cases, one or more interactions with the ACE active site residues or with  $Zn^{2+}$  coordinated residues were observed. These interactions included hydrogen bonds, electrostatic interactions, and hydrophobic interactions, with distances ranging from 1.9 to 4.8 Å.

### 3.2. Molecular dynamics (MD)

Molecular dynamics simulations were performed for the 12 ACE/peptides complexes, in order to explore the peptides dynamics within ACE active sites, as well as the temporal behavior of intermolecular interactions formed in such complexes. In order to examine the folding maintenance, RMSD values of the protein backbone atoms were calculated (Figure 6). For all complexes, no significant conformation changes were observed during 50 ns, with regard to the initial structure, as RMSD values remained at less than 3 Å in all cases. Also, for the ACE-ALNEINQFYQK, ACE-NAVPITPTLNR and ACE-FALPQYLK complexes, no significant differences were observed between N- and C-oriented complexes. However, for the ACE-FFVAPFPEVFGK, ACE-YLGYLEQLLR and ACE-HQGLPQEVLENLLR complexes, minor differences (about 0.5 Å) are observed between complexes with the N- and C-oriented ligands.

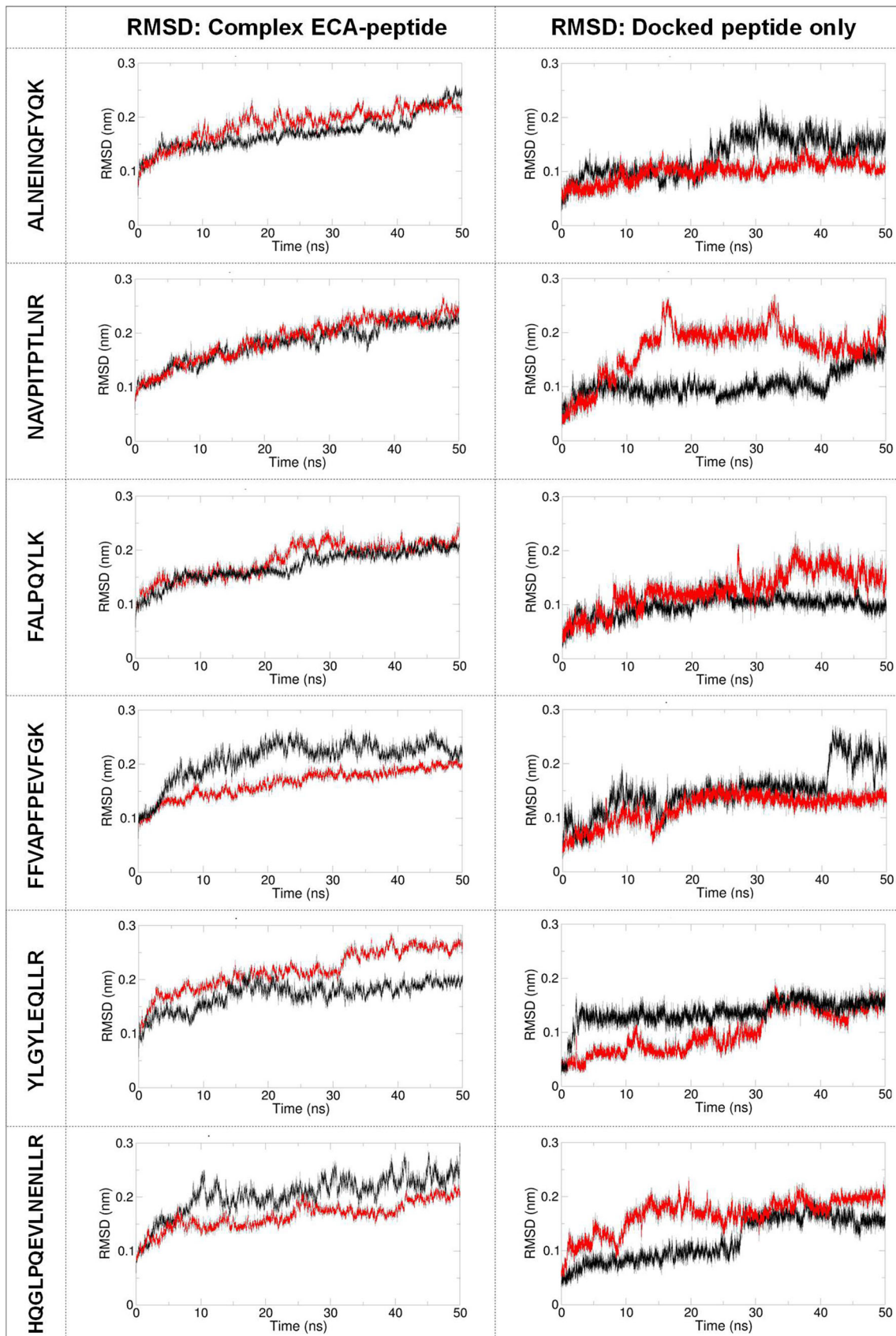
Due to the large number of atoms in each ACE/peptide complex which could mask the specific RMSD values of peptide atoms inside, RMSD values of peptides' backbone only were also calculated in each case. In general, the single peptides presented RMSD values close to those of the whole complexes, oscillating between 1 and 2 Å. For the ALNEINQFYQK peptide, the C-oriented pose stabilized rapidly, after about 5 ns ( $1.0 \pm 0.2$  Å), and the N-oriented pose showed an increase in its RMSD after 25 ns of simulation, reaching a RMSD value of  $1.6 \pm 0.2$  Å. For the HQGLPQEVLENLLR peptide, the C-oriented pose stabilized after about 15 ns with RMSD of  $1.8 \pm 0.2$  Å, and the N-oriented pose showed a stability in its RMSD before 25 ns of simulation ( $0.9 \pm 0.1$  Å). After that, the N-oriented pose showed a variation in the position of its atoms, reaching a RMSD of  $1.6 \pm 0.1$  Å at the end of the calculated trajectory. For NAVPITPTLNR peptide, a large difference between the N- and C-oriented poses was observed after 15 ns of simulation. The N-oriented pose showed some movement, stabilizing with RMSD of  $1.1 \pm 0.2$  Å, while the C-oriented pose rapidly reached a RMSD of about  $1.9 \pm 0.3$  Å. For the FALPQYLK peptide, the N-oriented pose stabilized rapidly, after about 12 ns, and the C-oriented pose showed an increase in its RMSD value by small steps, stabilizing at  $1.6 \pm 0.2$  Å after 35 ns of simulation. For the FFVAPFPEVFGK peptide, the two poses (N- and C-oriented) reached, after 15 ns, RMSD of about  $1.5 \pm 0.1$  Å. However, after 40 ns, the N-oriented pose showed great variation in the position of its atoms, suggesting a conformational or positional rearrangement within ACE structure, reaching a RMSD of  $2.2 \pm 0.2$  Å at the end of the calculated trajectory. For the YLGYLEQLLR peptide, N-oriented pose stabilized before 5 ns with a RMSD of  $1.4 \pm 0.2$  Å. The C-oriented pose presented a RMSD value of  $0.7 \pm 0.2$  Å until 30 ns of simulation but, after that, its RMSD increased to  $1.4 \pm 0.2$  Å, suggesting a conformational or positional rearrangement. It is



**Figure 5.** Schematic representation of interactions between ACE and peptides poses (N- and C-oriented). The black arrows indicate residues from ACE active sites interacting with the peptide pose. Hydrogen bonds are depicted with green dashed lines; electrostatic interactions, as orange dashed lines; hydrophobic interactions, as purple dashed lines.

**Table 3.**  $I_{ACE}$  (%) of peptides chromatographic fractions, binding energy ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) of ACE-peptides complexes obtained by docking assays, and intermolecular interactions involving the peptides and ACE residues from S1, S2 and S'1 active sites and residues coordinated with  $\text{Zn}^{2+}$ .

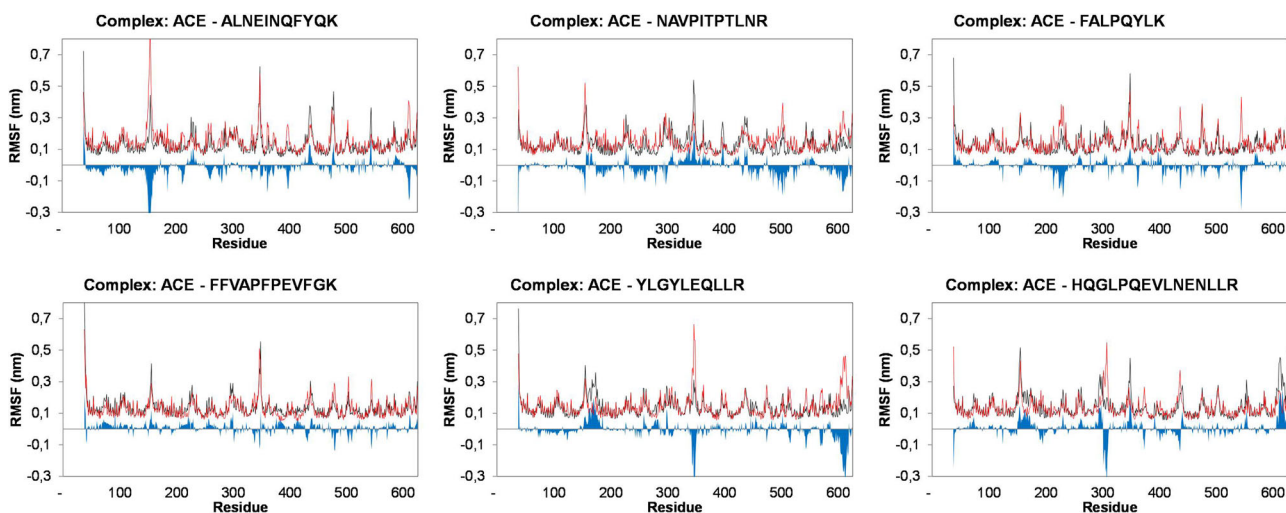
Peptide	$I_{ACE}$ (%) of chromatographic fraction <i>in vitro</i> (De Oliveira et al., 2020, <i>in press</i> )	Extremity orientation	Binding Energy ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	Interaction Type	ACE residue	Active Site	Peptide residue	Interaction distance (Å)	H-bonds angles (degrees)
ALNEINQFYQK	80.7	N → C	−8,8	Electrostatic	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	Lys11	4.8	−
				Hydrophobic	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Ala1	3.9	−
		C → N	−9,1	Hydrogen bond	His387	$\text{Zn}^{2+}$	Glu4	2.8	128.1
				Hydrogen bond	Tyr523	S1	Ala1	1.9	142.6
NAVPIPTLNR	80.7	N → C	−6,9	Hydrogen bond	Gln281	S2	Arg11	2.1	161.7
				Hydrogen bond	Ala354	S1	Leu9	2.5	145.5
				Hydrophobic	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Leu9	3.7	−
		C → N	−7,3	Hydrophobic	His387	$\text{Zn}^{2+}$	Pro7	5.0	−
				Hydrogen bond	Gln281	S2	Asn1	2.4	128.1
				Hydrogen bond	Ala354	S1	Ile5	2.0	177.5
				Hydrogen bond	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Pro4	2.4	120.7
FALPQYLK	79.0	N → C	−9,2	−	−	−	−	−	−
				C → N	−9,2	Hydrogen bond	Ala354	S1	Phe1
		C → N	−9,2	Hydrogen bond	Glu384	S1	Ala2	2.8	107.2
				Hydrogen bond	Glu411	$\text{Zn}^{2+}$	Ala2	2.8	132.5
FFVAPFPEVFGK	47.8	N → C	−9,4	Hydrophobic	Tyr523	S1	Phe1	4.9	−
				Electrostatic	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	Glu8	5.4	−
		C → N	−9,7	Hydrogen bond	Glu162	S'1	Phe10	2.2	140.7
				Hydrogen bond	Ala354	S1	Lys12	2.1	149.7
YLGYLEQLLR	47.8	N → C	−9,1	Hydrophobic	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Phe10	3.6	−
				Hydrogen bond	Tyr523	S1	Ala4	2.6	155.5
				Hydrogen bond	Ala354	S1	Arg10	2.1	143.5
		C → N	−8,3	Electrostatic	Glu384	S1	Arg10	4.2	−
				Electrostatic	Glu411	$\text{Zn}^{2+}$	Arg10	2.5	−
				Hydrogen bond	Gln281	S2	Tyr4	3.0	93.6
HQGLPQEVLNENLLR	49.2	N → C	−8,7	Hydrogen bond	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Gly3	2.6	97.7
				Hydrophobic	Tyr523	S1	Leu2	4.5	−
		C → N	−8,7	Hydrogen bond	Ala354	S1	Arg15	2.6	109.8
				Hydrogen bond	Ala354	S1	Leu14	2.3	120.6
C → N	−8,7	Hydrophobic	His383	$\text{Zn}^{2+}$	Leu14	4.3	−		
		Hydrogen bond	Ala354	S1	Pro5	2.8	107.1		
				Hydrogen bond	Tyr523	S1	Gln6	2.3	126.7



**Figure 6.** RMSD variation of backbone for complex ACE-peptides and for peptides only during MD trajectories. N-oriented poses are depicted with black lines and poses C-oriented poses with red lines.

noteworthy that, at the same trajectory time, an increase in RMSD of the corresponding whole complex had been previously observed (Figure 6).

Next, aiming to analyze the average fluctuations per amino acid residue during the MD simulations, RMSF values (considering all non-hydrogen atoms of the ACE/peptide



**Figure 7.** RMSF of heavy atoms of ACE-peptides complexes. RMSF of ACE complexed with N-oriented poses are depicted with black lines; RMSF of ACE complexed with C-oriented poses are depicted with red lines; difference between RMSF of ACE heavy atoms complexed with N-oriented pose and RMSF of ACE heavy atoms complexed with C-oriented pose are depicted with blue lines.

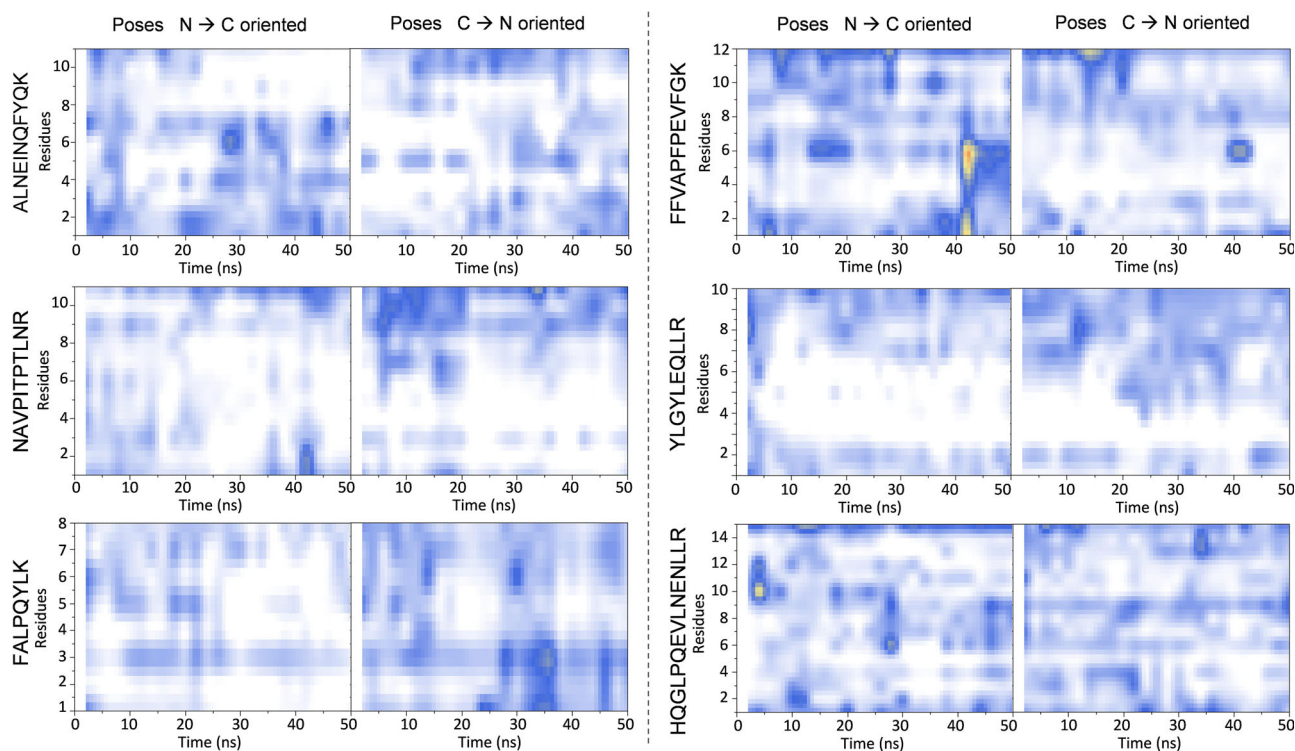
complexes) were calculated for both N- and C-oriented poses of each peptide. Results are represented in Figure 7, along with the differences of RMSF values between N- and C-oriented poses in each case. The RMSF plots (Figure 7) indicate that some regions of the enzyme is highly flexible regardless of the peptide or pose orientation, such as residues comprised at the ACE N-extremity, and regions between Thr150-Gln160 and Met340-Tyr360, notably residues from segments with a handle (turn) as secondary structure. In order to interpret the RMSF difference between the complexes with N- and C-oriented poses, we defined that when the difference  $> 0$ , the complex with N-oriented pose had greater fluctuation than the complex with C-oriented pose, whereas difference  $< 0$  was assigned for C-oriented pose with greater fluctuation than the N-oriented pose. For ALNEINQFYQK peptide, C-oriented pose, an outlier fluctuation is observed only for residues comprised between His153-Asn155, corresponding to a “turn” at the ACE surface. For ACE-NAVPITPTLNR and ACE-FFVAPFPEVFGK complexes, no abnormal fluctuation was verified between the different poses’ orientations, with RMSF differences less than 1 Å. For the FALPQYLK peptide, C-oriented pose, a small difference of fluctuation was observed for the segment Pro227-Gln231 and Leu544, which is located on the protein surface. For ACE-YLGYLEQLLR complex, C-oriented pose, one can note a greater variation of the active site S1 residue Glu162 which, although also in a region of great flexibility, fluctuates less than its N-oriented pose counterpart. However, since the peptide did not establish any type of interaction with this residue, no conclusion can be drawn on correlation between this behavior and an improvement of the ACE inhibitory capacity for this peptide. Finally, for ACE-HQGLPQEVLENLLR complex, the sole differences in the fluctuation pattern were in the Pro292-Asp300 region, for the N-oriented pose, and Met299-Gly309 region, for the C-oriented pose. These regions are not close to any active sites, but in the protein surface, and do not present a well-defined secondary structure.

In order to evaluate the average fluctuations per amino acid residue of the ligands during MD simulations, a heat map of

RMSF values over time (now considering all non-hydrogen atoms only of the docked peptides) was prepared separately for each peptide, in both N- and C-orientations, as shown in Figure 8. In general, the residues at the peptides’ extremities showed greater fluctuations during the simulation. For the extremities of the C-oriented poses of the peptides NAVPITPTLNR, FALPQYLK and FFVAPFPEVFGK, the initial moments of simulations induced greater fluctuation, while for N-oriented poses of FFVAPFPEVFGK and HQGLPQEVLENLLR peptides, the intermediate and final moments of simulations resulted in greater fluctuation of their residues.

#### 4. Discussion

The central purposes of the present study was to explore the molecular basis of ACE inhibition by six casein-derived peptides previously obtained through a controlled trypsinolysis process, to identify the interactions between ACE catalytic site residues and these peptides in different poses (N- or C-terminal extremity oriented towards the catalytic  $Zn^{2+}$  cation), to evaluate the temporal behavior of these complexes by exploring the conformational changes observed during MD simulations, and, to correlate the results with the *in vitro* findings. Some authors highlighted that peptides with low molecular weight and high content of hydrophobic amino acid residues have a better ACE inhibitory capacity (Castro & Sato, 2015; Shi et al., 2014). In our work, the molecular weight did not seem to be decisive to the  $\%I_{ACE}$ , since a heavy peptide, such as ALNEINQFYQK ( $1367.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), performed better inhibitory activity than smaller and similar weight peptides, such as FALPQYLK ( $979.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), YLGYLEQLLR ( $1267.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), and FFVAPFPEVFGK ( $1384.62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Other researchers also had reported large anti-hypertensive peptides, such as YQKFPQYLQY (Xue et al., 2018); YQEPVLGPVRGPFPIIV and RFFVAPFPE (Corrons et al., 2017); and YPELFEXERCEU, TTMLPW, and TTMLPW (Norris et al., 2015), showing that the molecular weight seems not to be a limiting feature to the ACE inhibition. In addition, in

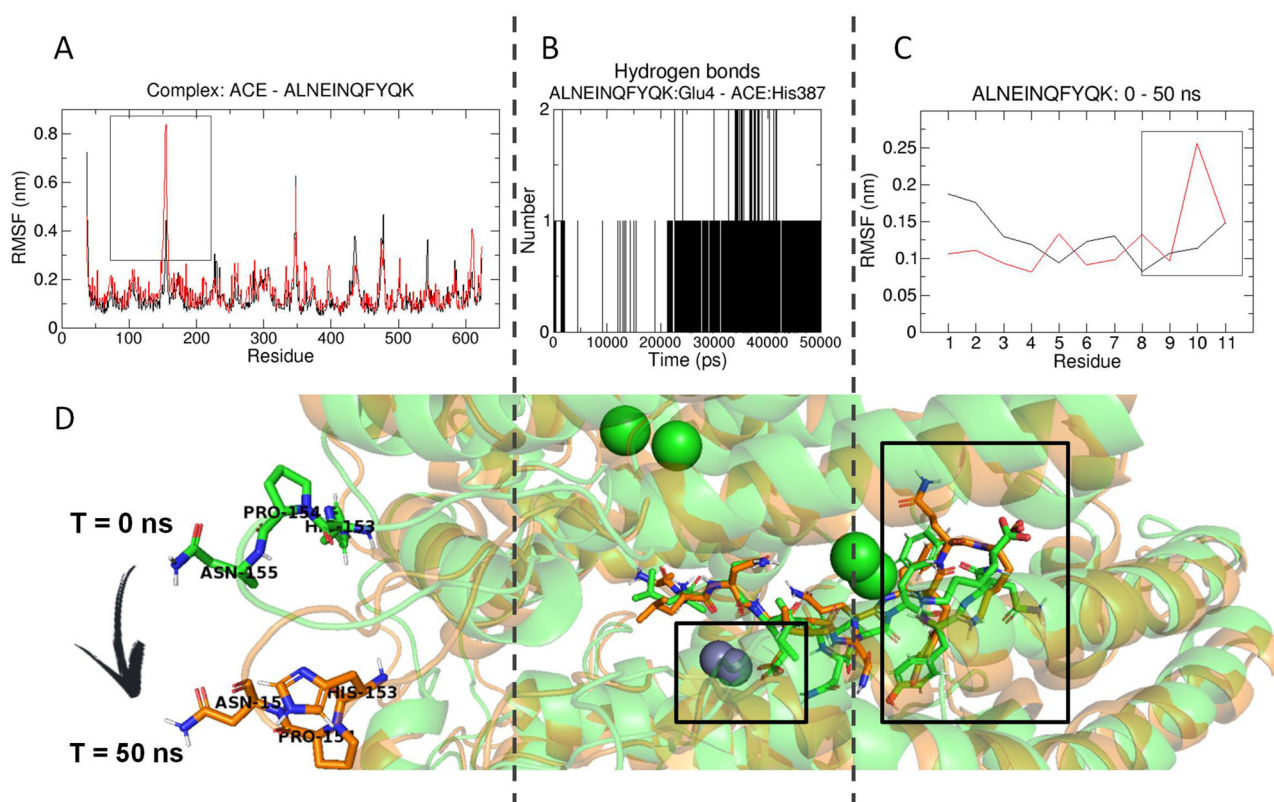


**Figure 8.** Heat map of RMSF values of heavy atoms from the peptides during MD trajectories.

the present study, a predominance of positively charged residues (Arg and Lys) at the N-terminal extremity was observed. Other authors had already pointed that lysine is the charged amino acid more frequent in both C- and N-terminal extremity of ACE-inhibitory peptides, such as KDEDTEEVP and KDEDTEEVH (Tanzadehpanah, Asoodeh, Saidijam, Chamani, & Mahaki, 2018), FPGPIPK and IPPK (Abdel-Hamid et al., 2017), LPESVHLDK and VLSTSFPPK (Mirzaei et al., 2018), KYIPIQ (Lin et al., 2017), and NMAINPSK (Tu et al., 2018) that studied other peptides with ACE inhibition capacity.

In seeking to understand the mechanisms of interaction of ACE and some of the main commercial antihypertensive drugs, Natesh, Schwager, Evans, Sturrock, and Acharya (2004) revealed that the thiol group of captopril (AP) (Ferreira, Bartelt, & Greene, 1970) and the carboxylate groups of enalapril (FAP) and lisinopropyl (FKP) make direct interactions with the catalytic  $Zn^{2+}$  cation or their coordinated residues at the active site of the ACE. More recent studies, such as those by Ke et al. (2017) (licochalcone A, echinatin and EGCG peptide), Gunalan et al. (2019) (RALP and WYT peptides), and by Chen et al. (2019) (LSGYGP) highlighted interactions between the ACE inhibitor with more than one enzyme active site, and always with residues complexed with  $Zn^{2+}$  cation, as a common feature of the action mechanisms of ACE inhibitors. As shown in Table 3, all peptides under study presented at least one of the poses interacting with the  $Zn^{2+}$  cation or its coordinate residues, which can be related to their inhibitory activities. The peptide ALNEINQFYQK, N-oriented pose, formed an electrostatic interaction between the oxygen atom ALNEINQFYQK:Lys11:OXT and the  $Zn^{2+}$  cation, which is relevant for ACE activity inhibition. On the other hand, ALNEINQFYQK, C-oriented pose, formed two

interactions of with residues complexed with  $Zn^{2+}$  cation and one interaction with the active site S1, suggesting that its C-oriented pose has a higher inhibitory capacity compared to its N-oriented pose. The two proposed poses for NAVPITPTLNR, N- and C-oriented, interact with different active sites of the enzyme (S1, S2, and coordination of  $Zn^{2+}$ ) by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. The C-oriented pose from FALPQYLK peptide stands out for interacting with all S1 active site residues, and for making a hydrogen bond with the  $Zn^{2+}$  coordinated residue Glu411. This last interaction is extremely relevant to ACE inhibition, according Natesh et al. (2003) and Wei et al. (1992). Both N and C-oriented poses of FFVAPFPEVFGK peptide established interactions with ACE active sites residues, but the N-oriented pose presented more interactions with the active site residues than the C-oriented pose. It is noteworthy that the N-oriented pose of FFVAPFPEVFGK interacted simultaneously with three different ACE sites, and one of them is the  $Zn^{2+}$  ion coordination site. For YLGYLEQLLR peptide, both N- and C-oriented poses made interactions with different ACE active sites, including the  $Zn^{2+}$  cation coordinated site. For the N-oriented pose, all three interactions occur with the peptide YLGYLEQLLR:Tyr1 residue, being two electrostatic interactions and one hydrogen bond. On the other hand, the C-oriented pose had the interactions with active sites distributed along with the peptide, by hydrogen bonds with the S2 site and the  $Zn^{2+}$  site and by a hydrophobic interaction with the S1 site. For HQGLPQEVLNENLLR peptide, both N and C-oriented poses established hydrogen bonds interactions with ACE S1 active site residues, and only the N-oriented pose formed a hydrophobic interaction with the  $Zn^{2+}$  coordinated residue His383.

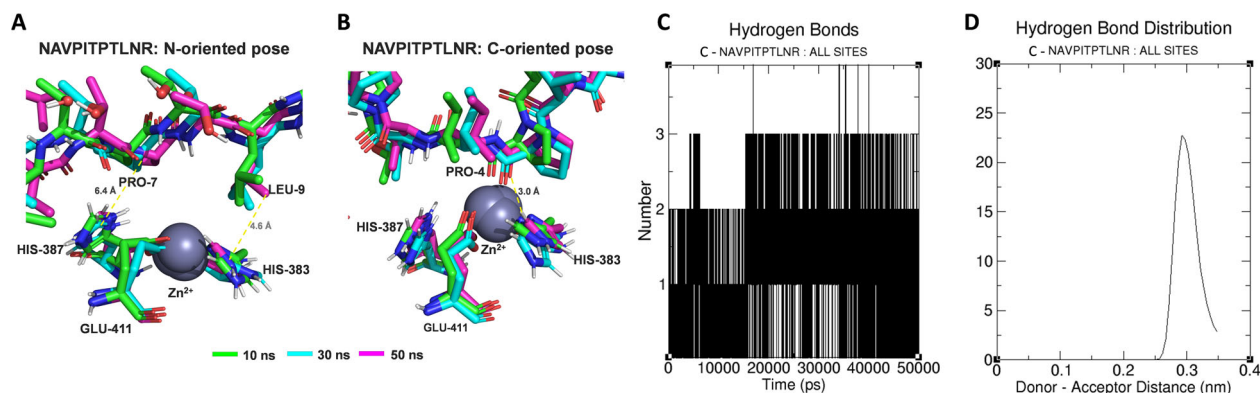


**Figure 9.** Behavior of ACE-ALNEINQFYQK C-oriented complex during MD trajectory: A) ACE residues fluctuations; B) Hydrogen bonds between ALNEINQFYQK:Glu4 and ACE:His387; and C) RMSF of ALNEINQFYQK peptide only; and D) Region with high fluctuation on the ACE surface. The complex conformation at  $t = 0$  ns is depicted with green ribbons, and the complex conformation at  $t = 50$  ns is depicted with orange ribbons. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.

The identification of all putative interactions between a given ligand and amino acid residues and their dynamics must be considered in the analysis. In fact the importance of hydrogen bonds interactions in maintaining the stability of protein/ligand complexes, especially for ACE, has been confirmed by such approaches. For instance, Chen et al. (2019) reported that the hydrogen bonds were the key interactions in the structure of the complex formed between the LSGYGP peptide ( $IC_{50}$  value of  $2.577 \mu\text{M}$ ) and ACE. Yu, Wang, Song, Zhu, and Zhang (2019) also observed similar behavior when analyzing the ACE inhibitory activity of two peptides, namely NPPK and ILY. Throughout the calculated MD trajectories (Amber 14SB; 10 ns at 200 K), both peptides formed at least three hydrogen bonds with ACE, which remained stable for 86.3% and 39.5% of the trajectory time, for ILY and NPPK, respectively. Other researchers such as Zarei et al. (2019), showed that the inhibitory capacity of YLLLK ( $I_{ACE}$  of 100% and  $IC_{50}$  value of  $47 \mu\text{M}$ ), WAFS ( $I_{ACE}$  of 55% and  $IC_{50}$  value of  $202 \mu\text{M}$ ) and GVQEGAGHYALL ( $I_{ACE}$  of 70% and  $IC_{50}$  value of  $239 \mu\text{M}$ ) increases with increasing the number of hydrogen bonds with ACE. Similarly, Tu et al. (2018) studied the ACE inhibition by a peptide obtained by casein hydrolysis, NMAINPSKENLCSTFCK ( $IC_{50}$  value of  $129.07 \mu\text{M}$ ), and emphasized the importance of the hydrogen bonds in the stabilization of the peptide within the ACE catalytic cavity. Shahi and Arunan (2016) point out the importance not only of the existence or not of the hydrogen bonds, but also of their angles, and highlighted that initially identified hydrogen bonds with donor-H-acceptor inferior to  $110^\circ$  is an indicative

that the interaction is weak or transient throughout MD trajectory. In addition, according Girgih, He, and Aluko (2014) and Li et al. (2014) the hydrogen bonds with lengths inferior to  $3.5 \text{ \AA}$  are more strong and stable, contributing to the stability of the peptides within the ACE catalytic cavity and, as a consequence, being related to a more pronounced with higher inhibitory capacity.

In the present study, for the ALNEINQFYQK peptide ( $I_{ACE} = 80.7\%$ ), although no significant difference was observed between N- and C-oriented RMSD (Figure 6), each residue pair fluctuated differently (Figure 8). For the N-oriented pose, a greater variation is observed for the residues at the extremities, (Ala1, Leu2 and Lys11). Among them, only the ALNEINQFYQK:Lys11:OXT atom interacted with the active site of the enzyme through an electrostatic interaction with the  $\text{Zn}^{2+}$  cation. For C-oriented pose, even though it formed more interactions with active sites residues, a great fluctuation was observed for its residues from C-terminal extremity (Gln10 and Lys11). However, strong interactions with the residues of the enzyme active sites were formed by residues of the opposite peptide extremity: ALNEINQFYQK:Ala1:HT2 ... ACE:Tyr523:OH and ALNEINQFYQK:Glu4:OE1 ... ACE:His387:HD2, and also by one hydrophobic interaction between ALNEINQFYQK:Ala1 and ACE:His387. In this case, the hydrogen bond between ALNEINQFYQK:Glu4:O and ACE:His387:HD2 presented some instability in the first 40% of the trajectory, but remained stable for the remaining 60% (Figure 9(B)). As shown, fluctuations in the complex ACE-ALNEINQFYQK, C-oriented, occurred with a displacement of the ligand, but the interactions with the ACE



**Figure 10.** (A) Behavior of ACE-NAVPIPTLNR N-oriented and (B) C-oriented complexes interacting with  $Zn^{2+}$  coordinated residues during MD trajectories. (C) Number of hydrogen bonds between NAVPIPTLNR and all ACE active sites, and (D) distances distribution of hydrogen bonds. The complex conformations: at  $t = 10$  ns is depicted with green sticks, at  $t = 30$  ns with cyan sticks, and the complex conformation at  $t = 50$  ns with purple sticks. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.

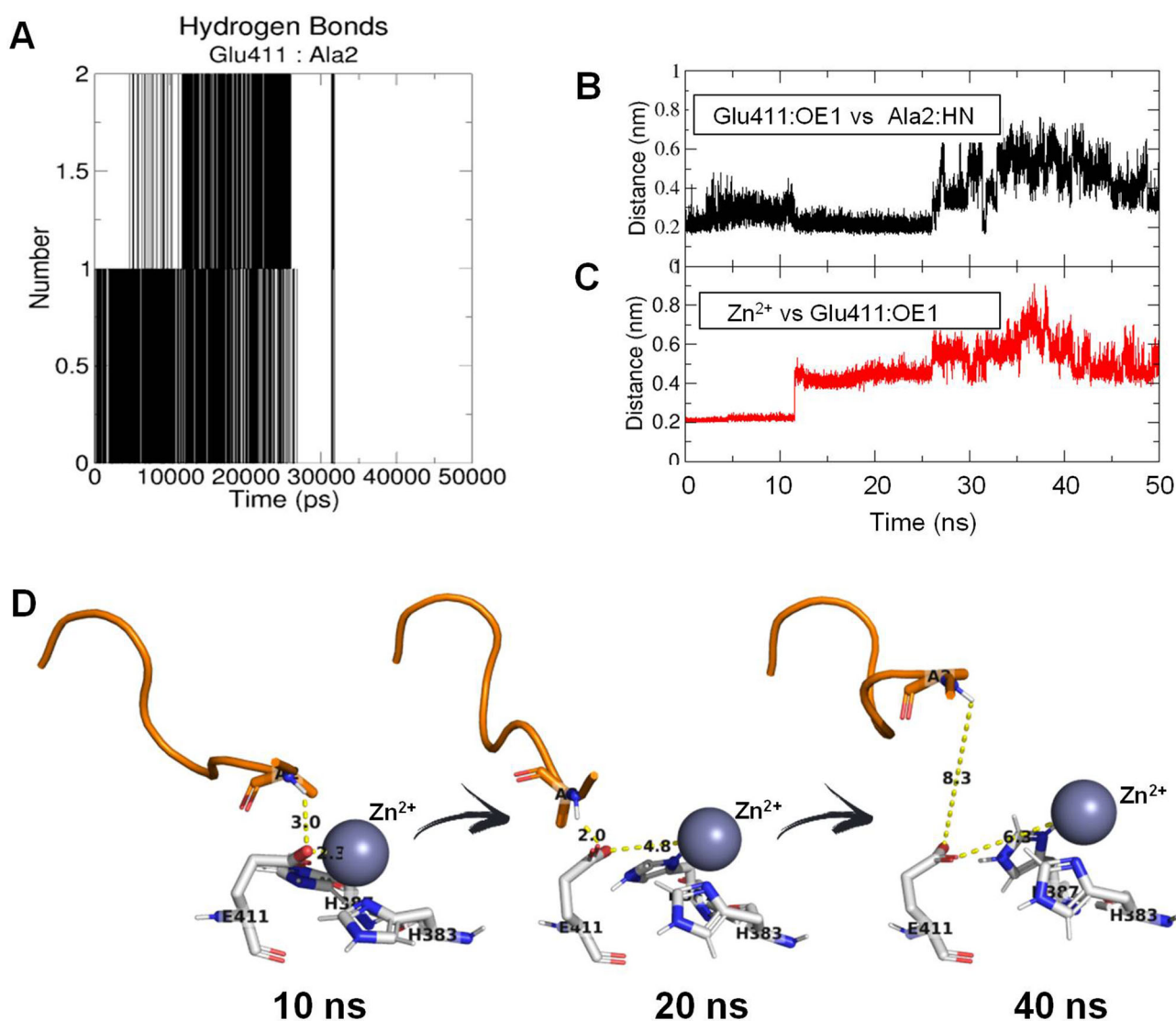
active sites' amino acid residues were maintained (Figure 9(C)). Despite His153-Asn155 fragment is located in a "turn" at the ACE surface, its pronounced fluctuations (RSMF) may represent an induced-fit process (Figure 9(D)). As explained by Yang, Gao, Xiong, Su, and Huang (2019) and Ahuja, Taylor, and Kornev (2019), in an allosteric process changes in the protein's quaternary or tertiary structure, albeit away from the active site, may occur induced by the presence of a ligand complexed in its active site, affecting directly the protein functions and its activity. To date, there are few studies that associated the ACE inhibition to allosteric effects by induced-fit processes. Erdos, Tan, and Skidgel (2015) pointed out that ACE inhibitors and some of its metabolites promote a conformational change in the ACE structure impacting in the kinin levels, and, hence, in various cardiovascular disorders. However, they did not clear up where these conformational changes occur in the protein sequence.

Thus, due to the stability of interactions between the docked peptide and active sites' residues along with the abnormal fluctuation of His153-Asn155 residues, MD results suggest that this pose is likely to be the one with the best inhibitory capacity for ACE. And, indeed, data collected *in vitro* indicated that the chromatographic fraction containing this peptide presented  $I_{ACE}$  equal to 80.7%.

For the NAVPIPTLNR peptide, the N-oriented pose remained more stable than the C-oriented pose throughout MD trajectory (Figures 6 and 8). Large fluctuations were observed for the C-oriented pose residues Leu9-Arg11 (Figure 8), but these residues are presumed to have less impact on the inhibitory capacity of the peptide, since they did not interact with any of the ACE active sites (Wu et al., 2015). Both N- and C-oriented poses interacted with the active site  $Zn^{2+}$  coordinated residues. However, the hydrogen bond between the NAVPIPTLNR:Pro4 (C-oriented) and ACE:His383 exerted a greater disturbance on the zinc coordination than the hydrophobic interactions between the residues NAVPIPTLNR:Pro7 and NAVPIPTLNR:Leu9 (N-oriented) and His387 and His383, respectively (Figure 10(A,B)). Moreover, the C-oriented pose of NAVPIPTLNR presented three hydrogen bonds with the catalytic sites S1, S2 and  $Zn^{2+}$ -coordinated residues (Table 3) with high temporal stability (Figure 10(C)), and mostly short lengths ( $<3.5$  Å) (Figure

10(D)). As already mentioned, according to Girgih et al. (2014) and Li et al. (2014) such features have been correlated to stronger intermolecular interactions. Hence, the C-oriented pose of NAVPIPTLNR may be responsible for its ACE inhibitory capacity ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction containing it = 80.7%).

Regarding the FALPQYLK peptide the C-oriented pose fitted better into the ACE catalytic site (Figure 4). This information is further confirmed in Figure 5, which shows the presence of four interactions between the C-oriented pose and the ACE active sites' residues (three hydrogen bonds and one hydrophobic interaction). Due to the large number of interactions with the active site, including the ACE:Glu411 residue, which participates in the tetrahedral coordination of the  $Zn^{2+}$  cation, it is reasonable to hypothesize that the peptide FALPQYLK, C-oriented pose, is one of the strongest ACE inhibitors among those included in the present study. In order to verify this hypothesis, hydrogen bonding dynamics between FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1 was investigated (Figure 11(A)). After 25 ns, there was a large variation, from  $2.3 \pm 0.4$  Å to  $4.6 \pm 1.1$  Å, in the distance between the FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1 residues (Figure 11(B)). Also, after 12 ns the distance between the atom ACE:Glu411:OE1 and the  $Zn^{2+}$  cation increased sharply, from  $2.2 \pm 0.1$  Å to  $5.0 \pm 0.9$  Å, (Figure 11(C)). Corroborating these results, the hydrogen interactions involving the oxygens atoms from the Glu411 carboxyl group were simultaneously lost. And, as depicted in Figure 11(D), despite the presence of a hydrogen bonding between FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1, the tetrahedral coordination of the  $Zn^{2+}$  cation was kept during the first 12 ns. However, after this time, the residues FALPQYLK:Ala2 and ACE:Glu411 moved away from the  $Zn^{2+}$  cation, characterizing the start of the zinc coordination loss. Then, after 40 ns, the hydrogen bonding between FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1 broke down, but the ACE:Glu411 residue did not return to the initial position, leading to the complete loss of  $Zn^{2+}$  tetrahedral coordination. As previously explained by Fang et al. (2019), Qi et al. (2018) and Cito, Botta, Francardi, and Dreassi (2017), the ACE inhibition through the active site in which the  $Zn^{2+}$  cation is found is due to the loss of the tetrahedral coordination of this ion, which is coordinated by the residues

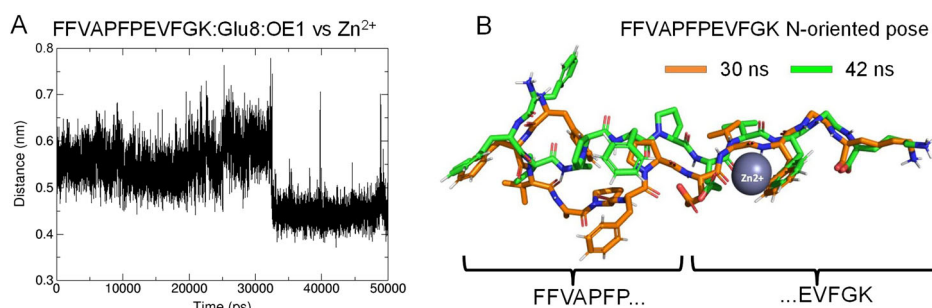


**Figure 11.** Analysis of the hydrogen bond between the C-oriented FALPQYLK:Ala2:HN and ACE:Glu411:OE1 residues: A) hydrogens bond number between Glu411a and Ala2 during MD trajectory; B) distance (nm) between ACE:Glu411:OE1 and Zn<sup>2+</sup> cation during MD trajectory, C) distance between ACE:Glu411:OE1 and FALPQYLK:Ala2:HN during MD trajectory, and D) FALPQYLK conformation evolution during MD trajectory. For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.

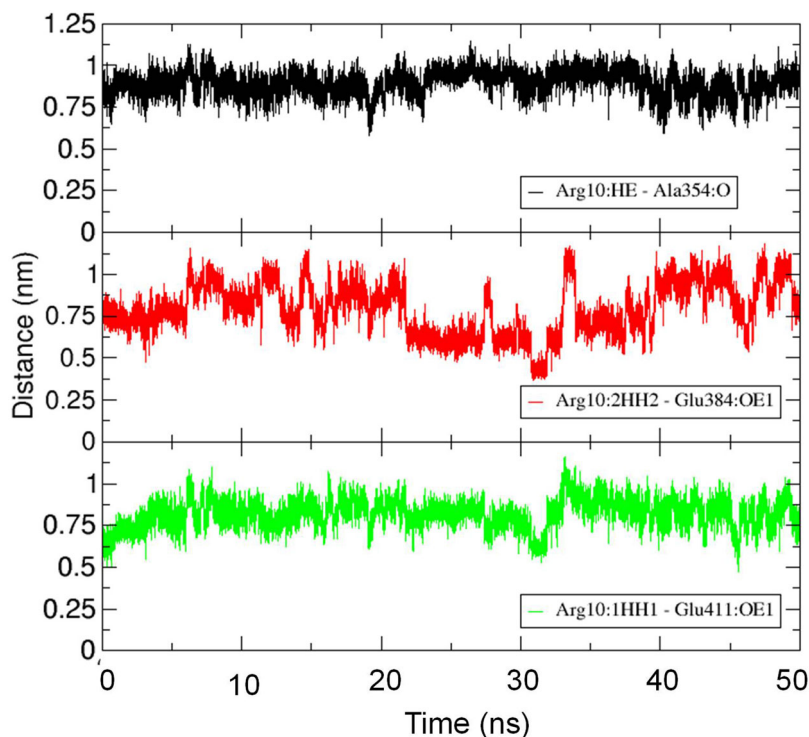
His353, His357 and Glu411 in the enzyme active form. Therefore, the high ACE inhibitory activity presented by the chromatographic fraction containing this peptide ( $I_{ACE} = 79.0\%$ ) may be explained by the molecular events above described and discussed, wherein the peptide promoted the loss of Zn<sup>2+</sup> coordination even with the disruption of the h-bond between ACE:Glu411 and the peptide.

With regard to the FFVAPFPEVFGK peptide, the N-oriented pose established four interactions with ACE active sites residues, two of which were short hydrogen bonds with angles  $> 140^\circ$ , and one electrostatic interaction with the Zn<sup>2+</sup> cation (Table 3). On the other hand, the C-oriented pose established just one hydrogen bond with Tyr523. Smaller RSMF values were found to the C-oriented pose residues compared to N-oriented pose residues (Figure 8), and a peak in RMSD values was observed after 40 ns for N-oriented pose (Figure 6). In the N-oriented pose, the residue FFVAPFPEVFGK:Glu8, which presented a low fluctuation over time (Figure 8), interacted electrostatically with the Zn<sup>2+</sup> cation, which, as previously mentioned, is essential for the ACE

activity (Yu et al., 2019; Zarei et al., 2019). In order to investigate if this electrostatic interaction was kept throughout the simulation, the distance between the FFVAPFPEVFGK:Glu8:OE1 atom and the Zn<sup>2+</sup> cation was calculated over time (Figure 12(A)). In fact, as observed in Figure 12(A), an approximation of about  $1.1 \pm 0.1 \text{ \AA}$  between the FFVAPFPEVFGK:Glu8:OE1 atom and the Zn<sup>2+</sup> cation occurred after 32.5 ns, indicating an increase in the intensity of the electrostatic attraction between this oxygen atoms and Zn<sup>2+</sup> cation. It indicated that the conformational changes undergone by the peptide (indicated by its large increase in RMSD) did not necessarily result in a distancing increase of ACE active sites. In this case, the RMSD increase reported in Figure 6 is rather indicative of a conformational rearrangement of the peptide within ACE catalytic cleft, as depicted in Figure 12(B). The peptide residues that interacted with ACE active sites (FFVAPFPEVFGK:Phe10 and FFVAPFPEVFGK:Lys12) are located in the portion of the peptide molecule which remained stable over the simulation, so the RMSD peak (Figure 6) reflected the conformational changes of



**Figure 12.** FFVAPFPEVFGK N-oriented pose behavior during MD trajectory: A) distance between FFVAPFPEVFGK:Glu8:OE1 atom and  $Zn^{2+}$  ion, and B) peptide N-oriented pose in 30 ns of simulation (orange) and 42 ns of simulation (green). For clarity, only the residues useful for discussion are shown and water molecules are hidden.



**Figure 13.** Distances between the YLGYLEQLLR:Arg10 atoms of N-oriented pose and the ACE active sites residues during MD trajectory: distance between YLGYLEQLLR:Arg10:HE and ACE:Ala354:O is depicted with black line; distance between YLGYLEQLLR:Arg10:2HH2 and ACE:Glu384:OE1 with red line, and distance between YLGYLEQLLR:Arg10:1HH1 and ACE:Glu411:OE1 with green line.

the N-terminal extremity residues. Such molecular features should explain the moderate ACE inhibitory activity ( $I_{ACE} = 47.8\%$ ) measured for the chromatographic fraction containing the peptide FFVAPFPEVFGK.

For the YLGYLEQLLR peptide, no significantly high fluctuations were observed for the N-oriented pose, and only a small peak was observed for the C-oriented pose due to the fluctuation of Leu2 and Leu5 residues. Apparently, the YLGYLEQLLR:Leu5 fluctuation influenced the stability of its neighbor YLGYLEQLLR:Tyr4:O, which established a hydrogen bond with the ACE active site residue ACE:Gln281:HE2. However, as also observed by Girgih et al. (2014) and Shahi and Arunan (2016) in other ECA studies, since this hydrogen bond angle was low ( $< 110^\circ$ ) at the beginning of the simulation, it was lost during the dynamics, reaching distances about  $11.8 \pm 0.5 \text{ \AA}$  between the Gln281:HE2 and Tyr4:O atoms. On the other hand, the N-oriented pose, although binding to three different ACE active sites residues, performed all of these

interactions through its C-terminal arginine residue. Figure 13 shows that hydrogen bond between YLGYLEQLLR:Arg10:HE and ACE:Ala354:O, from S1 active site, remains stable until 40 ns ( $3.4 \pm 1.0 \text{ \AA}$ ), whereas the electrostatic interactions between YLGYLEQLLR:Arg10:2HH2 and ACE:Glu384:OE1 (S1 active site) ( $5.2 \pm 0.9 \text{ \AA}$ ), as well as YLGYLEQLLR:Arg10:1HH1 and ACE:Glu411:OE1 ( $Zn^{2+}$  coordination) ( $5.8 \pm 1.2 \text{ \AA}$ ) presented oscillations higher than  $5 \text{ \AA}$  during throughout the simulation time. It is noteworthy that this peptide is part of the chromatographic fraction also containing the FFVAPFPEVFGK peptide ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction = 47.8%). These interactions oscillations above discussed should further contribute to the moderate ACE inhibitory capacity measured for this chromatographic fraction.

The docked HQGLPQEVLENLLR peptide ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction = 49.0%) showed a different fluctuation profile for both N- and C-oriented poses. The C-oriented pose presented higher fluctuation for its extremities residues and greater stability

for those intermediates and, in addition, did not present any interaction with the ACE residues coordinated with  $Zn^{2+}$  cation. For the N-oriented pose, interactions with the active sites occurred at its C-terminal extremity, involving the residues Leu14 and Arg15. Due to its angle near to  $110^\circ$  and its higher fluctuation, the hydrogen bond between HQGLPQEVLENLLR:Arg15:O... ACE:Ala354:H does not persist over time ( $4.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ). On the other hand, the HQGLPQEVLENLLR:Leu14 residue presented low fluctuation, keeping stable the hydrogen bond HQGLPQEVLENLLR:Leu14:HN... ACE:Ala354:O ( $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ) and the hydrophobic interaction with ACE:His383, which coordinates the  $Zn^{2+}$  cation. Cito et al. (2017) and Meisel and FitzGerald (2003) reported that peptides with high ACE inhibitory capacity often are formed by at least 2 and at most 12 amino acids residues. Nonetheless, contrarily to this statement, in our present study the N-oriented pose of the HQGLPQEVLENLLR peptide (15 amino acids residues) did not show a great difference concerning the stability within the ACE catalytic pocket when compared to the other studied peptides. The interactions between Leu14 and the active sites residues Ala354 and His383 seemed to provide to HQGLPQEVLENLLR peptide some ability to inhibit ACE. This should explain the moderate ACE inhibitory activity attributed to this peptide.

Regarding the global fluctuation of the ACE-peptide complexes, the ACE extremities and segments with no well-defined secondary structure, presented large fluctuations, regardless of the docked peptides and their orientations. Among these regions, the most notable fluctuations were noted in the segments Thr150-Gln160 and Met340-Tyr360. Qi et al. (2018), which study the inhibitory capacity of a small peptide (GEF) when complexed with ACE employing the GROMOS 96 force field by 20 ns at 300 K, noted similar fluctuation behavior in enzyme segments belonging to turn or loops regions, such as Met299-Ala304 and Asp440-Asn445 residues. Moreover, corroborating with our results, Fang et al. (2019) using Amber99SB force field by 400 ns, at 300 K, observed high fluctuations for residues belonging to the region between Asp300-Val350 when ACE was complexed with three different peptides with high inhibitory capacity, namely YLVPH, VLVR and LIVT. Yu et al. (2019), when analyzing the dynamic behavior of complexes formed by ACE and the peptides ILY or NPPK applying Amber 14SB force field, by 10 ns at 300 K, the author reported large fluctuations (superior to  $4 \text{ \AA}$ ) in ACE fragments Val151-His153, Glu342-Met348 and Cys496-Pro500. Despite these common fluctuations among the cited works belong to ACE turn or loops regions, they may be associated with an induced-fit process and be correlated with ACE activity decrease, as reported by Erdos et al. (2015).

The application of molecular dynamics simulation to enzyme/ligand complexes obtained by docking allowed us to observe that all six studied peptides were able to form stable complexes with the ACE active sites. Peptides belonging to the fractions with the highest ACE-inhibitory capacity *in vitro*, such as ALINEFYQK, C-oriented pose ( $I_{ACE} = 80.7\%$ ), NAVPITPTLNR, N-oriented pose ( $I_{ACE} = 80.7\%$ ) and FALPQYLK, C-oriented ( $I_{ACE} = 79.0\%$ ), formed hydrogen bonds with residues coordinated with  $Zn^{2+}$  cation (His383, His387 and

Glu411). These hydrogen bonds were stable throughout MD trajectories of 50 ns, or at least maintained for a period sufficient to disrupt the geometric coordination of the  $Zn^{2+}$  cation, as happened with the ALNEINQFYQK, C-oriented pose. Such molecular features are correlated to the ACE inhibition. Accordingly, Tu et al. (2018) and García-Mora et al. (2017) had already emphasized the importance of the hydrogen bonds in the stabilization of inhibitory peptide within the ACE catalytic cavity. Also, peptides present in chromatographic fractions with moderate inhibitory capacity, as FFVAPFPEVFGK ( $I_{ACE} = 47.8\%$ ), YLGYLEQLLR ( $I_{ACE} = 47.8\%$ ) and HQGLPQEVLENLLR ( $I_{ACE} = 49.2\%$ ) formed electrostatic and hydrophobic interactions with the  $Zn^{2+}$  ion and/or the ACE residues coordinating this cation, such as His383 and Glu411. Additionally, our results indicated that another condition *sine qua non* for a high ACE inhibitory capacity of a peptide is the formation of at least one hydrogen bond with the S1 residues site (Ala354, Glu384 or Tyr523). According to Mirzaei et al. (2018), another important feature that would contribute to the ACE inhibitory activity is the presence of positively or negatively charged amino acid residues at the C- and N-terminal extremity of the peptides. This trend was not observed in our study, except for the YLGYLEQLLR peptide, N-oriented pose, indicating that not only the peptide primary sequence, but also the intermolecular interactions that they form within the ACE catalytic site, should be carefully analyzed when designing or selecting new ACE inhibitors.

## 5. Conclusions

The molecular bases of ACE activity inhibition were investigated by docking and molecular dynamics simulations for six peptides obtained from a controlled trypsinolysis of milk casein: ALNEINQFYQK, NAVPITPTLNR, FALPQYLK, FFVAPFPEVFGK, YLGYLEQLLR, and HQGLPQEVLENLLR. The peptides orientations inside the ACE directly impacted on the complex stability over time, on the interactions types, and on the ACE residues that interact with the peptide. According to the interactions established by each pose and its stability during the dynamics simulation, the *in vitro* inhibitory capacity from the peptides ALNEINQFYQK, NAVPITPTLNR, and FALPQYLK, appear to come from their C-oriented poses, while for FFVAPFPEVFGK, YLGYLEQLLR, and HQGLPQEVLENLLR, from their N-oriented poses. As indicated by several researchers, interactions with residues coordinated with the  $Zn^{2+}$  cation, such as His383, His387 and Glu411, appear to be a rule for peptides presenting ACE inhibitory capacity, being the hydrogen bonds the interaction type predominant for peptides with higher  $I_{ACE}$ , such as ALNEINQFYQK ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction =  $80.7\%$ ), NAVPITPTLNR ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction =  $80.7\%$ ), FALPQYLK ( $I_{ACE}$  of chromatographic fraction =  $79.0\%$ ). Concomitantly, these poses made hydrogen bonds with residues of the active site S1, such as Ala354, Glu384 or Tyr 523, being a second condition for a good ACE inhibitory capacity *in vitro*. It has also been observed that, even if one of a hydrogen bond is lost, the inhibition capacity can be

maintained, since  $Zn^{2+}$  tetrahedral coordination is changed, as occurred in the hydrogen bond formed by FALPQYLK:Ala2:HN at your C-oriented pose and ACE:Glu411:OE1. The RMSF values indicate that residues comprised at the ACE extremities have large fluctuations independent of the peptide or pose orientation, and do not have a relation with the ACE inhibition. These mechanisms of ACE inhibition may: i) assist the discrimination *in silico* of “good” and “bad” ACE-inhibitory peptides from other natural sources, and ii) help in designing *de novo* new molecules with ACE-inhibitory capacity, based on the key intermolecular interactions found in the present paper.

## Acknowledgements

We are grateful to: the UFV Computational Cluster ("Jupiter"), for providing the facilities to carry out the *in silico* experiments; Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPEMIG, FINEP and FUNARBE, for the financial support.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## ORCID

Jane Sélia dos Reis Coimbra  <http://orcid.org/0000-0002-5998-189X>  
Eduardo Basílio De Oliveira  <http://orcid.org/0000-0002-2329-2507>

## References

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, *66*, 91–98. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.006
- Abraham, J. M., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *1-2*, 19–25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
- Ahuja, L. G., Taylor, S. S., & Kornev, A. P. (2019). Tuning the “violin” of protein kinases: The role of dynamics-based allostery. *IUBMB Life*, *71*(6), 685–696. doi:10.1002/iub.2057
- Andrade, C. K., Silva, W. A., & Maia, E. R. (2007). Computational approach for the design of AP1867 analogs: Aiming at new synthetic routes for potential immunosuppressant agents. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *25*(1), 35–48. doi:10.1080/07391102.2007.10507153
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., & Straatsma, T. P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry*, *91*(24), 6269–6271. doi:10.1021/j100308a038
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, *126*(1), 1–7. doi:10.1063/1.2408420
- Carey, R. M. (2015). The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Advances in Chronic Kidney Diseases*, *22*(3), 204–210. doi:10.1053/j.ackd.2014.11.004
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, *74*, 185–198. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.013
- Chen, J., Ryu, B., Zhang, Y. Y., Liang, P., Li, C., Shou, C., Yang, P., Hong, P., ... Ian, Z. J. (2019). Comparison of an angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) with captopril: Inhibition kinetics, *in vivo* effect, simulated gastrointestinal digestion and a molecular docking study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(1), 315–324. doi:10.1002/jsfa.10041
- Cito, A., Botta, M., Francardi, V., & Dreassi, E. (2017). Insects as source of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Insects as Food and Feed*, *3*(4), 231–240. doi:10.3920/JIFF2017.0017
- Corrons, M. A., Liggieri, C. S., Trejo, S. A., & Bruno, M. A. (2017). ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Research International*, *93*, 8–15. doi:10.1016/j.foodres.2017.01.003
- Cruz-Huerta, E., Garcia-Nebot, M. J., Miralles, B., Recio, I., & Amigo, L. (2015). Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product. *Food Chemistry*, *168*, 648–655. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.090
- Cunha, E. F. F., Ramalho, T. C., Alencastro, R. B., & Maia, E. R. (2004). Interactions of 5-deazapteridine derivatives with *Mycobacterium tuberculosis* and with human dihydrofolate reductases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *22*(2), 119–130. doi:10.1080/07391102.2004.10506988
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, *20*(7), 1637–1648. doi:10.1016/0006-2952(71)90292-9
- De Oliveira, E. B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E. R., Dehez, F., Maigret, B., ... Engasser, J. M. (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *59* (1-3), 96–105. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.011
- De Oliveira, M. R., Silva, T. J., Barros, E., Guimarães, V. M., Baracat-Pereira, M. C., Eller, M. R., ... De Oliveira, E. B. (2018). Anti-hypertensive peptides derived from caseins: mechanism of physiological action, production bioprocesses, and challenges for food applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *185*(4), 884–908. doi:10.1007/s12010-018-2692-8
- De Oliveira, T. V., Polêto, M. D., De Oliveira, M. R., Silva, T. J., Barros, E., Guimarães, V. M., ... De Oliveira, E. B. (2020). Casein-derived peptides with antihypertensive potential: production, identification and assessment of complex formation with angiotensin I-converting enzyme (ACE) through molecular docking studies. *Food Biophysics*. (In press). doi:10.1007/s11483-019-09616-9
- Erdos, E. G., Tan, F., & Skidgel, R. A. (2015). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*, *55*, 214–220. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144600
- Fang, L., Geng, M., Liu, C., Wang, J., Min, W., & Liu, J. (2019). Structural and molecular basis of angiotensin-converting enzyme by computational modeling: Insights into the mechanisms of different inhibitors. *PLoS One*, *14*(4), e0215609. doi:10.1371/journal.pone.0215609
- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., & Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* Venon. *Biochemistry*, *9*(13), 2583–2593. doi:10.1021/bi00815a005
- Fitzgerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, *134*(4), 980S–988S. doi:10.1093/jn/134.4.980S
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frías, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, *221*, 464–472. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.087
- Girgih, A. T., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Kinetics and molecular docking studies of the inhibitions of angiotensin converting enzyme and renin activities by hemp seed (*Cannabis sativa* L.) peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(18), 4135–4144. doi:10.1021/jf5002606
- Gonçalves, Y. M. H., Senac, C., Fuchs, P. F., Hunenberger, P. H., & Horta, B. A. C. (2019). Influence of the treatment of nonbonded interactions on the thermodynamic and transport properties of pure liquids calculated using the 2016H66 force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *15*(3), 1806–1826. doi:10.1021/acs.jctc.8b00425
- Gunalan, S., Somarathinam, K., Bhattacharya, J., Srinivasan, S., Jaimohan, S. M., Manoharan, R., ... Kothandan, G. (2019). Understanding the

- dual mechanism of bioactive peptides targeting the enzymes involved in Renin Angiotensin System (RAS): An *in-silico* approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 3, 1–18. doi:10.1080/07391102.2019.1695668
- Jalkute, B. C., Barage, S. H., Dhanavade, M. J., & Sonawane, K. D. (2013). Molecular dynamics simulation and molecular docking studies of angiotensin converting enzyme with inhibitor lisinopril and amyloid beta peptide. *The Protein Journal*, 32(5), 356–364. doi:10.1007/s10930-013-9492-3
- Jonniya, N. A., & Kar, P. (2019). Investigating specificity of the anti-hypertensive inhibitor WNK463 against with-no-lysine kinase family isoforms via multiscale simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 24(1), 1–16. doi:10.1080/07391102.2019.1602079
- Joshi, T., Joshi, T., Sharma, P., Chandra, S., & Pande, V. (2020). Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 30(1), 1–18. doi:10.1080/07391102.2020.1719200
- Ke, Z., Su, Z., Zhang, X., Cao, Z., Ding, Y., Cao, L., Ding, G., ... Xiao, W. (2017). Discovery of a potent angiotensin converting enzyme inhibitor via virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(16), 3688–3692. doi:10.1016/j.bmcl.2017.07.016
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. doi:10.1038/nprot.2015-053
- Li, P., Jià, J., Fang, M., Zhang, L., Guo, M., Xie, J., ... Wei, D. (2014). In vitro and in vivo ACE inhibitory of pistachio hydrolysates and in silico mechanism of identified peptide binding with ACE. *Process Biochemistry*, 49(5), 898–904. doi:10.1016/j.procbio.2014.02.007
- Lin, K., Zhang, L., Han, X., & Cheng, D. (2017). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. *Journal of Functional Foods*, 32, 266–277. doi:10.1016/j.jff.2017.03.008
- Meisel, H., & FitzGerald, J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289–1295. doi:10.2174/1381612033454847
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., & Aminlari, M. (2018). Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 696–705. doi:10.1016/j.jfda.2017.07.008
- Natesh, R., Schwager, S. L., Evans, H. R., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2004). Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, 43 (27), 8718–8724. doi:10.1021/bi049480n
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme -lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551–554. doi:10.1038/nature01370
- NCD Risk Factor Collaboration. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: A pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet*, 389(10064), 37–55. doi:10.1016/S0140-6736(16)31919-5
- Norris, R., O’Keeffe, M., Poyarkov, A., & FitzGerald, R. J. (2015). Peptide identification and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in prolyl endoproteinase digests of bovine  $\alpha_s$ -casein. *Food Chemistry*, 188, 210–217. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.130
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., & Gunsteren, W. F. V. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13), 1656–1676. doi:10.1002/jcc.20090
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182–7190. doi:10.1063/1.328693
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., & Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 317–325. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.091
- Polêto, M. D., Alves, M. P., Ligabue-Braun, R., Eller, M. R., & De Carvalho, A. F. (2019). Role of structural ions on the dynamics of the *Pseudomonas fluorescens* 07A metalloprotease. *Food Chemistry*, 286, 309–315. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.204
- Qi, C., Zhang, R., Liu, F., Zheng, T., & Wu, W. (2018). Molecular mechanism of interactions between inhibitory tripeptide GEF and angiotensin-converting enzyme in aqueous solutions by molecular dynamic simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 249, 389–396. doi:10.1016/j.molliq.2017.11.033
- Shahi, A., & Arunan, E. (2016). Why are hydrogen bonds directional? *Journal of Chemical Sciences*, 128(10), 1571–1577. doi:10.1007/s12039-016-1156-3
- Shi, A., Liu, H., Liu, H., Hu, H., Wang, Q., & Adhikari, B. (2014). Isolation, purification and molecular mechanism of a peanut protein-derived ACE-inhibitory peptide. *PLoS One*, 9(10), e111188. doi:10.1371/journal.pone.0111188
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., Saidijam, M., Chamani, J., & Mahaki, H. (2018). Improving efficiency of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide as multifunctional peptides. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(14), 3803–3818. doi:10.1080/07391102.2017.1401001
- Tavassoli, Z., Taghdir, M., & Ranjbar, B. (2018). Renin inhibition by soyasaponin I: A potent native anti-hypertensive compound. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(1), 166–176. doi:10.1080/07391102.2016.1270855
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461. doi:10.1002/jcc.21334
- Tu, M., Wang, C., Chen, C., Zhang, R., Liu, H., Lu, W., ... Du, M. (2018). Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, 256, 98–104. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.107
- Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S., & Wei, J. (2017). A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT*, 75, 93–99. doi:10.1016/j.lwt.2016.08.047
- Wei, L., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., & Corvol, P. (1992). The Two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13398–13405.
- Woodman, Z. L., Schwager, S. L. U., Redelinghuys, P., Chubb, A. J., Merwe, E. L. V., Whlers, M. R. W., & Sturrock, E. D. (2006). Homologous substitution of ACE C-domain regions with N-domain sequences: Effect on processing, shedding, and catalytic properties. *Biological Chemistry*, 387, 1043–1051. doi:10.1515/BC.2006.129
- Wu, Q., Jia, J., Yan, H., Du, J., & Gui, Z. (2015). Peptides A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *Peptides*, 68, 17–24. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.026
- Xue, L., Wang, X., Hu, Z., Wu, Z., Wang, L., Wang, H., & Yang, M. (2018). Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Peptides*, 99, 161–168. doi:10.1016/j.peptides.2017.09.021
- Yang, J., Gao, M., Xiong, J., Su, Z., & Huang, Y. (2019). Features of molecular recognition of intrinsically disordered proteins via coupled folding and binding. *Protein Science*, 28 (11), 1952–1965. doi:10.1002/pro.3718
- Yu, D., Wang, C., Song, Y., Zhu, J., & Zhang, X. (2019). Discovery of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Todarodes pacificus* and their inhibitory mechanism: In silico and in vitro studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4159. doi:10.3390/ijms20174159
- Zarei, M., Abidin, N. B. Z., Auwal, S. M., Chay, S. Y., Haiyee, Z. A., Sikin, A. M., & Saari, N. (2019). Angiotensin converting enzyme (ACE) -peptide interactions: Inhibition kinetics, in silico molecular docking and stability study of three novel peptides generated from palm kernel cake proteins. *Biomolecules*, 9(10), 569. doi:10.3390/biom9100569

---

## CAPÍTULO 4.

The loss of  $\text{Ca}^{2+}$  at  $75^\circ\text{C}$  destabilizes  $\alpha$ -lactalbumin secondary structures and affects its foamability – insights from computational molecular dynamics

---

**The loss of Ca<sup>2+</sup> at 75 °C destabilizes  $\alpha$ -lactalbumin secondary structures and affects its foamability – insights from computational molecular dynamics**

Thomás Valente DE OLIVEIRA<sup>a</sup> ✉, Marcelo Depólo POLÊTO<sup>b</sup>, Samuel Vieira BARBOSA<sup>c</sup>, Jane Sélia dos Reis COIMBRA<sup>a</sup>, Eduardo Basílio DE OLIVEIRA<sup>a</sup> ✉

<sup>a</sup>*Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Biologia Geral (DBG), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.*

<sup>c</sup>*Departamento de Química (DEQ), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.*

✉ Corresponding authors:

Thomás Valente de Oliveira ([thomas.valente@ufv.br](mailto:thomas.valente@ufv.br)); Eduardo Basílio de Oliveira ([eduardo.basilio@ufv.br](mailto:eduardo.basilio@ufv.br)).

## 6.1. Abstract

Bovine  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) is a protein with a variety of technological applications, used as foaming, gelling or emulsifying agents in foods. The aim of this work was to analyze the molecular bases of bovine  $\alpha$ -lactalbumin dynamics in different temperatures used during milk processing and storage (4, 25 and 75 °C), to investigate, at the molecular level, the role of the complexed  $\text{Ca}^{2+}$  and to correlate the results with its foaming behavior. Protein dynamics were analyzed by molecular dynamics calculations using GROMOS53A6 force field and the foamability and interfacial tension were examined through *in vitro* experiments. At 4 °C and 25 °C, protein structure and folding were not significantly changed, while at 75 °C, significant losses of secondary structures were observed for both apo and holo structures. At low-temperatures, the structural stability was governed by H-bonds and hydrophobic intra-protein interactions, while at 75 °C, disulfide bonds were crucial for avoiding denaturation. The improvements in foaming properties were correlated only with temperature and not with presence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 6.2. Introduction

$\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) is the second most abundant protein in bovine whey after  $\beta$ -lactoglobulin. It is a globular protein with 14.1 kDa and isoelectric point (pI) 4.8, which is expressed in mammary glands during lactation with the biological function of regulating lactose biosynthesis in milk (Hill & Brew, 1975). Structurally, it is composed of 123 amino acids, divided into two domains: the  $\alpha$ -domain organized into three  $\alpha$ -helix named H1 (5-11), H2 (23-34), H3 (86-98) and one helix  $3_{10}$ , called h3c (115-118); the  $\beta$ -domain, composed by a series of loops, a small three-stranded antiparallel  $\beta$ -sheets named S1 (41–44) S2 (47–50) and S3 (55–56) and a short  $3_{10}$  helix (77–80). These two domains are divided by a deep cleft, but kept together by four disulfide bridges between residues Cys6–Cys120, Cys61–Cys77, Cys73–Cys91, and Cys28–Cys111, two H-bonds between the Gln54, Asn56 e Tyr103 residues, and one cation  $\text{Ca}^{2+}$  bound to lysine and aspartates residues (Lys79, Asp82, Asp84 and Asp87) (Pike, Brew, & Acharya, 1996).

Besides its biological function,  $\alpha$ -La is a protein with high nutritional and technical-functional capacities and can be used for different purposes in foods, such as foaming, gelling or emulsifying agents, according to different conditions of the food matrix. In the 1990's, Eynard *et al.* (1992) and Ibanoglu & Ibanoglu (1999) observed that  $\alpha$ -La had great potential as a foaming agent, however, they noticed significant oscillation in these properties due to pH, temperature, and presence of the  $\text{Ca}^{2+}$  cation complexed to the structure. Subsequent studies, such as Cornec, Kim, & Narsimhan (2001) and Tomasula & Yee (2001) observed that these different conditions induce different  $\alpha$ -La conformations in different molten globule states, and each of them has different adsorption dynamics at the water/air interface during creating the foam. Until nowadays, deeper studies standing the  $\alpha$ -La foaming properties keep going carried out, e.g., comparing different  $\alpha$ -La sources (Ellouze *et al.*, 2020), analyzing the impact of physical treatments such as ultrasound and high-pressure homogenization combined with high temperatures (Qayum *et al.*, 2020a), investigating the effect of mixtures in different proportions of  $\alpha$ -La from different sources (Lajnaf *et al.*, 2016), and studying the effect of supramolecular structures between bovine  $\alpha$ -La and glycomacroteins under combinations of temperature, time and pH (Diniz *et al.*, 2014).

In parallel with these studies about the  $\alpha$ -La technological applications, other works were developed focusing on the protein structure and how it is affected by the medium conditions. Through a calorimetric study, Hendrix, Griko, & Privalov (2000) concluded that the  $\text{Ca}^{2+}$  complexed to the  $\alpha$ -La structure reduces its flexibility and increased its thermal stability. This study agrees with what was previously observed by Relkin, Launay, & Eynard (1993), which demonstrated that the  $\alpha$ -La denaturation

temperature was reduced from 64 °C to 35 °C after removing  $\text{Ca}^{2+}$ , emphasizing this cation importance in the protein conformational stability and, consequently, in its technological properties.

To identify these conformational changes or the absence of them, and to correlate it with the technological behavior of  $\alpha$ -La, only three groups of methodologies were used in all mentioned studies: fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, and calorimetry. However, these methodologies were not able to clarify specifically how and where these changes are occurring in  $\alpha$ -La structure, which residues were involved in these changes, and which types of chemical interactions were broken or created. In this context, the use of computational methods, such as molecular dynamics simulations, can model, at a molecular level, the chemical events in  $\alpha$ -La structure that changes its technical-functional properties, subsidizing further rational improvements of these properties.

Despite its three-dimensional structure is available since 1996 (Pike et al.1996), there are few studies involving  $\alpha$ -La and molecular dynamics simulations. The technique versatility allows it to be used for different purposes, such as studying incorrect folding, stability, and aggregation of  $\alpha$ -La (Bucciarelli *et al.*, 2020), the ability of different biomolecules to bind the  $\alpha$ -La structure and its influence on the structural stability and on the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site (Radibratovic *et al.*, 2019), the action mechanism of a denaturing agent (Kumar & Kishore, 2014) and possible structural rearrangements without the disulfide bridges (Schmid et al., 2008).

Until now, there are no studies with this depth that can explain, at a molecular level: "How the temperature and  $\text{Ca}^{2+}$  cation change the  $\alpha$ -La thermostability?"; "Which are the secondary structures most affected by these variables?"; "Which are the most stable?"; "What intermolecular interactions are lost or formed?"; and, mainly, "How do such structural changes affect the  $\alpha$ -La interfacial properties?". Hence, the present study aimed to gain a deeper understanding of the conformational stability of bovine  $\alpha$ -La submitted to different temperatures usually used during milk processing and storage (4, 25 and 75 °C), with and without the  $\text{Ca}^{2+}$  cation complexed, and to correlate the data obtained through computational and *in vitro* experiments.

### **6.3. Materials and methods**

#### **6.3.1. Materials**

$\alpha$ -La from bovine milk and  $\alpha$ -La type III calcium depleted were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. The purity of both holo-La (Product: L5385, Lot: 110M7030V) and apo-La (Product: L6010, Lot: 012M7000V) are  $\geq 85$  %. To validate the interfacial tension method, the following analytical standard solvents

were used: petroleum ether (Qhemis, Brazil), hexane (scientific ACS, Brazil) and methanol (scientific ACS, Brazil).

### 6.3.2. Computational resources

Systems preparation and all molecular modelling calculations were carried out using the “Jupiter” Calculation Cluster, at the Universidade Federal de Viçosa, which is equipped with 1 AMD Opteron TM Processor 6376 (16M cache, 2.3 GHz and 32 cores), 64 GB of RAM, 100 TB of storage capacity and 24 calculation nodes. All analysis were performed on a computer equipped with an IntelVR Core TM i7-8700 - 8th generation processor, 16 GB of RAM, equipped with a NVIDIAVR GeForceVR GTX 1060 video card of 6 GB, GDDR5.

### 6.3.3. Molecular dynamics (MD)

The crystal structures of native  $\alpha$ -La bovine (*Bos taurus*) (holo-La) and calcium depleted  $\alpha$ -La (apo-La) at 2.2 Å resolution was obtained from the RCSB Protein Data Bank (1F6S and 1F6R, respectively) (Chrysina, Brew, & Acharya, 2000). The “chain A” from both tridimensional structures of were selected and submitted to molecular dynamics (MD) simulations using the GROMACS 2018 software package (Abraham et al., 2015) in a dodecahedral box with edges of 44 Å and a distance of 14 Å between the protein and the nearest edge. Firstly, the hydrogens were added to the crystallographic structures and protein topologies were built using the GROMOS53A6 force field (Oostenbrink, Villa, Mark, & Van Gunsteren, 2004). The systems holo and apo were, respectively, filled with 9727 and 9722 explicit SPC water models, parametrized to obtain the correct density and energy within the work temperatures region (Berendsen, Grigera, & Straatsma, 1987) and 29 Cl<sup>-</sup> and 34 and 36 Na<sup>+</sup>, respectively, monoatomic ions to neutralize the systems while creating a saline concentration of 0.15 mol.L<sup>-1</sup> to get close to the biological system's conditions.

Accordingly to De Oliveira et al. (2020) and Polêto, *et al.* (2019), systems energy were minimized through a sequence of energy minimizations, using two sets of *steepest descent* algorithm with maximum converging energy smaller than 10 and 1 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup>, respectively, and one set of *conjugate gradient* algorithm with maximum converging energy smaller than 0.1 kJ.mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-1</sup>. Next, both holo-La and apo-La systems were replicated obtaining six systems, that were equilibrated for 1 ns in a NVT ensemble to reach equilibrium temperatures of 4 °C (277 K), 25 °C (298 K) and 75 °C (348 K), using a V-rescale thermostat and position restraint forces of 1000 kJ.mol<sup>-1</sup> for all protein atoms (Bussi, Donadio, & Parrinello, 2007). After that, all systems were subjected to the same process: equilibration in 1 bar, with a Parrinello-Rahman barostat

(Parrinello & Rahman, 1981), using several short simulations in a NPT ensemble, totalizing 15 ns, to provide a slow equilibration while accommodating the protein to liquid phase. The position restraints were done as described by Polêto et al. (2019) (Table S1 - Supplementary Material). The *cutoff* for Lennard-Jones and electrostatic interactions were set to 12 Å and the PME algorithm was used to treat electrostatic interactions (Gonçalves, Senac, Fuchs, Hunenberger, & Horta, 2019). The temperature and density of all systems were calculated to assess proper equilibration. Finally, the systems were submitted to a production run of 200 ns using a 2 fs timestep and the Verlet leapfrog algorithm (Verlet, 1967), three times, totalizing 600 ns of sampling for each simulated system.

**Table S1 – Supplementary Material – Equilibration protocol (adapted from Polêto et al., 2019).**

Position restraint atoms	Position restraint energy (kJ mol <sup>-1</sup> )	Duration of step (ns)
All atoms	1000	1
Heavy atoms	800	2
Main chain + β-carbon	600	2
Main chain	400	2
Protein backbone	200	2
α-carbons	100	3
α-carbons	50	3

The trajectories were analyzed according to their Root Mean Square Deviation (RMSD) (Eq.1), Root Mean Square Fluctuations (RMSF) (Eq. 2), Radius of Gyration (Rg) (Eq. 3) and solvent accessible surface area (SASA) (Connolly, 1983). The stability of the native secondary structures, as well as the stability between the alpha- and beta-domains, were investigated by the behavior of intermolecular interactions over trajectory and the DSSP database (Touw et al., 2015).

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n ((\hat{r}_i - r_i^{ref})^2 + (\hat{r}_j - r_j^{ref})^2 + (\hat{r}_k - r_k^{ref})^2)}{n}} \quad \text{Eq.1}$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^n (r_i - r_i^{ref})^2} \quad \text{Eq.2}$$

$$R_g = \left( \frac{\sum_i r_i^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{1/2} \quad \text{Eq.3}$$

Where  $n$  is the number of atoms in the system;  $\hat{r}$  is the each atom position in the coordinates  $i, j$  and  $k$ ;  $r^{ref}$  is the atom position reference in the coordinates  $i, j$  and  $k$ ; and  $m_i$  is the mass of atom  $i$ .

### 6.3.4. Interfacial tension

Deionized water (pH 6.6) at each temperature (4 °C, 25 °C and 75 °C) were used to produce 10 mL of holo-La and apo-La dispersions at 70.5  $\mu\text{M}$  ( $\cong$  0.1% w/v). After dispersing the proteins, each system was kept under stirring at its respective temperature in a water bath for 2 min. Then, the dispersion was submitted to the interfacial tension measurement apparatus with controlled temperature, built according to the guidelines of Lee, Ravindra, & Chan (2008) for the drop weight method (Figure S1 - Supplementary Material), previously validated for solvents with interfacial tension known, for instance, water, hexane, petroleum ether e methanol. Forty dispersion drops were collected in triplicate and weighed, and the interfacial tension was calculated according to Tate's law (Eq. 4):

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2\pi \cdot r \cdot \Psi(r/V^{1/3})} \quad \text{Eq.4}$$

where  $m$  is the drop average mass,  $g$  is the gravitational acceleration ( $9.80 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ),  $r$  is the tube radius (0.0015 m) and  $\Psi(r/V^{1/3})$  is the correction factor of Harkins and Browns calculated for our apparatus (0.65).

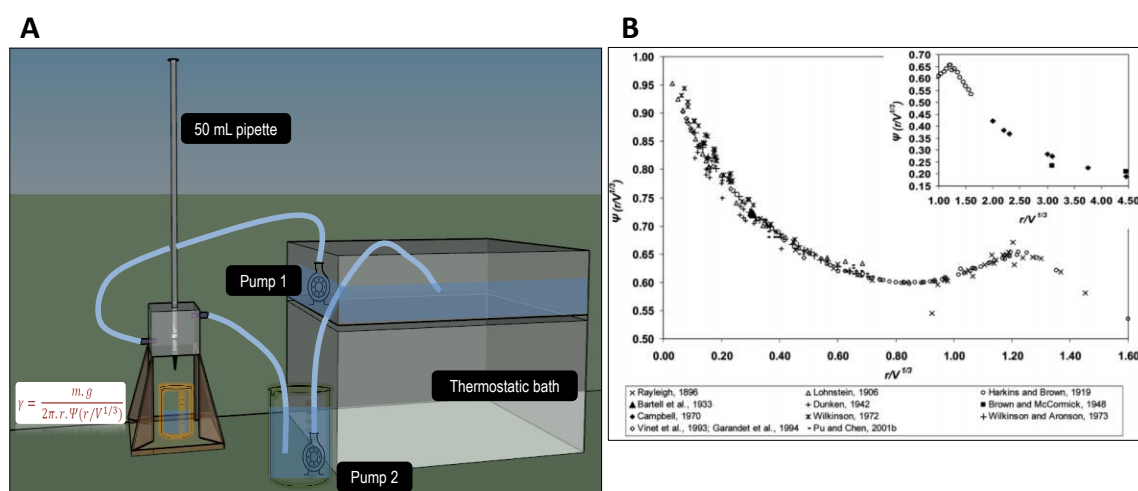


Figure S1 - A) Interfacial tension measurement apparatus with controlled temperature built according to Lee, Ravindra, & Chan (2008), and B) drop weight correction factors  $\Psi(r/V^{1/3})$ .

### 6.3.5. Foamability

The same dispersions stirred in water bath for 2 min were used to analyze the foam properties according to Lajnaf et al. (2016) with modifications. For each combination of  $\alpha$ -La (holo or apo) and temperature (4, 25 and 75 °C), aliquots of 2.5 mL were inserted into an empty syringe, which was connected to another syringe with 5 mL of air. To produce the foam, 20 punctures were performed between the syringes and the foam capacity (FC) was calculated through Equation 5:

$$FC (\%) = \frac{V_f - V_0}{V_0} \cdot 100 \quad \text{Eq.5}$$

where  $V_f$  is the dispersion volume immediately after creating the foam and  $V_0$  is the initial dispersion volume.

After produce the foam, the dispersion volume was systematically measured every 10 seconds, throughout 150 seconds, and then, a graph of foam decay over time was designed for each treatment, indicating the foam stability (FS) the as function of time. The obtained curves were adjusted according to the mathematical model presented in Equation 6:

$$F_V = a \cdot e^{-bt} \quad \text{Eq.6}$$

where  $F_V$  is the foam volume, the  $a$  (%) index means an approximate value of FC when  $t = 0$ , and the  $b$  ( $s^{-1}$ ) index means the rate of foam decay, so that the greater is the  $b$  modulus, less stable is the foam (de Oliveira et al., 2020). To visually analyze the foam reduction volume over time, we use images taken from a biological microscope, with a finite achromatic binocular lens (Global Trade Technology, Brazil), with 40x magnification.

### 6.3.6. Statistical analyses

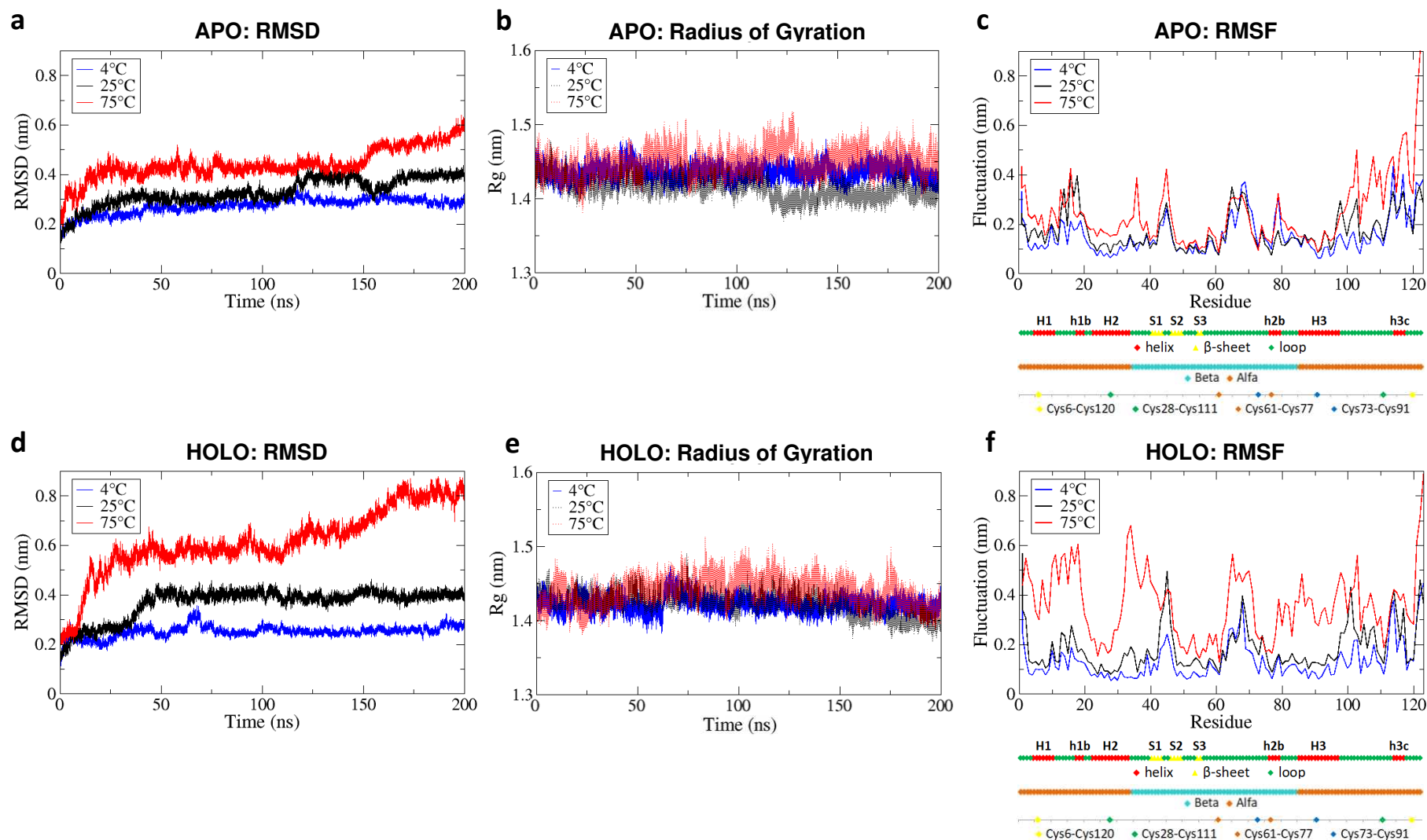
A completely randomized design between temperatures and calcium presence was used. The computational simulations data were expressed as mean  $\pm$  standard error. One-way analysis of variance verified by a post-hoc comparison Tukey test at 95% confidence interval and  $p < 0.05$  were carried out to estimate the effect of different treatments interfacial tension, foam capacity and foam stability. All analyses were carried out using the software package Statistical Analysis System (SAS) (version 9.0).

## 6.4. Results

Molecular dynamics trajectories of 200 ns were calculated for both  $\alpha$ -lactalbumin native (holo) and calcium depleted (apo) at different temperatures (4 °C, 25 °C and 75 °C) to evaluate the protein conformational stability at milk and whey processing and storage conditions. To examine the folding maintenance, RMSD values of the holo-La and apo-La heavy atoms were calculated (Figure 1).

Since the RMSD involves the global difference of atoms positions at the initial structure and during the simulation, as expected, for both structures the rise in temperature increased the RMSD values being 4 °C < 25 °C < 75 °C (Figure 1a and 1d). Regarding holo and apo structures, at 4 °C were not observed a significant difference between RMSD values, with an average of  $2.73 \pm 0.03$  Å and  $2.51 \pm 0.02$  Å, respectively. At 25 °C, small differences are observed between holo and apo structures. For holo-structure, after 50 ns is observed a curve stabilization that remains until the simulation end, with an average RMSD of  $3.68 \pm 0.06$  Å. However, for apo structure, an apparent plateau around  $3.09 \pm 0.01$  Å is observed between 50 and 100 ns. However, after 100 ns is observed a new increase in the RMSD value, which stabilizes close to the holo RMSD, with an average of  $3.70 \pm 0.03$  Å. At 75 °C, it is noted a significant difference between holo and apo behavior. In general, the holo-structure atoms have moved further away from the start position than apo-structure atoms, with average RMSD's of  $6.17 \pm 0.13$  Å and  $4.43 \pm 0.06$  Å, respectively. However, some behavioral nuances were observed in each structure, which indicates significant conformational changes at specific moments of the simulation that need to be investigated in detail, as they will possibly explain the origins of this great difference between the average values of RMSD. Between 25 and 110 ns for holo and 25 and 150 ns for apo, both structures remained stable with average RMSD's of  $4.68 \pm 0.10$  Å and  $4.26 \pm 0.02$  Å. From these moments, is observed an increase in atoms deviations for both structures finding a plateau close to 175 ns, with RMSD values equal to  $5.28 \pm 0.03$  Å and  $7.84 \pm 0.04$  Å, respectively.

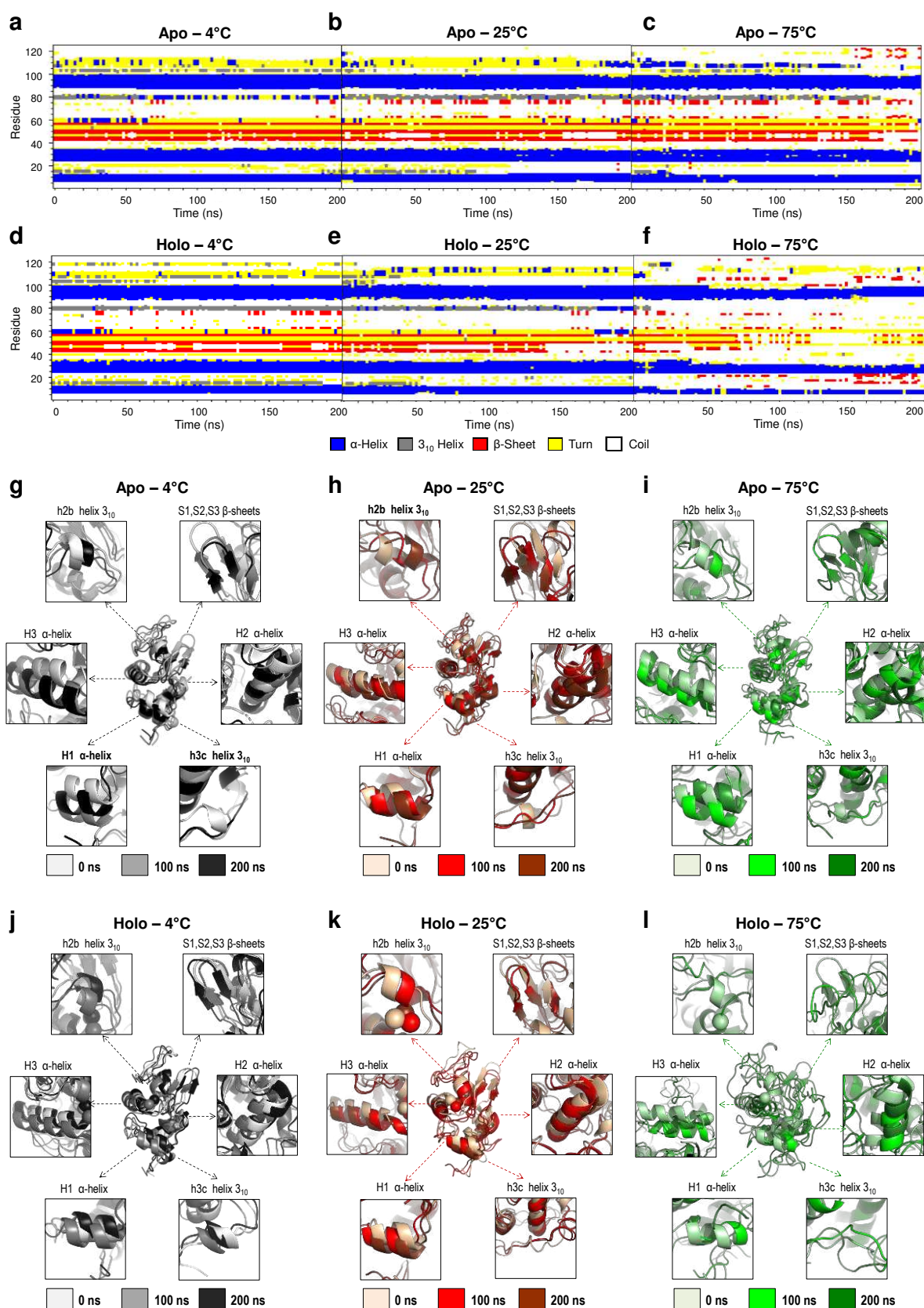
The radius of gyration along the trajectory were calculated and are shown in Figure 1b (apo-La) and 1e (holo-La). For apo-La, the Rg values were equal to  $14.3 \pm 0.1$  Å,  $14.1 \pm 0.1$  Å and  $14.4 \pm 0.2$  Å, for temperatures of 4 °C, 25 °C and 75 °C, respectively, while for the holo-La,  $14.2 \pm 0.1$  Å,  $14.3 \pm 0.2$  Å and  $14.4 \pm 0.1$  Å, respectively. The Rg values showed a similar behavior between the structures independent of the simulation temperature and the Ca<sup>2+</sup> presence, indicating that were not changes in apo- and holo-structures compaction, despite the large atomic movements observed in the RMSD results, even at 75 °C.



**Figure 1 - Structural behavior indicators over simulation time: a) RMSD variation of apo structure heavy atoms; b) RMSF of apo structure heavy atoms; c) Radius of gyration of apo structure; d) RMSD variation of holo structure heavy atoms; e) RMSF of holo structure heavy atoms; f) Radius of gyration of holo structure. RMSF x-axes mean i. the secondary structures, ii. the sub-domains and iii. the disulfide bridges. 4 °C systems are depicted with black lines; 25 °C systems are depicted with red lines and 75 °C systems are depicted with green lines.**

Regarding the residues fluctuation, as already predicted by the calculated values of RMSD, for both structures an increase in some regions was observed due to the temperature increase (Figure 1c and 1f). High fluctuations are observed in regions with secondary structure ill-defined, for instance, the region between Met1 and Leu4 (N-terminus region); the loops Leu12-Gly17 and Asn45-Asp46, the latter between the anti-parallel  $\beta$ -sheets S1 and S2; the Trp60-Ser70 region, which comprises a large sequence located on the surface exposed to the solvent; finally, the Val99-Trp104 sequence, neighbors of the super-flexible loop (Pike et al.,1996), as well as the C-terminal protein extremity. On the other hand, it is observed that  $\alpha$ -La regions immediately adjacent to the disulfide bridges show low fluctuation regardless of simulation temperature.

To observe in detail how the residues fluctuation affected the  $\alpha$ -La stability, for each system a graph was built showing the secondary structure assignments by residue over simulation, and trajectory frames were dumped and superposed at 0 ns, 100 ns and 200 ns, visually highlighting the behavior of all  $\alpha$ -La native secondary structures (Figure 2). For both structures, the temperatures of 4 and 25 °C did not promote losses in the  $\alpha$ -La secondary structures during the 200 ns trajectory, even with high fluctuations. For holo-La simulated at 25 °C, the high fluctuation presented by the Asn45 and Asp46 residues draw our attention. It is a small turn between the  $\beta$ -sheets S1 and S2, but despite its high fluctuation, the structural motif of the three anti-parallel  $\beta$ -sheets remains stable throughout the trajectory. The h3c helix showed low stability during all trajectories, and was not lost only in holo-La at 4 °C. The helix  $3_{10}$  has, usually, low stability, but its loss may have been accelerated by the high flexibility of its neighbor's residues, from the super flexible loops (Pike et al., 1996).



**Figure 2 - Secondary structure assignments by residue over simulation time for each system (a-f) and trajectory frames superposition at 0 ns, 100 ns and 200 ns highlighting natives secondary structures for each system (g-l).**

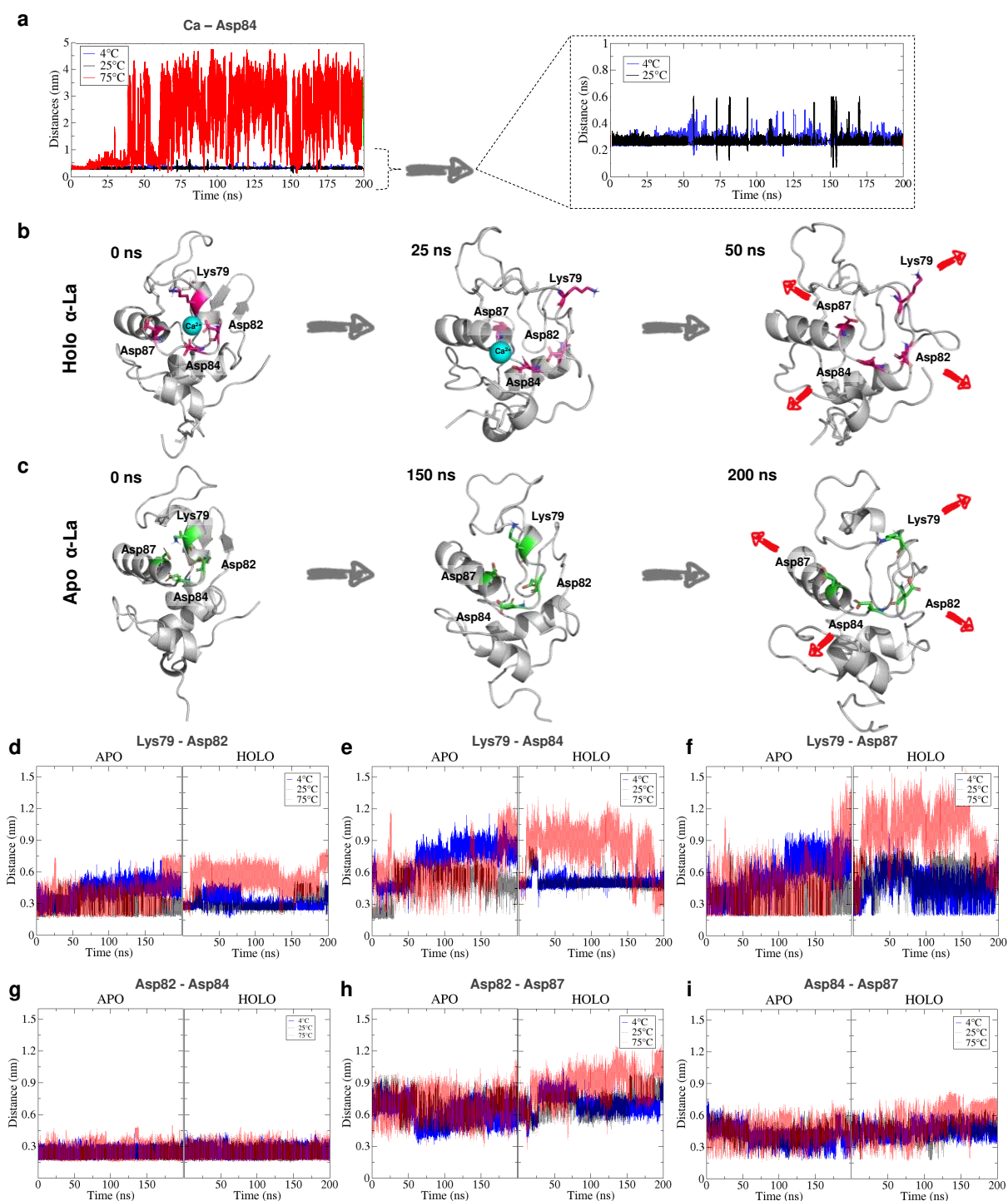
At 75 °C, significant losses are observed in both structures (holo and apo), compatible with the high fluctuations observed in Figures 1c and 1f. For apo-La, there

was a complete loss of the structural motif formed by the three antiparallel  $\beta$ -sheets (S1: Ile41, Val42, Gln43 and Asn44, S2: Ser47, Thr48, Glu49 and Tyr50, and S3: Ile55 and Asn56) (Figures 2c and 2i). When analyzing the high fluctuation presented by the apo-LA region comprised of Cys77-Phe80 residues (h2b helix) (Figure 1b), it is observed an irreversible loss of its secondary structure about 150 ns of simulation (Figures 2c and 2i). This trajectory moment (150 ns) had already been highlighted in Figure 1, as an indication of significant structural changes, with a new peak in the RMSD graph, from 4 Å to, approximately, 6 Å.

For holo-La at 75 °C, even greater structural changes are observed. As indicated by Figure 1d and Figure 1f, and visually seen in Figures 2f and 2l, significant changes in native secondary structures occurred mainly before the 100 ns of simulation. Investigating the moment when these changes started, it was observed that around 25 ns of trajectory, early on, significant structural changes began to happen in the following order: i) irreversible loss of h2b helix, arising from H-bonds losses between the atoms Cys77:O...Phe80:NH and Asp78:O...Leu81:NH, untying Cys77, Asp78, Lys79, Phe80 and Leu81 from this secondary structure; ii) release of  $\text{Ca}^{2+}$  cation to the solvent; iii) complete and irreversible loss of the three antiparallel  $\beta$ -sheets S1, S2 and S3, releasing from the structure the residues Ile41, Val42, Gln43, Asn44, Ser47, Thr48, Glu49, Ile55 and Asn56; and iv) size reduction of  $\alpha$ -helix H1, arising from H-bonds breaking between the atoms Phe9:O...Arg10:NH, releasing from this structure the residues Phe9, Arg10, Glu11. After that, other structural losses continued to happen, but with a lesser extent: v) around 100 ns, a partial destabilization in H2  $\alpha$ -helix is observed, arising from H-bonds broken between atoms Phe31:O...Thr33:NH and His32:O...Ser34:NH, which resulted in the detachment of Phe31, His32, Thr33 and Ser34, possibly caused by an increase in neighboring residues fluctuation that, initially, were organized in  $\beta$ -antiparallel sheets; vi) at the end ( $\cong$  200 ns) the terminal residues of H3  $\alpha$ -helix, such as Asp97 and Lys98, lost their stability after the H-bonds broken between Ile95:O...Asp97:NH and Leu96:O...Lys98:NH atoms.

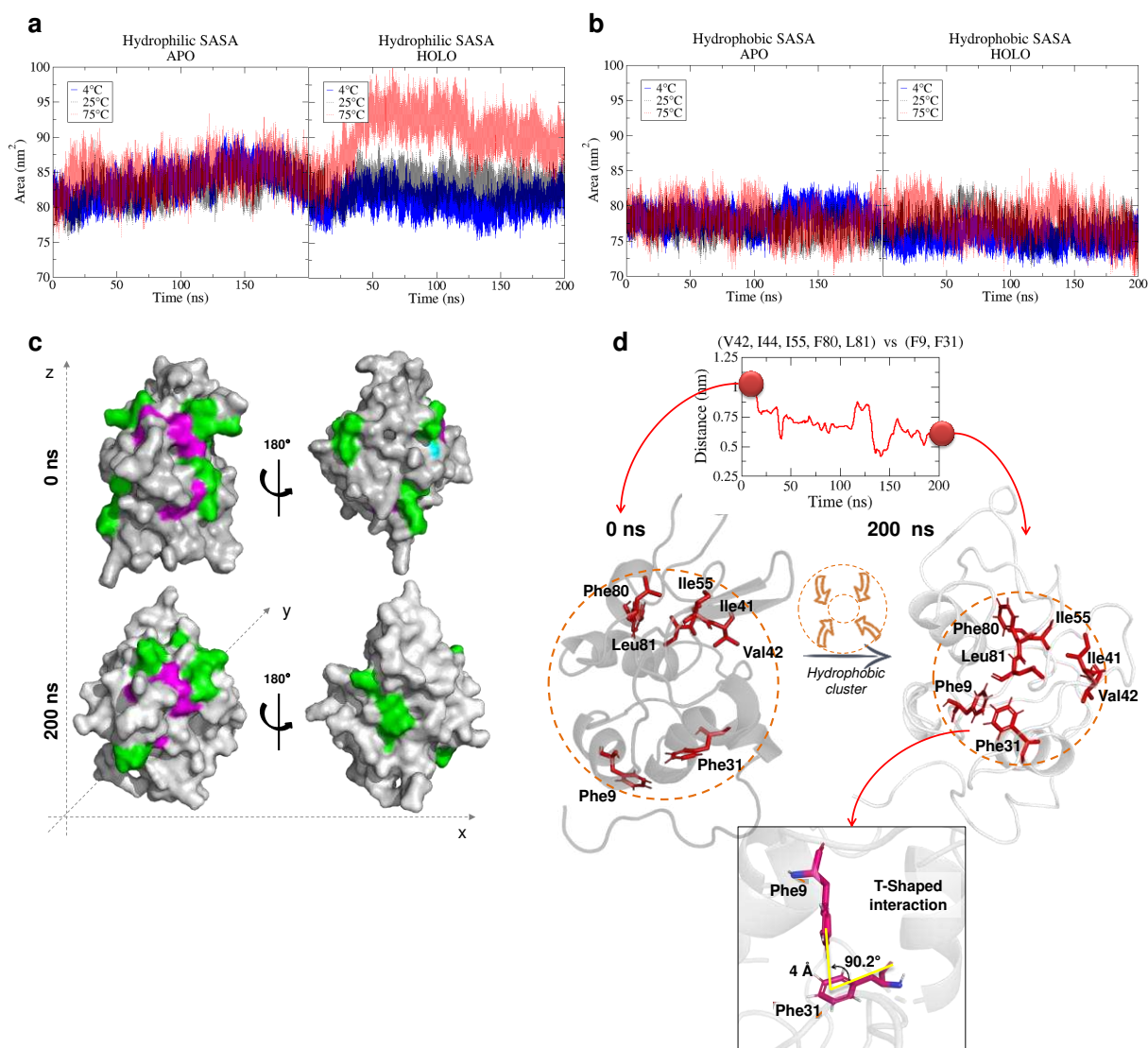
Due to conformational differences observed during simulation between holo-La and apo-La structures at 75 °C, it was performed a detailed analysis of calcium-binding site dynamics (Figure 3). For 4 °C and 25 °C, the  $\text{Ca}^{2+}$  remains stable throughout the trajectory, with an average distance from Asp84 residue of  $2.60 \pm 0.02$  Å and  $2.59 \pm 0.04$  Å, respectively (Figure 3a). Pike et al. (1996) state that, during the ALA crystallization all distances between  $\text{Ca}^{2+}$  and the oxygens to which it is complexed are between 2.15 and 2.5 Å, close to observed in our study. At 75 °C, around 12 ns of simulation, the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site begins to destabilize and gradually unbinds the  $\text{Ca}^{2+}$  cation until 35 ns, when it completely detaches and migrates to the bulk. After, it was observed a progressive opening of  $\text{Ca}^{2+}$  binding site (named as “elbow”), indicating a

possible separation between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -domains (Figure 3b). This behavior is also observed for the calcium-depleted structure, but near to the end of trajectory (Figure 3c). At 75 °C there is an increase on distance between calcium binding site residues (Lys79, Asp82, Asp84 and Asp87) for both structures, but at the start of trajectory for holo-La and at the end for apo-La (Figures 3d-3i).



**Figure 3 -  $\text{Ca}^{2+}$  binding site behavior:** a) distances between  $\text{Ca}^{2+}$  and Asp84 residue at 4, 25 and 75 °C; b) opening of  $\text{Ca}^{2+}$  binding from holo-La at 75 °C before (0 and 25 ns) and after cation leave (50 ns); c) opening of  $\text{Ca}^{2+}$  binding site from apo-La in 0, 150 and 200 ns at 75 °C; d) distances between apo-La and holo-La residues Lys79 and 82; e) Lys79 and Asp84; f) Lys79 and Asp87; g) Asp82 and Asp84; h) Asp82 and Asp87; and i) Asp84 and Asp87.

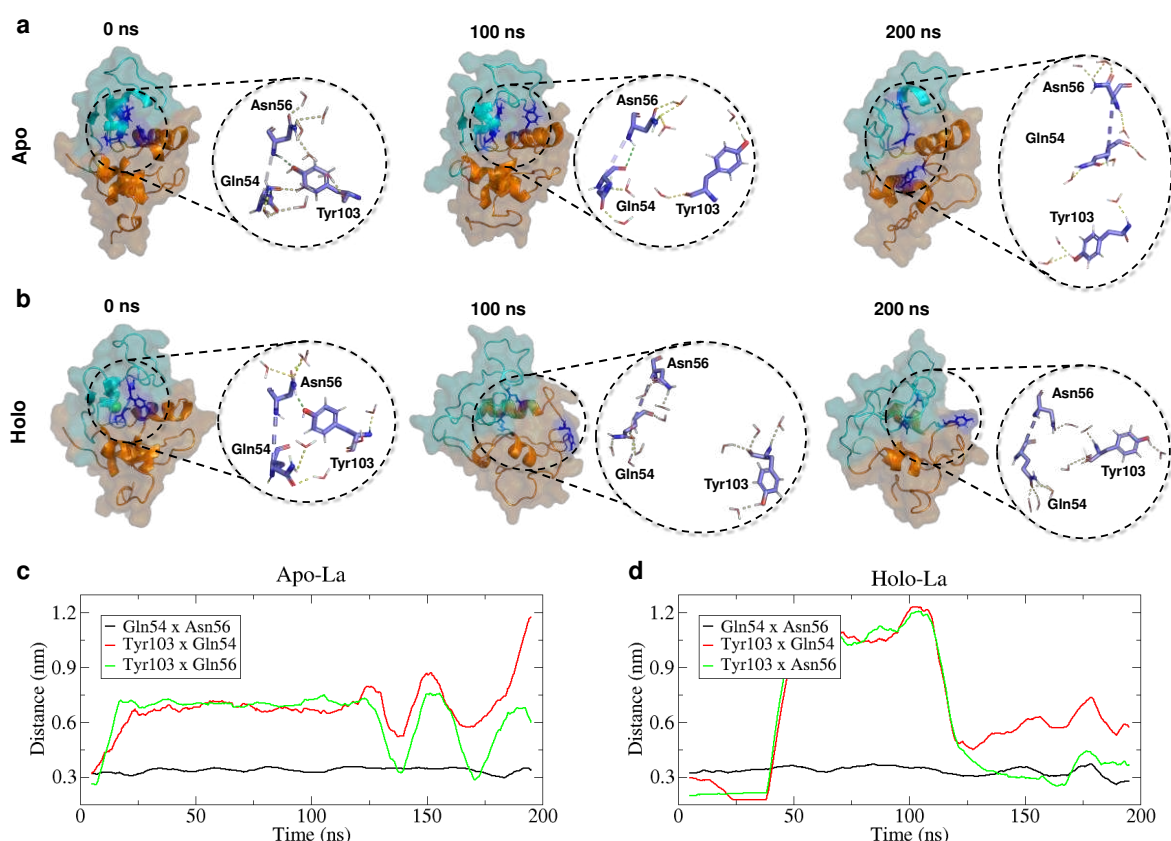
One of the main features of foaming and emulsifying proteins is its high surface exposed to the solvent, mainly the hydrophobic surface (Bos & Vliet, 2001). Therefore, the evolution of hydrophilic (Figure 4a) and hydrophobic (Figure 4b) solvent-accessible surface (SASA) of all systems were calculated. There was no significant difference between apo-La hydrophilic SAS at 4, 25 and 75 °C, with averages of  $83.5 \pm 2.2 \text{ nm}^2$ ,  $83.0 \pm 1.9 \text{ nm}^2$ ,  $84.5 \pm 2.1 \text{ nm}^2$ , respectively, while for holo-La, a significant increase was observed when temperatures were raised, with averages of  $81.0 \pm 1.5 \text{ nm}^2$ ,  $83.2 \pm 1.5 \text{ nm}^2$ ,  $90.4 \pm 3.5 \text{ nm}^2$ , for 4, 25 and 75 °C, respectively. On the other hand, for hydrophobic SASA no differences were observed between the two structures and the three temperatures. For apo-La, averages of  $78.3 \pm 1.4 \text{ nm}^2$ ,  $75.6 \pm 1.1 \text{ nm}^2$ ,  $77.9 \pm 1.9 \text{ nm}^2$  were obtained, and for holo-La  $75.6 \pm 1.1 \text{ nm}^2$ ,  $77.3 \pm 1.5 \text{ nm}^2$ ,  $77.9 \pm 2.0 \text{ nm}^2$ , at 4, 25 and 75 °C, respectively. Even so, it draws our attention that for holo-La at 75 °C, after 150 ns a drop of hydrophobic SASA is started, which reduced, approximately,  $10 \text{ nm}^2$  at the end of trajectory. Possibly, this difference between apo- and holo-La SASA behaviors is due to the amino acid residues detached from the holo-La H1, H2 and H3  $\alpha$ -helices, and that were not detached in apo-La. To understand the dynamic behavior of these residues and how it affects the protein surface polarity, these residues side chain were separated into polar (Arg10, Glu11, His32, Thr33, Ser34, Gln43, Asn44, Ser47, Thr48, Glu49, Asn56, Asp78, Lys79, Asp97 and Lys98) and nonpolar (Phe9, Phe31, Ile41, Val42, Ile55, Phe80 and Leu81) residues, and two Connolly surfaces were elaborated for holo-La at 75 °C at the trajectory begin and at the end (Figure 4c). In the beginning, these hydrophobic residues fill different protein surface regions, but after 200 ns there was noted a reduction of its surface presence (red points), and a grouping in a single region. On the other hand, the polar residues (green) remain distributed on the protein surface. In Figure 4d it can be observed that after the hydrophobic residues losing their secondary structures, there is a spatial reorganization and forming of a "hydrophobic cluster", moving away from the water on the surface, and getting closer to each other. Among these hydrophobic interactions into the cluster, there is a T-shaped interaction between the Phe9 and Phe31 residues, with  $90.2^\circ$  between the aromatic rings centers and a distance of 4 Å between the nearest atoms, featuring a strong hydrophobic interaction (Rutledge & Wetmore, 2008).



**Figure 4 - Solvent accessible surface area (SASA) behavior: a) Hydrophilic SASA from apo and holo structures over simulation time; b) Hydrophobic SASA from apo and holo structures over simulation time; c) Connolly surface of holo structure in 0 and 200 ns at 75 °C, highlighting the polar (green) and nonpolar (purple) residues that lost its native secondary structure; d) HOLO-La hydrophobic cluster organization at 75 °C.**

An important region named “cleft-region”, composed by Gln54 and Asn56 from  $\alpha$ -domain and Tyr103 from  $\beta$ -domain, also seems to significantly influence the exposure of hydrophobic residues on the protein surface, through H-bonds that stabilizes their respective subdomains (Chrysin et al., 2000). Due to destabilization presented at 75 °C, this “cleft” was detailed investigated after warming, and, for both, holo- and apo-La, after 100 ns, all native H-bonds between such residues and its different domains (alpha and beta) are replaced by H-bonds with solvent water molecules (Figures 5a-b). For apo-La, it was observed an H-bond between Asn56:NH...Gln54:O, which possibly indicate a stability intra- $\beta$ -domain. However, at the trajectory end (200 ns), is noted that due to the high movement promoted by the

temperature and the minimum distance increase between these subdomains residues (Figures 5 c-d), all H-bonds between these residues are completely lost giving way to H-bonds with the neighboring water molecules, indicating, for both, possible flexibility of the carbon chain at 75 °C and, in addition, the ability that aminoacids residues to reorganize according to the surrounding solvent.

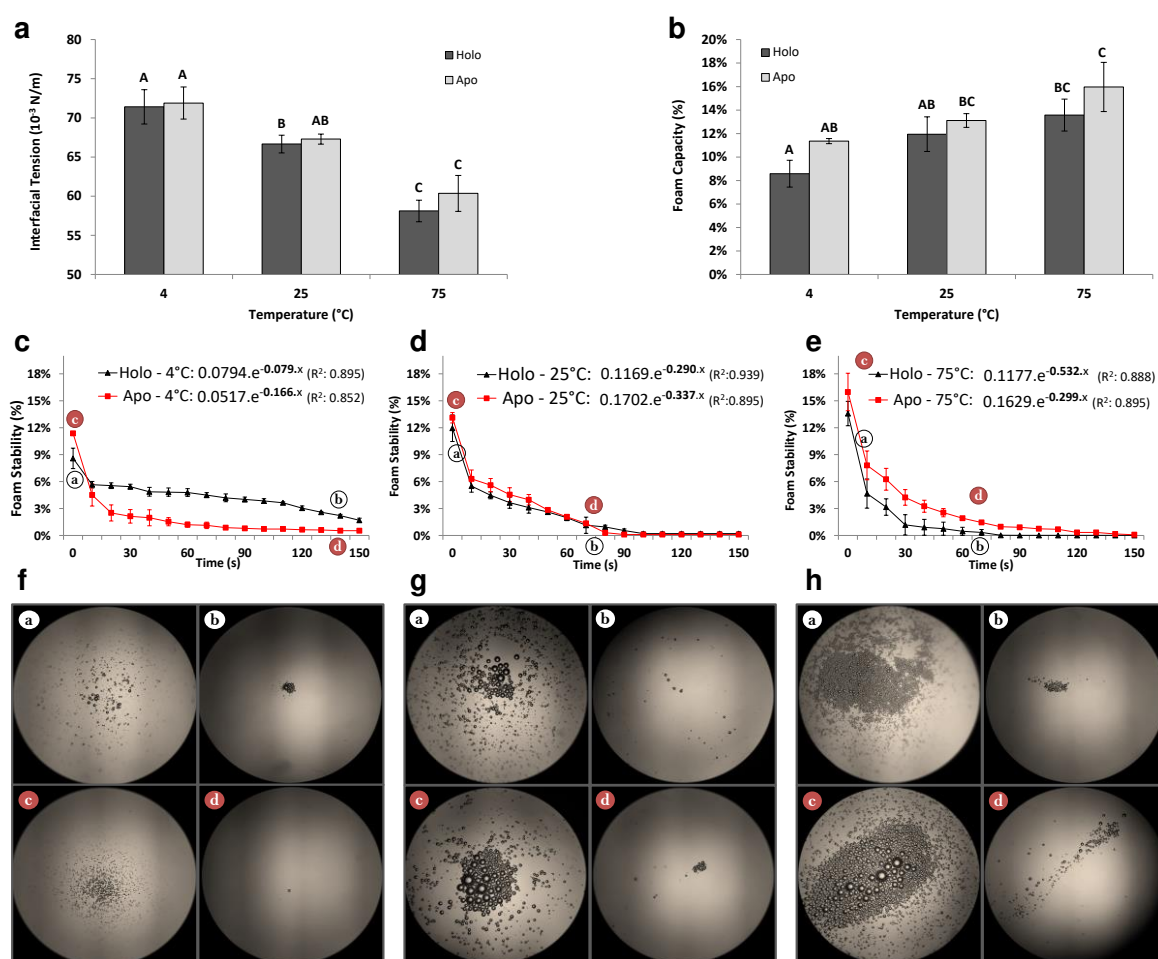


**Figure 5 - Loss of stability between alpha and beta subdomains, promoted by the lost of hydrogen bonds between the Gln54, Asn56 and Tyr103 residues, for a) apo and b) holo structures, at 75 °C in 0, 100 and 200 ns of simulation, and distances between the Gln54, Asn56 and Tyr103 residues for c) apo-La and d) holo-La. The  $\alpha$ -domain is depicted in orange and the  $\beta$ -domain is depicted in cyan.**

Finally, when analyzing the technological behavior *in vitro* for each simulated system *in silico*, it was observed that the interfacial tension significantly decreases with increasing temperature for both structures, holo- and apo-La (Figure 6a). A Pearson's Correlation Coefficient of -0.987 was obtained between interfacial tension and temperature, indicating a strong inverse correlation between these variables, such as the temperature increase promotes a significant reduction in the interfacial tension. On the other hand, the  $\text{Ca}^{2+}$  did not affect the systems' interfacial tension. Regarding the foaming capacity (FC), a significant increase is obtained due to the temperature increase, without the influence of the  $\text{Ca}^{2+}$  presence (Figure 6b), with a strong Pearson's Correlation Coefficient of 0.839 between FC and temperature. To assess a possible correlation between "interfacial tension" and "FC" of  $\alpha$ -LA, a Pearson's Correlation Coefficient of -0,795 was calculated, indicating that the reduction in

interfacial tension promotes a significant increase in the  $\alpha$ -LA FC, with or without  $\text{Ca}^{2+}$  complexed.

Lastly, the foam stability was assessed through the evolution of foam volume over time (Figures 6c-h). From the stability results, an exponential equation such as "y" (%) was modeled, in which the "a" (%) index corresponds to an approximate value of the foaming capacity when time (t(s)) is zero, and the "b" ( $\text{s}^{-1}$ ) index corresponds to the rate of foam decay, as the greater the modulus of "b", the less stable is the foam, that is, the foam stability. The index modules of foam decay at 4 °C for both holo- and apo-La are equal to  $0.079 \text{ s}^{-1}$  and  $0.166 \text{ s}^{-1}$ , respectively, and are smaller than those obtained at 25 and 75 °C,  $0.290 \text{ s}^{-1}$  and  $0.337 \text{ s}^{-1}$ , and  $0.532 \text{ s}^{-1}$  and  $0.299 \text{ s}^{-1}$ , for holo- and apo-La, respectively (Figures 6c-e).



**Figure 6 - Systems *in vitro* behavior:** a) foam capacity of apo and holo structures at 4, 25 and 75 °C; b) interfacial tension of apo and holo structures at 4, 25 and 75 °C; c) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 4 °C; d) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 25 °C; e) mathematic model of foam stability of apo (red line) and holo (black line) structures at 75 °C; foam microscopic images of apo and holo structures in different time moments at f) 4 °C, g) 25 °C and h) 75 °C.

## 6.5. Discussion

### 6.5.1. Molecular characterization of $\alpha$ -La molten globule state

In our study, temperatures of 4 and 25 °C were not able to significantly change both structures, with or without calcium, which remained stable throughout the trajectory, despite the greater fluctuation presented at 25 °C. Stanciuc & Râpeanu (2010) and Tarek *et al.* (2003), state that  $\alpha$ -La's molten globule is characterized by: (i) partial maintenance of native secondary structures; (ii) compact structure with a radius of gyration 10 and 20% greater than native molecule; (iii) absence of specific tertiary packaging interactions; and iv) significant solvent penetration into the protein's hydrophobic core. Despite this, Chrysina *et al.* (2000) explain that, at room temperature ( $\cong$  25 °C) the calcium-depleted structure (apo-La) assumes a state of molten globule, even though its native secondary structure is mostly preserved. On the other hand, at 75 °C both structures reached a molten globule state, with significant loss of its native secondary structures. As expected, this temperature increases the system kinetic energy promoting greater atomic movement and, therefore, greater fluctuation and a greater tendency to structural losses (Figures 1 and 2). Smith *et al.* (2005) also observed a significant increase in the RMSD values after increasing temperature from 20 °C to 87 °C and 127 °C, using Gromos43A1 ff, reaching values close to 5 and 10 Å, respectively.

*In vitro* experiments using SAXS also obtained an Rg variation of  $\cong$  10 % between the native  $\alpha$ -La (15.7 Å) and the molten globule state (17.2 Å), and this behavior was attributed to the four  $\alpha$ -La disulfide bridges (Kataoka *et al.*, 1997). In this work, even at 75 °C, when both structures lost many of its secondary structures, minimal variations in Rg (<5%) were observed. Bucciarelli *et al.* (2020) e Tarek *et al.* (2003) also simulated native and calcium depleted  $\alpha$ -La at 25 °C using CHARMM36 and CHARMM22 ff, respectively, and obtained similar results, with Rg variations <10% (Rg average  $\cong$  14.5 Å) and  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets conservation for both structures. Oroguchi *et al.* (2005), using the CHARMM22 ff, in 10 trajectories of 5 ns at 25 and 100 °C, also obtained Rg values between 14.9 and 15.1 Å, although they considered that at this stage the  $\alpha$ -La had not reached the molten state globule yet. However, based on our results and on the other studies mentioned above, it is observed that, unlike other globular proteins, for  $\alpha$ -La the Rg values are not a good parameter to characterize its molten globule state.

The RMSF results (Figure 1) corroborate this statement, where it was observed low fluctuations for cysteine residues involved in disulfide bridges, contributing significantly to the partial maintenance of the  $\alpha$ -la tertiary structure and avoiding its denaturation at 75 °C. Schmid, Bolliger, Smith, & Van Gunsteren (2008), to observe

possible conformational rearrangements of  $\alpha$ -La without disulfide bridges, performed simulations at 25, 79 and 100 °C, using Gromos53a6 ff by 20 ns without S-S bond length parameters. At 25 °C, they observed that the native conformation was preserved even with the disulfide bridges broken, assenting with our results (Figure 2), and for high temperatures like 75 °C and 100 °C, there was a large deviation from the native structure (RMSD  $\cong$ 10 Å). We suggest that at 25 °C, the structural stability of both structures (holo- and apo-La) are governed by H-bonds and hydrophobic intra-protein interactions, whilst for high temperatures, the disulfide bonds are crucial for ALA not unfold irreversibly.

Despite the significant structural losses at 75 °C, mainly for the holo-La structure, it is observed that those secondary structures that have not been completely destabilized have cysteine residues performing disulfide bridges (e.g.  $\alpha$ -helix H1: Cys6,  $\alpha$ -helix H2: Cys28 and  $\alpha$ -helix H3: Cys91) (Figures 2f and 2l). Some researchers observed that even after great structural disturbance, if the four disulfide bridges are maintained,  $\alpha$ -La maintains a high capacity to slowly and perfectly refold to the native state, with efficiency up to 90% and very fast when  $\text{Ca}^{2+}$  remains complex to the structure (Chrysina et al., 2000; Ellouze, Vial, Attia, & Ayadi, 2019; Stanciuc & Răpeanu, 2010).

As noted in our results, since the first  $\alpha$ -La structure characterizations, it was indicated that some regions of the protein would be more rigid, i.g. the calcium-binding-loop (Lys79-Asp88), the aromatic cluster (Phe31-His32, Gln117-Trp118) and the hydrophobic region (Phe53, Ile55, Ile95, Tyr103, Trp104), while others could show greater motility, such as the loops exposed to the solvent in the  $\beta$ -domain (Gln43-Ser47 and Lys62-Phe67) and the C-terminal tail (Cys111-Leu123) (Pike et al., 1996). Using molecular dynamics simulation, Schmid *et al.* (2008) and Smith *et al.* (2005), with Gromos53a6 and Gromos43a1 ff, respectively, also observed secondary structures stability at 25 °C, while above 80 °C there was a significant loss in all  $\alpha$ - and  $3_{10}$ -helices, as well as the  $\beta$ -sheets instability. Santos, *et al.* (2019) and Diniz *et al.* (2014), using circular dichroism spectroscopy, observed similar behavior to *in silico* results, with changes in standard ellipticity peaks of  $\alpha$ -helices at 62.7 °C and pH 6.5, indicating a reduction or loss of this secondary structure and a conversion to a less dense state of  $\alpha$ -La.

An important conformational change presented by both structures was the distance increasing between the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site residues, caused by an electrostatic repulsion promoted by the high concentration of negative charges between the Asp82, Asp84 and Asp87 residues. When carrying out the  $\alpha$ -La crystallization, Chrysina *et al.* (2000) had observed similar behavior, suggesting that environments with low ionic strength could increase these residues separation and produce, by the same

mechanism, an additional separation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -domains, increasing the exposure of hydrophobic regions. Our results showed that apo-La, despite its greater flexibility in this region (Kronman, 1989), presented this conformational change after holo-La, possibly because during the initial stages of simulation preparation, its structure had been relaxed and stabilized without the cation  $\text{Ca}^{2+}$  with high movement restrictions. On the other hand, the holo-La lost this cation during the production stage without any movement restriction, and it was possibly promoted by the destabilization of the h2b helix, resulting in several conformational changes.

This series of structural changes after  $\text{Ca}^{2+}$  loss appears to have a correlation with the thermal stability promoted by this cation historically discussed in related literature. Agreeing with Radibratovic *et al.* (2019) results, using circular dichroism and CHARMM27 ff by 40 ns, but diverging to Eynard *et al.* (1992) and Stanciuc & Răpeanu (2010), authors noted that holo-La seems to be thermally more unstable than apo-La when subjected to temperatures  $\geq 75$  °C. This is based on the greater conformational impact caused by the  $\text{Ca}^{2+}$  loss on the holo-structure, that affects not only its neighboring helix h2b, but also the  $\alpha$ -helices H1, H2 and H3 and  $\beta$ -sheets S1, S2 and S3. This accelerated unfold observed after the  $\text{Ca}^{2+}$  loss is in line with Oroguchi *et al.* (2005) e Kronman (1989), which characterized the  $\alpha$ -La unfolding in two stages: i) progressive increase in residues fluctuations and weakening of intermolecular interactions; ii) release of  $\text{Ca}^{2+}$  to the solvent and subsequent acceleration of secondary structures losses. Our results allow understanding rationally Pike *et al.* (1996), which drew attention to the fact that the stabilizing effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on bovine  $\alpha$ -La was little apparent than  $\alpha$ -La from other sources and seemed to be intensely affected by temperature.

It was observed a significant increase in hydrophilic SASA of the holo-La at 75 °C immediately after 25 ns, just when the  $\text{Ca}^{2+}$  leaves the structure and, as already discussed, the destabilization process begins. From a technological perspective, this is a undesired behavior since an increase in the hydrophobic residues exposure is sought for the improvement of the interfacial properties (e.g. foaming and emulsifying capacity), aiming to promote fast adsorption at the interfaces air/water or oil/water and reduce the interfacial tension between the two phases (Eynard *et al.*, 1992). On the other hand, after losing its native secondary structure, some hydrophobic residues create a “hydrophobic cluster”, showing sufficient flexibility to organize spontaneously in a more energetically stable conformation (Figure 4). Likewise, inter-domain instability shown at 75 °C can also promote greater protein flexibility and significantly influence the hydrophobic surface exposed as a function of the solvent (Figure 5).

## 6.5.2. Foamability vs $\alpha$ -La conformational changes

### 6.5.2.1. Foam capacity

In our study the improvements in foaming properties were associated with temperature and not with the presence  $\text{Ca}^{2+}$  in the structure, as was also observed by Ellouze *et al.* (2020). In similar studies, Ellouze *et al.* (2019) and Eynard *et al.* (1992) observed that temperature increase promoted a gradual reduction in the surface hydrophobicity of bovine  $\alpha$ -La, and attributed this behavior to the reorganization of free hydrophobic aminoacids residues and possible protein aggregation. On the other hand, Smith *et al.* (2005), stating that when reaching a molten globule state due to temperature increase, there is a loss of hydrophobic packaging and a consequent increase in the hydrophobic residues exposure. It is possible that the protein aggregation was promoted by the search for a thermodynamically less unstable structure, reducing the exposure of hydrophobic residues to the polar solvent, similar to the hydrophobic cluster observed in our study (Figure 4).

However, unlike our results, Barbana & Pérez (2011) observed an improvement in the interfacial properties of bovine  $\alpha$ -La in water after  $\text{Ca}^{2+}$  removal and its unfolding until molten globule state in neutral pH at 40 °C, as well as Ibanoglu & Ibanoglu (1999), who observed a significant increase in the foam volume produced by  $\alpha$ -La after the removal of the  $\text{Ca}^{2+}$  cation. The authors attributed this improvement to a possible increase in the  $\alpha$ -La hydrophobic surface that reduced the interfacial tension between the systems different phases.

This contradiction observed between these studies can be explained by the molecular behavior of  $\alpha$ -La observed during dynamics, but with prudence and precaution, since the protein was simulated only in water. In both systems at 75 °C, after the  $\alpha$ -La's secondary structures destabilization, the solvent nature starts to modulate the residues exposure through a combination of direct protein-solvent interactions, or interactions mediated by solvent molecules. Therefore, experiments carried in aqueous media only, as in this study, are able to show only when and under what conditions amino acids residues lose their secondary structure (e.g. Phe9, Arg10, Glu11, Phe31, His32, Thr33, Ser34, Ile41, Val42, Gln43, Asn44, Ser47, Thr48, Glu49, Gln54, Ile55, Asn56, Asp78, Lys79, Phe80, Leu81, Asp97 and Lys98 and Tyr103), but its reorganization after that will depend on the chemical environment in which it is immersed. Hence, different conformations are observed in different solvents and at the interface between different solvents. Thus, a complex food matrix and after to processing operations that promote physical stress, such as temperature increase (at least 75 °C), homogenization and abrasion, the hydrophobic SASA can spontaneously increase, based on the reorganization of free hydrophobic residues that assume a

more thermodynamically favorable conformation, exposing its hydrophobic residues to the interface of air bubbles or oil droplets, and reducing the interfacial tension between the different phases, significantly improving its technological properties.

Our *in vitro* results are in line with this premise, which was observed that temperature increase promoted a significant increase in the  $\alpha$ -La foaming capacity (FC), and this behavior can be attributed to: i) the conformational changes promoted by the temperature increase indicated by the *in silico* results; and ii) consequent interfacial tension reduction promoted by the protein coating at the water/air interface and by the temperature increase. As already discussed, the temperature increase affected significantly the stability of some secondary structures, increasing the flexibility of both proteins, thus increasing their unitary capacity to cover the bubble's interface. Due to the greater thermal instability presented by the holo-La, it was assumed that it would present better foaming properties than apo-La, but no significant differences were observed between them, possibly because apo-La also reached a high flexibility level after the heat treatment enough to cover the water/air interface similarly to holo-La. This ability to reduce the interfacial tension of  $\alpha$ -La has been studied for decades, and it always seems facilitated when its unfolding or molten globule state are induced, such as in the works of Bacon *et al.* (1988) and Cornec *et al.* (2001), which also did not observe differences with or without  $\text{Ca}^{2+}$  complexed in the structure. Both authors emphasize that the partial denaturation of  $\alpha$ -La promotes the hydrophobic residues exposure, which becomes more available to reduce the water/air interfacial tension and, thus, improve the foaming properties, since it needs fewer units to cover the same interfacial area.

Physical treatments such as high temperatures, high pressures and shear forces have been reported as being able to improve the interfacial properties of  $\alpha$ -La, always through destabilizing its secondary structures (Diniz *et al.*, 2014; Duerkop, Berger, Dürauer, & Jungbauer, 2018; Jambrak, Mason, Lelas, & Krešić, 2010). Briefly, these different studies showed that different physical treatments affect  $\alpha$ -La interface properties by different ways, and the destabilization of native secondary structures is important to improve these properties, but the foam creation process also has a great impact, since it also guides the form in which the hydrophobic and hydrophilic residues are exposed at the interface.

#### **6.5.2.2. Foam stability**

Regarding the foam stability, as calculated, there is an increase in the foam decay speed modulus with an increase in the system temperature, and, therefore, low-temperature systems, such as apo- and holo-La at 4 °C, had the greatest foam stability. The bubbles obtained at 4 °C are smaller than those obtained at higher

temperatures (Figures 6f-h) and, although the holo and apo-La structures maintain its original conformation at this temperature, the bubbles' smaller size requires fewer protein units to cover the interface. In addition, the lower kinetic energy at this temperature reduces the movement and expandability of bubbles, reducing contact between them and, consequently, reducing the destabilization by Ostwald ripening (McClements, 2007), even though it produces a smaller foam volume. At the other extreme of temperature (75 °C), higher decay modules are observed, with values of 0.523 and 0.299 for holo- and apo-La, respectively.

In this work, therefore, the foam stability was mainly sensitive to the temperature variable, and the  $\text{Ca}^{2+}$  presence or absence seems to be irrelevant in the studied conditions. As the protein structures was simulated only in water, carefully, the molecular dynamics can indicate that, after the  $\alpha$ -La's secondary structures destabilization at 75 °C, the solvent features come to modulate the residues exposure and govern the types and stability of interactions between protein-solvent molecules. It is possible, therefore, that at 75 °C, the high kinetic energy of the solvent molecules in both phases promote the destabilization of the foams, as observed *in vitro*. A second cause pointed by Barbana & Pérez (2011), correlated further to the solvent characteristics, is the air expansibility at higher temperatures, that promoted larger bubbles and, consequently, reduced the interface film thickness, accelerating its rupture and promoting a rapid foam destabilization. In contrast, Lajnaf, Picart-Palmade & Marchesseau (2017) observed an increase in the foam's stability with the heat treatment increase. However, their analysis methodology was different, when only proteins were heat-treated and foams were prepared at room temperature, corroborating with our conclusions.

## 6.6. Conclusion

This study has highlighted the promising application of molecular dynamics simulation as a novel and innovative technique to be used in analyses of technological aspects of food proteins at a molecular level, for instance,  $\alpha$ -La with or without calcium complexed in its structures and at different temperatures. In essence, it was found that temperatures of 4 and 25 °C were not able to significantly change both structures, but at 75 °C significant losses of its secondary structures were observed with the maintenance of the  $\alpha$ -La tertiary structure. So, we observed that at 4 and 25 °C the structural stability was governed by H-bonds and hydrophobic intra-protein interactions, while at 75 °C, the disulfide bonds were crucial for avoiding the irreversible denaturation. At 75 °C, the  $\text{Ca}^{2+}$  leaving the holo-La structure starts a sequence of secondary structures destabilizations, with complete loss of h2b, h3c helices and S1, S2 and S3  $\beta$ -sheets, and partial loss of H1, H2 and H3  $\alpha$ -helices, promoting a new

conformational organization of these residues such as: i) the opening of Ca<sup>2+</sup> binding site (for both structures) due to the electrostatic repulsion between the Asp82, Asp84 and Asp87 residues; ii) the creation of a “hydrophobic cluster”; and iii) the loss of inter-domain stability, looking for an energetically more stable conformation as a function of the phase nature. The improvements in foaming properties were associated only with temperature and not with Ca<sup>2+</sup> complexed in the structure. The conformational changes promoted by the temperature may be related to the increase and the interfacial tension decrease promoted a significant increase in the  $\alpha$ -La foaming capacity (FC). The no significant differences between holo- and apo-La foam properties may be associated with the similar flexibility level assumed for both structures after the heat treatment, enough to cover better the water/air interface. At the end, low-temperature systems, such as at 4 °C, had the greatest foam stability due to the lower kinetic energy which reduces the movement and expandability of bubbles, reducing its destabilization by Ostwald ripening. This *in silico* approach can impart further understanding at a molecular level for not only the intra-residue interactions within  $\alpha$ -La, but also its key conformational features during thermal processing and storage for milk or whey.

## 6.7. References

- Abraham, J. M., Murtola, T., Schulz, R., Pall, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2(19–25), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Bacon, J. R., Hemmant, J. W., Lambert, N., Moore, R., & Wright, D. J. (1988). Characterization of the foaming properties of lysozymes and  $\alpha$ -lactalbumins: a structural evaluation. *Food Hydrocolloids*, 2(3), 225–245. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80020-1)
- Barbana, C., & Pérez, M. D. (2011). Interaction of  $\alpha$ -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties - A review. *International Dairy Journal*, 21(10), 727–741. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.009>
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., & Straatsma, T. P. (1987). The Missing Term in Effective Pair Potentials. *The Journal of Physical Chemistry*, 91, 6269–6271. <https://doi.org/10.1021/j100308a038>
- Bos, M. A., & Vliet, T. Van. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 437–471.
- Bucciarelli, S., Sayedi, E. S., Osella, S., Trzaskowski, B., Vissing, K. J., Vestergaard, B., & Foderà, V. (2020). Disentangling the role of solvent polarity and protein solvation in folding and self-assembly of a  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 561, 749–761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.11.051>
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, 126(1), 1–7. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>

- Chrysin, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine  $\alpha$ -Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>
- Connolly, M. L. (1983). Analytical molecular surface calculation. *Journal of Applied Crystallography*, 16, 548–558. <https://doi.org/10.1107/s0021889883010985>
- Cornec, M., Kim, D. A., & Narsimhan, G. (2001). Adsorption dynamics and interfacial properties of  $\alpha$ -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 15, 303–313.
- de Oliveira, A. P. H., Omura, M. H., Barbosa, É. de A. A., Bressan, G. C., Vieira, É. N. R., Coimbra, J. S. dos R., & de Oliveira, E. B. (2020). Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 603. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125156>
- De Oliveira, T. V., Guimarães, A. P., Bressan, G. C., Maia, E. R., Sélia, J., & Polêto, M. D. (2020). Structural and Molecular Bases of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition by Bovine Casein-Derived Peptides: An In Silico Molecular Dynamics Approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1730243>
- Diniz, R. S., Coimbra, J. S. dos R., Teixeira, Á. V. N. de C., da Costa, A. R., Santos, I. J. B., Bressan, G. C., ... Silva, L. H. M. (2014). Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. *Food Research International*, 64, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.079>
- Duerkop, M., Berger, E., Dürauer, A., & Jungbauer, A. (2018). Impact of Cavitation, High Shear Stress and Air/Liquid Interfaces on Protein Aggregation. *Biotechnology Journal*, 13, 1–9. <https://doi.org/10.1002/biot.201800062>
- Ellouze, M., Lajnaf, R., Zouari, A., Attia, H., Ali, M., & Vial, C. (2020). Camel  $\alpha$ -lactalbumin at the oil-water interface: Effect of protein concentration and pH change on surface characteristics and emulsifying properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 189, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110654>
- Ellouze, M., Vial, C., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2019). Camel  $\alpha$ -lactalbumin at the oil-water interface: Effect of pH and heat treatment on the structure, surface characteristics and emulsifying properties. *LWT - Food Science and Technology*, 116, 108550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108550>
- Eynard, L., Iametti, S., Relkin, P., & Bonomi, F. (1992). Surface Hydrophobicity Changes and Heat-Induced Modifications of  $\alpha$ -Lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1731–1736. <https://doi.org/10.1021/jf00022a002>
- Gonçalves, Y. M. H., Senac, C., Fuchs, P. F. J., Hunenberger, P. H., & Horta, B. A. C. (2019). Influence of the Treatment of Nonbonded Interactions on the Thermodynamic and Transport Properties of Pure Liquids Calculated Using the 2016H66 Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15, 1806–1826. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00425>
- Hendrix, T., Griko, Y. V., & Privalov, P. L. (2000). A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, 84, 27–34.
- Hill, R. L., & Brew, K. (1975). LACTOSE SYNTHETASE. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 43(1), 411–484. <https://doi.org/10.1002/9780470122884.ch5>

- Ibanoglu, E., & Ibanoglu, Ş. (1999). Foaming behaviour of EDTA-treated  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chemistry*, *66*, 477–481. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00083-7)
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(2), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.001>
- Kataoka, M., Kuwajima, K., Tokunaga, F., & Goto, Y. (1997). Structural characterization of the molten globule of  $\alpha$ -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Science*, *6*, 422–430. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060219>
- Katouzian, I., Jafari, S. M., Maghsoudlou, Y., Karami, L., & Eikani, M. H. (2020). Experimental and molecular docking study of the binding interactions between bovine  $\alpha$ -lactalbumin and oleuropein. *Food Hydrocolloids*, *105*, 105859. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105859>
- Kronman, M. J. (1989). Metal-ion binding and the molecular conformational properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *24*(6), 565–667. <https://doi.org/10.3109/10409238909080054>
- Kumar, N., & Kishore, N. (2014). Arginine inhibits aggregation of  $\alpha$ -lactalbumin but also decreases its stability: Calorimetric, spectroscopic, and molecular dynamics studies. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, *78*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.06.024>
- Lajnaf, R., Picart-Palmade, L., Attia, H., & Marchesseau, S. (2017). The effect of pH and heat treatments on the foaming properties of purified  $\alpha$ -lactalbumin from camel milk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.002>
- Lajnaf, R., Picart-Palmade, L., Attia, H., Marchesseau, S., & Ayadi, M. A. (2016). Foaming and adsorption behavior of bovine and camel proteins mixed layers at the air/water interface. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, *151*, 287–294.
- Lee, B. B., Ravindra, P., & Chan, E. S. (2008). A critical review: Surface and interfacial tension measurement by the drop weight method. *Chemical Engineering Communications*, *195*(8), 889–924. <https://doi.org/10.1080/00986440801905056>
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, *25*, 1656–1676. <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>
- Oroguchi, T., Ikeguchi, M., Saeki, K., Kamagata, K., Sawano, Y., Tanokura, M., ... Kuwajima, K. (2005). Atomically detailed description of the unfolding of  $\alpha$ -lactalbumin by the combined use of experiments and simulations. *Journal of Molecular Biology*, *354*, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.061>
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, *52*(12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Pike, A. C., Brew, K., & Acharya, K. R. (1996). Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine  $\alpha$ -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure*, *4*(6), 691–703. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00075-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00075-5)
- Polêto, M. D., Alves, M. P., Ligabue-braun, R., Eller, M. R., & de Carvalho, A. F. (2019). Role of structural ions on the dynamics of the *Pseudomonas fluorescens*

- 07A metalloprotease. *Food Chemistry*, 286(February), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.204>
- Qayum, A., Chen, W., Ma, L., Li, T., Hussain, M., Bilawal, A., ... Hou, J. (2020a). Characterization and comparison of  $\alpha$ -lactalbumin pre-and post-emulsion. *Journal of Food Engineering*, 269, 109743. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109743>
- Qayum, A., Chen, W., Ma, L., Li, T., Hussain, M., Bilawal, A., ... Hou, J. (2020b). Characterization and comparison of  $\alpha$ -lactalbumin pre-and post-emulsion. *Journal of Food Engineering*, 269, 109743.
- Radibratovic, M., Al-Hanish, A., Minic, S., Radomirovic, M., Milcic, M., Stanic-Vucinic, D., & Velickovic, T. C. (2019). Stabilization of apo- $\alpha$ -lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: Experimental and molecular dynamics study. *Food Chemistry*, 278, 388–395.
- Relkin, P., Launay, B., & Eynard, L. (1993). Effect of Sodium and Calcium Addition on Thermal Denaturation of Apo-a-Lactalbumin: a Differential Scanning Calorimetric Study. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 36–47. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77321-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77321-X)
- Rutledge, L. R., & Wetmore, S. D. (2008). Remarkably strong T-Shaped interactions between aromatic amino acids and adenine: Their increase upon nucleobase methylation and a comparison to stacking. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(10), 1768–1780. <https://doi.org/10.1021/ct8002332>
- Santos, I. J. B., Hernandez, H. L., Costa, M. H. C., Lafetá Junior, J. A. de Q., & Coimbra, J. S. dos R. (2019). Conjugates of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and lysozyme with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. *Food Research International*, 116, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.065>
- Schmid, N., Bolliger, C., Smith, L. J., & Van Gunsteren, W. F. (2008). Disulfide bond shuffling in bovine  $\alpha$ -lactalbumin: MD simulation confirms experiment. *Biochemistry*, 47, 12104–12107. <https://doi.org/10.1021/bi8013455>
- Smith, L. J., Jones, R. M., & Van Gunsteren, W. F. (2005). Characterization of the denaturation of human  $\alpha$ -lactalbumin in urea by molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 58, 439–449. <https://doi.org/10.1002/prot.20287>
- Stanciuc, N., & Râpeanu, G. (2010). An overview of bovine  $\alpha$ -lactalbumin structure and functionality. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati - Food Technology*, 34(2), 82–93.
- Tarek, M., Neumann, D. A., & Tobias, D. J. (2003). Characterization of sub-nanosecond dynamics of the molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin using quasielastic neutron scattering and molecular dynamics simulations. *Chemical Physics*, 292, 435–443. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(03\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(03)00291-X)
- Tomasula, P. M., & Yee, W. C. F. (2001). Enriched fractions of alpha-lactalbumin ( $\alpha$ -LA) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -LG) from whey protein concentrate using carbon dioxide. Functional properties in aqueous solution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25, 267–282. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2001.tb00460.x>
- Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., Te Beek, T. A. H., Krieger, E., Joosten, R. P., & Vriend, G. (2015). A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D364–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1028>
- Verlet, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159(1), 98–103. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/9/2/008>

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Por meio da presente tese foi possível corroborar o enorme potencial de aplicação que os métodos de modelagem molecular, de simulações de *docking* e de dinâmica molecular, possuem frente a estudos que lidam com biomoléculas complexas, tais como aquelas comumente estudadas em CTA. Os estudos de caso aqui desenvolvidos com o objetivo de elucidar as bases moleculares e o mecanismo de ação de algumas biomoléculas de origem alimentar, nos permitiram alcançar níveis de profundidade que raramente são encontrados em discussões científicas dessa área, como:

i. que os peptídeos obtidos do processo de tripsinólise aqui estudado, apresentavam capacidade anti-hipertensiva melhor quando complexados à resíduos de aminoácidos específicos na enzima conversora de angiotensina I (ECA), como os resíduos Ala354, Glu384, Tyr523, His383, His387, Glu411 e o íon de zinco (**Capítulo 2**);

ii. que, uma vez complexado à ECA, o tipo de interação em cada sítio ativo era o fator predominante na promoção dos diferentes níveis de inibição, sendo que quanto maior a capacidade do peptídeo de desestruturar a coordenação tetraédrica do íon de zinco, maior a inibição promovida e, conseqüentemente, maior sua atividade anti-hipertensiva (**Capítulo 3**);

iii. que a 4 °C e a 25 °C a estrutura da  $\alpha$ -La, com ou sem cálcio, mantém suas estruturas secundárias estáveis por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio intra-proteína. Já a 75 °C, o íon cálcio é depletado com posterior perda das estruturas 2<sup>as</sup> h2b, h3c, S1, S2 e S3, e a desestruturação parcial das hélices H1, H2 e H3. Isso nos sugere que houve um aumento nas possibilidades de reorganização dos resíduos na interface ar/água, com conseqüente redução da tensão interfacial em relação a 4 °C e 25 °C e, portanto, aumento da capacidade espumante da proteína a 75 °C (**Capítulo 4**).

A consolidação de tais ferramentas e técnicas em pesquisas relacionadas à CTA nos permitirá esclarecer uma série de questionamentos acerca da relação estrutura-função de diversas biomoléculas alimentares que ainda não fomos capazes de elucidar em escala molecular. Além dos estudos de inibição enzimática e de termoestabilidade de proteínas apresentados nessa tese, o *docking* e a dinâmica molecular combinados podem nos auxiliar, por exemplo, a: i. descobrir e aprimorar moléculas carreadoras de substâncias termossensíveis com funções nutricionais e/ou tecnológicas para alimentos; ii. entender a origem molecular do comportamento espumante, emulsificante e gelificante de outras biomoléculas em alimentos e

entender racionalmente como esse comportamento se altera em função da temperatura de tratamento térmico, pressão e pH do meio. Para tal, já se encontram disponíveis no PDB e em outras bases de dados mais de 20 mil estruturas cristalográficas de biomoléculas relacionadas a alimentos, que são o ponto de partida para as simulações de modelagem molecular.

Temos consciência, porém, que ainda há algumas limitações para o uso exaustivo de tais técnicas em CTA. Alimentos são matrizes complexas, formadas por uma grande diversidade de moléculas bioquimicamente diferentes (proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e íons), que durante o processamento são submetidas a condições bastante variáveis (temperatura, pressão, atmosfera modificada) e que precisam ser estáveis contra processos deteriorativos ao longo do armazenamento (oxidação de lipídeos, escurecimento enzimático e não-enzimático, deterioração microbiológica com alteração de pH e da atmosfera do meio, estabilidade de fases, estabilidade de substâncias corantes e bioativas, etc.). Além disso, há uma limitação em relação à escala de tempo, pois o alto custo computacional demandado não nos permite alcançar (ainda) amostragens suficientemente longas (na escala de microssegundos ou milissegundos), para uma compreensão mais abrangente de sistemas alimentares complexos.

Com aprimoramento contínuo dos campos de força, observado durante os poucos anos de desenvolvimento dessa tese, abordagens de dinâmica molecular em mesoescala, o aumento da utilização de métodos híbridos envolvendo química quântica e mecânica molecular (QM/MM) e com a rápida evolução da capacidade de processamento dos computadores, cria-se a expectativa de que as limitações anteriormente levantadas serão ultrapassadas muito em breve, abrindo ainda mais caminhos para o estudo do comportamento de biomoléculas alimentares.

Espera-se, portanto, que esse trabalho contribua efetivamente para o desenvolvimento da CTA brasileira, não apenas devido aos relevantes resultados dos estudos de caso aqui expostos, mas que também promova e desperte nos pesquisadores nacionais da área o interesse em tais métodos. Para tanto, é importante que se aumente a divulgação de trabalhos envolvendo simulações de *docking* e dinâmica moleculares em congressos e eventos em CTA, além de se oferecer cursos e treinamentos relacionados a essas ferramentas, abrindo, assim, novas perspectivas e frentes de trabalho para os pesquisadores dessa abrangente e instigante área do conhecimento.

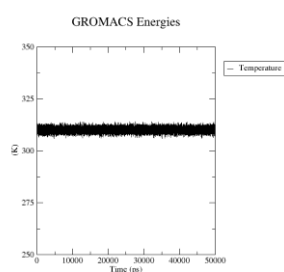
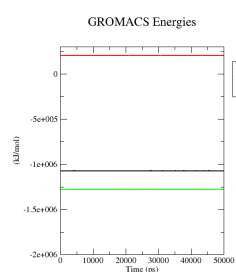
# APÊNDICES

## INFORMAÇÕES REFERENTES AO EQUILBRIO DE ENERGIA E TEMPERATURA DURANTE AS SIMULAÇÕES

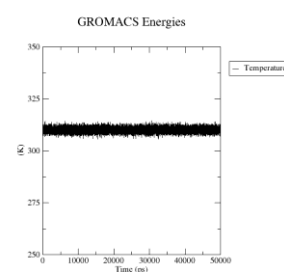
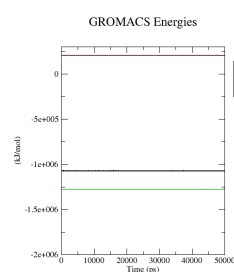
### CAPÍTULO 3

#### ALNEINQFYQK

N → C

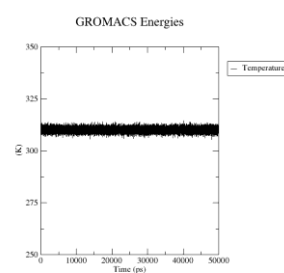
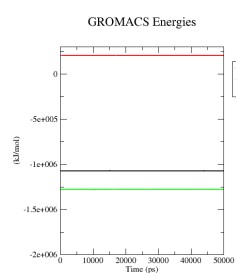


C → N

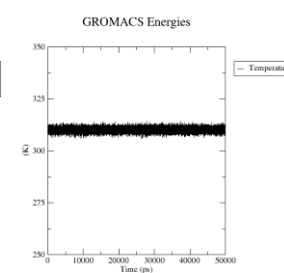
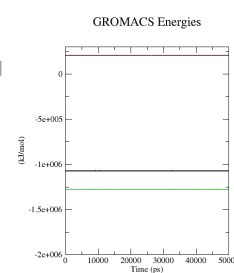


#### NAVPITPLNR

N → C

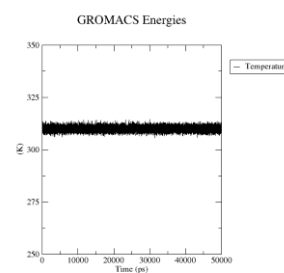
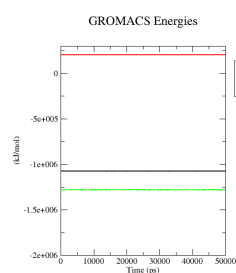


C → N

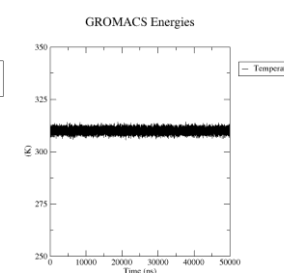
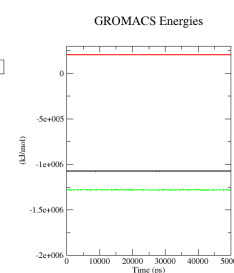


#### FALPQYLK

N → C

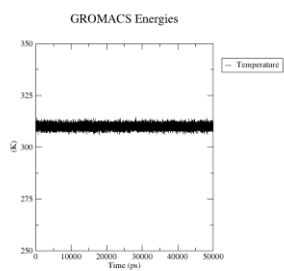
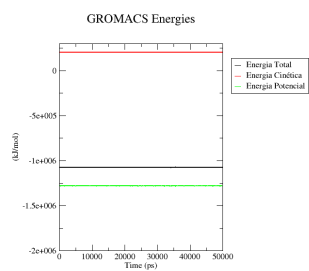


C → N

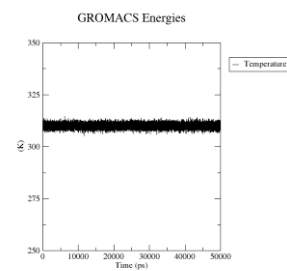
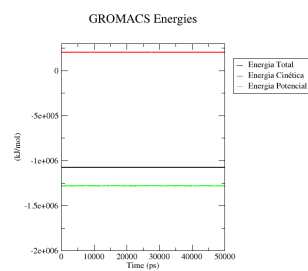


## FFVAPFPEVFGK

N → C

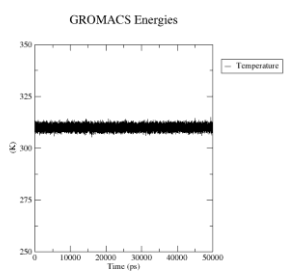
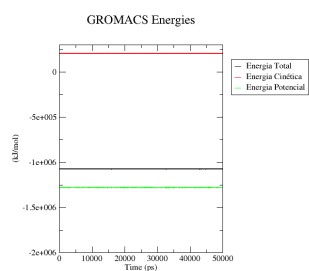


C → N

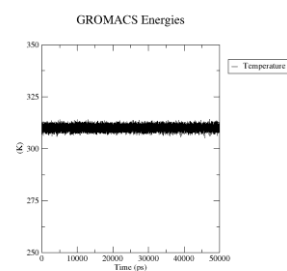
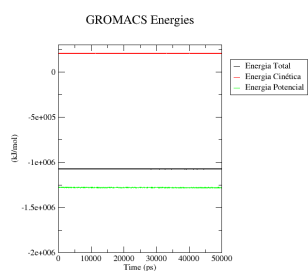


## YLGYLEQLLR

N → C

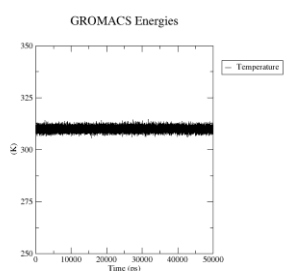
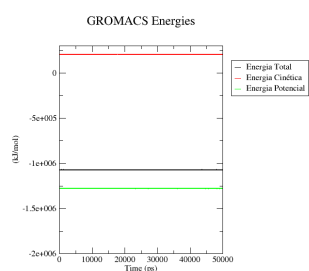


C → N

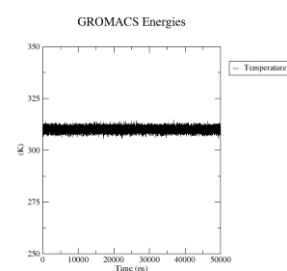
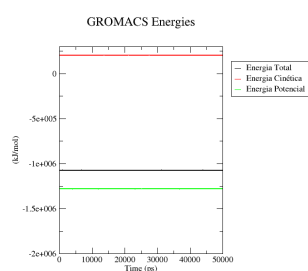


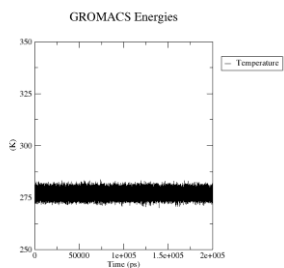
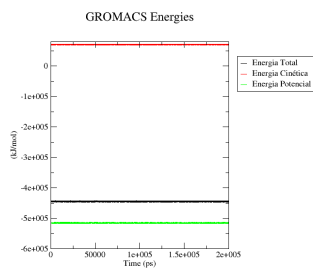
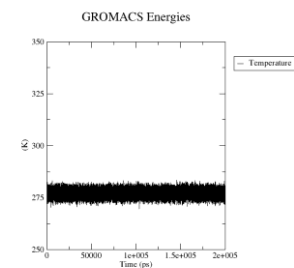
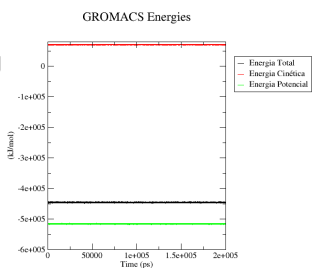
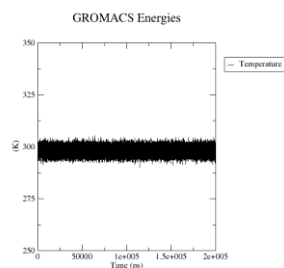
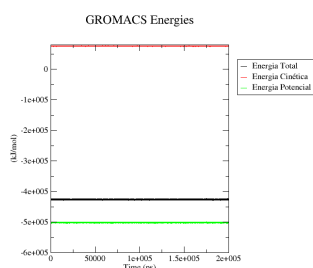
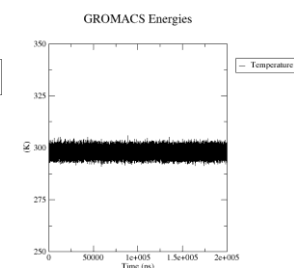
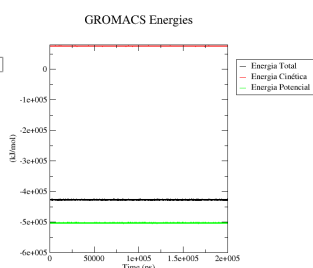
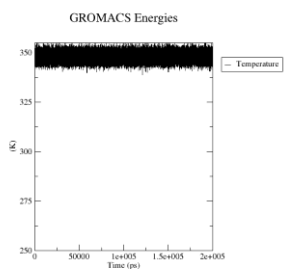
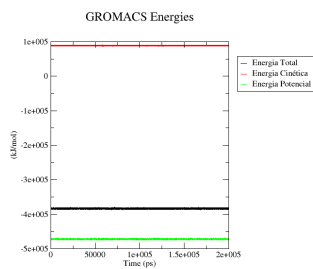
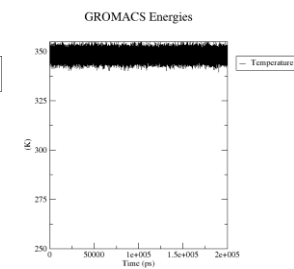
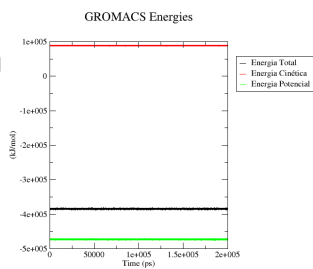
## HQGLPQEVLNENLLR

N → C



C → N



**CAPÍTULO 4****4 °C****APO****HOLO****25 °C****APO****HOLO****75 °C****APO****HOLO**

---

# ANEXOS

---

# **APRESENTAÇÕES DE TRABALHO FORMA ORAL**



## ***CERTIFICATE OF ORAL PRESENTATION***

This certifies that **THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA** has presented the **oral presentation** entitled **"IN SILICO STUDY OF THE MOLECULAR BASIS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITION BY DIFFERENT CASEIN-DERIVED PEPTIDES"** by **De Oliveira, T.V.; Guimarães, A.P.; Maia, E.R.; Bressan, G.C.; Polêto, M.D.; Barbosa, S.V.; Coimbra, J.S.R.; De Oliveira, E.B.**, at the **1<sup>st</sup> CIAPep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, promoted by Food Science and Quality Center and held in Campinas, Brazil, on December 3<sup>rd</sup> – 5<sup>th</sup>, 2019.

**Maria Teresa Bertoldo Pacheco**  
Technical Coordination  
Scientific Researcher - Ital



***In silico* study of the molecular basis of angiotensin-converting enzyme inhibition by different casein-derived peptides**

De Oliveira, T.V.<sup>1</sup>; Guimarães, A.P.<sup>2</sup>; Maia, E.R.<sup>3</sup>; Bressan, G.C.<sup>4</sup>; Polêto, M.D.<sup>5</sup>; Barbosa, S.V.<sup>1</sup>; Coimbra, J.S.R.<sup>1</sup>; De Oliveira, E.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

The angiotensin-converting enzyme (ACE) plays a key role in blood pressure regulation process, and its inhibition is the main drug target for the treatment of cardiovascular system diseases. In this work, docking studies and molecular dynamics simulations were performed to study the intermolecular interactions involved in angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition by six different casein-derived peptides (FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK, YLGYLEQLLR, HQGLPQEVLNENLLR and NAVPITPTLNR). Two possible poses for each peptide (with N and C-terminal oriented towards the active sites), and possessing the smallest binding energies, were selected for dynamic simulations and the results were correlated to *in vitro* ACE inhibitory capacity. Peptides belonging to chromatographic fractions with better *in vitro* inhibitory capacity, as ALNEINQFYQK and NAVPITPTLNR ( $I_{ACE} = 80.7\%$ ), and FALPQYLK ( $I_{ACE} = 79.0\%$ ) performed short hydrogen bonds at angles greater than  $120^\circ$  with residues involved in the geometric coordination of zinc ion, His383, His387 and Glu411. Nonetheless, peptides belonging to the chromatographic fractions with lower inhibitory capacity, as HQGLPQEVLNENLLR ( $I_{ACE} = 49.2\%$ ), FFVAPFPEVFGK and YLGYLEQLLR ( $I_{ACE} = 47.8\%$ ) also interacted with residues complexed to the zinc ion, but by electrostatic and hydrophobic interactions. The FALPQYLK peptide has an excellent inhibitory capacity *in vitro* ( $I_{ACE} = 79.0\%$ ), probably due to an irreversible disruption of the tetrahedral coordination of the zinc, through a hydrogen bond formed initially between FALPQYLK: Ala2: HN and ACE: Glu411: OE1, which resulted in a large displacement of the ACE:Glu411 residue. All complexes showed similar RMSF profiles for ACE residues. However, the complex ACE:ALNEINQFYQK C-oriented peptide promoted large fluctuations in ACE residues comprised between His153-Asn155, likely is one of the reasons for its high *in vitro* inhibitory capacity. ( $I_{ACE} = 80.7\%$ ).

**Palavras-chave:** ACE inhibitory activity, Molecular docking, Molecular dynamics, Bioactive

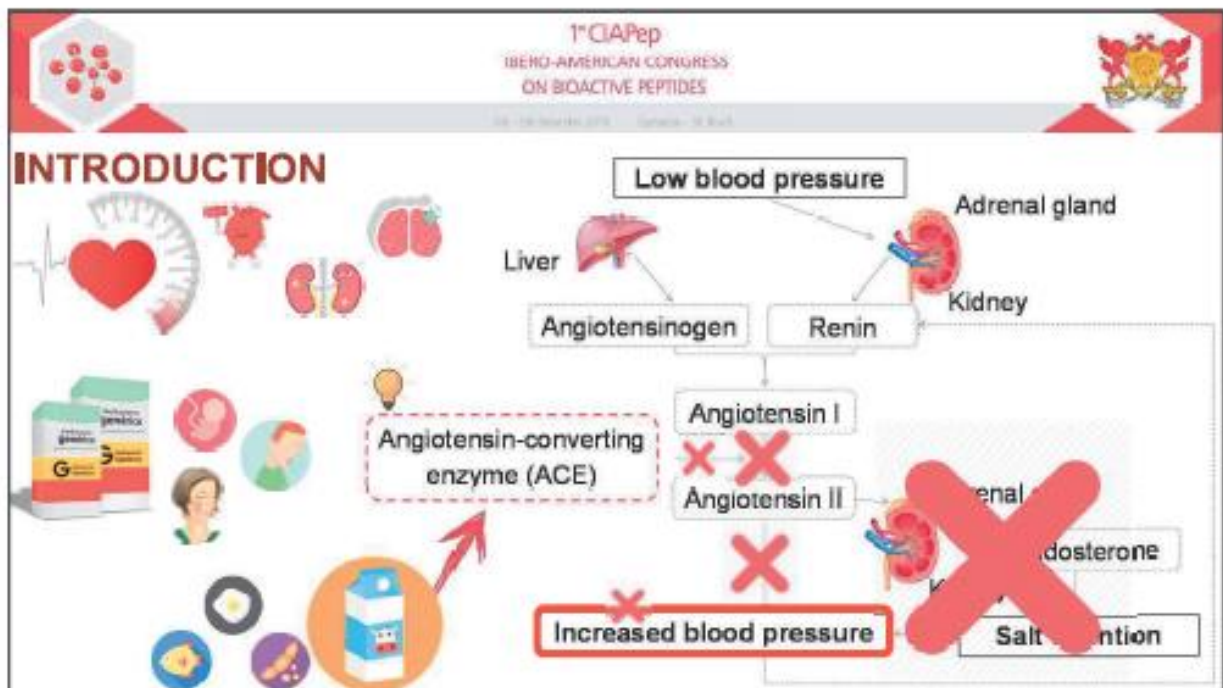
Órgão financiador: CNPq

1<sup>o</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES  
04 - 08 November 2019 - Curitiba, PR, Brazil

***In silico* study of the molecular basis of  
angiotensin-converting enzyme inhibition by  
different casein-derived peptides**

**Thomás Valente de Oliveira**  
Guimarães, A.P.; Maia, E.R.; Bressan, G.C.; Polêto, M.D.; Barbosa, S.V.; Coimbra, J.S.R.; De Oliveira, E.B.  
Department of Food Technology  
UFV - Brazil


**04/12/2019**




1<sup>st</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES

16-18 December 2015    Valencia, SPAIN


## BACKGROUND




**Casein**  
(20 mg/L)  
pH 8.0



**Trypsin**  
(20 mg/L)  
pH 8.0



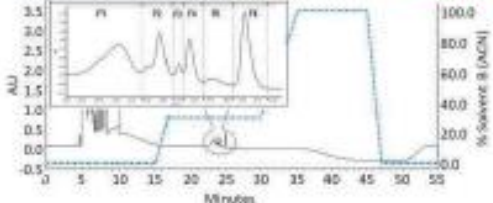


**Casein-derived peptides**

↔ Fractioning

↔ ACE *in vitro* inhibitory activity

↔ Peptides identification



Fraction	% I <sub>ACE</sub>
F1	80.7
F2	79.0
F3	
F4	
F5	
F6	47.8


WHY?

1<sup>st</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES

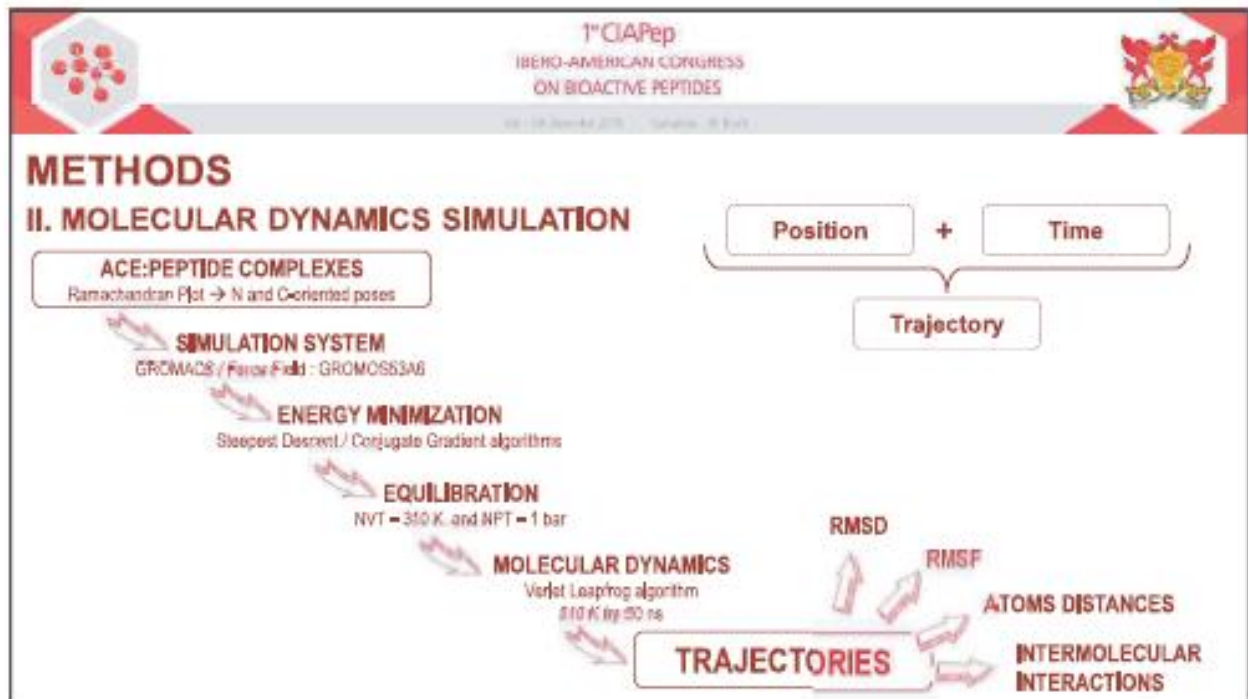
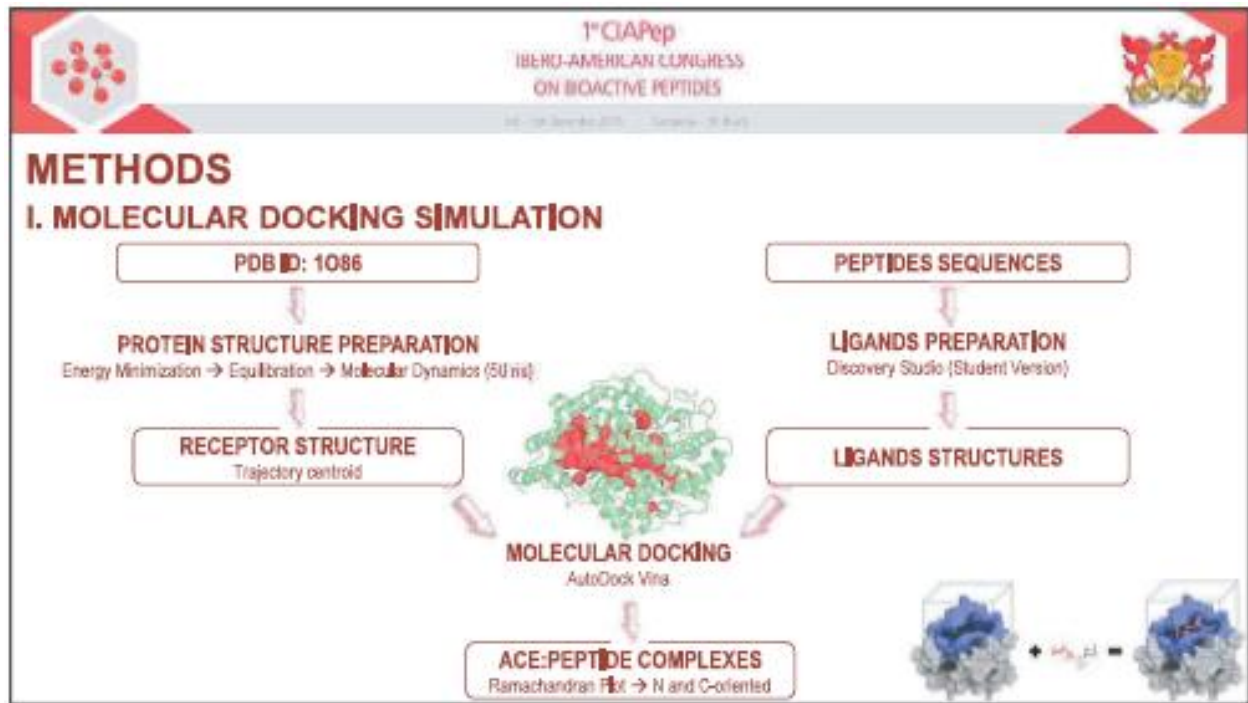
16-18 December 2015    Valencia, SPAIN

## OBJECTIVE

**To gain a deeper understanding of the molecular basis of ACE inhibition by these peptides by using docking and molecular dynamics simulations**



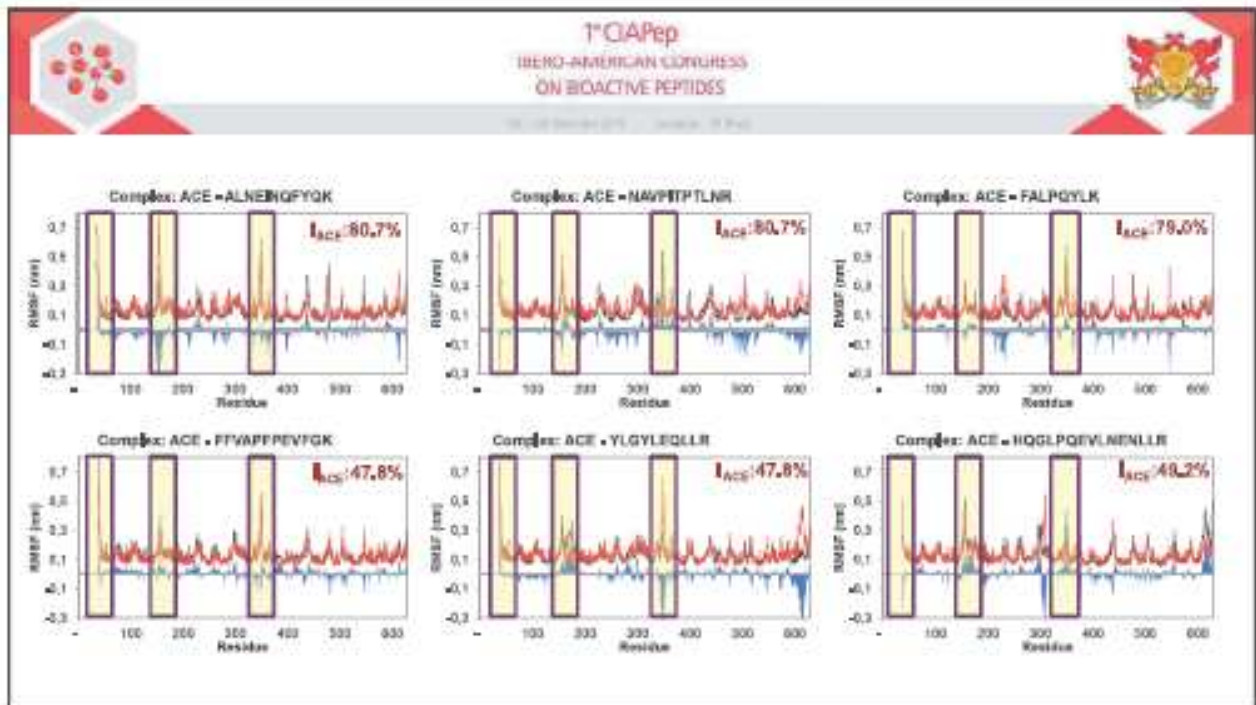
- Among intermolecular interactions identified, are there some more relevant for the complex stability?
- Among intermolecular interactions identified, are there one or more which are essential for an effective peptide inhibitory activity?



1<sup>o</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES

16 - 18 December 2015 - Valencia, SP (Spain)

## RESULTS



1<sup>st</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES

30 Oct 2016, Valencia, Spain

### ACTIVE SITES INTERACTIONS

Peptide	$I_{ACE}$	Key Interactions
ALNEINQFYQK	80.7%	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>S1: Ala354, Glu384 and Tyr523</b></li> <li>● Hydrogen bonds</li> </ul>
IKKIPPTILNR	80.0%	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>Zn<sup>2+</sup>: His383, His387 and Glu411</b></li> <li>● Hydrogen bonds</li> </ul>
FAUPDYLK	79.0%	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>S1: Ala354, Glu384 and Tyr523</b></li> <li>● Hydrogen bonds</li> <li>● Electrostatic interactions</li> <li>● Hydrophobic interactions</li> </ul>

# WHY?

1<sup>st</sup> CIA Pep  
IBERO-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES

30 Oct 2016, Valencia, Spain

## ALNEINQFYQK – $I_{ACE}$ :80.7 %

- Hydrogen bond
- ACE:His387:HD2
- ALNEINQFYQK:Glu4:O

**A** Complex ACE - ALNEINQFYQK

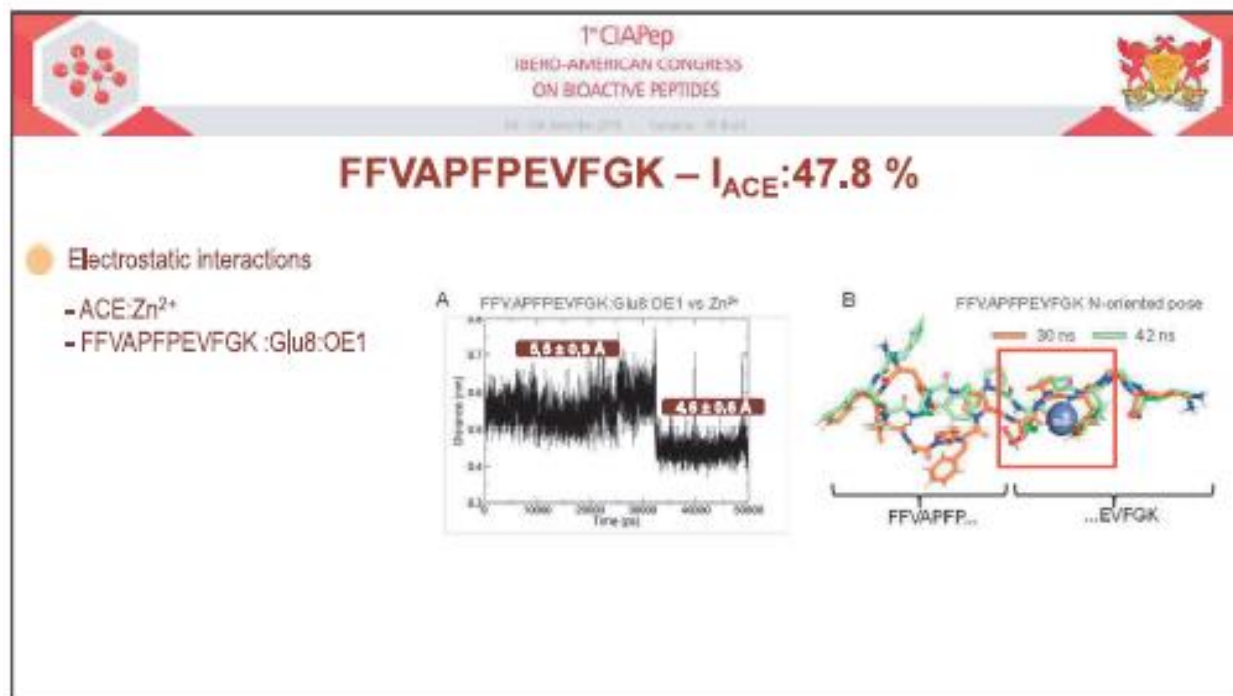
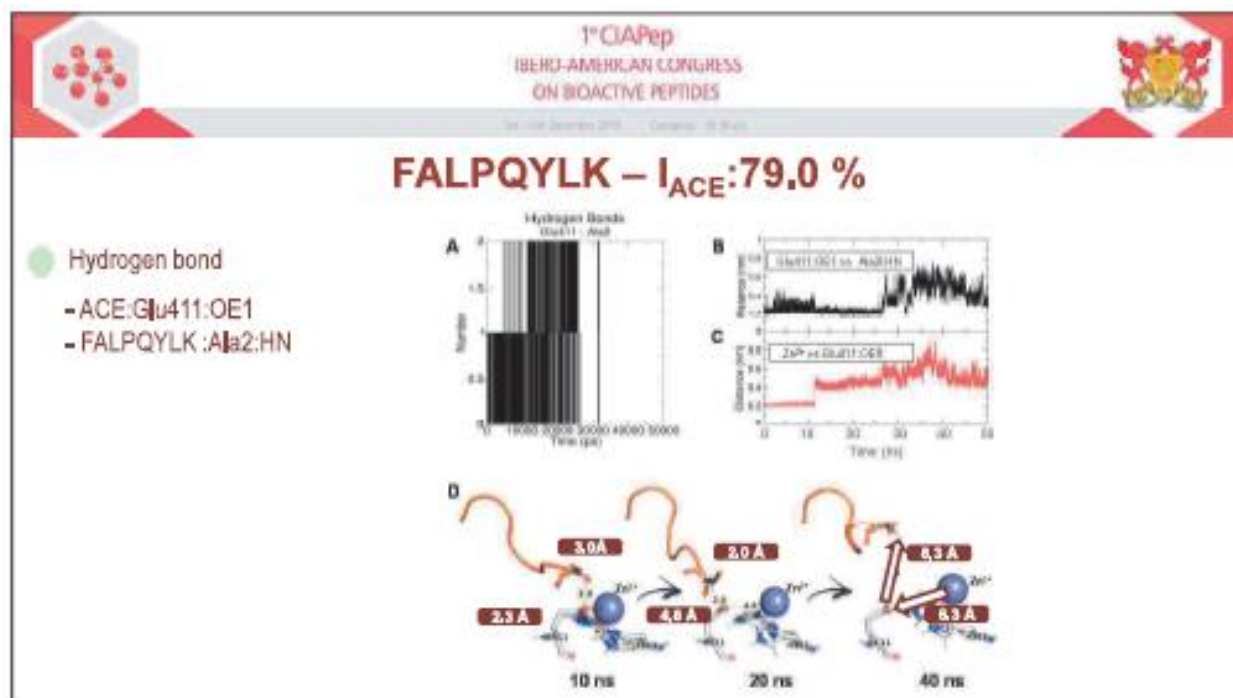
**B** Hydrogen bonds ALNEINQFYQK:Glu4 - ACE:His387

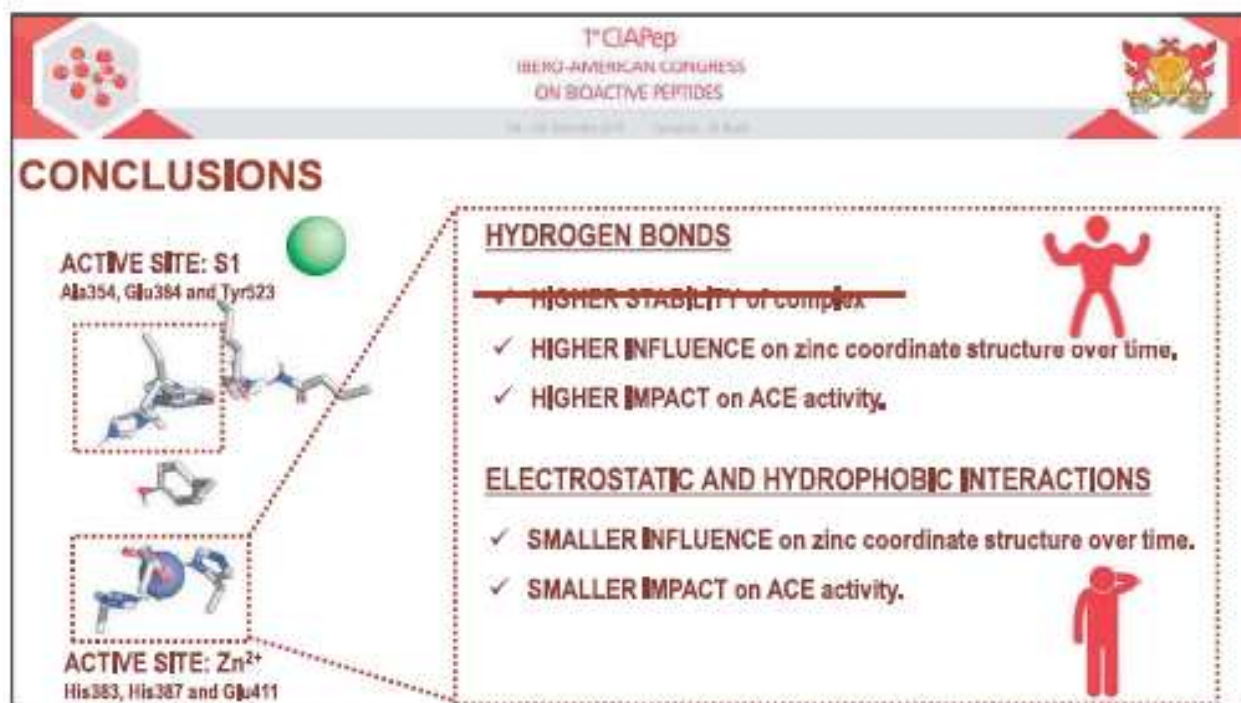
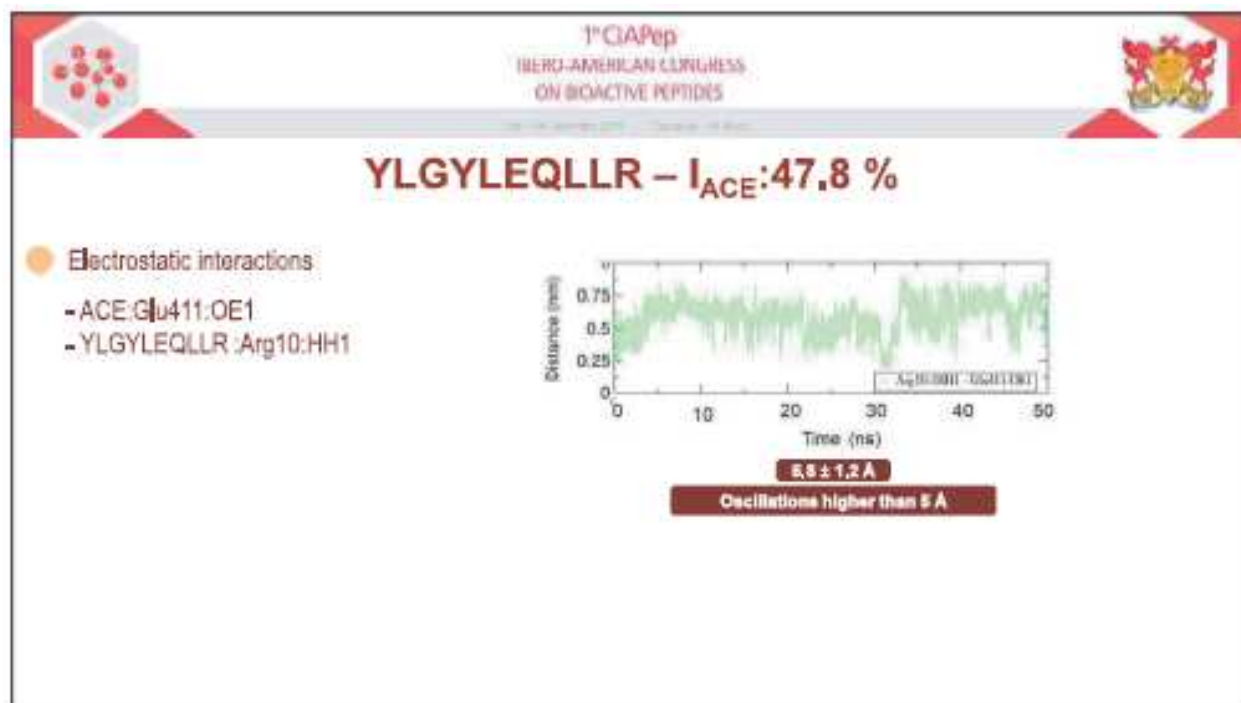
**C** ALNEINQFYQK:G - 50 ns

**D**

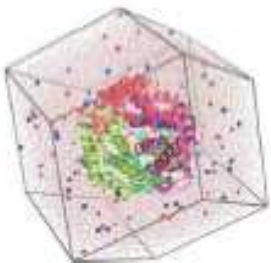
T = 0 ns

T = 50 ns





1<sup>st</sup> CIApP  
IBRD-AMERICAN CONGRESS  
ON BIOACTIVE PEPTIDES



**THANK YOU!**

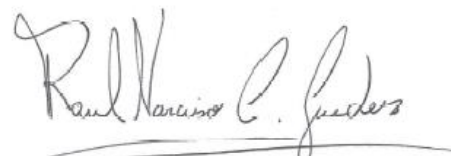


## **CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho "Modelagem molecular computacional aplicada ao estudo de relações estrutura-propriedades da alfa-lactoalbumina bovina", de autoria de Samuel Vieira Barbosa, EDUARDO BASILIO DE OLIVEIRA (Orientador), Thomás Valente de Oliveira, Marcelo Depólo Polêto, foi apresentado em sessão oral no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 21 a 25 de outubro de 2019, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 28 de janeiro de 2020.

  
**João Carlos Pereira da Silva**  
Pró-Reitor de Ensino

  
**Raul Narciso C. Guedes**  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação

  
**José Ambrósio Ferreira Neto**  
Pró-Reitor de Extensão e Cultura




## **CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho "Caracterização da diversidade e estudos de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos de pimentão auxiliados pela peptidômica e bioinformática", de autoria de Isabela de Souza Gomes, MARIA CRISTINA BARACAT PEREIRA (Orientador), Thomás Valente de Oliveira, Italo de Andrade Bianchini, Lavínia Martins da Silva, PAULO ROBERTO GOMES PEREIRA, foi apresentado em sessão oral no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 21 a 25 de outubro de 2019, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 17 de dezembro de 2019.

  
João Carlos Pereira da Silva  
Pró-Reitor de Ensino

  
Raul Narciso C. Guedes  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação

  
José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

# **APRESENTAÇÕES DE TRABALHO FORMA PÔSTER**



## ***CERTIFICATE OF PRESENTATION***

This certifies that **THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA** has presented the **poster** entitled  
**“BOVINE CASEIN-DERIVED PEPTIDES: OBTAINING, IDENTIFICATION AND  
INHIBITION CAPACITY OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME AS REVEALED BY  
MOLECULAR DOCKING”** by **De Oliveira, T.V.; Polêto, M.D.; De Oliveira, M.R.; Silva, T.J.;  
Barros, E.; Guimarães, V.M.; Baracat-Pereira, M.C.; Barbosa, S.V.; Eller, M.R.;  
Coimbra, J.S.R.; De Oliveira, E.B.**, at the  
***1<sup>st</sup> CIAPep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides***, promoted by Food Science  
and Quality Center and held in Campinas, Brazil, on December 3<sup>rd</sup> – 5<sup>th</sup>, 2019.

**Maria Teresa Bertoldo Pacheco**  
Technical Coordination  
Scientific Researcher - Ital



**Bovine casein-derived peptides: obtaining, identification and inhibition capacity of angiotensin I-converting enzyme as revealed by molecular docking**

*De Oliveira, T.V.<sup>1</sup>; Polêto, M.D.<sup>2,3</sup>; De Oliveira, M.R.<sup>1</sup>; Silva, T.J.<sup>1</sup>; Barros, E.<sup>4</sup>; Guimarães, V.M.<sup>5</sup>; Baracat-Pereira, M.C.<sup>5</sup>; Barbosa, S.V.<sup>1</sup>; Eller, M.R.<sup>1</sup>; Coimbra, J.S.R.<sup>1</sup>; De Oliveira, E.B.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.*

<sup>2</sup>*Grupo de Bioinformática Estrutural, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>3</sup>*Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.*

<sup>4</sup>*Núcleo de Análise de Biomoléculas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil*

<sup>5</sup>*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.*

Hypertension is nowadays one of the major world concerns in public health. Several food proteins, among which caseins, can be substrates for generating peptides with antihypertensive potential. With the increasingly evolution of computational tools, in silico methodologies have gained prominence in studies of protein-ligand complexes in different research fields, such as pharmaceuticals and biochemical engineering. However, the application of such tools in food-related research can be considered still embryonic. Thus, the present work intended to apply molecular modelling to elucidate the molecular bases of the anti-hypertensive potential of milk caseins-derived peptides. Hydrolysates obtained from a controlled trypsinolysis of caseins were fractionated according to their molecular weight, by ultrafiltration and RP-HPLC. The obtained fractions were evaluated towards their in vitro inhibitory angiotensin-converting enzyme activity (%IACE). Six fractions were identified and three of them displayed high ACE-inhibition (F1: 80.68%; F2: 79.00%; and F4: 62.44%). The amino acid sequences of peptides in each fraction were identified by MALDI-TOF/TOF. Finally, intermolecular interactions networks in complexes formed between ACE and the identified peptides were calculated through molecular docking. At the molecular level, a correlation between in vitro and in silico analysis was found: the peptides FFVAPFPEVFGK (F6), FALPQYLK (F2, F4) and ALNEINQFYQK (F1) presented the lowest binding energies and interacted by specific H-bonds, electrostatic and hydrophobic interactions formed with in ACE active site S1 residues (Ala354, Glu384, Tyr 523) and the Zn<sup>2+</sup> coordinated residues (His383, His387, Glu411). The low F6 %IACE is likely to be due to a low FFVAPFPEVFGK concentration in the same fraction.

*Palavras-chave:* ACE inhibitory activity, Food bioactive peptides, Molecular docking, Protein-ligand interactions

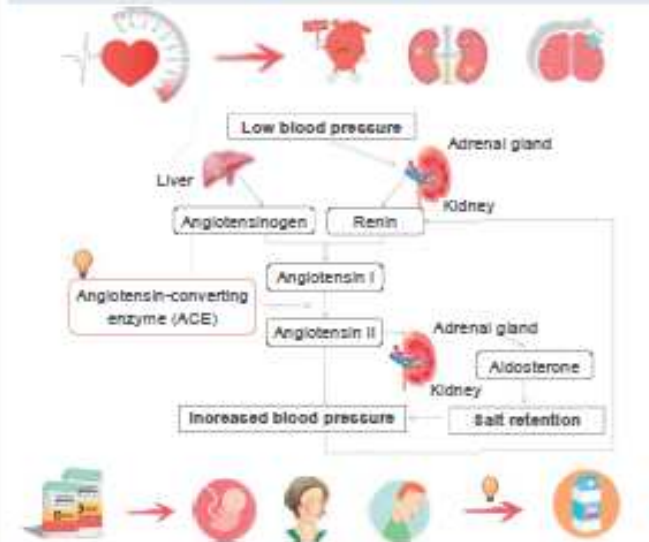
Órgão financiador: Fapemig, CNPq, Capes

## Bovine casein-derived peptides: obtaining, identification and inhibition capacity of Angiotensin I-Converting Enzyme as revealed by molecular docking

De Oliveira, T.V.<sup>1</sup> ([thomas.valente@ufv.br](mailto:thomas.valente@ufv.br)); Polito, M.D.<sup>2</sup>; De Oliveira, M.R.<sup>3</sup>; Silva, T.J.<sup>4</sup>; Barros, E.<sup>5</sup>; Guimarães, V.M.<sup>6</sup>; Barakat-Pereira, M.C.<sup>7</sup>; Barbosa, S.V.<sup>1</sup>; Eiler, M.R.<sup>1</sup>; Coimbra, J.S.R.<sup>1</sup>; De Oliveira, E.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa; <sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa; <sup>3</sup> Núcleo de Análise de Biotecnologia (NuBioM), Universidade Federal de Viçosa; <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa

### Introduction



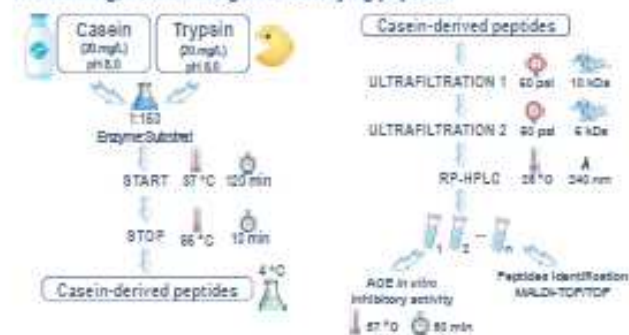
### Objectives

The present work intended:

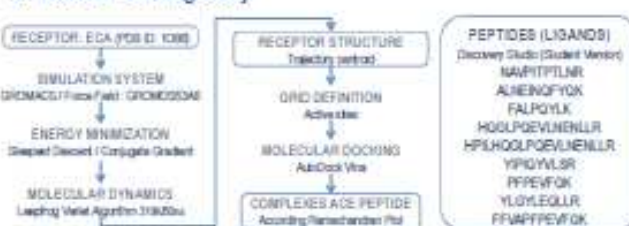
- to obtain ACE-inhibitory peptides from the *in vitro* trypsinolysis of bovine milk caseins, under previously optimized reaction conditions, as well as to fractionate and to identify these peptides;
- to model the interaction networks of ACE/peptides complexes, by applying *in silico* molecular docking techniques, in order to identify the specific intermolecular interactions stabilizing such complexes.

### Material and Methods

#### 1. Obtaining, fractionating and identifying peptides



#### 2. Molecular Docking Study



### Results

Figure 1. Chromatographic fractions obtained by bovine casein hydrolyzate

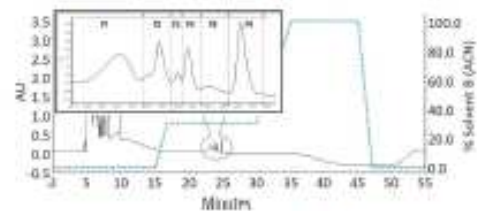
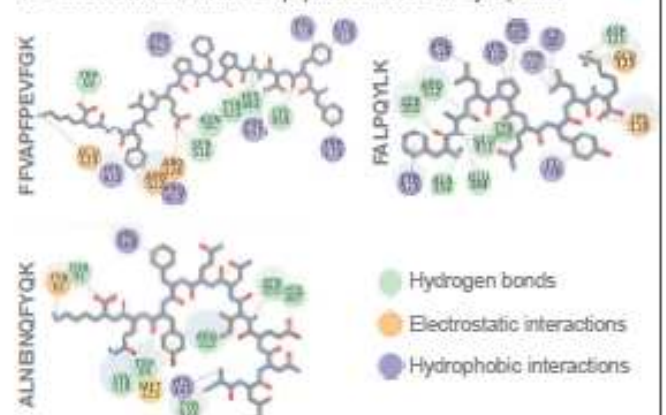


Table 1. ACE-inhibitory activity *in vitro* and molecular docking results

Peptide	Fraction/ %Ace	Binding Energy kcal/mol	Interaction Type	ACE residue	Active Site	Peptide residue
FFVAPFPEVFGK	F <sub>6</sub> 47.8	-0.7	H-bond Hydrophobic	Tyr523 His383	S1 Zn(II)	Ala4 Ala4
FALPQYLK	F <sub>2</sub> , F <sub>3</sub> 79.0, 62.4	-0.2	H-bond H-bond	Ala354 Glu411	S1 Zn(II)	Phe1 Ala2
ALNEINQFYQK	F <sub>1</sub> 80.7	-0.1	H-bond Hydrophobic	Tyr523 His383	S1 Zn(II)	Ala1 Ala1
PFPEVFGK	F <sub>6</sub> /47.8	-0.9	-	-	-	-
YLGYLEQLLR	F <sub>6</sub> /47.8	-0.9	H-bond	Glu384	S1	Tyr1
HQGLPQEVLENLLR	F <sub>2</sub> , F <sub>3</sub> , F <sub>5</sub> 40.2, 62.4, 16.3	-0.7	H-bond Hydrophobic	Ala354 Ala354	S1 S1	Pro5 Leu4
YIPQYVLSF	F <sub>3</sub> /16.3	-0.7	-	-	-	-
NAVPTPTLNR	F <sub>1</sub> /80.7	-7.8	-	-	-	-
HPKHQGLPQEVLENLLR	F <sub>2</sub> /40.2	-0.9	-	-	-	-

Figure 2. Schematic 2D depiction of interactions among FFVAPFPEVFGK, FALPQYLK and ALNEINQFYQK peptides and ACE catalytic pocket



### Conclusão

Six fractions were identified and three of them displayed high ACE-inhibition (F<sub>1</sub>: 80.7%; F<sub>2</sub>: 79.0%; and F<sub>3</sub>: 62.4%). The peptides FFVAPFPEVFGK (F<sub>6</sub>), FALPQYLK (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>) and ALNEINQFYQK (F<sub>1</sub>) presented the lowest binding energies and interacted by specific H-bonds, electrostatic and hydrophobic interactions formed with in ACE active site S1 residues (Ala354, Glu384, Tyr 523) and the Zn<sup>2+</sup> coordinated residues (His383, His387, Glu411).




## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "Dinâmica molecular computacional como ferramenta para a compreensão racional das propriedades tecnológicas de proteínas alimentares", de autoria de Thomás Valente de Oliveira, EDUARDO BASILIO DE OLIVEIRA (Orientador), Samuel Vieira Barbosa, Marcelo Depólo Polêto, foi apresentado em sessão painel no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 21 a 25 de outubro de 2019, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 17 de dezembro de 2019.

  
João Carlos Pereira da Silva  
Pró-Reitor de Ensino

  
Raul Narciso C. Guedes  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação

  
José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró-Reitor de Extensão e Cultura



Modalidade: Pesquisa  
Ciências Exatas e Tecnológicas / Engenharia e Tecnologia

## Dinâmica molecular computacional como ferramenta para a compreensão racional das propriedades tecnológicas de proteínas alimentares

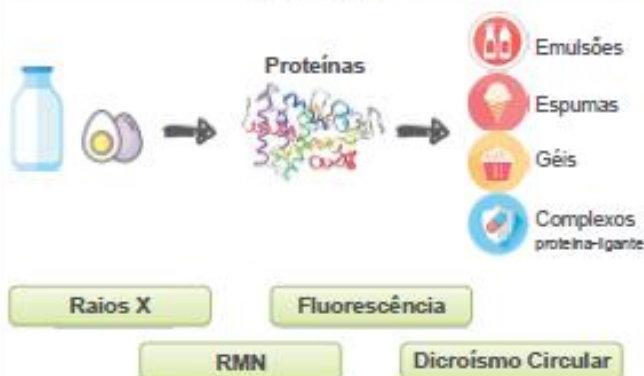
Thomás Valente de Oliveira<sup>1</sup>, Eduardo Basílio de Oliveira<sup>1</sup>, Samuel Vieira Barbosa<sup>2</sup>, Marcelo Depólo Polêto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Viçosa

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa

### Introdução



### Simulações de Dinâmica Molecular



### Simulações de Docking Molecular



### Objetivos

Utilizar metodologias *in silico* como simulações de dinâmica molecular e simulações de *docking* (ou ancoragem) molecular, para o estudo racional e menos empírico das aplicações tecnológicas de proteínas alimentares.

Elaboração do Sistema      Solvatação e Neutralização      Minimização de Energia

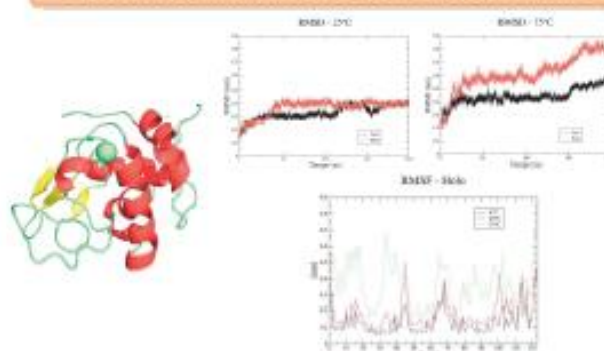


$$V(r) = \sum \frac{1}{2} k_l (l - l_0)^2 + \sum \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum \frac{1}{2} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_0))$$

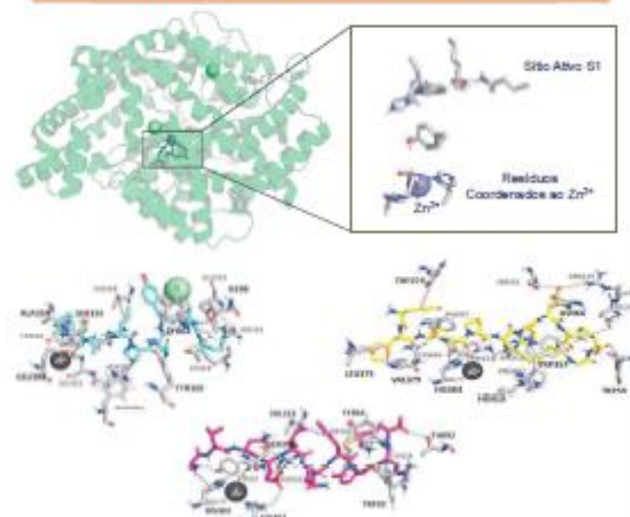
$$k(1 - \cos 2\omega) \cdot \sum_{i=1}^{N1} \sum_{j=1}^{N2} \frac{\partial \psi_i}{\partial r_{ij}} \cdot \sum_{j=1}^{N1} 4r_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_j}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_j}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

### Resultados

#### Capacidade emulsificante da $\alpha$ -Lactalbumina



#### Peptídeos Bioativos do Leite Bovino



### Conclusão

Entende-se, portanto, que estudos que visem à aplicação desta poderosa e subutilizada ferramenta científica para a compreensão dos fundamentos moleculares das propriedades tecnológicas de proteínas alimentares são uma inovação promissora, haja vista a variedade de proteínas alimentares com propriedades técnico-funcionais demonstradas experimentalmente e cujas estruturas cristalográficas estão disponíveis.

# **CURSOS MINISTRADOS**

## CERTIFICADO

Certificamos que THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA participou do evento de extensão "2º TREINAMENTO EM MODELAGEM MOLECULAR APLICADA A MATERIAIS ALIMENTARES", registrado no Sistema de Registro de Atividades de Extensão, RAEX, sob o nº EVE-3524/2019, no período de 19/08/2019 à 23/08/2019, como Ministrante do tema: "INTRODUÇÃO AOS PRINCÍPIOS DE DINÂMICA MOLECULAR E DOCKING COMPUTACIONAIS". Carga horária total: 1200 minutos.

Viçosa, 19 de novembro de 2020.



José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró Reitor de Extensão e Cultura



## CERTIFICADO

Certificamos que THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA participou do evento de extensão "1º TREINAMENTO EM MODELAGEM MOLECULAR APLICADA A MATERIAIS ALIMENTARES", registrado no Sistema de Registro de Atividades de Extensão, RAEX, sob o nº EVE-2619/2019, no período de 04/02/2019 à 08/02/2019, como Ministrante do tema: "INTRODUÇÃO AOS PRINCÍPIOS DE DINÂMICA MOLECULAR E DOCKING COMPUTACIONAIS". Carga horária total: 1200 minutos.

Viçosa, 19 de novembro de 2020.



José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró Reitor de Extensão e Cultura



# **PARTICIPAÇÃO EM COORDENAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS CIENTÍFICOS**

## CERTIFICADO

Certificamos que THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA participou da comissão coordenadora do evento de extensão "2º TREINAMENTO EM MODELAGEM MOLECULAR APLICADA A MATERIAIS ALIMENTARES", registrado no Sistema de Registro de Atividades de Extensão, RAEX, sob o nº EVE-3524/2019, no período de 19/08/2019 à 23/08/2019. Carga horária total: 1200 minutos.

Viçosa, 19 de novembro de 2020.



José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró Reitor de Extensão e Cultura



## CERTIFICADO

Certificamos que THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA participou do evento de extensão "2º TREINAMENTO EM MODELAGEM MOLECULAR APLICADA A MATERIAIS ALIMENTARES", registrado no Sistema de Registro de Atividades de Extensão, RAEX, sob o nº EVE-3524/2019, no período de 19/08/2019 à 23/08/2019, como

horária total: 1200 minutos.

Viçosa, 28 de janeiro de 2020.



José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró Reitor de Extensão e Cultura



## CERTIFICADO

Certificamos que THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA participou da comissão coordenadora do evento de extensão "SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA - SIA 2017", registrado no Sistema de Registro de Atividades de Extensão, RAEX, sob o nº EVE-942/2017, no período de 23/10/2017 à 28/10/2017. Carga horária total: 960 minutos.

Viçosa, 19 de novembro de 2020.



José Ambrósio Ferreira Neto  
Pró Reitor de Extensão e Cultura

