

LAYLA BARBOSA ALVES

**ESTUDO DO ACOPLAMENTO MOLECULAR
β-LACTOGLOBULINA/VANILINA – ABORDAGENS ESPECTROSCÓPICA E POR
SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE *DOCKING***

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

Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira

Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra
Thomás Valente de Oliveira
Gustavo Costa Bressan

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

A474e
2022

Alves, Layla Barbosa, 1994-

Estudo do acoplamento molecular β -lactoglobulina/vanilina
- abordagens espectroscópica e por simulações computacionais de
docking / Layla Barbosa Alves. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (81 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês. Orientador:
Eduardo Basílio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.763>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas do soro de leite. 2. Simulação de acoplamento
molecular. 3. Espectroscopia molecular. 4. Alimentos - Sabor e
aroma. I. Oliveira, Eduardo Basílio de, 1980-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 641.373


LAYLA BARBOSA ALVES

**ESTUDO DO ACOPLAMENTO MOLECULAR
β-LACTOGLOBULINA/VANILINA – ABORDAGENS ESPECTROSCÓPICA E POR
SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE *DOCKING***


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

APROVADA: 27 de outubro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LAYLA BARBOSA ALVES
Data: 14/12/2022 09:21:28-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Layla Barbosa Alves
Autora

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO BASILIO DE OLIVEIRA
Data: 14/12/2022 12:33:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Eduardo Basílio de Oliveira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado em mais essa empreitada, certamente foi a de maior conexão e certeza de Seu amor para comigo.

À minha mãe Joelma, por ter me ensinado com sua própria história sobre princípios e determinação, saiba, foi todo seu esforço e investimento que me trouxeram até aqui. Ao meu pai Edésio, pelo exemplo de humildade e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que precisei.

À minha irmã Laysa, por existir e ter transformado a minha vida com sua chegada, você é minha definição mais palpável de amor. À minha prima Jenniffer, por me contagiar diariamente com sua força e estar comigo, sempre.

Ao Rafa, que, mesmo que eu tente, não conseguiria expressar toda a minha gratidão por ter sido meu companheiro inseparável nesta jornada. Indubitavelmente, por todos esses anos de ouvinte e de renúncias, você deveria ser co-autor desse material. Não houve um só dia em que você não renovasse as minhas esperanças. Seu incentivo, amor e compreensão foram essenciais para que este dia chegasse.

Ao meu orientador, professor Eduardo Basílio de Oliveira, pelo aprendizado, paciência e principalmente, pela humanidade. Sua empatia e altruísmo me revigoraram em muitos momentos. Obrigada por toda sua contribuição em minha formação como profissional e como pessoa, sou muito grata por ter depositado confiança e expectativas em mim e neste trabalho.

Ao meu co-orientador Thomás Valente de Oliveira meu muito obrigada! Sem seu auxílio, dedicação, paciência e amizade seria impossível findar este ciclo. Todas as reuniões, ideias e *insights* foram essenciais para o meu crescimento e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus co-orientadores professora Jane Sélia dos Reis Coimbra e professor Gustavo Bressan, agradeço pela educação e disposição em contribuir ativamente no meu trabalho, cedendo estrutura e recurso para as análises. Um agradecimento especial ao Éverton pelo auxílio no planejamento e execução da metodologia *in vitro*.

À professora Ana Paula Guimarães pela disponibilidade em aceitar meu convite e compor minha banca de defesa de mestrado, contribuindo ativamente com suas considerações.

A todos os meus professores da graduação (UFV-Campus Florestal), por terem me proporcionado uma base de conhecimentos sólida. Agradeço em especial, meu

professor e ex-orientador José Carlos Baffa Júnior, por ter confiado em minha trajetória acadêmica e me inspirado com a sua. Seu incentivo foi determinante para que eu escolhesse a ciência.

Às minhas amigas de departamento e de Viçosa: Dani, Vivi, Érica, Sabrine e em especial Raissa, vocês foram meu alicerce nesta jornada. Dividir os momentos, experiências e anseios com vocês tornou o processo muito mais leve e divertido. Vocês nunca sairão do meu coração!

À Michele, por ter compartilhado comigo a casa, o laboratório, conhecimentos e a vida. Sua disciplina e altruísmo são exemplos para mim. Obrigada por toda ajuda e carinho no decorrer desta etapa.

Ao meu amigo e colega de departamento Gustavo Milião agradeço por toda disponibilidade e atenção. Suas considerações sempre pontuais foram determinantes para o êxito deste trabalho, você nasceu para fazer ciência.

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

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

(Carl Jung)

RESUMO

ALVES, Layla Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2022. **Estudo do acoplamento molecular β -lactoglobulina/vanilina – Abordagens espectroscópica e por simulações computacionais de *docking*.** Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: Thomás Valente de Oliveira, Jane Sélia dos Reis Coimbra e Gustavo Costa Bressan.

O sabor é um dos principais atributos para a aceitação de alimentos e trata-se da combinação de aroma e gosto. A vanilina é um dos principais constituintes da baunilha, o aroma mais popular no mundo, porém, devido a sua estrutura química apresenta alta susceptibilidade a degradação durante o processamento de alimentos. Sabe-se que é de extremo interesse promover a melhoria do perfil sensorial e da qualidade geral dos produtos, deste modo, as interações proteína-ligante, embora contribuam de forma mínima no sabor, são utilizadas por influenciar consideravelmente na percepção do mesmo. A β -lactoglobulina bovina (β -lg), proteína majoritária do soro de leite, é amplamente utilizada como proteína modelo para interações proteína-aroma, porém, na maioria dos relatos seu estado oligomérico em relação ao pH é negligenciado. Neste trabalho, o estudo dos complexos formados entre a β -lg em sua forma dimérica e a vanilina foi conduzido por metodologias "*in vitro*" (espectroscopia de fluorescência) e "*in silico*" (simulações de *docking*) para avaliar, em nível atômico, as características intrínsecas do mecanismo e dos tipos de interações formadas entre a proteína e o ligante. Os resultados demonstraram que nos complexos β -lg/vanilina o mecanismo de extinção estática foi predominante, que a complexação foi espontânea e foi observada a presença de dois possíveis sítios de interação (Sítio A: interface do dímero e Sítio B: entrada do β -barril). A partir das análises experimentais e de *docking*, o sítio B foi considerado o mais provável para a molécula de vanilina, por apresentar um equilíbrio entre as interações envolvendo resíduos de aminoácidos aromáticos (do tipo ligação de hidrogênio, eletrostáticas e hidrofóbicas), sendo Trp19, Tyr20, Val43, Glu44, Leu156, Glu157 e His161 os resíduos de aminoácidos da β -lg envolvidos nessas interações.

Palavras-chave: *Docking* molecular. Espectroscopia molecular. Interação proteína-aroma. Proteínas de soro de leite.

ABSTRACT

ALVES, Layla Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2022. **Study of β -lactoglobulin/vanillin molecular coupling – spectroscopic approaches and by computational docking simulations.** Adviser: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisers: Thomás Valente de Oliveira, Jane Sélia dos Reis Coimbra and Gustavo Costa Bressan.

Flavor is one of the main attributes for food acceptance and it is the combination of aroma and taste. Vanillin is one of the main constituents of vanilla, the most popular aroma in the world, however, due to its chemical structure, it has a high susceptibility to degradation during food processing. It is known that it is of extreme interest to promote the improvement of the sensorial profile and the general quality of the products, in this way, the protein-ligand interactions, although they contribute in a minimal way to the flavor, are used to considerably influence the perception of it. Bovine β -lactoglobulin, the major whey protein, is widely used as a model protein for protein-aroma interactions, however, in most reports its oligomeric state in relation to pH is neglected. In this work, the study of the complexes formed between β -lg in its dimeric form and vanillin was carried out by "*in vitro*" (fluorescence spectroscopy) and "*in silico*" (docking simulations) methodologies to evaluate, at the atomic level, the intrinsic characteristics of the mechanism and types of interactions formed between the protein and the ligand. The results showed that in the β -lg/vanillin complexes the static extinction mechanism was predominant, that the complexation was spontaneous and the presence of two possible interaction sites was observed (Site A: dimer interface and Site B: β - barrel entrance). Based on several analyses, the B site was considered the most likely for the vanillin molecule, as it presents a balance between interactions involving aromatic amino acid residues (hydrogen bond, electrostatic and hydrophobic), with Trp19, Tyr20, Val43, Glu44, Leu156, Glu157 and His161 the β -lg amino acid residues involved in these interactions.

Keywords: Docking molecular. Molecular spectroscopy. Protein-flavor interaction. Whey proteins.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1-Representação esquemática de seleção de artigos para revisão bibliográfica.....	17
Figura 2-Orquídea do gênero <i>Vanilla planifolia</i> ; vagem madura de baunilha e vanilina em pó. Fonte: Jiri Hera (2013).....	19
Figura 3-Principais propriedades bioativas da vanilina.	20
Figura 4-Estrutura tridimensional da proteína β -lactoglobulina bovina (código PDB ID: 3NPO). Fonte: Protein Data Bank (PDB, www.pdb.org).....	23
Figura 5-Estrutura dimérica da β -lactoglobulina com os três possíveis locais de interação relatados, destacados em roxo: 1) sulco hidrofóbico entre α -hélice e o β -barril, 2) superfície próxima ao β -barril e 3) interface do dímero.....	25
Figura 6-Esquema do arranjo de componentes de um espectrofluorímetro.....	33
Figura 7-Representação das condições periódicas de contorno na caixa de simulação.....	39

CAPÍTULO 2

Figure 1-A) Molecular structure of vanillin. B) Ribbons representation of the crystal structure of bovine monomer taken from the RCSB protein data bank (PDB ID:3NPO).	56
Figure 2-Intrinsic fluorescence spectra of β -lg ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence of vanillin ($0\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), at pH 7.1 and four different temperatures.	64
Figure 3-Stern-Volmer plots of β -lg ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence of vanillin ($0\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), at pH 7.1 and four different temperatures.....	65
Figure 4-A) Putative binding sites identified for the vanillin in the β -lg dimer, B) Connolly surfaces and C) ribbons representations of the β -lg dimer with the vanillin molecule docked within the five putative binding sites (complexes V1, V2, V3, V4, and V5)....	68
Figure 5-Connolly surfaces of the β -lg dimer with the vanillin molecule docked within each of the five putative binding sites (complexes V1, V2, V3, V4, and V5). For each complex, the binding site was zoomed to show the intermolecular interactions formed by vanillin.....	70
Figure 6-2D schematic diagram of intermolecular interactions formed by vanillin (complexes V1, V2, V3, V4, and V5). Hydrogen bonds are represented as green dashed lines; electrostatic (\square -anion) interactions as orange dashed lines; \square -alkyl interactions as purple	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1-Propriedades físico-químicas da vanilina.	20
Tabela 2-Estudos recentes abordando algumas das propriedades bioativas da Vanilina.	21
Tabela 3-Propriedades da β -lactoglobulina.	24
Tabela 4-Estado conformacional da β -lg em relação a faixa de pH.	24
Tabela 5-Alguns estudos realizados nos últimos 7 anos (2015 -2022) sobre a interação entre β -lg e pequenas moléculas.	28

CAPÍTULO 2

Table 1-Quenching constants (K_{sv} and k_q) calculated for the interaction between β -lg and vanillin, at pH = 7.1 and four different temperatures.	62
Table 2-Number of interaction sites (n) and Binding constants calculated for the interaction between β -lg and vanillin, at pH = 7.1, and four different temperatures. ...	62
Table 3-Thermodynamic parameters ($\Delta H_{VAN/\beta - lg}$, $\Delta S_{VAN/\beta - lg}$, and $\Delta G_{VAN/\beta - lg}$) calculated for β -lg/vanillin interaction, at pH = 7.1.	63
Table 4-Data about intermolecular interactions identified in the five best-scored β -lg-VAN complexes obtained by in silico docking calculations.	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMBER	Campo de força ou pacote de programas de simulação; do inglês, Assisted Model Building with Energy Refinement
CAP	Capsaicina
CD	Dicroísmo Circular
CHARMM	Campo de força ou pacote de programas de simulação; do inglês, Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
DM	Dinâmica Molecular; do inglês, Molecular Dynamic
GROMACS	Software para cálculo de trajetórias da dinâmica molecular; do inglês, GRONingen MACHine for Chemical Simulations
GROMOS	Groningen Molecular Simulations
NPT	Ensemble com número de partículas (N), pressão (P) e temperatura (T) constantes
NVT	Ensemble com número de partículas (N), volume (V) e temperatura (T) constantes
PBC	Condições Periódicas de Contorno; do inglês, Periodic Boundary Conditions
PDB	Banco de dados de proteínas; do inglês, Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
K_{sv}	Stern-Volmer constant ($L \cdot mol^{-1}$)
K_q	Bimolecular quenching constant ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)
$K_{VAN/\beta-Ig}$	Association constant between β -IG and vanillin ($L \cdot mol^{-1}$)
SPC	Modelo de água de ponto de carga simples; do inglês Simple Point Charge
β -Ig	β -lactoglobulina
ΔG	Varição de Energia Livre de Gibbs
ΔH	Varição de Entalpia
ΔS	Varição de Entropia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
CAPÍTULO 1. Referencial teórico.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Aromas e sua importância tecnológica	18
3.1.1. A vanilina	19
3.2. Proteínas e seus complexos com aromas alimentícios.....	22
3.2.1. A β -lactoglobulina	23
3.3. Espectroscopia de fluorescência.....	32
3.4. Metodologias de modelagem molecular <i>in silico</i>	34
3.3.1. Mecânica molecular	34
3.3.2. Preparo do receptor	36
3.3.3. Simulações de <i>docking</i> molecular.....	40
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 2.	53
1. INTRODUCTION	55
2. MATERIALS AND METHODS	57
2.1. <i>In vitro</i> experiments.....	57
2.1.1. Materials.....	57
2.1.2. Fluorescence spectroscopy analyses.....	57
2.2. <i>In silico</i> experiments	58
2.2.1. Computational Resources	58
2.2.2. β -Ig and vanillin initial structures.....	59
2.2.3. β -Ig dimer relaxation procedure.....	59
2.2.4. Docking procedure	60
3. RESULTS AND DISCUSSION	61
3.1. <i>In vitro</i> study: fluorescence spectroscopy	61
3.2. <i>In silico</i> study: computational molecular docking	66
4. CONCLUSIONS	75
REFERENCES.....	76
CAPÍTULO 3.	80
CONCLUSÕES GERAIS.....	81

1. INTRODUÇÃO

O sabor é uma experiência sensorial multifatorial que envolve aroma, sabor, sensações bucais (picância, adstringência etc.) e a integração de todas essas percepções (AMMARI & SCHROEN, 2018; VAN RUTH & ROOZEN, 2010; VISSCHERS et al., 2006), sendo um dos atributos determinantes para a aceitação dos alimentos pelos consumidores.

Dentre os componentes do sabor, o aroma é influenciado por alguns fatores, como: reatividade química dos compostos que lhe originam, presença de luz e oxigênio no ambiente alimentar e pelos componentes da matriz alimentar em si, incluindo carboidratos, proteínas, gorduras e produtos formados durante o processamento, que podem modular a volatilidade e a reatividade das moléculas responsáveis pelo aroma (WEERAWATANAKORN et al., 2015).

A vanilina, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, é um dos principais constituintes do aroma da baunilha, além de agente aromatizante é amplamente utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica como conservante (devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas), (GALLAGE & MØLLER, 2018). No entanto, por possuir três grupos funcionais reativos – grupo aldeído, hidroxila fenólica e núcleo aromático – pode facilmente sofrer diferentes tipos de reações, tornando sua aplicação desafiadora devido à sua reatividade química, instabilidade térmica e volatilidade (TAI et al., 2011).

Sabe-se que as interações entre proteínas e aromas influenciam o sabor percebido de um produto alimentício (LAND, 1996; REINECCIUS, 2022; TEMTHAWEE et al., 2020). As interações proteína-ligante são fundamentais para muitos processos biológicos; com efeito, diversas proteínas possuem capacidade de formar complexos com diferentes ligantes, sendo capazes de protegê-los contra oxidação, outras formas de degradação e, até mesmo, liberá-los a taxas controladas em locais e condições de pH, temperatura e força iônica específicos (REINECCIUS, 2018).

A β -lactoglobulina (β -lg) é a fração mais abundante no soro de leite, aproximadamente 50% da proteína (MARSHALL et al., 2004) e tem sido uma das proteínas mais estudadas com relação à interação com outros compostos de relevância alimentícia, uma vez que sua estrutura tridimensional lhe permite associar-

se a ligantes com diferentes estruturas moleculares e polaridades, incluindo ácidos graxos, flavonoides, antocianinas, glicosídeos e vitaminas (ZHANG et al., 2017). É, dessa forma, considerado um sistema de carregamento promissor para vários nutrientes e aditivos, principalmente devido à sua capacidade de potencializar a estabilidade físico-química desses compostos, desacelerando suas taxas de degradação e modulando suas taxas de liberação no meio (YI et al., 2016). Assim, compreender, em escala molecular, o comportamento de compostos aromáticos em matrizes alimentares, incluindo a natureza e a intensidade das interações β -lg-aroma em formulações contendo essa proteína, é essencial para melhoria do perfil sensorial e da qualidade geral desses produtos (GUICHARD, 2006).

Nas três últimas décadas a elucidação de estruturas, dados de atividades biológicas e interações intermoleculares de proteínas diversas aumentaram imensamente. Avanços em cristalografia por difração de raios X permitiram a elucidação da estrutura tridimensional de milhares de proteínas, que podem ser acessadas para estudos em base de dados de domínio público, como o *Protein Data Bank* (PDB). Aliados à disponibilização desses dados de estruturas proteicas, os desenvolvimentos na informática têm permitido aplicar mais frequentemente formalismos teóricos e cálculos físico-químicos à compreensão da dinâmica dessas biomacromoléculas e de suas interações com outros compostos.

Tais metodologias computacionais (também por vezes referidas como metodologias "*in silico*", em alusão ao silício dos processadores mais antigos) permitem, quando aplicadas com rigor científico, avaliar acuradamente as características físico-químicas do acoplamento de pequenas moléculas (denominadas ligantes) a proteínas, seus possíveis efeitos na estrutura (secundária e terciária) da molécula proteica e calcular modelos em duas e três dimensões (2D e 3D) desses complexos proteína-ligante, visando identificar regiões da macromolécula de maior ou menor probabilidade de interação com compostos de interesse (ligantes) (FAUSTINO et al., 2018).

Apesar de haver histórico bem sucedido na literatura de investigação de interações proteína-aroma aplicando técnicas *in vitro* (principalmente microcalorimetrias e espectrofotometrias), tais estudos ainda carregam limitações, principalmente a imensa dificuldade (quando não a impossibilidade) de determinação,

em escala molecular, dos sítios específicos de interação, da evolução temporal das interações intermoleculares formadas e das potenciais mudanças conformacionais proteicas decorrentes dessas interações. Por outro lado, é consenso que as metodologias *in silico*, como as simulações de *docking* molecular e dinâmica molecular (DM), permitem fazer inferências cientificamente válidas sobre proteínas em meio aquoso, complexadas ou não a outros compostos, que não podem ser facilmente feitas *in vitro* ou *in vivo*.

Em vista do exposto, a presente dissertação reporta a aplicação de análises *in vitro* de espectrofotometria de fluorescência complementadas por metodologias *in silico* (especificamente simulações de *docking*) ao estudo, em escala molecular, das interações intermoleculares entre a β -lg bovina complexada com o aroma alimentício vanilina.

O documento está organizado da seguinte forma:

- (1) O capítulo 1 traz um referencial teórico correspondente à revisão da literatura de artigos científicos e publicações relevantes sobre as características intrínsecas da β -lg e da vanilina, assim como um estado da arte das principais metodologias abordadas para o estudo da formação do complexo β -lg-VAN.
- (2) O capítulo 2 aborda, sob a forma de um manuscrito de artigo científico a aplicação da metodologia apresentada, os principais resultados obtidos e a investigação de parâmetros termodinâmicos, das forças mantenedoras e do sítio mais provável para ocorrência do complexo β -lg-VAN.
- (3) No capítulo 3, resumimos as principais conclusões advindas do desenvolvimento do estudo e previsões futuras de otimização do trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar, em escala molecular, a complexação entre β -lactoglobulina (β -lg) e o aroma alimentício vanilina, por meio de análises por espectroscopia de fluorescência e metodologia *in silico* (simulações de *docking*).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a formação dos referidos complexos β -lg/vanilina, por espectroscopia de fluorescência, determinando o mecanismo de interação através das constantes K_{sv} e k_q ; o número de sítios (n), a constante de ligação ($K_{VAN/\beta-lg}$) e os parâmetros termodinâmicos ($\Delta H_{VAN/\beta-lg}$, $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$, e $\Delta G_{VAN/\beta-lg}$).
- Obter, no PDB, uma estrutura cristalográfica da β -lg com alta resolução e proceder o seu relaxamento progressivo em meio aquoso (na presença de moléculas de água explícitas), aplicando-se sucessivas minimizações de energia com retirada progressiva das restrições de movimento;
- A partir da estrutura da β -lg relaxada, realizar simulações de *docking* molecular do aroma vanilina, de modo a se obter modelos coerentes dos complexos proteína/aroma em diferentes sítios de ligação potenciais de modo a sugerir o mais provável e determinar as forças mantenedoras envolvidas.

CAPÍTULO 1.

Referencial teórico

3. REVISÃO DE LITERATURA

Na busca de embasamento científico para construção da revisão bibliográfica (primeiro capítulo deste trabalho), foram realizadas consultas em livros e diversos bancos de dados, através dos seguintes mecanismos virtuais de pesquisa: Google Academic, Pubmed, Science Direct, Springer e Wiley, entre janeiro de 2020 e outubro de 2022.

Com o intuito de obter maior assertividade nas buscas, as pesquisas envolveram os seguintes termos: “Docking molecular”, “interaction protein-flavor”, “*in silico* methodology”, “ β -lactoglobulin”, “ β -lactoglobulin interaction”, “Vanillin”, “Molecular spectroscopy” e “Whey protein”. Como critério de seleção, os artigos encontrados passaram por uma triagem prévia de análise de título e resumo, sendo selecionados considerados elegíveis para inclusão, os artigos científicos que contivessem informações relevantes diretamente associadas a proteína (β -lactoglobulina) e aroma (vanilina) e as metodologias objeto deste estudo.

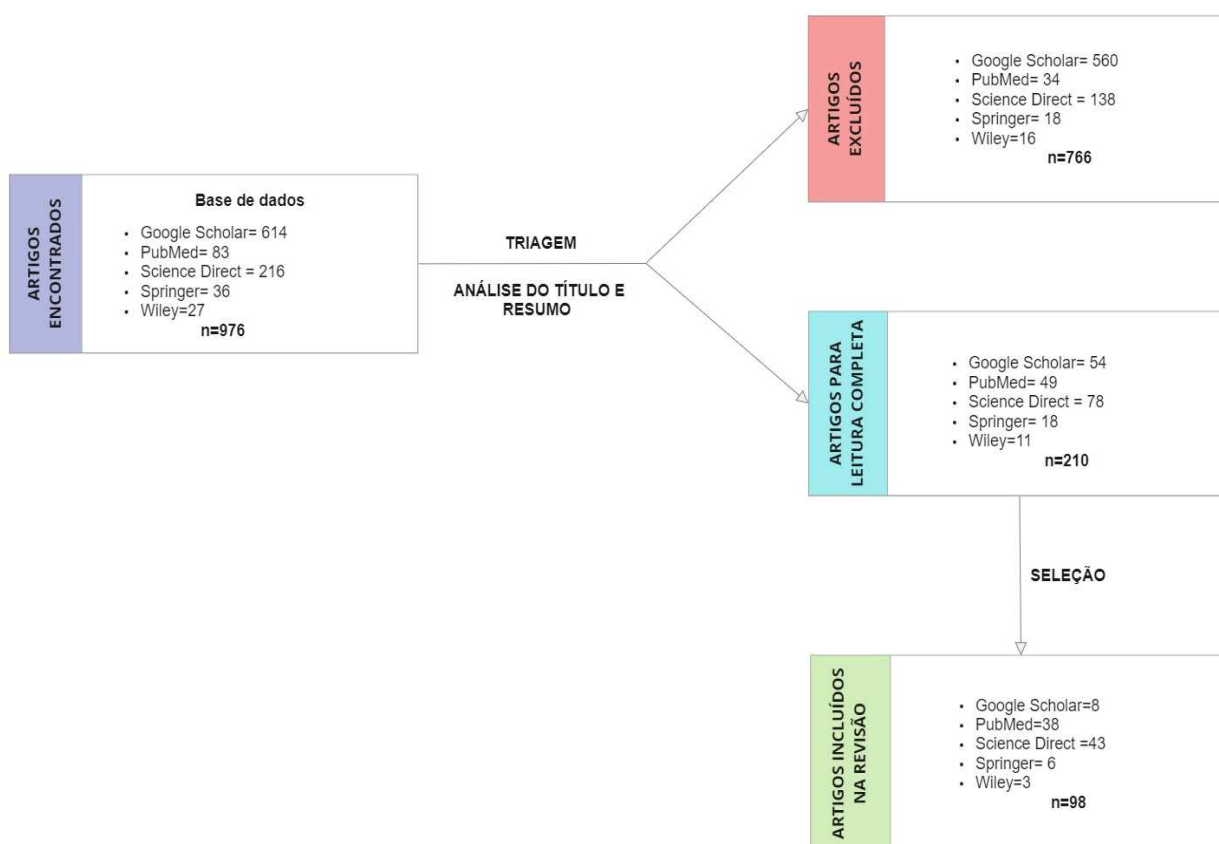


Figura 1- Representação esquemática de seleção de artigos para revisão bibliográfica.

3.1. Aromas e sua importância tecnológica

Uma das propriedades mais importantes que impacta a qualidade dos alimentos e sua competitividade global é o sabor, e cada vez mais atenção está sendo dada à estabilidade do mesmo durante o armazenamento (WEERAWATANAKORN et al., 2015; YIN et al., 2017). A percepção do sabor é a combinação de modalidades multissensoriais, das quais aroma e gosto são os dois principais impulsionadores, responsáveis por aumentar a sensação de saciedade, suprimir a sensação de fome e reduzir a ingestão de alimentos (BOLHUIS et al., 2011, RAMAEKERS et al., 2013).

Diversos empreendimentos, como técnica de *marketing*, aproveitam os aromas inerentes ao produto para atrair clientes e aumentar o desejo de consumo (MITCHELL et al., 1995). A grande maioria dos aromas são misturas quimicamente complexas que exercem fortes sensações de sabor e odor ainda que presentes em baixas concentrações, sendo, pois, sinais poderosos que desencadeiam memórias e inspiram reações viscerais de desejo de consumo (GENOVESE et al, 2009; OUYANG et al., 2017). Geralmente, porém, são rapidamente perdidos durante o processamento de alimentos, principalmente devido à sua volatilidade e reatividade química (ROSENBERG e SHEU, 1996).

A liberação do aroma e sua chegada aos receptores olfativos e gustativos dependem diretamente da matriz alimentar bem como das propriedades físico-químicas moleculares dos compostos aromáticos (GUICHARD, 2002; TERTA et al., 2006). Embora os principais ingredientes (polissacarídeos, lipídeos e proteínas) nos alimentos não contribuam diretamente para o sabor, eles podem reter compostos ativos de sabor e assim modular sua percepção pelos consumidores (TROMELIN et al, 2006).

A vanilina, objeto deste estudo, é um dos compostos aromáticos mais difundidos e apreciados, amplamente utilizado como agente aromatizante em alimentos, perfumes, bebidas e produtos farmacêuticos (MOHAMAD YUSOF et al., 2014).

3.1.1. A vanilina

O aroma de baunilha é uma mistura de aproximadamente 200 compostos; no entanto, seu sabor e fragrância característicos vêm principalmente da molécula de vanilina, que ocorre na concentração de 1,0-2,0% (m/m) em grãos de baunilha curados (Figura 2) (ZHANG & MUELLER 2012). Pode ser obtida naturalmente do extrato de vagem de baunilha proveniente das orquídeas trepadeiras *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* e *Vanilla pompona* (BEZERRA et al. 2016) e, em quantidades mais modestas, de uma variedade de outras espécies de plantas (RADULOVIC et al., 2010).

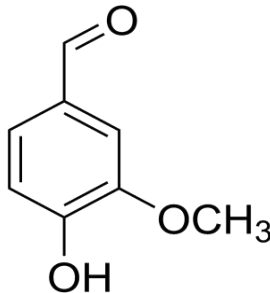


Figura 2- Figura 2- Orquídea do gênero *Vanilla planifolia*; vagem madura de baunilha e vanilina em pó. Fonte: Jiri Hera (2013).

Como forma alternativa e a mais barata de obtenção, a vanilina pode ser quimicamente sintetizada através de substratos, como lignina, guaiacol, 4-hidroxibenzaldeide, 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído, álcool 3-metoxi-4-hidroxibenzílico (ARYA et al., 2021; BANERJEE & CHAT-TOPADHYAY 2019; CIRIMINNA et al., 2019). Possui em sua estrutura molecular os grupos funcionais aldeído, hidroxila e éter ligados a um

anel aromático (GALLAGE & MØLLER, 2018), suas propriedades físico-químicas estão sumarizadas na Tabela 1:

Tabela 0-1-Propriedades físico-químicas da vanilina.

Propriedades físico-químicas da vanilina	
Nome IUPAC	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído
Fórmula química	$C_8H_8O_3$
Estrutura molecular	
Massa molar	152,15 g/mol
Densidade	1,06 g/cm ³
Cor	Branca
Estado físico (a 25 °C)	Sólido
Ponto de ebulição	285 °C
Ponto de fusão	81.5 °C

Fonte: Adaptado de ARYA et al., 2021.

A demanda pela vanilina como aromatizante em produtos alimentícios é muito alta, e por possuir diversas propriedades bioativas (Figura 3), também é amplamente utilizada como conservante em muitas matrizes alimentícias (ARYA et al., 2021; LI et al., 2018). A tabela 2 traz um compilado de trabalhos recentes abordando algumas destas propriedades.

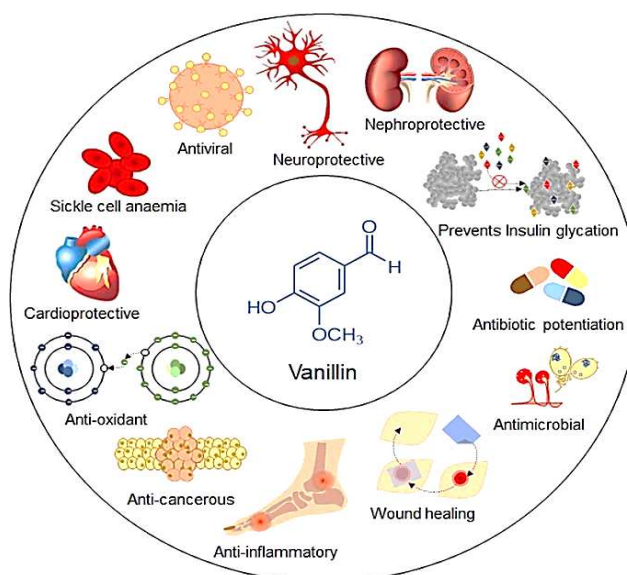


Figura 3-Principais propriedades bioativas da vanilina.

Tabela 0-2-Estudos recentes abordando algumas das propriedades bioativas da Vanilina.

Propriedade	Referência	Sinopse dos estudos abordando propriedades bioativas da Vanilina
Anticâncer	LI et al., 2018	Avaliaram-se as atividades inibitórias da vanilina em camundongos a partir da indução de colite -por administração de azoximetano (AOM) e sulfato de sódio dextrano (DSS). Várias dosagens de vanilina foram administradas oralmente durante 13 semanas consecutivas. A vanilina afetou a expressão de genes de proteassoma e sua administração oral a 100 mg/kg melhorou o desenvolvimento dos tumores, sugerindo que o consumo de vanilina pode ter um efeito benéfico sobre o câncer colorretal
Antiinflamatória	CICILIATO et al., 2022	Objetivou-se avaliar a atividade gastroprotetora da vanilina e investigar sua atividade e modulação da expressão gênica ao tratar ratos Wistar com benoxolona ou vanilina (25, 50 ou 100 mg/kg) após receberem etanol absoluto por via oral para desenvolvimento de úlceras.
Antioxidante	BEZERRA et al., 2016	A ação antioxidante da vanilina foi demonstrada por meio de testes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , atuando na prevenção de danos oxidativos às membranas celulares em tecidos de mamíferos. Por meio da cisão homolítica da ligação covalente O-H, a geração de espécies capazes de estabilizar radicais livres reduziu a velocidade de propagação das reações de oxidação.
Antifúngica	ROMERO-CORTES et al., 2019	Testou-se a atividade antifúngica do suco de baunilha (vanilina) contra cepas de fungos da família <i>Pleosporaceae</i> , isoladas de plantas doentes de sorgo e cevada. O suco apresentou efeito fungistático contra todas as cepas de <i>A. alternata</i> testadas e aumentou o tempo de latência de 50 para 112 h, não havendo produção de conídios, indicando a possível aplicação do mesmo como alternativa para o controle de culturas agrícolas como cevada e sorgo.

3.2. Proteínas e seus complexos com aromas alimentícios

Os ingredientes proteicos, devido a suas propriedades funcionais, são largamente utilizados no processamento de alimentos. Embora sua contribuição direta no sabor seja mínima, sua influência na percepção do sabor é considerável, devido à sua capacidade de ligar-se e reter compostos de aroma (HENG et al., 2004).

As interações proteína-ligante resultam de uma combinação de diferentes tipos interações intermoleculares, incluindo eletrostáticas, de *van der Waals*, hidrofóbicas e interações do tipo ligações de hidrogênio (DUNN, 2010). Vários fatores, como: características moleculares das substâncias de sabor, temperatura, força iônica, presença de etanol, estrutura da proteína alimentar e histórico de seu processamento, determinam a extensão das interações entre proteínas e as substâncias de sabor em alimentos, podendo a complexação entre estes ocorrer de forma reversível ou irreversível (GUICHARD, 2002).

A interação físico-química reversível inclui interações do tipo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, sendo importante para proteger os compostos de sabor desejáveis durante o processamento e liberando-os de maneira controlada durante o consumo (ZHOU et al., 2006). Já as interações químicas irreversíveis se dão por meio de ligações covalentes, como formação de amidas e ésteres e condensação de aldeídos com grupos amino (-NH₂) ou sulfidril (-SH) (MEYNIER et al., 2004).

Dentre as principais proteínas utilizadas para a promoção de interações proteína-ligante, destaca-se a β -lactoglobulina por sua seletividade e capacidade de interagir com um grande número de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, possibilitando o desenvolvimento de diferentes aplicações na indústria alimentícia (XIANG et al., 2018).

3.2.1. A β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina bovina (Figura 4) é a proteína majoritária do soro de leite, representando 58% das proteínas do soro e 10% das totais do leite (VEGARUD et al., 2000; BARBIROLI et al., 2022). Embora encontrada em proporções substanciais no leite de muitos mamíferos, é completamente ausente no leite de humanos (O'MAHONY et al., 2012). Apresenta polimorfismo genético, sendo as variantes A e B as mais comuns em raças de gado leiteiro, diferindo entre si por dois aminoácidos (Asp64/Val118 e Gly64/Ala118 em A e B, respectivamente (DAVIS et al., 2022; HARAGUCHI et al., 2006). Os estudos nesta dissertação foram conduzidos com a variante A.

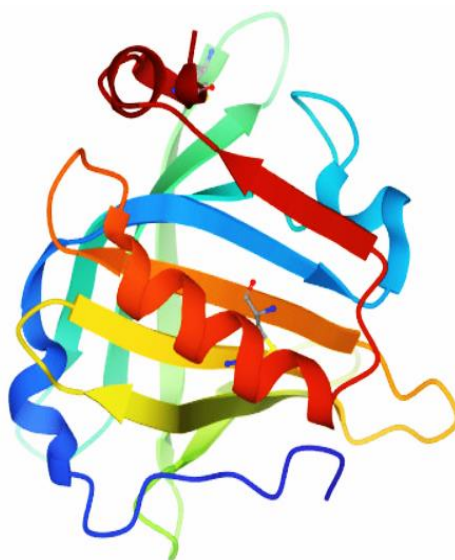


Figura 4-Estrutura tridimensional da proteína β -lactoglobulina bovina (código PDB ID: 3NPO). Fonte: Protein Data Bank (PDB, www.pdb.org).

Os monômeros consistem predominantemente de folhas- β (50%), uma pequena porção de α -hélice (15%), *random coils* (15%) e *turns* (20%). Cada monômero de β -lg contém cinco resíduos de cisteína. Um deles como um tiol livre (-SH) na fita G, localizado, na estrutura nativa, sob a α -hélice que fica ao lado do β -barril, enquanto os outros quatro formam duas pontes dissulfeto (-S-S). A primeira (Cys66-Cys160) liga o terminal C à alça CD, enquanto a segunda (Cys106-Cys119) liga as fitas β , G e H (BROWNLOW et al., 1997; QIN et al., 2008; CHANPHAI, 2018). O cálice é flanqueado em sua superfície externa por uma hélice alfa de três voltas. As alças na extremidade fechada do cálice (BC, DE e FG) são bastante curtas, enquanto os da extremidade aberta (AB, CD, EF e GH) são mais longos e flexíveis (JAMESON

et al.,2002; CROWTHER et al., 2016). A tabela 3 traz algumas das principais propriedades da β -Ig:

Tabela 03-Propriedades da β -lactoglobulina.

Propriedades gerais da β-lactoglobulina	
Nome	β -lactoglobulina
Concentração	2,7 g/L
Peso molecular	Aproximadamente 18,4 kDa
Nº de aminoácidos residuais	162
Família	Lipocaínas
pHi	5,35-5,49

Fonte: Adaptado de CHANPHAI, 2018.

Por tratar-se de uma proteína termossensível, vários efeitos são produzidos por ação da temperatura, entre eles, a redução acentuada de solubilidade e a desnaturação, com conseqüente exposição de regiões da molécula, tornando-as suscetíveis a formar diferentes tipos de interações intermoleculares com outros componentes em sistemas complexos (IAMETTI et al., 1996). Na faixa de temperatura entre 30 °C e 55 °C, a β -Ig é dissociada em monômeros, em temperaturas superiores a 60°C seus monômeros se desdobram aumentando a reatividade do grupo tiol livre, e a 95 °C há completa desnaturação, com extensa transformação conformacional (CULBERTSON & HUI, 2006).

Devido à sua estrutura compacta quando em sua forma nativa, a β -Ig apresenta considerável resistência à proteólise em uma faixa de pH bastante extensa (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2006). A β -Ig bovina sofre uma mudança conformacional reversível induzida pelo pH, denominada “transição de Tanford” (Tabela 4), existindo como um dímero em pH neutro enquanto se dissocia em monômeros nativos em pH ácido (SAKURAI & GOTO, 2002).

Tabela 04- Estado conformacional da β -Ig em relação a faixa de pH.

Faixa de pH	Estado conformacional β-Ig	Referências Bibliográficas
<3,5	Monômeros	
3,5 - 5,5	Octâmeros	BROWNLOW et al., 1997; FOX & MCSWEENEY, 1998;
4 - 5	Transição octâmero-dímero	KHAN et al., 2018; STENDER et al., 2019.
5,5 -7,5	Dímeros	

A função biológica da β -lg está diretamente associada ao carregamento de compostos hidrofóbicos bioativos (notadamente ácidos graxos insaturados) (WILDE et al., 2016), sendo amplamente utilizada como proteína modelo para interações proteína-ligante, devido a sua disponibilidade e capacidade de se acoplar tanto com ligantes polares quanto com apolares (CROWTHER et al., 2016; KONTOPIDIS et al., 2004). Atua como um “nano transportador” ou “microcápsula” eficaz para o carregamento e a liberação controlada de drogas, potencializando a bioatividade de ligantes hidrofóbicos e melhorando a estabilidade destes (CHANPHAI, 2018).

Sabe-se que a interação com ligantes envolve diferentes regiões da estrutura da β -lg, dependendo das características físico-química do ligante (SHAFAEI et al., 2017).

Em seu estado monomérico, a interação entre β -lg e as pequenas moléculas que ela é capaz de carrear é relatada com a presença de dois principais locais de interação: um sítio situado na cavidade do barril e o outro no sulco hidrofóbico entre α -hélice e o β -barril formado por filamentos β (EVOLI et al., 2014, VISENTINI et al., 2017). Já em sua forma dimérica, um terceiro sítio adicional foi reportado na interface entre os monômeros (LOCH et al., 2022) (Figura 5):

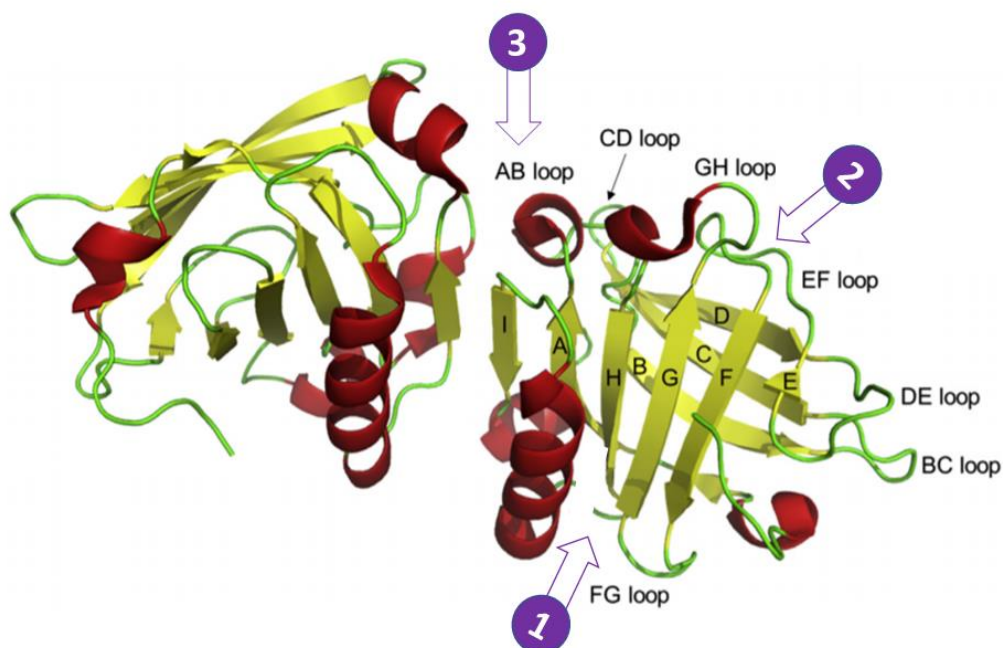


Figura 5-Estrutura dimérica da β -lactoglobulina com os três possíveis locais de interação relatados, destacados em roxo: 1) sulco hidrofóbico entre α -hélice e o β -barril, 2) superfície próxima ao β -barril e 3) interface do dímero.

A Tabela 5, traz um pequeno estado da arte da pesquisa versando sobre a interação entre β -lg e pequenas moléculas, aplicando-se metodologias *in vitro* e/ou *in silico*. Para facilitar a leitura e a análise, alguns dos pontos principais compilados na mesma foram sintetizados a seguir, destacando-se:

- O fármaco tricíclico desipramina (DSM) esteve presente nos três sítios de interação conhecidos nas estruturas diméricas de β -lg, sendo que no sítio no interior do β -barril possuiu a maior afinidade pelo DSM (LOCH et al., 2022);
- O ácido vanílico foi estabilizado no β -barril da proteína com ligações de hidrogênio, interações π -alquil e uma série de outros resíduos desempenhando um papel menor na estabilização (ABDOLLAHI et al., 2021);
- A capsaicina se liga à bolsa hidrofóbica do cálice da β -lg com alta afinidade por interações hidrofóbicas e de *Van der Waals*, promovendo pequenas alterações na estrutura e dinâmica da proteína (ZHAN et al., 2020);
- A apigenina apresentou comportamentos e sítios de interação distintos nos diferentes valores de pH estudados. Em pH 2,6 e 6,2 observou-se a formação de interações do tipo ligações de hidrogênio na superfície externa da β -lg e em pH 7,1 e 8,2: interações hidrofóbicas, dentro do β -barril de β -lg (ZHU et al., 2020);
- As interações hidrofóbicas desempenham o papel principal na ligação da cadeia de polieno da crocina à superfície da β -lg. Através de indícios de estabilização e desestabilização, prevê-se que as funcionalidades da crocina sejam afetadas pela associação à β -lg e vice-versa (ALLAHDAD et al., 2020);
- Interações do tipo ligação de hidrogênio e de *van der Waals* foram as principais forças mantenedoras dos complexos de miricetina/baicalina- β -lg. Pode-se afirmar que utilizar a metodologia QSAR juntamente com simulações de DM fornece uma nova maneira de investigar a interação entre polifenóis e proteínas (GENG et al., 2020);
- As interações entre ácido cítrico/gálico e a β -lg ocorreram por meio de contatos iônicos, promovendo alterações na estrutura secundária da proteína (CHANPHAI & TAJMIR-RIahi, 2020);
- β -lg pode ser um bom veículo para a criação de um sistema de proteção e distribuição de 3,3-di-indol metano (DIM) devido à forte interação entre ambos (WANG et al., 2019);

- Ao promover a interação da β -lg com três polifenóis (teaflavina, ácido clorogênico e delphinidina-3-glicosídeo) foi observado que os mesmos impedem que a IgE se aproxime da β -lg, podendo fornecer um método viável para redução de sua alergenicidade (XU et al., 2019);
- As interações hidrofóbicas foram as responsáveis pela interação entre β -lg e 3-glucósido cianidina (CHENG et al., 2017);
- Ciprofloxacina e Canamicina interagem com β -lg por meio de mecanismo de supressão estático (MEHRABAN et al., 2016);
- Todas as 3 tiazolidinedionas (troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona) ligam-se na cavidade interna da β -lg. As interações hidrofóbicas e do tipo ligação de hidrogênio desempenham um papel importante na estabilidade dos complexos. (KHOSRAVI & HEIDARI-KOHOLI, 2015)

Tabela 5-a: Alguns estudos realizados nos últimos 7 anos (2015 -2022) sobre a interação entre β -Ig e pequenas moléculas.

β -Ig/ Ligante	Objetivo	Metodologia	Conclusões
β-Ig / Desipramina (LOCH et al., 2022)	Analisar as interações entre estruturas cristalinas de β -lactoglobulina e o fármaco tricíclico desipramina (DSM).	<i>In vitro</i> : Cristalografia de raios X, Calorimetria (ITC) e Dicroísmo Circular (CD)	As estruturas cristalinas mostraram que as formas diméricas da β -Ig são capazes de ligar DSM não apenas dentro do β -barril como esperado, mas também na interface do dímero e na entrada da bolsa de ligação.
β-Ig / Ácido vanílico (ABDOLLAHI et al., 2021)	Estudar as interações moleculares entre o ácido vanílico e a β -lactoglobulina em condições ácidas.	<i>In vitro</i> : FT-IR; UV/VIS; CD; Espectroscopia de fluorescência. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de DM	Foram observadas alterações consideráveis após a complexação na estrutura secundária da β -Ig em pH 2.4, como: diminuição da α -helicidade e \uparrow do conteúdo estrutural desordenado O ácido vanílico foi estabilizado no β -barril da proteína com ligações de hidrogênio (Gln120), interações π -alquil (Leu39, Ile56, Ile71 e Met107), com uma série de outros resíduos desempenhando um papel menor na estabilização
β-Ig / Capsaicina (ZHAN et al., 2020)	Investigar o mecanismo de interação entre capsaicina (CAP) e β -Ig para aumentar a biodisponibilidade de CAP.	<i>In vitro</i> : UV/VIS; CD; Espectroscopia de fluorescência. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de DM.	Interação entre β -Ig e CAP: processo espontâneo em pH 7,4. A CAP se liga à bolsa hidrofóbica do cálice da β -Ig (\uparrow afinidade) por interações hidrofóbicas e de <i>Van der Waals</i> . Ocorreram pequenas alterações na estrutura e dinâmica da proteína.

Tabela 5-b: Alguns estudos realizados nos últimos 7 anos (2015 -2022) sobre a interação entre β -lg e pequenas moléculas.

β -lg/ Ligante	Objetivo	Metodologia	Conclusões
β-lg / Apigenina (ZHU et al., 2020)	Explorar a interação da β -lg com a apigenina em diferentes níveis de pH.	<i>In vitro</i> : Espectroscopia de fluorescência; CD. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de DM	Interação entre apigenina e β -lg: mecanismo estático em pH 2,6 e 8,2. Em pH 2,6 e 6,2: formação de interações do tipo ligações de hidrogênio, ligação na superfície externa da β -lg devido ao β -barril fechado. Em pH 7,1 e 8,2: interações hidrofóbicas, ligações dentro do β -barril aberto de β -lg. \uparrow polaridade em torno dos resíduos de Trp da β -lg e \downarrow da hidrofobicidade de superfície após a ligação.
β-lg / Crocina (ALLAHDAD et al.,2020)	Investigar o impacto da interação molecular da crocina à β -lg, visto que a instabilidade da crocina limita sua aplicação em sistemas alimentares.	<i>In vitro</i> : UV/VIS; CD; Espectroscopia de fluorescência tridimensional; Espectroscopia Raman; <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de dinâmica molecular	As interações hidrofóbicas desempenham o papel principal na ligação da cadeia de polieno da crocina à superfície β -lg. A crocina desestabilizou a β -lg até a temperatura ambiente e a estabilizou em temperaturas mais altas. Prevê-se que as funcionalidades da crocina sejam afetadas pela associação à β -lg e vice-versa.
β-lg / flavonóides (GENG et al., 2020)	Estabelecer a relação quantitativa estrutura-afinidade de flavonóides com β -lg e o mecanismo de interação correspondente.	<i>In vitro</i> : Espectroscopia de fluorescência <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> , simulações de dinâmica molecular e QSAR.	O grupo hidroxila e a hidrofobicidade do flavonóides foram relacionados às suas capacidades de ligação com β -lg. Ligação do tipo interação de hidrogênio e de <i>van der Waals</i> foram as principais forças mantenedoras dos complexos de miricetina e baicalina com β -lg.

Tabela 5-c: Alguns estudos realizados nos últimos 7 anos (2015 -2022) sobre a interação entre β -Ig e pequenas moléculas.

β -Ig/ Ligante	Objetivo	Metodologia	Conclusões
β-Ig / Ácido cítrico e ácido gálico (CHANPHAI & TAJMIR-RIAAHI, 2020)	Determinar os locais de ligação dos ácidos na β -Ig e os efeitos da complexação sobre a estabilidade e conformação da proteína.	<i>In vitro</i> : UV/VIS, FTIR <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de dinâmica molecular	A interação ácido-proteína ocorre por meio de contatos iônicos e altera a estrutura secundária da proteína: \downarrow na folha β e \uparrow na alfa-hélice, levando a uma desestabilização parcial da proteína. Estes ácidos podem ser transportados <i>in vitro</i> pela β -Ig.
β-Ig / DIM (WANG et al., 2019)	Investigar as interações formadas entre DIM (3,3'-Diindolilmetano) e β -Ig.	<i>In vitro</i> : UV-VIS; FT-IR; potencial ζ , Far UV-CD, Espectroscopia de fluorescência <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> molecular.	Com a interação β -Ig-DIM foi observado: \uparrow diâmetro, \uparrow valor do potencial ζ absoluto e \uparrow intensidade da fluorescência. $\Delta G_{\text{ligação}} = -40,06$ kJ/mol
β-Ig / Teaflavina, ácido clorogênico e delfinidina-3-glicosídeo (XU et al., 2019)	Investigar o mecanismo da redução de capacidade alergênica da β -Ig através de sua interação com três polifenóis.	<i>In vitro</i> : UV-Vis; espectroscopia de fluorescência; FTIR; CD. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> molecular	Os polifenóis causaram supressão de fluorescência da β -Ig, principalmente por mecanismo estático. Foram observados: \uparrow Frações de α -hélice e \downarrow das frações de folha β na estrutura secundária e terciária de β -Ig. Os polifenóis impedem que a IgE se aproxime da β -Ig, podendo fornecer um método viável para redução da alergenicidade da β -Ig.

Tabela 5-d: Alguns estudos realizados nos últimos 7 anos (2015 -2022) sobre a interação entre β -lg e pequenas moléculas.

β -lg/ Ligante	Objetivo	Metodologia	Conclusões
β-lg/ C3G (CHENG et al., 2017)	Caracterizar a interação entre β -lg e 3-glucósido cianidina para melhor compreensão das propriedades físico-químicas das antocianinas complexadas com proteínas do leite	<i>In vitro</i> : CD; UV-Vis; Espectroscopia de fluorescência. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> molecular.	Foram observados: \uparrow afinidade de ligação entre β -lg e C3G por meio de interação hidrofóbica. \uparrow na estrutura principal da folha β e \downarrow na estrutura menor da α -helix da β -lg. A interação induziu alterações na estrutura terciária da β -lg.
β-lg/Ciprofloxacina e canamicina (MEHRABAN et al., 2016)	Analisar a interação dos antibióticos e delinear a localização de ligação dessas drogas, caracterizando o sítio de ligação da ciprofloxacina e canamicina na β -lg.	<i>In vitro</i> : UV-Vis; Espectroscopia de fluorescência; CD. <i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> .	Ciprofloxacina tem \uparrow afinidade para β -lg e pode penetrar mais profundamente no interior da proteína que canamicina. Ambas as drogas interagem com β -lg por meio de mecanismo de supressão estático e podem ligar-se a este transportador na formação do complexo equimolar, revelando potencialidade da β -lg como veículo de transporte eficaz para estes antibióticos amplamente utilizados.
β-lg/ Tiazolidinedionas (KHOSRAVI & HEIDARI-KOHOLI, 2015)	Investigar a conformação da proteína e sua afinidade de ligação com três tiazolidinedionas para compreender suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.	<i>In silico</i> : Simulações de <i>docking</i> e simulações de dinâmica molecular	Todas as 3 tiazolidinedionas ligam-se na cavidade interna da β -lg. A afinidade de ligação da β -lg com as tiazolidinedionas diminui na seguinte ordem: troglitazona > pioglitazona > rosiglitazona. As interações hidrofóbicas, interações do tipo ligações de hidrogênio, empilhamento π - π e cátions π desempenham um papel importante na estabilidade dos complexos.

3.3. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica largamente empregada em pesquisa para estudar a interação de biomacromoléculas (como proteínas) e pequenas moléculas de ligantes, devido à sua precisão e relativamente fácil acessibilidade (GHALANDARI et al., 2014; XU et al., 2019). O uso da técnica como ferramenta analítica oferece vantagens, dentre as quais se destacam alta sensibilidade, rapidez e disponibilidade para automação total da coleta e processamento de dados. Comercialmente, os espectrômetros de fluorescência disponíveis permitem medir atributos de qualidade de alimentos de maneira rápida e não destrutiva.

A maioria das moléculas, à temperatura ambiente, encontra-se em seu nível vibracional e rotacional fundamental. Ao serem irradiadas com fótons de frequências apropriadas, estas moléculas podem absorver energia, passando do estado fundamental para vários estados vibracionais do estado eletrônico excitado. Ao sofrerem colisões com outras moléculas, a molécula excitada perde energia vibracional até alcançar o estado de menor energia. Este estado, por ser instável, faz com que as moléculas retornem para qualquer nível vibracional do estado eletrônico fundamental emitindo um fóton (que carrega a energia fluorescente) com diferentes energias e frequências. Munidos das intensidades emitidas nestas, é possível obter o espectro de emissão de fluorescência na espectroscopia de fluorescência (ELUMALAI et al., 2010).

O espectrofluorímetro, ou espectrofotômetro de fluorescência, equipamento utilizado para a execução desse tipo de análise, é composto basicamente por um sistema de iluminação duplo de leds, que excitam a amostra e produzem sua emissão (Figura 6). Em seguida, uma lente convergente focaliza a luz emitida na entrada do monocromador de excitação e é utilizado para modular este sinal com uma frequência conhecida através de um acoplador ótico. Após isso, a luz entra em um monocromador de emissão, responsável pela decomposição espectral, cujos componentes são detectados com um fotodiodo amplificado (PAVONI et al., 2014).

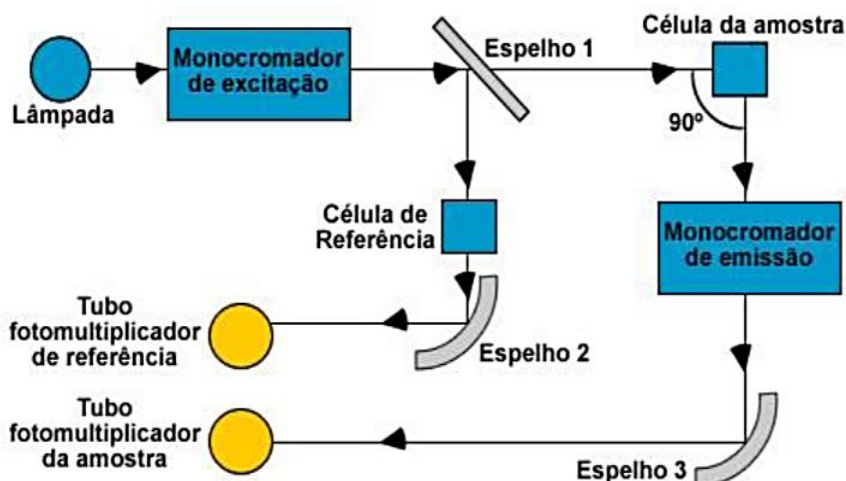


Figura 6- Esquema do arranjo de componentes de um espectrofluorímetro.

O processo no qual uma molécula perde sua fluorescência pela presença de um agente chamado de supressor é denominado supressão (VALEUR, 2002). A intensidade de fluorescência de uma macromolécula pode diminuir devido a uma variedade de interações com outros compostos moleculares: rearranjo molecular, transferência de energia, supressão devido a colisões, dentre outros (LAKOWICZ, 1999). Tal decréscimo da fluorescência é denominado supressão ou “*quenching*” e é descrita pela relação de *Stern–Volmer*:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Ligante] = 1 + K_{sv} \cdot [Ligante] \quad (1)$$

Onde F_0 e F são as intensidades do fluoróforo na presença e ausência do supressor (ligante), respectivamente, $[Ligante]$ é a concentração do supressor; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer; k_q é a constante biomolecular da taxa de supressão e τ_0 é o tempo de vida médio da biomolécula sem o supressor (1,45 ns para a β -lg) (MOHAMMADI et al., 2015).

O mecanismo de supressão por fluorescência de pequenas moléculas que se ligam à proteína pode ser classificado como supressão estática ou dinâmica, podendo estes serem distinguidos em relação ao comportamento em função da temperatura. Devido à formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor, a constante de supressão estática tende a diminuir com o aumento da temperatura, já a supressão dinâmica, é a favor de uma temperatura crescente, pois é controlada por encontros de difusão e colisão (CHENG et al., 2017).

Tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe) são os aminoácidos responsáveis pela fluorescência intrínseca das proteínas. A β -lactoglobulina, proteína de estudo, contém dois triptofanos (Trp) nos locais 19 e 61; quatro tirosinas (Tyr) nas posições 20, 42, 102, 99 (JIA et al., 2017).

3.4. Metodologias de modelagem molecular *in silico*

A caracterização de uma proteína só pode ser completa a partir do conhecimento de sua sequência primária e também de sua estrutura tridimensional, o que possibilita inferir e mensurar seu mecanismo de funcionamento biológico (ou tecnológico) e propor, a partir daí, intervenções para obter desde o aumento até a cessação da atividade proteica (NADEAU et al., 2011; KUMAR et al., 2014). Para estudar propriedades e comportamentos de sistemas em escala molecular e temporal, as metodologias de modelagem molecular *in silico* têm sido utilizadas para corroborar com técnicas *in vivo/in vitro*, explorando de maneira mais detalhada as bases moleculares das propriedades físicas macroscópicas das proteínas (SHARPE, 2017; PIECZYWEK et al., 2020).

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos, tratando-se de um campo científico multidisciplinar, pois explora fundamentos teórico-matemáticos da química, física e biologia em programas de computador a fim de calcular estruturas, propriedades e modos de interação entre entidades químicas e bioquímicas, incluindo íons, moléculas e polímeros (LEACH, 2001; OLIVEIRA, 2009). Para o estudo molecular de proteínas e de seus complexos, as principais ferramentas de modelagem molecular convencionalmente utilizadas são apresentadas e descritas de forma resumida nas subseções a seguir.

3.3.1. Mecânica molecular

A mecânica molecular utiliza os princípios da física clássica, assim, as moléculas são consideradas um conjunto de átomos interagindo por forças newtonianas harmônicas, ou seja, os movimentos dos núcleos são tratados por forças harmônicas ou elásticas, enquanto os elétrons são tratados indiretamente, admitindo-se que estes têm uma distribuição uniforme em torno dos núcleos (CRAMER, 2004). Como resultado direto desta simplificação, os átomos são tidos como esferas dotadas

de uma massa m , um raio r e uma carga elétrica q , e as ligações covalentes são consideradas como uma mola de constante elástica k . Trata-se de um método computacional relativamente rápido, que pode ser empregado no cálculo de estruturas moleculares pequenas e até de sistemas oligo moleculares, englobando dezenas de milhares de átomos (HÖLTJE et al., 2003).

A expressão “campo de forças” designa um conjunto de parâmetros e equações que devem ser rigorosamente ajustados, de forma se calcular o comportamento adequado das moléculas – tidas como um conjunto de átomos esféricos ligados por molas – durante os cálculos de minimização de energia e de trajetórias de dinâmica molecular (MARTÍNEZ et al., 2007). Todos os campos de força visam uma representação o mais precisa possível de aspectos de um sistema físico. Por esta razão, a questão da qualidade geral de um campo de força particular não pode ser facilmente respondida. Dependerá do tipo de propriedade e do sistema molecular sob investigação (OOSTENBRINK et al., 2004). Entre os campos de força mais utilizados estão CHARMM, GROMOS, AMBER e OPLS, em suas dezenas de versões ajustadas e atualizadas (HUANG et al., 2016).

Um campo de forças clássico é definido pela energia potencial total do sistema, descrita como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados, (representadas por ligações covalentes, dobramento angular, etc) e não ligados, os quais são computados baseando-se em uma lista de átomos vizinhos não ligados, dentro de certo raio de corte (Eq.2) (NAMBA et al., 2008; VERLI, 2014).

$$V_{total} = \sum V_{ligados} + \sum V_{n\grave{a}o\ ligados} \quad (2)$$

$$V_{total} = V_{ligações\ covalentes} + V_{\grave{a}ngulos\ de\ val\ência} + V_{\grave{a}ngulos\ de\ torç\~{a}o} \\ + V_{diedros\ impr\acute{o}prios} + V_{eletrost\acute{a}ticas} + V_{Van\ der\ Waals} \quad (3)$$

O campo de força escolhido para o desenvolvimento deste trabalho foi o GROMOS53A6 (Eq.4), onde todo sistema molecular é tratado em nível atômico, todo átomo tem três graus de liberdade e *momentum* conjugado associado. Neste campo de força, os átomos de carbono alifáticos são tratados como *united atoms*: o carbono e os hidrogênios que estão ligados a ele são tratados como um único átomo reduzindo os graus de liberdade que são simulados explicitamente (DE OLIVEIRA, 2020; OOSTENBRINK et al., 2004)

$$\begin{aligned}
V(\vec{r}) = & \sum_{\text{ligações}} \frac{1}{4} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} k_\theta (\cos \theta - \cos \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedral}} k_\varphi [1 + \\
& \cos(\delta) \cos(m \varphi) + \sum_{\text{impróprios}} \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{não ligados}} \left(\left[\frac{C_{12ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{6ij}}{r_{ij}^6} \right] + \right. \\
& \left. \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_l r_{ij}} \right)
\end{aligned} \tag{4}$$

3.3.2. Preparo do receptor

A simulação de dinâmica molecular (DM) é uma técnica bem estabelecida para investigação de movimentos, ao longo de um intervalo de tempo de macromoléculas biológicas, possibilitando a visão temporal e espacial de suas características conformacionais, em escala nível molecular (DROR et al., 2012; ABRAHAM et al., 2015). A DM é uma das técnicas computacionais mais versáteis e uma das principais ferramentas para estudo teórico de moléculas biológicas (FENG et al., 2015), podendo ser encarada como uma ponte entre a teoria e o laboratório. Com seus dados, permite que experimentos sejam testados e validados, ao mesmo tempo em que seus resultados podem ser validados experimentalmente (ALLEN, 2004).

Estudos de processos dinâmicos fisiológicos complexos, como estabilidade de proteínas e suas mudanças conformacionais, dobramento de proteínas, reconhecimento molecular (proteínas, DNA, membranas e complexos) e transporte de íons em sistemas biológicos, se beneficiam da efetividade da aplicação de simulações de dinâmica molecular (WARSHEL, 2002).

Existem vários programas disponíveis que permitem a realização de cálculos de simulações de dinâmica molecular de biomoléculas, os mais empregados são o AMBER, NAMD, GROMOS, CHARMM e GROMACS. Dentre eles, o GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) é um dos mais difundidos e utilizado em pesquisas que envolvam dinâmica molecular de proteínas, por seus amplos e precisos recursos de parametrização e por sua gratuidade de uso para fins acadêmicos (VAN DER SPOEL et al. 2005), sendo o escolhido para utilização neste trabalho.

A equação de movimento de Newton (Eq.5) é a base para os cálculos de dinâmica molecular, pois correlaciona as alterações na energia potencial de um sistema às alterações nas posições dos átomos ao longo do tempo (LEACH, 2001).

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 \vec{r}}{dt^2} \quad (5)$$

Onde V é a função de energia potencial (representada matematicamente pela equação do campo de forças); m_i é a massa do átomo, e r_i representa a posição espacial (x_i, y_i, z_i) de cada átomo i do sistema.

Diversos algoritmos de integração numérica podem ser empregados para resolução da Eq.5, diferindo-se entre eles pela precisão e custo computacional. O Algoritmo de *Verlet* (Eq.6) é o mais comumente utilizado e para minimização de suas imprecisões numéricas, utiliza-se associado a ele o algoritmo “*leapfrog*”, caso haja uma velocidade e posição inicial para as interações. Nesta associação (algoritmo *Verlet Leapfrog*, Eq.7 e Eq.8) as velocidades e as posições são atualizadas em intervalos iguais à metade do passo de tempo Δt (VERLET, 1967).

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \vec{a}_i(t)\Delta t^2 + \vartheta(\Delta t^4) \quad (6)$$

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) - \Delta t \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \quad (7)$$

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)}{2} \quad (8)$$

Para se calcular trajetórias de dinâmica molecular coerentes, os sistemas moleculares devem ser submetidos à minimização de energia e equilibração prévias. Ademais, já nessas duas etapas preliminares, a aplicação de condições periódicas de contorno contribui para mitigar artefatos de cálculos nas interfaces do sistema.

Como passo precedente para início das simulações de DM tem-se a minimização de energia do sistema, que objetiva eliminar contatos incoerentes entre os átomos e otimizar suas posições relativas. Trata-se da técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse. Através de ajustes nas posições atômicas, o processo relaxa as distorções nas interações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de *van der Waals* (PASCUTTI, 2002; NAMBA et al., 2008).

Em caso de sistemas com biomoléculas de arquitetura muito precisa, como as proteínas, a minimização de energia deve ser feita em etapas graduais, em que são impostas restrições a seus átomos, e progressivamente vai-se removendo tais restrições – primeiro dos átomos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos,

depois do esqueleto (*backbone*) da molécula, e só então se eliminam todas as restrições. Caso a minimização energética progressiva não seja executada previamente à simulação de dinâmica, poderá culminar em alterações conformacionais na proteína ao ponto de desnaturá-la, fazendo com que a mesma perca sua “memória” cristalográfica irreversivelmente (OLIVEIRA, 2020).

A escolha do método numérico de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, disponibilidade e parâmetros, dados armazenados e ao recurso computacional (CARVALHO et al., 2003). Dentre os algoritmos de minimização mais utilizados, pode-se destacar: *conjugate gradient* e *steepest descent*. O *Steepest Descent* é um dos métodos mais antigos (proposto em 1847) e mais simples dentre a família dos métodos de “otimização por gradiente”. É um algoritmo de otimização de primeira ordem, onde a escolha da direção do mínimo da função f é a direção oposta ao gradiente. Dentre suas vantagens, não necessita calcular segundas derivadas, e nem resolver sistemas de equações; entretanto, a sua convergência se faz muito lentamente, uma vez que a progressão no sentido ao ótimo é efetuada em diversas mudanças de direção (DE AZEVEDO, 1995). Já 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 (AVIAT et al., 2017).

Apenas a minimização de energia não habilita o início da simulação: para que os cálculos da trajetória da DM sejam executados sem problemas iniciais que os tornem inviáveis, faz-se necessário equilibrar o solvente e os íons ao redor da proteína para que o sistema não entre em colapso durante a simulação (CALIXTO, 2015). O tempo de simulação necessário para a equilibração é variável e depende do sistema em estudo, variando comumente de 1 a 5 ns. Geralmente, dá-se por finalizado quando se alcança o equilíbrio termodinâmico (NAMBA et al., 2008). O conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton e que representam o estado do sistema, é chamado de ensemble (ALLEN & TILDESLEY, 1987). Normalmente, a equilibração é conduzida em duas fases com duração de tempo semelhantes. A primeira fase é a NVT (do inglês constant Number of particles, Volume, and Temperature), sendo o tempo gasto no NVT proporcional ao número de moléculas do sistema. A segunda fase é caracterizada pelo equilíbrio da pressão, realizada pelo conjunto NPT (do inglês

Number of particles, Pressure, and Temperature) sendo todos os elementos do acrônimo, constantes.

A forma mais comum de minimizar os efeitos de superfície (a interface com o vácuo) e obter as propriedades macroscópicas a partir das trajetórias das simulações de DM é a utilização de condições periódicas de contorno (ou fronteira) (FRENKEL & SMIT, 2002). Com essa abordagem, os átomos do sistema são colocados em uma caixa (os tipos mais usados são cubos, dodecaedros rômnicos e octaedros truncados), e a caixa original é replicada em todas as direções do espaço (Figura 7). Quando um átomo se move na caixa original, sua imagem periódica, em uma das caixas imagem, move-se da mesma maneira, caso um átomo saia da caixa original, sua imagem entra pela face oposta da caixa imagem, com a mesma velocidade. Deste modo, o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo é conservado (VERLI, 2014).

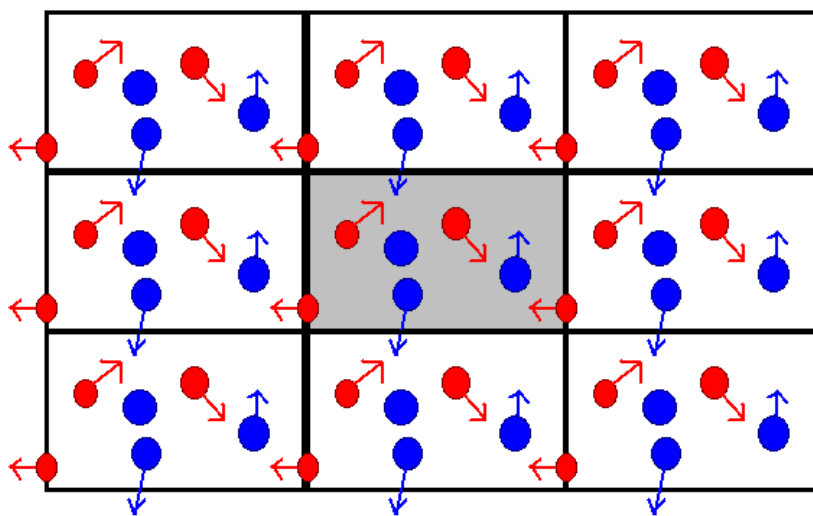


Figura 7- Representação das condições periódicas de contorno na caixa de simulação.

Após calculadas as trajetórias, cabe ao cientista modelador analisá-las, a fim de identificar alterações conformacionais, deslocamento de moléculas e íons, e também interações intramoleculares ou intermoleculares perdidas e formadas, correlacionado esses eventos moleculares ao fenômeno macroscópico em estudo (ou os utilizando para prever racionalmente tais fenômenos).

3.3.3. Simulações de *docking* molecular

As simulações de *docking* visam à predição das posições e orientações mais prováveis de uma pequena molécula quando acoplada a um alvo biomacromolecular (proteína com frequência; às vezes ácidos nucleicos) (VERDONK et al., 2011). Trata-se de uma técnica computacional que permite obter detalhes do reconhecimento e modo de interação entre proteína-proteína e receptor-ligante. De modo geral, com o uso das simulações de *docking* podem ser observados os contatos intermoleculares, obtida a energia de acoplamento e avaliada a afinidade de interação com o receptor ou proteína (RENUGA et al., 2015).

O objetivo do *docking* é encontrar a melhor configuração dentro do sítio de ligação do receptor, trazendo também informações físico-químicas das interações moleculares. Quando o acoplamento proteína-ligante é explicitamente explicado em simulações de *docking*, também é possível obter informações úteis sobre como a alteração conformacional coordenada de um ligante e uma proteína pode facilitar o encaixe (WONG, 2008), fenômeno frequentemente referido na literatura como *induced fit* (KOSHLAND, 1958; HONG et al., 2017). Nesse processo de *docking* que ocorre através do modelo de encaixe induzido, o ligante é capaz de gerar uma mudança conformacional no receptor para que eles se adaptem durante o reconhecimento molecular. Durante o processo, o ligante é colocado em várias posições iniciais diferentes e tanto o encaixe geométrico quanto as energias de interação são avaliadas, e os complexos resultantes comparados e ranqueados (KITCHEN et al., 2004).

Dentre as ferramentas básicas para a execução de uma simulação de *docking* estão o algoritmo de busca conformacional e a função *escore* de energia (GUEDES et al., 2013). Os algoritmos de busca exploram o perfil de energia livre para encontrar o melhor modo de ligação (posicionamento) do ligante dentro do sítio ativo do receptor, enquanto as funções de *escore* avaliam a qualidade do modo de ligação e selecionam os complexos que correspondem às conformações mais relevantes (SILVA, 2015).

As simulações de *docking* molecular dependem da execução de um *software* em um computador que possua o sistema operacional Windows ou Linux, para tentar formar a estrutura da intrincada combinação entre a macro e micromolécula em

estudo. Embora exista uma grande quantidade de *softwares* a serem empregados nas simulações de *docking* molecular, eles são diferentes em sua função ou precisão.

O pacote AutoDock Vina, utilizado neste trabalho, é sem dúvida um dos programas de código aberto mais utilizados, provavelmente devido à sua facilidade de uso, rapidez e alta precisão (80%) (EBERHARDT et al., 2021, LIU et al., 2018).

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, K., CONDUCT, L., HUNG, A., & KASAPIS, S. (2021). Binding parameters and molecular dynamics of β -lactoglobulin-vanillic acid complexation as a function of pH – Part A: Acidic pH. **Food Chemistry**, 360, 130059. doi:10.1016/j.foodchem.2021.13005
- ALLAHDAD, Z., KHAMMARI, A., KARAMI, L., GHASEMI, A., SIROTKIN, V. A., HAERTLÉ, T., & SABOURY, A. A. (2020). Binding studies of crocin to β -Lactoglobulin and its impacts on both components. **Food Hydrocolloids**, 106003. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106003
- AUVRAY, M., & SPENCE, C. (2008). The multisensory perception of flavor. **Consciousness and Cognition**, 17(3), 1016–1031. doi:10.1016/j.concog.2007.06.005
- ARYA, S. S., ROOKES, J. E., CAHILL, D. M., & LENKA, S. K. (2021). Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. **Advances in Traditional Medicine**, 21(3), 1–17. doi:10.1007/s13596-020-00531-w
- AVIAT, F., LEVITT, A., STAMM, B., MADAY, Y., REN, P., PONDER, J. W., ... PIQUEMAL, J.-P. (2016). Truncated Conjugate Gradient: An Optimal Strategy for the Analytical Evaluation of the Many-Body Polarization Energy and Forces in Molecular Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 13(1), 180–190. doi:10.1021/acs.jctc.6b00981
- BARBIROLI, A., IAMETTI, S., BONOMI, F. Beta-Lactoglobulin as a Model Food Protein: How to Promote, Prevent, and Exploit Its Unfolding Processes. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1131, 2022. doi: 10.3390/molecules27031131
- BANERJEE, G., & CHATTOPADHYAY, P. (2018). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. doi:10.1002/jsfa.9303
- BEZERRA, D. P., SOARES, A. K. N., & DE SOUSA, D. P. (2016). Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/9734816
- BOLHUIS, D. P., LAKEMOND, C. M. M., DE WIJK, R. A., LUNING, P. A., & DE GRAAF, C. (2012). Effect of salt intensity in soup on ad libitum intake and on subsequent food choice. **Appetite**, 58(1), 48–55. doi:10.1016/j.appet.2011.09.001
- CARVALHO, I., PUPO, M. T., BORGES, Á. D. L., & BERNARDES, L. S. C. (2003). Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, 26(3), 428–438. doi:10.1590/s0100-40422003000300023

- CHANPHAI, P., & TAJMIR-RIahi, H. A. (2020). Locating the binding sites of citric acid and gallic acid on milk β -lactoglobulin. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 1–6. doi:10.1080/07391102.2020.1784290
- CHANPHAI, P., BOURASSA, P., KANAKIS, C. D., TARANTILIS, P. A., POLISSIOU, M. G., & TAJMIR-RIahi, H. A. (2018). Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. **Food Hydrocolloids**, 77, 322–328. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.10.008
- CHENG, J., LIU, J.-H., PRASANNA, G., & JING, P. (2017). Spectrofluorimetric and molecular docking studies on the interaction of cyanidin-3- O -glucoside with whey protein, β -lactoglobulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 105, 965–972. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.11
- CICILIATO, M.P.; DE SOUZA, M.C.; TARRAN, C.M.; DE CASTILHO, A.L.T.; VIEIRA, A.J.; ROZZA, A.L. (2022). Anti-Inflammatory Effect of Vanillin Protects the Stomach against Ulcer Formation. **Pharmaceutics**, 14, 755. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040755>
- CIRIMINNA, R., FIDALGO, A., MENEGUZZO, F., PARRINO, F., ILHARCO, L. M., & PAGLIARO, M. (2019). Cover Feature: Vanillin: The Case for Greener Production Driven by Sustainability Megatrend (ChemistryOpen 6/2019). **ChemistryOpen**, 8(6), 658–658. doi:10.1002/open.201900163
- CRAMER, C. J. (2004). *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. Wiley: Weinheim, Germany.
- CROWTHER, J. M., JAMESON, G. B., HODGKINSON, A. J., & DOBSON, R. C. J. (2016). Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin. **Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects**. doi:10.5772/62992
- CULBERTSON, J.D.; HUI, YIU H. (2005). *Handbook of food science, technology, and engineering*. Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group.
- DAVIS, S.R., WARD, H.E., KELLY, V. ET AL. (2022). Screening for phenotypic outliers identifies an unusually low concentration of a β -lactoglobulin B protein isoform in bovine milk caused by a synonymous SNP. **Genet Sel Evol** 54, 22. doi: 10.1186/s12711-022-00711-z
- DE AZEVEDO, M. B. M., & GREENE, A. E. (1995). Chiral Enol Ethers in Asymmetric Synthesis: Preparation of the β -Oxygenated Lactones (-)-Blastmycinolactol, (+)-Blastmycinone, (-)-NFX-2, and (+)-Antimycinone. **The Journal of Organic Chemistry**, 60(15), 4940–4942. doi:10.1021/jo00120a048
- DROR, R. O., DIRKS, R. M., GROSSMAN, J. P., XU, H., & SHAW, D. E. (2012). Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. **Annual Review of Biophysics**, 41(1), 429–452. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155245

- DUNN, J. D., REID, G. E., & BRUENING, M. L. (2009). Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, n/a–n/a. doi:10.1002/mas.20219
- EBERHARDT, J., SANTOS-MARTINS, D., TILLACK, A. F., & FORLI, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 61(8), 3891–3898. doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203
- ELUMALAI, P., ATKINS, P., DE PAULA J.(2010). Atkins' Physical Chemistry. Oxford University Press, Oxford, 9th ed.
- EVOLI, S., GUZZI, R., & RIZZUTI, B. (2014). Molecular simulations of β -lactoglobulin complexed with fatty acids reveal the structural basis of ligand affinity to internal and possible external binding sites. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 82(10), 2609–2619. doi:10.1002/prot.24625
- FAUSTINO., P. L., CUNHA B., BARBOSA C. A., MACHADO A. M. V., PIRES D. V., RIBEIRO A. F. (2018) In silico structural characterization of recombinant protein Neuraminidase-RFP. **Sinapse Múltipla**, 7(2), dez., 81-94, 2018.
- FENG, T., LI, M., ZHOU, J., ZHUANG, H., CHEN, F., YE, R., FANG, Z. (2015). Application of molecular dynamics simulation in food carbohydrate research -a review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 31, 1–13. doi: 10.1016/j.ifset.2015.06.015
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. **Blackie Academic & Professional**, London.
- FRENKEL, D., SMIT, B. (2002). Understanding Molecular Simulations: From Algorithms to Applications. **Academic Press**, Fribourg.
- GALLAGE, N. J., & MØLLER, B. L. (2018). Vanilla: The Most Popular Flavour. **Biotechnology of Natural Products**, 3–24. doi:10.1007/978-3-319-67903-7_1
- GENG, S., JIANG, Z., MA, H., WANG, Y., LIU, B., & LIANG, G. (2020). Interaction mechanism of flavonoids and bovine β -lactoglobulin: Experimental and molecular modelling studies. **Food Chemistry**, 312, 126066. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126066
- GENOVESE, A., PIOMBINO, P., GAMBUTI, A., & MOIO, L. (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. **Food Chemistry**, 114(1), 100–107. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.02
- GHALANDARI, B., DIVSALAR, A., SABOURY, A. A., HAERTLÉ, T., PARIVAR, K., BAZL, R., AMANLOU, M. (2014). Spectroscopic and theoretical investigation of oxali–palladium interactions with β -lactoglobulin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 118, 1038–1046. doi:10.1016/j.saa.2013.09.126

- GUEDES, I. A., DE MAGALHÃES, C. S., & DARDENNE, L. E. (2013). Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, 6(1), 75–87. doi:10.1007/s12551-013-0130-2
- GUICHARD, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. **Food Reviews International**, 18(1), 49–70. doi:10.1081/fri-120003417
- GUICHARD, E. (2006). Flavour retention and release from protein solutions. **Biotechnology Advances**, 24(2), 226–229. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.11.
- HARAGUCHI, F. K., ABREU, W. C. DE, & PAULA, H. DE. (2006). Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, 19(4), 479–488. doi:10.1590/s1415-52732006000400007
- HASEL, W., HENDRICKSON, T. F., & STILL, W. C. (1988). A rapid approximation to the solvent accessible surface areas of atoms. **Tetrahedron Computer Methodology**, 1(2), 103–116. doi:10.1016/0898-5529(88)90015-2
- HENG, L.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; VINCKEN, J. P.; ROOZEN, J. P.; VORAGEN, A. G. J. Protein-flavour interactions in relation to development of novel protein foods. **Trends in Food Science & Technology** 2004, 15, 217-224.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RAMOS, M., RECIO, I., & AMIGO, L. (2006). Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. **Journal of Chromatography A**, 1116(1-2), 31–37. doi: 10.1016/j.chroma.2006.03.006
- HÖLTJE, H., SIPPL, W., ROGNAN, D., FOLKERS, G. (2003). Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. **Wiley VCH**; 2nd Edition.
- HONG, C. M., KAPHAN, D. M., BERGMAN, R. G., RAYMOND, K. N., & TOSTE, F. D. (2017). Conformational Selection as the Mechanism of Guest Binding in a Flexible Supramolecular Host. **Journal of the American Chemical Society**, 139(23), 8013–8021. doi: 10.1021/jacs.7b03812
- HUANG, Y., CHEN, W., WALLACE, J. A., & SHEN, J. (2016). All-Atom Continuous Constant pH Molecular Dynamics with Particle Mesh Ewald and Titratable Water. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 12(11), 5411–5421. doi: 10.1021/acs.jctc.6b00552
- IAMETTI, S., GREGORI, B., VECCHIO, G., & BONOMI, F. (1996). Modifications Occur at Different Structural Levels During the Heat Denaturation of β -Lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, 237(1), 106–112. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0106n.x
- JAMESON, G. B., ADAMS, J. J., & CREAMER, L. K. (2002). Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, 12(4), 319–329. doi:10.1016/s0958-6946(02)00028-6

- JIA, J., GAO, X., HAO, M., & TANG, L. (2017). Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods. **Food Chemistry**, 228, 143–151. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.13
- KHOSRAVI, I., & HEIDARI-KOHOLI, Z. (2015). In Silico Study on the Interaction of Thiazolidinediones and β -Lactoglobulin by Molecular Dynamics and Docking Approach. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, 54(9), 1042–1052. doi:10.1080/00222348.2015.1061883
- KHOSRAVI, I., & SAHIHI, M. (2014). Computational Studies on the Interaction of Arctiin and Liquiritin With β -lactoglobulin. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, 53(9), 1591–1600. doi:10.1080/00222348.2014.946844
- KITCHEN, D. B., DECORNEZ, H., FURR, J. R., & BAJORATH, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3(11), 935–949. doi:10.1038/nrd1549
- KONTOPIDIS, G., HOLT, C., & SAWYER, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. **Journal of Dairy Science**, 87(4), 785–796. doi:10.3168/jds.s0022-0302(04)73222-1
- KOSHLAND, D. E. (1995). The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 33(2324), 2375–2378. doi:10.1002/anie.199423751
- KUMAR, H., CHATTOPADHYAY, A., PRASATH, R., DEVARAJI, V., JOSHI, R., BHAVANA, P., GHOSH, S. K. (2014). Design, Synthesis, Physicochemical Studies, Solvation, and DNA Damage of Quinoline-Appended Chalcone Derivative: Comprehensive Spectroscopic Approach toward Drug Discovery. **The Journal of Physical Chemistry B**, 118(26), 7257–7266. doi:10.1021/jp5025262
- LAND, D. G. (1996). Perspectives on the Effects of Interactions on Flavor Perception: An Overview. **Flavor-Food Interactions**, 2–11. doi:10.1021/bk-1996-0633.ch001
- LAKOWICZ, J.R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd Edition, Plenum Press, New York.
- LEACH, A. R. (2001). Molecular modelling: Principles and applications. **Harlow, England: Prentice Hall.**
- LI, J.-M., LEE, Y.-C., LI, C.-C., LO, H.-Y., CHEN, F.-Y., CHEN, Y.-S., HO, T.-Y. (2018). Vanillin-Ameliorated Development of Azoxymethane/Dextran Sodium Sulfate-Induced Murine Colorectal Cancer: The Involvement of Proteasome/Nuclear Factor- κ B/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 66(22), 5563–5573. doi:10.1021/acs.jafc.8b01582

- LIU, Z., LIU, Y., ZENG, G., SHAO, B., CHEN, M., LI, Z., ZHONG, H. (2018). Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, 203, 139–150. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03
- LOCH, J. I., BARCISZEWSKI, J., SLIWIAK, J., BONAREK, P., WROBEL, P., POKRYWKA, K., SHABALIN, I. G., MINOR, W., JASKOLSKI, M. & LEWINSKI, K. (2022). New ligand-binding sites identified in the crystal structures of β -lactoglobulin complexes with desipramine. **IUCrJ**, 9, Part 3, 386-398. doi:10.1107/S2052252522004183
- LUO, R., DAVID, L., & GILSON, M. K. (2002). Accelerated Poisson-Boltzmann calculations for static and dynamic systems. **Journal of Computational Chemistry**, 23(13), 1244–1253. doi:10.1002/jcc.10120
- MARSHALL, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**. 9(2):136–156.
- MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, p. 413-452, 2007.
- MEHRABAN, M. H., ODOOLI, S., YOUSEFI, R., ROGHANIAN, R., MOTOVALI-BASHI, M., MOOSAVI-MOVAHEDI, A.-A., & GHASEMI, Y. (2016). The interaction of beta-lactoglobulin with ciprofloxacin and kanamycin; a spectroscopic and molecular modeling approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 35(9), 1968–1978. doi:10.1080/07391102.2016.1203819
- MEYNIER, A., RAMPON, V., DALGALARRONDO, M., & GENOT, C. (2004). Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. **International Dairy Journal**, 14(8), 681–690. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.01.003
- MITCHELL, D. J., KAHN, B. E., & KNASKO, S. C. (1995). There's Something in the Air: Effects of Congruent or Incongruent Ambient Odor on Consumer Decision Making. **Journal of Consumer Research**, 22(2), 229. doi:10.1086/209447
- MOHAMAD YUSOF, N. N., TANIOKA, E., & KOBAYASHI, T. (2014). Molecularly imprinted polymer particles having coordinated hydrogen bonding in covalent-imprinting for efficient recognition towards vanillin. **Separation and Purification Technology**, 122, 341–349. doi:10.1016/j.seppur.2013.11.028
- MOHAMMADI, F., SAHIHI, M., & BORDBAR, A. K. (2015). Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of two curcuminoids with β -lactoglobulin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 140, 274–282. doi:10.1016/j.saa.2014.12.032
- MONAJJEMI, M.; OLIAEY, AR. (2009). Gyration Radius and Energy Study at Different Temperatures for Acetylcholine Receptor Protein in Gas Phase by Monte Carlo, Molecular and Langevin Dynamics Simulations. **Journal of**

Physical and Theoretical Chemistry, [s. l.], v. 5, p. 195–201. Disponível em: <<http://jptc.srbiau.ac.ir/archive/v5n4/4.pdf>>

- NADEAU, O. W., & CARLSON, G. M. (2011). A Review of Methods Used for Identifying Structural Changes in a Large Protein Complex. **Allostery**, 117–132. doi:10.1007/978-1-61779-334-9_7
- NAMBA, A. M., SILVA, V. B. DA, & SILVA, C. H. T. P. DA. (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, 33(4), 13–24. doi:10.1590/s0100-46702008000400002
- NEGOIAS, S., VISSCHERS, R., BOELRIJK, A., & HUMMEL, T. (2008). New ways to understand aroma perception. **Food Chemistry**, 108(4), 1247–1254. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.03
- O'MAHONY, J. A., & FOX, P. F. (2012). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. **Advanced Dairy Chemistry**, 43–85. doi:10.1007/978-1-4614-4714-6_2
- OLIVEIRA, E. B. (2009). Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonóides catalysées par des lipases: influence des structures de la lipase et du flavonoïde sur la régiosélectivité de la bioconversion. 203 f. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- OLIVEIRA, T. V. (2020). Estudos *in silico* e *in vitro* sobre bases estruturais de propriedades tecnológicas de proteínas e peptídeos do leite bovino. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.
- 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(13), 1656–1676. doi:10.1002/jcc.20090
- OUYANG, Y., BEHNKE, C., ALMANZA, B., & GHISELLI, R. (2017). The Influence of Food Aromas on Restaurant Consumer Emotions, Perceptions, and Purchases. **Journal of Hospitality Marketing & Management**, 27(4), 405–423. doi:10.1080/19368623.2017.1374225
- OVERBOSCH, P., AFTEROF, W. G. M., & HARING, P. G. M. (1991). Flavor release in the mouth. **Food Reviews International**, 7(2), 137–184. doi:10.1080/87559129109540906
- PASCUTTI P. G. (2002). Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular v. 1, p. 1-38. In: Pedro G Pascutti.
- PAVONI, J. F., NEVES-JUNIOR, W. F. P., SPIROPULOS, M. A., & ARAÚJO, D. B. DE. (2014). Uma montagem experimental para a medida de fluorescência.

Revista Brasileira de Ensino de Física, 36(4). doi:10.1590/s1806-11172014000400018

- PIECZYWEK, P. M., KOZIOŁ, A., PŁAZIŃSKI, W., CYBULSKA, J., & ZDUNEK, A. (2020). Resolving the nanostructure of sodium carbonate extracted pectins (DASP) from apple cell walls with atomic force microscopy and molecular dynamics. **Food Hydrocolloids**, 105726. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105726
- POBLETE, S., BOTTARO, S., & BUSSI, G. (2018). Effects and limitations of a nucleobase-driven backmapping procedure for nucleic acids using steered molecular dynamics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 498(2), 352–358. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.057.
- QIN, B. Y., JAMESON, G. B., BEWLEY, M. C., BAKER, E. N., & CREAMER, L. K. (2008). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. **Protein Science**, 8(1), 75–83. doi:10.1110/ps.8.1.75
- RADULOVIC, N., DORDEVIC, N., MARKOVIC, M., PALIC, R. (2010). Volatile constituents of *Glechoma hirsuta* Waldst. & Kit. and *G. hederacea* L. (*Lamiaceae*). **Bull Chem Soc Ethiop** 24: 67- 76.
- RAMAEKERS, M. G., LUNING, P. A., RUIJSCHOP, R. M. A. J., LAKEMOND, C. M. M., BULT, J. H. F., GORT, G., & VAN BOEKEL, M. A. J. S. (2013). Aroma exposure time and aroma concentration in relation to satiation. **British Journal of Nutrition**, 111(03), 554–562. doi:10.1017/s0007114513002729
- REINECCIUS, G. (2018). Use of proteins for the delivery of flavours and other bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.01.039
- REINECCIUS, G. A. (2022). Flavor interactions with proteins. **Current Opinion in Food Science**, Volume 47,100884, ISSN 2214-7993. doi:10.1016/j.cofs.2022.100884.
- RENUGA PARAMESWARI, A., RAJALAKSHMI, G., & KUMARADHAS, P. (2015). A Combined molecular docking and charge density analysis is a new approach for medicinal research to understand drug–receptor interaction: Curcumin–AChE model. **Chemico-Biological Interactions**, 225, 21–31. doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.011
- ROMERO-CORTES, T., PÉREZ ESPAÑA, V. H., LÓPEZ PÉREZ, P. A., RODRÍGUEZ-JIMENES, G. D. C., ROBLES-OLVERA, V. J., APARICIO BURGOS, J. E., & CUERVO-PARRA, J. A. (2019). Antifungal activity of vanilla juice and vanillin against *Alternaria alternata*. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 375–383. doi:10.1080/19476337.2019.1586776
- ROSENBERG, M., & SHEU, T.-Y. (1996). Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. **International Dairy Journal**, 6(3), 273–284. doi:10.1016/0958-6946(95)00020-8
- SAKURAI, K., & GOTO, Y. (2002). Manipulating Monomer-Dimer Equilibrium of Bovine β -Lactoglobulin by Amino Acid Substitution. **Journal of Biological Chemistry**, 277(28), 25735–25740. doi:10.1074/jbc.m203659200

- SHAFAEI, Z., GHALANDARI, B., VASEGHI, A., DIVSALAR, A., HAERTLÉ, T., SABOURY, A. A., & SAWYER, L. (2017). β -Lactoglobulin: An efficient nanocarrier for advanced delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 13(5), 1685–1692. doi: 10.1016/j.nano.2017.03.007
- SHARPE, A. H. (2017). Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy. **Immunological Reviews**, 276(1), 5–8. doi:10.1111/imr.12531
- SORIN, E. J., & PANDE, V. S. (2005). Exploring the Helix-Coil Transition via All-Atom Equilibrium Ensemble Simulations. **Biophysical Journal**, 88(4), 2472–2493. doi:10.1529/biophysj.104.051938
- TAI, A., SAWANO, T., YAZAMA, F., & ITO, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810(2), 170–177. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.11.004
- TERTA, M., BLEKAS, G., & PARASKEVOPOULOU, A. (2006). Retention of selected aroma compounds by polysaccharide solutions: A thermodynamic and kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, 20(6), 863–871. doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.08.011
- TROMELIN, A., ANDRIOT, I. & GUICHARD, E. (2006). Protein-flavour interactions. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), **Flavour in food** (pp. 172-207). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- VALEUR, B. (2002) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1st edn , **Wiley - VCH Verlag GmbH** , Weinheim.
- VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A. E., & BERENDSEN, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, 26(16), 1701–1718. doi:10.1002/jcc.20291
- VAN RUTH, S. M., & ROOZEN, J. P. (2010). Delivery of Flavours from Food Matrices. **Food Flavour Technology**, Taylor A. J., Ed.; Sheffield Academic Press Ltd 190–206. doi: 10.1002/9781444317770.ch7
- VEGARUD GE, LANGSRUD T, SVENNING C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. **Br J Nutr.**84:S91–8
- VERDONK, M. L., GIANGRECO, I., HALL, R. J., KORB, O., MORTENSON, P. N., & MURRAY, C. W. (2011). Docking Performance of Fragments and Druglike Compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, 54(15), 5422–5431. doi:10.1021/jm200558u
- VERLI, H. (2014). *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. 1. ed. São Paulo: [s.n.].

- VISENTINI, F. F., SPONTON, O. E., PEREZ, A. A., & SANTIAGO, L. G. (2017). Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. **Food Hydrocolloids**, 67, 130–138. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.027
- VISSCHERS, R. W., JACOBS, M. A., FRASNELLI, J., HUMMEL, T., BURGERING, M., & BOELRIJK, A. E. M. (2006). Cross-Modality of Texture and Aroma Perception Is Independent of Orthonasal or Retronasal Stimulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(15), 5509–5515. doi:10.1021/jf060533c
- WALLACE, M. T. (2015). Multisensory Perception: The Building of Flavor Representations. **Current Biology**, 25(20), R986–R988. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.009
- WANG, C., ZHOU, X., WANG, H., SUN, X., & GUO, M. (2019). Interactions between β -Lactoglobulin and 3,3'-Diindolylmethane in Model System. **Molecules**, 24(11), 2151. doi:10.3390/molecules24112151
- WARSHEL, A. (2002). Molecular Dynamics Simulations of Biological Reactions. **Accounts of Chemical Research**, 35(6), 385–395. doi:10.1021/ar010033z
- WEERAWATANAKORN, M., WU, J. C., PAN, M. H., & HO, C. T. (2015). Reactivity and stability of selected flavor compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, 23(2), 176–190. doi: 10.1016/j.jfda.2015.02.001
- WILDE, S. C., KEPPLER, J. K., PALANI, K., & SCHWARZ, K. (2016). β -Lactoglobulin as nanotransporter for allicin: Sensory properties and applicability in food. **Food Chemistry**, 199, 667–674. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.055
- WONG, R. S. Y., BODART, V., METZ, M., LABRECQUE, J., BRIDGER, G., & FRICKER, S. P. (2008). Comparison of the Potential Multiple Binding Modes of Bicyclam, Monocyclam, and Noncyclam Small-Molecule CXCR4 Chemokine Receptor 4 Inhibitors. **Molecular Pharmacology**, 74(6), 1485–1495. doi:10.1124/mol.108.049775
- XIANG, L.-W., MELTON, L. D., & LEUNG, I. K. H. (2018). Interactions of β -Lactoglobulin With Small Molecules. **Reference Module in Food Science**. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.21488-1
- XU, J., HAO, M., SUN, Q., & TANG, L. (2019). Comparative studies of interaction of β -lactoglobulin with three polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.05
- YI, L., DONG, N., YUN, Y., DENG, B., REN, D., LIU, S., & LIANG, Y. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, 914, 17–34. doi: 10.1016/j.aca.2016.02.001
- YIN, W., HEWSON, L., LINFORTH, R., TAYLOR, M., & FISK, I. D. (2017). Effects of aroma and taste, independently or in combination, on appetite sensation and subsequent food intake. **Appetite**, 114, 265–274. doi: 10.1016/j.appet.2017.04.005

- ZHAN, F., DING, S., XIE, W., ZHU, X., HU, J., GAO, J., CHEN, Y. (2020). Towards understanding the interaction of β -lactoglobulin with capsaicin: multi-spectroscopic, thermodynamic, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches. **Food Hydrocolloids**, 105767. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105767
- ZHANG, S., & MUELLER, C. (2012). Comparative Analysis of Volatiles in Traditionally Cured Bourbon and Ugandan Vanilla Bean (*Vanilla planifolia*) Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60(42), 10433–10444. doi:10.1021/jf302615s
- ZHANG, L., SAHU, I. D., XU, M., WANG, Y., & HU, X. (2017). Effect of metal ions on the binding reaction of (-)-epigallocatechin gallate to β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, 221, 1923–1929. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.15
- ZHOU, Q., LEE, S.-Y. & CADWALLADER, K.R. (2006). Inverse gas chromatographic evaluation of the influence of soy protein on the binding of selected butter flavor compounds in a wheat soda cracker system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5516-5520.
- ZHU, J., LI, K., WU, H., LI, W., & SUN, Q. (2020). Multi-spectroscopic, conformational, and computational atomic-level insights into the interaction of β -lactoglobulin with apigenin at different pH levels. **Food Hydrocolloids**, 105810. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105810

CAPÍTULO 2.

A combined spectroscopic and computational molecular docking investigation on the coupling between β -lactoglobulin dimers and vanillin.

Manuscript prepared and submitted to Food Biophysics
(Submission ID cc659792-49b2-4200-be64-c2c41102e688)

ABSTRACT

Protein–flavor interactions may influence flavor perception in food products and, therefore, they need to be deeply understood, at the molecular scale. We investigated the coupling between the bovine whey protein β -lactoglobulin (β -lg) and the vanillin (VAN), the main compound present in the flavor vanilla, at pH 7.1 (which is representative of close-to-neutral food formulations). Fluorescence quenching data showed that the static quenching mechanism was predominant in the β -lg/vanillin complexes formation, and allowed estimating its thermodynamic parameters $\Delta H_{VAN/\beta\text{-lg}} = -30.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta S_{VAN/\beta\text{-lg}} = -45.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, and $\Delta G_{VAN/\beta\text{-lg}}$ ranging from -16.9 to $-16.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, showing that the β -lg-VAN complexation was spontaneous and enthalpically driven, with the involvement of both hydrogen bonding and hydrophobic interactions, and only one site needed to promote the β -lg/vanillin complexes formation. *In silico* molecular docking assays were undertaken to identify the specific binding sites and to verify the nature of intermolecular interactions between β -lg and VAN. At pH 7.1, β -lg forms dimers in aqueous medium, and this important fact was considered. Molecular docking results showed that vanillin may bind to two possible sites: A-site (interface between the two β -lg monomers) and B-site (β -barrel entrance of β -lg). The conjoint analysis of *in vitro* and *in silico* findings indicated that the B-site is more likely to be the binding site of β -lg for the vanillin molecule. Indeed, while in the A-site hydrogen bonds seemed to be stronger, in the B-site there was a balance between the presence of hydrogen bonds, electrostatic interactions, and hydrophobic interactions, in particular involving aromatic amino acid residues. The β -lg amino acid residues involved in these interactions were Trp19, Tyr20, Val43, Glu44, Leu156, Glu157, and His161.

KEYWORDS: *In silico* molecular modelling. Molecular spectroscopy. Protein-flavor interaction. Whey proteins.

1. INTRODUCTION

Flavor is one of the most determinant factors for the acceptance of foods, and it plays an important role in consumer satisfaction [1,2]. The combined responses of our cognitive processing and senses are responsible for the complete flavor involvement when tasting food. Thus, the perception of taste (attributed to non-volatile compounds), aroma (related to volatile compounds), and chemesthesis (i.e., the sensitivity of mucosal surfaces to environmental chemicals) are the most important factors related to flavor perception [3].

Vanilla (Fig 1a) is a worldwide appreciated flavor and probably the most popular known plant-derived flavor, native to mature pods of the orchid *Vanilla planifolia* [4]. The main substance of vanilla extract is vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), which may also be chemically synthesized from guaiacol [5]. Besides its flavor properties, vanillin molecules may present diverse bioactivities, such as anticancer [6], anti-inflammatory [7], and antibiotic [8]. The presence of reactive functional groups (carbonyl, phenolic hydroxyl, and ether) in flavor compounds affects their chemical reactivity, making them susceptible to chemical transformations, such as oxidation, hydrolysis, or even oligomerization, during processing and storage, resulting in the loss of their odorant properties [9]. However, when flavor molecules are coupled with proteins, flavor retention and/or their release rates may be extended, which contributes to preserving desirable sensory properties [10]. Hence, studies on interactions between proteins and flavor compounds have suggested that the flavor/protein coupling in food products may positively impact the flavor profile of foods [11].

β -lactoglobulin (β -lg; Figure 1b) is the predominant protein in bovine whey. It is a member of the lipocalin family (Li et al., 2013), composed of 162 residues of amino acids, with a molecular mass of \sim 18.4 kDa and isoelectric point (pI) at pH \sim 5.2 [12]. Although the biological function of β -lactoglobulin remains a debated topic, lipocalins share structural motifs giving rise to the ability of β -lactoglobulin to bind to small hydrophobic ligands, as it carries fatty acid molecules in the milk of several mammals [13]. In an aqueous medium, β -lg may be present in different oligomerization states, depending on the pH. At close-to-neutral pH, β -lg may be comprised of homodimers, while at pH < 5.0, it may be present as a monomer-dimer equilibrium. On the other hand, at pH < 3.0, it may be predominantly a monomer [14, 15, 16]. More than 200 different compounds have been reported to bind to β -lg [17],

especially small hydrophobic molecules, including aromatic compounds, polyphenols [18], drugs [19], and fatty acids [20]. Even though within the pH range 5.0-7.0 (which encompasses the pH of many food products containing whey proteins), the β -lg forms homodimers, most of the literature reports dealt with β -lg monomers [21, 22, 23, 24, 25]. Consequently, identifying the binding sites for a given molecule onto this protein may perhaps be inaccurate, and such mistaken conclusions may lead to incorrect technological decisions when exploring β -lg as a putative flavor carrier.

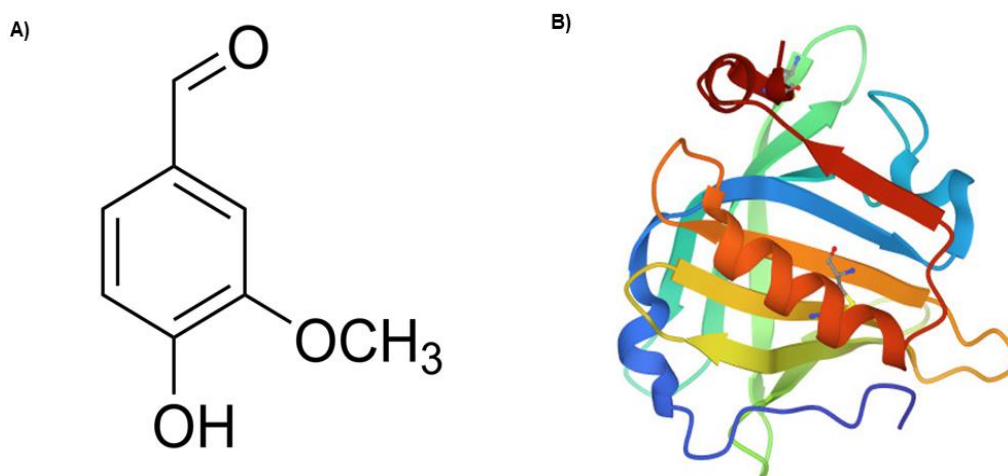


Figure 1- A) Molecular structure of vanillin. B) Ribbons representation of the crystal structure of bovine monomer taken from the RCSB protein data bank (PDB ID:3NPO).

Therefore, in the present work, we sought to understand, at the molecular scale, the coupling between β -lg and vanillin molecules, at pH 7.1, through fluorescence spectroscopy and *in silico* molecular docking calculations. One noteworthy novelty of this study is that the dimeric state of β -lg at pH 7.1 was considered. Indeed, this was not the case in most of the studies we found dealing with β -lg/ligands interactions, as they considered this protein as monomers regardless of the pH investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In vitro* experiments

2.1.1. Materials

β -lg protein (A variant, purity $\geq 90\%$), vanillin (99.9% purity), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (St-Louis, MO, USA). Deionized water (Reference A+, Millipore, Italy; electrical resistivity next to $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, at 25°C) was used in all experiments to prepare the dispersions.

2.1.2. Fluorescence spectroscopy analyses

Fluorescence spectroscopy measurements were performed in a fluorescence spectrometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA), at four different temperatures (295, 298, 300, and 302 K), according to previous reports [26, 24, 27], with some adaptations. β -lg solution was formulated in a phosphate buffer stock solution (50 mM, pH 7.1). Vanillin was dissolved with DMSO (2%) and then diluted in a phosphate buffer stock solution. To form the vanillin/ β -lg complexes, the concentration of β -lg was kept constant at $25 \mu\text{M}$ while the vanillin concentration ranged between 0-100 μM (100, 50, 25, 20, 12.5, and 6.25 μM). The fluorescence spectra were recorded at 290-450 nm. The excitation wavelength was set at 280 nm to excite only tryptophan and tyrosine residues.

Eq. 1 was then used to eliminate the inner-filter effect from the collected data to estimate the correct fluorescence [28,29]:

$$F_{corr} = F_{obs} \exp^{-2,303 \cdot \epsilon \cdot l \cdot [VAN]} \quad (1)$$

In Eq. (1), F_{corr} is the corrected fluorescence, F_{obs} is the experimental fluorescence, ϵ is the molar extinction coefficient of the ligand at 280 nm, l is the path length, and $[VAN]$ is the vanillin concentration. The ϵ was estimated for vanillin, in the buffer and at the wavelength described earlier in this section, by the slope of the absorbance curve versus the ligand concentration.

Then, the Stern-Volmer equation (Eq. (2)) was utilized to assess the fluorescence quenching mechanism. In addition, to estimate the binding constant ($K_{VAN/\beta-lg}$) and the number of vanillin binding sites on the β -lg dimer (n), the double-reciprocal equation Eq. (6) was used:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [VAN] = 1 + K_{SV} \cdot [VAN] \quad (2)$$

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_{VAN/\beta-lg} + n \cdot \log [VAN] \quad (3)$$

In Eq. (2) and (3), F_0 and F (dimensionless) are the fluorescence intensity without and with the quencher, respectively; k_q ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$) is the biomolecular quenching rate constant; $[VAN]$ (μM) is the vanillin (quencher) concentration; K_{SV} ($L \cdot mol^{-1}$) is the Stern-Volmer quenching constant; $K_{VAN/\beta-lg}$ is the association constant; n is the number of binding sites; and τ_0 (ns) is the average lifetime of the biomolecule without a quencher – reported to be 1.28 ns for Trp residues of β -lg at neutral pH [30,31,32].

To obtain the $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ (entropy change) and $\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ (enthalpy change) in the complexation between vanillin molecules and the β -lg dimer, the Van't Hoff equation [33], Eq. (4), was used at four different temperatures:

$$\ln K_{VAN/\beta-lg} = - \frac{\Delta H_{VAN/\beta-lg}}{RT} + \frac{\Delta S_{VAN/\beta-lg}}{R} \quad (4)$$

In Eq. (4), R and T are the gas constant ($8.314 J \cdot mol^{-1} L^{-1}$) and the experimental absolute temperature (K), respectively.

Then, the ΔG (free energy change in the complexation between vanillin molecules and the β -lg dimer) was calculated by $VAN/\beta-lg$ applying Eq. (5):

$$\Delta G_{VAN/\beta-lg} = \Delta H_{VAN/\beta-lg} - T \Delta S_{VAN/\beta-lg} \quad (5)$$

2.2. *In silico* experiments

2.2.1. Computational Resources

The molecular dynamics simulations were carried out at the Universidade Federal de Viçosa, in “Jupiter Calculation Cluster”, equipped with 1 AMD Opteron™ Processor 6376 (16M cache, 2.3 GHz and 32 colors), 64 GB of RAM, 100 TB of storage

capacity and 24 calculation nodes. All analyses 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.

2.2.2. β -lg and vanillin initial structures

Two crystallographic structures of β -lg were used in this study, and both were taken from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). The dimeric structure (PDB ID: 2Q39) [34] of β -lg available in PDB was incomplete, lacking some amino acid residues. Therefore, this dimer crystal was used as template for the insertion, by superposition, of two monomers of the complete β -lg crystal (PDB ID: 3NPO) [35]. After this superposition, the 2Q39 structure was deleted, and the resulting dimer was used in all subsequent molecular modeling assays. The protonation state of protein residues, around neutrality, was the same obtained from the PDB structure (PDB ID: 2Q39), and the non-polar hydrogens were added according to the force field Gromos 53a6 parameters. The structure of the vanillin was prepared manually using the software Avogadro, Version 1.1.2. Their tridimensional structures were obtained through Discovery Studio Visualizer (v17. 2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia), each molecule was first pre-optimized with the molecular mechanical force field (MMFF).

2.2.3. β -lg dimer relaxation procedure

To mitigate the impact of crystal packing effects and to minimize the absence of solvation in the target structure (β -lg dimer) during the docking, β -lg three-dimensional structure was submitted to molecular dynamics simulation using the GROMACS 2018 package, equipped with the GROMOS53A6 force field [36]. The protein was centered in a dodecahedral box (with 1.4 nm between the protein and the box edges) with periodic boundary conditions. The box volume was 842.20 nm³ which was filled with SPC water models. In addition, the system was neutralized by Na⁺ and Cl⁻ enough for creating a saline concentration of 0.15 mol·L⁻¹ (92 Na⁺ and 76 Cl⁻). Then, the system's energy was progressively minimized, by removing gradually the atomic positions restraints. Two sets of *steepest descent* algorithm were run, with maximum converging energy smaller than 10 and 1 kJ mol⁻¹ nm⁻¹, respectively, followed by one set of *conjugate gradient* algorithm with maximum converging energy smaller than 0.1 kJ mol⁻¹nm⁻¹. Next, the system was balanced in a MD run of 1 ns, in the NVT ensemble

(constant number of particles, constant system volume, and constant system temperature), until reaching the temperature of 298 K. After that, the system was equilibrated in 1 bar and 298 K, using several short MD runs in the NPT ensemble (constant number of particles, constant system pressure, and constant system temperature) [37, 38]. Finally, the systems were submitted to a MD production run of 50 ns and using the Verlet leapfrog algorithm for integration of Newton's equations of motion with time step = 2 fs [37]. In all MD runs, the *cutoff* for Lennard-Jones and electrostatic interactions was set as 10 Å.

To validate the constructed receiver structure, after completing these steps, the dimeric structure was analyzed for RMSD, superimposing the resulting protein of the system with the initial crystal, in the software PyMol.

2.2.4. Docking procedure

Docking assays, aiming at computationally calculating the most probable vanillin/ β -lg dimers complexes, were performed based on the methodology described by De Oliveira et al. [38], with some adaptations, using the Autodock Vina package [39]. The biomolecular target taken for these docking assays was the β -lg dimer output at the end of the relaxation procedure detailed in section 2.2.3. Briefly, a blind docking procedure was carried out, without any *a priori* indication of binding sites for vanillin onto the β -lg dimers. This choice aimed to allow the prediction of different putative binding sites for vanillin in the protein structure studied. The calculations were configured with exhaustiveness = 64, a maximum energy range of 2 kcal·mol⁻¹, to obtain 9 independent conformations in triplicate, *i.e.*, 27 poses. To identify intermolecular interactions between VAN and β -lg, all complexes were analyzed with the Discovery Studio Visualizer (v17.2.0.16349, Dassault Systèmes Biovia, free version). The five conformers with greater number and type of intermolecular interactions formed were selected to be examined in detail.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *In vitro* study: fluorescence spectroscopy

Fluorescence emission spectra of β -lg, at pH 7.1, both without and with gradual addition of vanillin (6.25; 12.5; 20; 25; 50 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), at four temperatures (295, 298, 300, or 302 K), are shown in Figure 2. The fluorescence intensity of β -lg alone decreased as the temperature increased, shifting from ~ 5945 a.u. at 295 K, to 5172 a.u. at 302 K. Either alone or in the presence of vanillin, β -lg displayed a maximum fluorescence emission at wavelength (λ_{max}) at 335 nm. It is well-known that the intrinsic fluorescence of proteins originates essentially from aromatic amino acid residues, being tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) the main responsible ones for this phenomenon [40]. Usually, protein-ligand coupling may reduce the intrinsic fluorescence intensity of the protein, and such reduction is dependent on the ligand concentration [41].

In view of this, the basis of β -lg/vanillin coupling, at pH 7.1 and temperatures 295, 298, 300, or 302 K, was further explored by fluorescence emission quenching, aiming to investigate if different concentrations of the vanillin would affect the structure of the protein. Noticeably, as the temperature increased, K_{sv} values (Eq. (2)) decreased (Table 1). Fluorescence quenching analyses are generally undertaken to assess protein–ligand interactions and to evaluate if the tertiary structure of the protein has been affected. The quenching phenomenon is usually classified as dynamic or static [42].

As also presented in figure 2, the increase in vanillin concentration from 0-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ amplified the fluorescence quenching, indicating that the β -lg and vanillin interacted at the pH and temperatures studied. In all cases, k_q values (Table 1) were greater than the maximum diffusion collision quenching constant for dynamic quenching ($2 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), suggesting that the static quenching mechanism was predominant in the β -lg/vanillin complexes formation. In this type of mechanism, a non-fluorescent complex is formed between the fluorophores in the ground state and the quencher [43]. Jia et al. [44] investigated the interaction between three plant polyphenols (chlorogenic acid, ferulic acid, and epigallocatechin-3-gallate) and β -lg and found the same mechanism for the three compounds. On the other hand, in another study by Abdulatif Al-Shabib et al. [45], the molecular interaction of tea catechin with β -lg presented a dynamic quenching mechanism.

Table 1- Quenching constants (K_{sv} and k_q) calculated for the interaction between β -lg and vanillin, at pH = 7.1 and four different temperatures.

T (K)	$K_{sv} \cdot 10^4$ (L·mol ⁻¹)	$k_q \cdot 10^{13}$ (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)	R ²
295	2.03	1.57	0.954
298	1.99	1.55	0.946
300	2.01	1.57	0.944
302	2.00	1.56	0.940

Each β -lg molecule has two Trp residues: Trp19, which is inside the cavity of the barrel, and Trp61, located at the surface [46]. Usually, when temperature increases, proteins may undergo conformational changes, triggering the additional exposure of hydrophobic binding sites and enabling more ligand molecules to interact with them [47,48,49]. However, fluorescence data (Figure 2) showed that the temperature increase did not promote drastic conformational changes in β -lg, since the λ_{max} remained unchanged (335 nm).

The binding constant ($K_{VAN/\beta-lg}$) and the number of vanillin binding sites on the β -lg dimer (n) were calculated from Eq. (3) (Table 2). At each temperature, n values were ≤ 1 , indicating that the β -lg/vanillin complexation is more likely to occur at only one protein binding site. Similar results were also reported for two other molecules having some structural similarity with vanillin – chlorogenic acid and ferulic acid – when interacting with β -lactoglobulin [44].

Table 2-Number of interaction sites (n) and Binding constants ($K_{VAN/\beta-lg}$) calculated for the interaction between β -lg and vanillin, at pH = 7.1, and four different temperatures.

T (K)	n	$K_{VAN/\beta-lg} \cdot 10^4$ (mol ⁻¹ ·L)	R ²
295	0.65	0.09	0.996
298	0.64	0.08	0.995
300	0.63	0.07	0.994
302	0.62	0.07	0.993

The nature of the driving forces involved in β -lg/vanillin complexes formation was also investigated from these fluorescence spectroscopy data. The thermodynamic parameters $\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ and $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ were calculated by plotting the natural logarithm of $K_{VAN/\beta-lg}$ versus T^{-1} and then using Eq. (4). So, $\Delta G_{VAN/\beta-lg}$ values were

calculated by applying the Eq. (5). The values found for these thermodynamic parameters are compiled in Table 3. The $\Delta G_{VAN/\beta-lg}$ values were negative for the four temperatures, indicating that the β -lg/vanillin complexation was spontaneous, at the pH and temperatures conditions of this study. $\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ and $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ values were both negative. In fact, as previously shown in Table 2, the values $K_{VAN/\beta-lg}$ decreased as temperature increased, having already suggested that the β -lg/vanillin coupling was exothermic. Moreover, a negative value for $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ is suggestive that aromatic hydrophobic interactions and hydrogen bonds interactions play a major role in the formation of these complexes, rather than the release of solvation water molecules from the protein surface [50].

Table 3- Thermodynamic parameters ($\Delta H_{VAN/\beta-lg}$, $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$, and $\Delta G_{VAN/\beta-lg}$) calculated for β -lg/vanillin interaction, at pH = 7.1.

T (K)	$\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	$\Delta G_{VAN/\beta-lg}$ (kJ · mol ⁻¹)
295			-16.87
298			-16.59
300	-30.32	-45.82	-16.57
302			-16.53

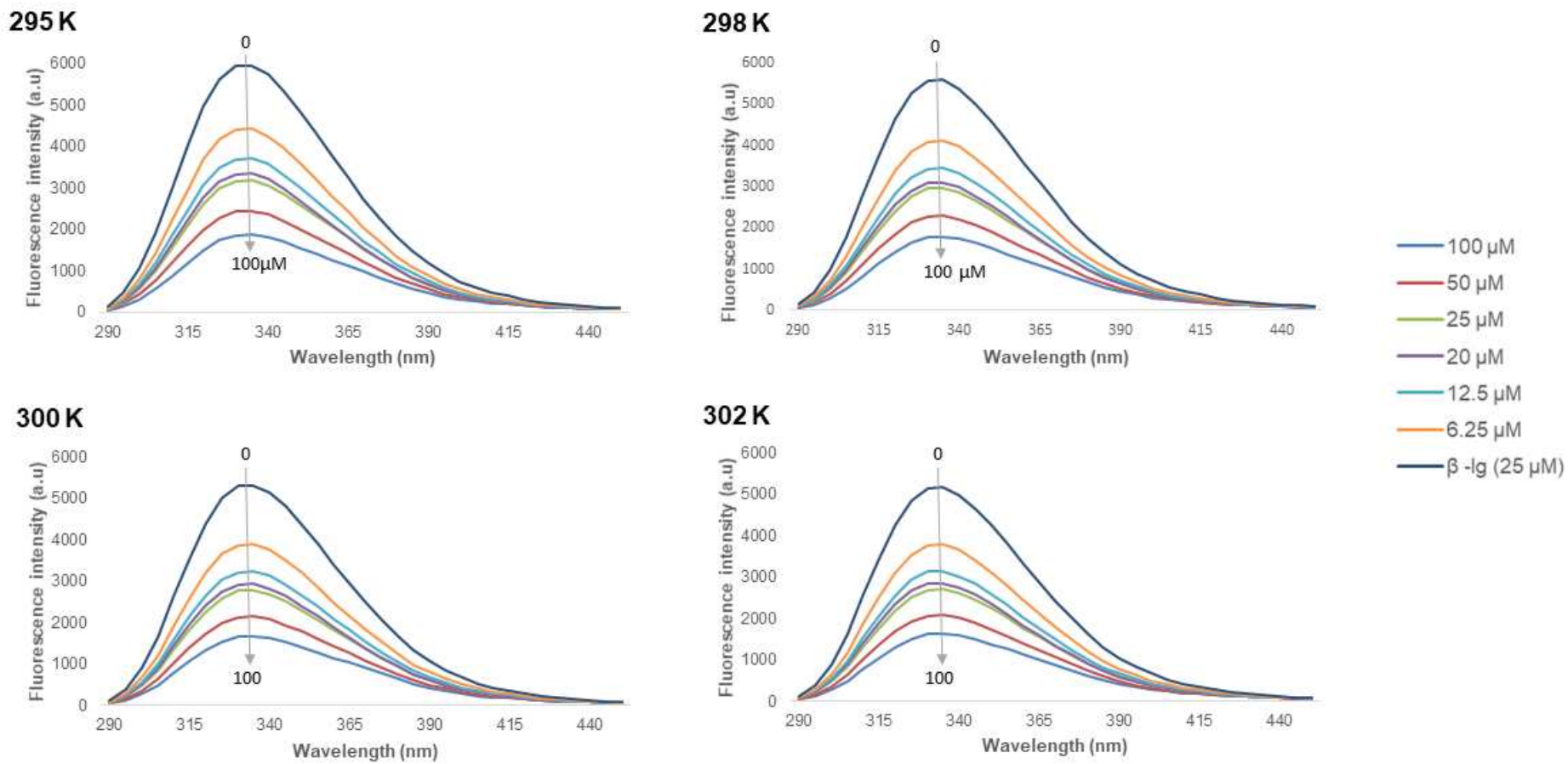


Figure 2- Intrinsic fluorescence spectra of β -lg (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence of vanillin (0–100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), at pH 7.1 and four different temperatures.

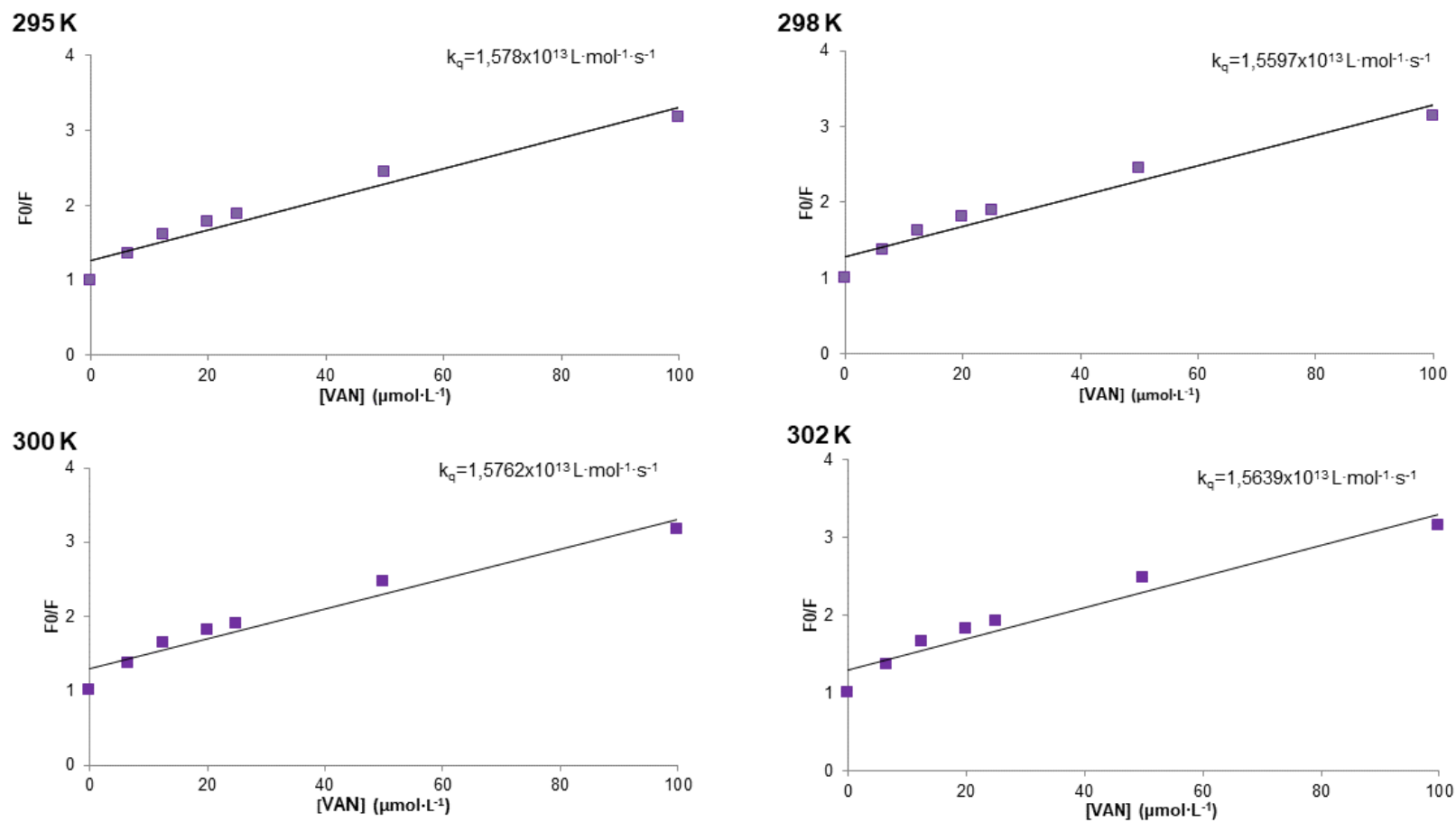


Figure 3-Stern-Volmer plots of β -lg ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence of vanillin ($0-100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), at pH 7.1 and four different temperatures.

In the related literature, negative values for ΔG , ΔH and ΔS have been reported for the complex formation between β -lg and the flavonoids myricetin (aglycon) and baicalin (glycosylated) [26], as well as between this protein and caffeic acid [11]. Also, some authors have documented spontaneous processes ($\Delta G < 0$) with both $\Delta H > 0$ and $\Delta S > 0$ in β -lg/catechin and β -lg/capsaicin complexes formation, indicating that these complexations are endothermic phenomena in which the protein (β -lg) interacts with the ligands by displacing solvation water molecules from the protein surface and forming hydrophobic intermolecular interactions [45,24]. Chanphai & Tajmir-Riahi [22], on the other hand, reported that complexes citric acid/ β -lg and gallic acid/ β -lg are formed with $\Delta H < 0$ and $\Delta S > 0$, and argued that both ligand-protein ionic interactions and solvating water molecules release were involved in these complexations. Our results, along with these literature data, indicate that even if the protein is the same, different binding sites features and molecular specificities of the ligands lead to diverse molecular complexation mechanisms, so each ligand requires a detailed study and no generalization on their molecular coupling with β -lg must be made.

It is worthy emphasizing that the $\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ and $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ values were derived from a van't Hoff plot, by fitting the Eq. (4) to experimental data obtained for $\ln[K_{VAN/\beta-lg}] = f(T^{-1})$, considering the four temperatures studied (295, 298, 300, and 302 K). The value of $\Delta H_{VAN/\beta-lg}$ was obtained from the slope of the plot, whereas the $\Delta S_{VAN/\beta-lg}$ value was estimated from the y-axis intercept of the same graph. Then, the values of $\Delta G_{VAN/\beta-lg}$ could be calculated by using Eq (5) separately for each temperature, even if the four values did not present drastic differences (Table 3).

3.2. *In silico* study: computational molecular docking

Computational docking essays were performed to deeper examine, in a molecular level, the interactions between vanillin and β -lg. The complexes were segregated into sites where vanillin was located (A: Dimer interface and B: β -barrel entrance), both highlighted in Fig 4-A. The five retained complexes in our study (namely V1, V2, V3, V4, and V5) presented the vanillin docked either in A-site or B-site, as summarized in Figure 4-C. For the A-site (Dimer Interface), the V1 and V2 complexes had the vanillin in similar orientations with only small conformational differences among them at upper end, whereas V3 had this ligand standing at the lower

end of the same site. For the B-site (β -barrel entrance), V4 and V5 had the vanillin also in similar orientations.

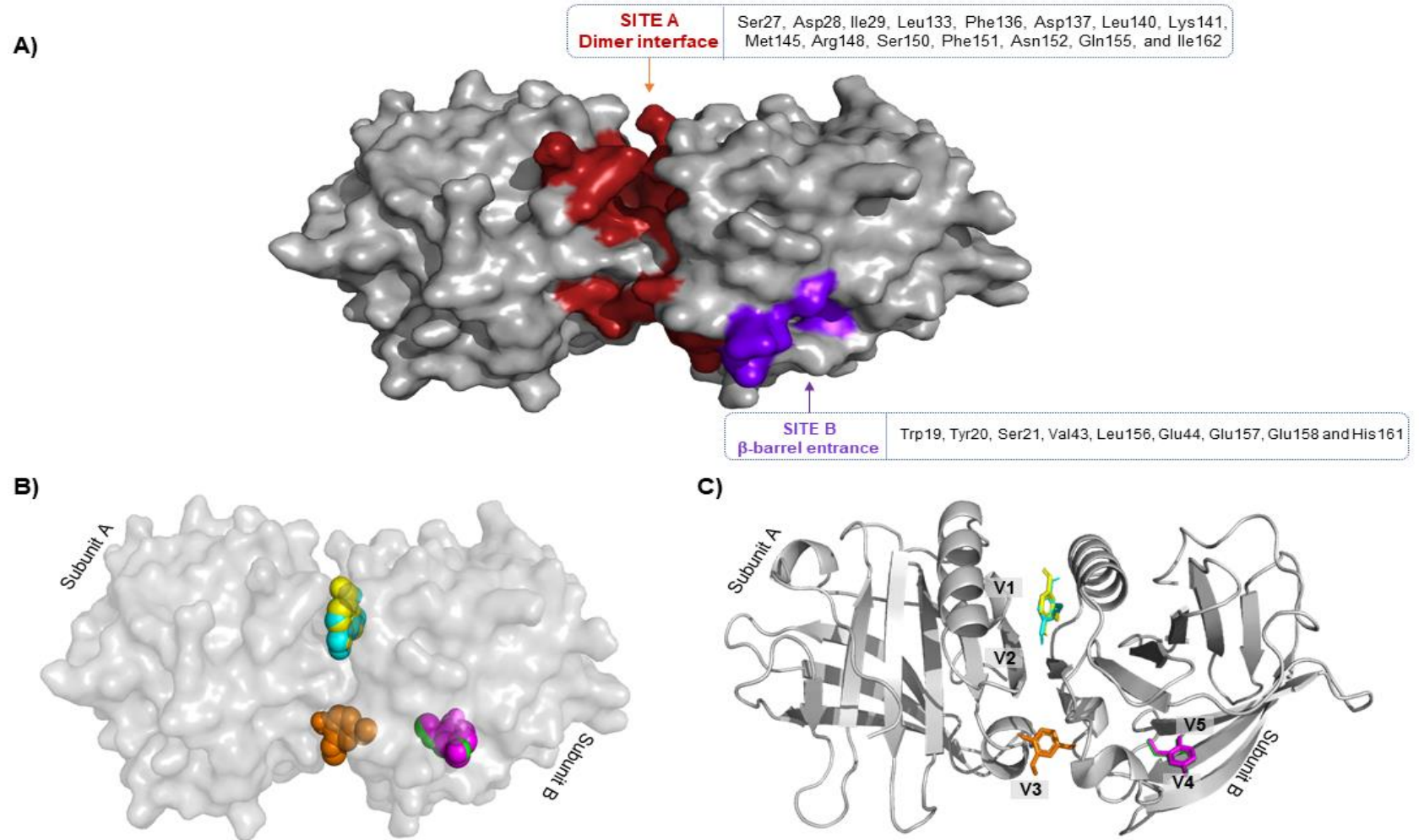


Figure 4-A) Putative binding sites identified for the vanillin in the β -lg dimer, B) Connolly surfaces and C) ribbons representations of the β -lg dimer with the vanillin molecule docked within the five putative binding sites (complexes V1, V2, V3, V4, and V5).

β -lg has been reported to have three main interaction binding sites: the β -barrel (also known as the central cavity or cup), the space between the α -helix and the barrel surface, and, in the case of the dimer, the monomer/monomer interface [53,54,23]. The B-site has been reported as one of the biggest hydrophobic ligand-binding sites in the monomeric form of β -lg [51]. Alternatively, Pu et al. [52] demonstrated that flavonoids also bind on the outer surface rather than on the hydrophobic cavities of β -lg. Swain et al. [55] and Zhan et al. [24] found out that vitamin B12 and capsaicin, respectively, were able to bind only at the β -barrel site. Loch et al. [56], when studying the dimeric form of β -lg, reported that desipramine was present inside the β -barrel, at the β -barrel entrance (B-site) and, in a cavity at the dimer interface (A-site), providing experimental evidence that the β -lg dimer was able to accommodate ligand molecules simultaneously at different binding sites.

Hence, to select the most probable binding modes, the calculated binding affinity, as well as the amount and type of intermolecular interactions, were analyzed. Also, each pose was studied individually through visual inspection of Connolly surfaces (Figure 5) to examine the shape fitting of the different vanillin conformations at both β -lg putative binding sites. Besides, figure 6 brings bidimensional schematic depictions of the interactions between vanillin and β -lg shown in figure 5.

Binding energy values of complexes V1-V5 varied little, ranging from $-4.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ to $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (in Table 4). In addition to being very similar in these cases, binding energy values calculated by score functions of docking algorithms are, in general, not binding free energies, as they come from numerous empirical data, and their physical meaning is controversial. Therefore, the complexes should not be compared in terms of these energy values, and systematic analyses of the ligands' fitting and their intermolecular interactions must be done for them all. Such analysis is presented for each complex in the paragraphs hereafter.

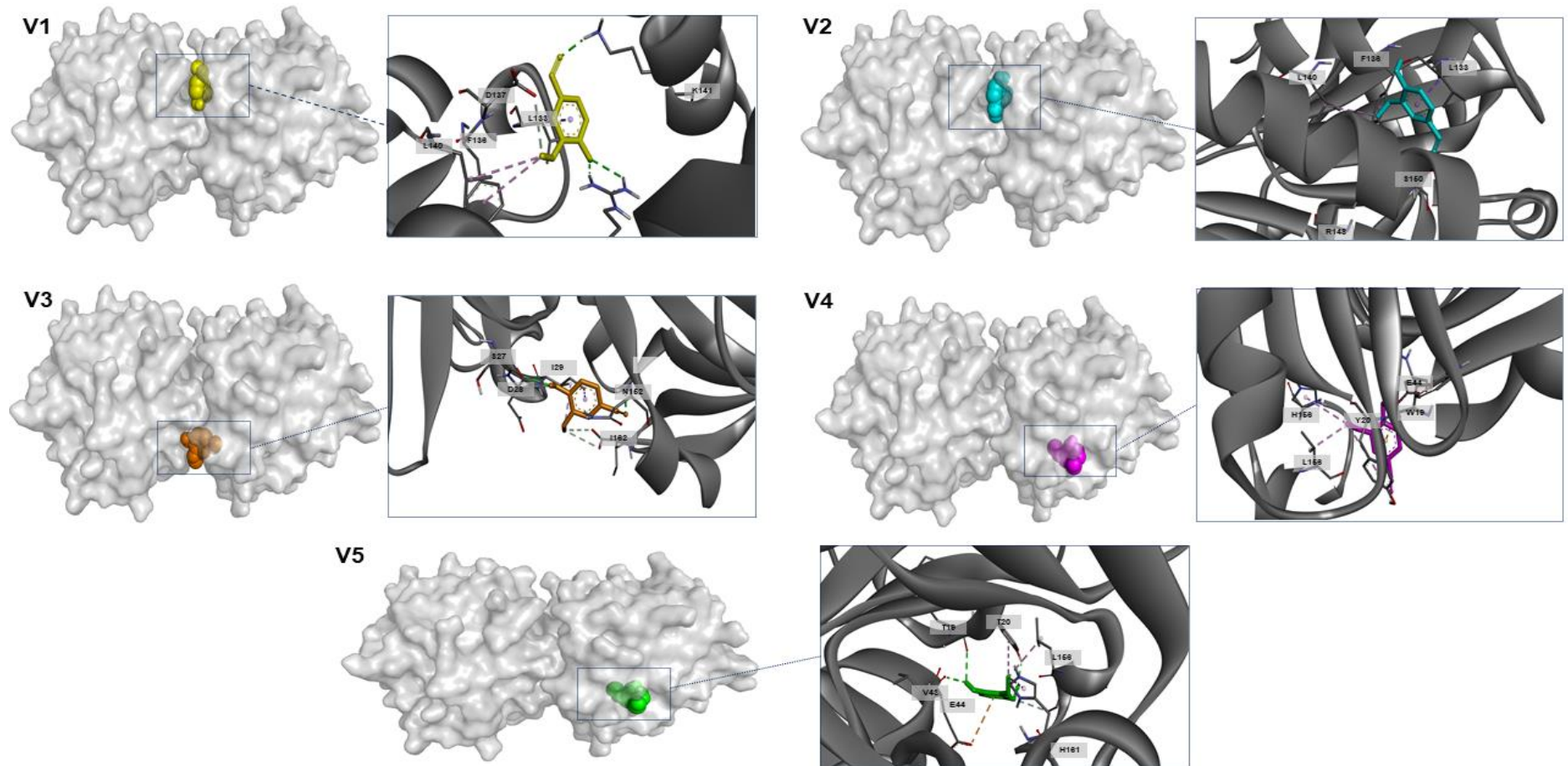


Figure 5-Connolly surfaces of the β -Ig dimer with the vanillin molecule docked within each of the five putative binding sites (complexes V1, V2, V3, V4, and V5). For each complex, the binding site was zoomed to show the intermolecular interactions formed by vanillin.

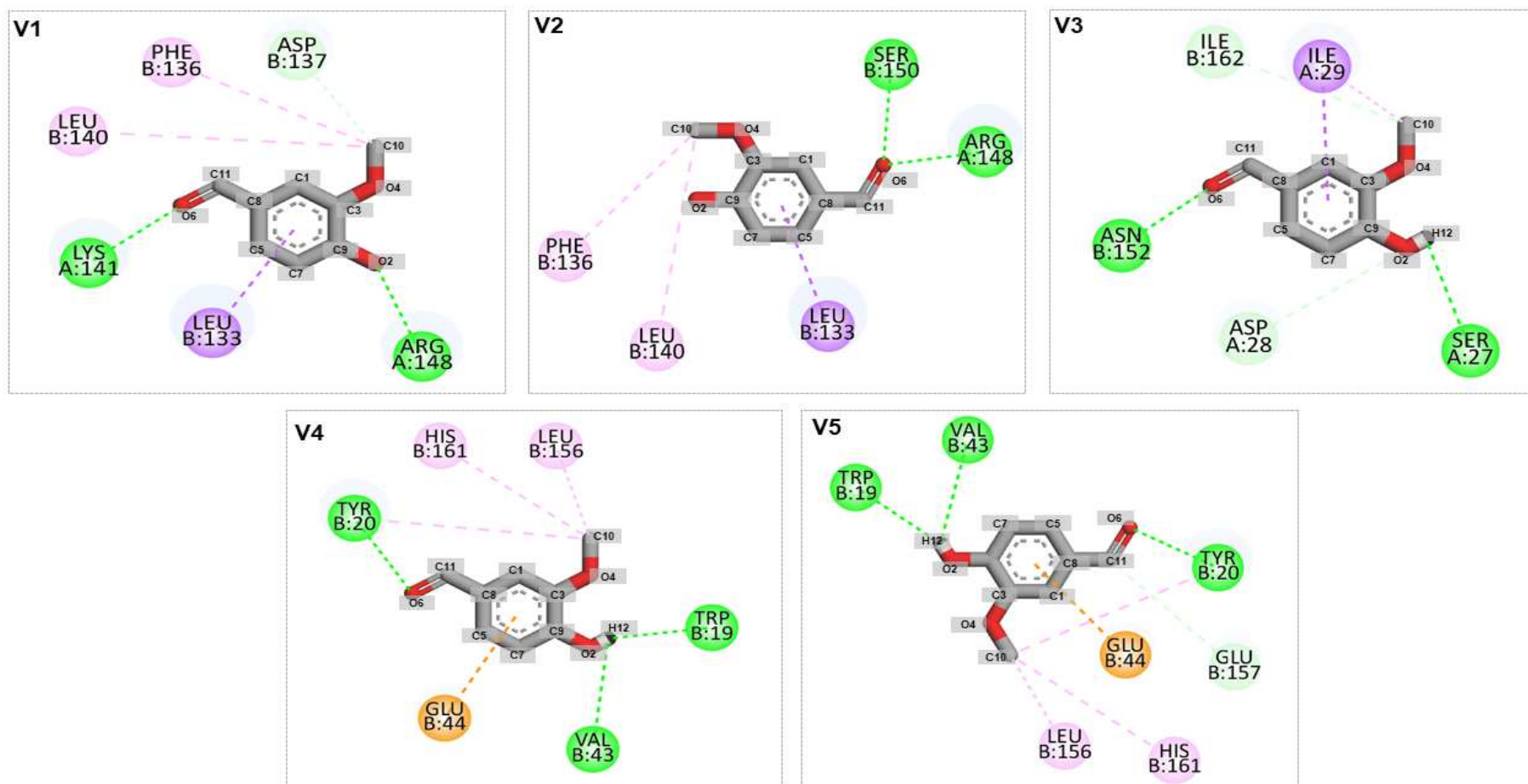


Figure 6-2D schematic diagram of intermolecular interactions formed by vanillin (complexes V1, V2, V3, V4, and V5). Hydrogen bonds are represented as green dashed lines; electrostatic (\square -anion) interactions as orange dashed lines; \square -alkyl interactions as purple

Table 4-Data about intermolecular interactions identified in the five best-scored β -Ig-VAN complexes obtained by in silico docking calculations.

β -Ig dimer binding site	Complex	Calculated binding energy	Interaction type	Donor #	Acceptor #	Distance (Å)	Angle DHA (°) ##
A	V1	-4.8 kcal·mol ⁻¹	Hydrogen Bond	Lys141:H ₂₃	Van: O ₆	2.2	159.3
			Hydrogen Bond	Arg148:H ₁₂	Van: O ₂	2.1	169.0
			Hydrogen Bond	Arg148:H ₂₂	Van: O ₂	2.9	130.2
			Carbon-oxygen hydrogen bond	Van:C ₁₀	Asp137:O _{d2}	3.6	-
			Hydrophobic (π -sigma)	Van:AC	Leu133: C _b	3.6	-
			Hydrophobic (alkyl-alkyl)	Van:C ₁₀	Leu140:SD	5.4	-
	Hydrophobic (π -alkyl)	Phe136:AC	Van:C ₁₀	4.9	-		
	V2	-5.0 kcal·mol ⁻¹	Hydrogen Bond	Arg148:H ₁₂	Van: O ₆	2.1	144.6
			Hydrogen Bond	Arg148:H ₂₂	Van: O ₆	2.4	124.5
Hydrogen Bond			Ser150: H _g	Van: O ₆	2.1	133.1	
Hydrophobic (π -sigma)			Van:AC	Leu133: SD	3.6	-	
Hydrophobic (alkyl-alkyl)			Van:C ₁₀	Leu140	5.3	-	
Hydrophobic (π -alkyl)			Phe136:AC	Van:C ₁₀	4.9	-	
V3	-4.9 kcal·mol ⁻¹	Hydrogen Bond	Asn152: H _n	Van: O ₆	2.5	150.1	
		Hydrogen Bond	Van:H ₁₂	Ser27:O	2.5	111.0	
		Carbon-oxygen hydrogen bond	Asp28: C _a	Van: O ₂	3.8	-	
		Carbon-oxygen hydrogen bond	Van:C ₁₀	Ile162:O ₁	3.7	-	
		Carbon-oxygen hydrogen bond	Van:C ₁₀	Ile162:O ₂	3.7	-	
		Hydrophobic (π -sigma)	Van:AC	Ile29: C _d	3.5	-	
Hydrophobic (alkyl-alkyl)	Van:C ₁₀	Ile29:SD	4.2	-			
B	V4	-5.0 kcal·mol ⁻¹	Hydrogen Bond	Tyr20: H _n	Van: O ₆	2.1	149.7
			Hydrogen Bond	Van:H ₁₂	Trp19:O	2.2	151.3
			Hydrogen Bond	Van:H ₁₂	Val43:O	2.7	96.6
			Eletrostatic (π -anion)	Van:AC	Glu44:O _{e2}	4.6	-
			Hydrophobic (alkyl-alkyl)	Van:C ₁₀	Leu156:SD	4.1	-
			Hydrophobic (π -alkyl)	Tyr20:AC	Van:C ₁₀	5.1	-
	Hydrophobic (π -alkyl)	His161:AC	Van:C ₁₀	4.4	-		
	V5	-5.0 kcal·mol ⁻¹	Hydrogen Bond	Tyr20: H _n	Van: O ₆	2.8	142.2
			Hydrogen Bond	Van:H ₁₂	Trp19:O	2.8	134.2
Hydrogen Bond			Van:H ₁₂	Val43:O	2.4	112.2	
Carbon-oxygen hydrogen bond			Van:C ₁₁	Glu157:O	3.6	-	
Eletrostatic (π -anion)			Van:AC	Glu44:O _{e2}	4.4	-	
Hydrophobic (alkyl-alkyl)			Van:C ₁₀	Leu156:SD	4.1	-	
Hydrophobic (π -alkyl)	Tyr20:AC	Van:C ₁₀	5.2	-			
Hydrophobic (π -alkyl)	His161:AC	Van:C ₁₀	4.3	-			

AC refers to the center of mass of an aromatic ring, whereas SD refers to the side chain of aliphatic hydrophobic amino acid residues

Angle values were measured for H-bonds only.

In the V1 complex, the vanillin molecule was buried in the A-site cleft, with the plane of the aromatic ring parallel to the cleft walls. Two vanillin oxygen atoms – on the hydroxyl, and carbonyl groups – formed strong hydrogen bonds respectively with the β -lg residues Arg148, Arg148 and Lys141 (lengths from 2.1 to 2.9 Å; DHA angles from 130.2° to 169.0°). Also, the vanillin aromatic ring center formed a π -alkyl interaction [57] with the Leu133 side chain, whereas the Phe136 residue aromatic ring center formed another π -alkyl interaction with the methoxyl –CH₃ group of vanillin. In fact, even though intermolecular interactions involving aromatic rings are pivotal in both chemical and biological recognition, little attention is usually paid to such interactions [58,59]. Finally, a carbon-oxygen hydrogen bond [60] was formed between the vanillin molecule and the Asp137 residue. This latter represents another underappreciated category of molecular interactions in the biochemical literature, but it began to receive the deserved attention over the past few years [61, 62].

Regarding the V2 complex, the vanillin molecule was also buried in the A-site cleft, with the plane of the aromatic ring parallel to the cleft walls. Three strong hydrogen bond interactions were observed between the residues Arg148, Arg148, Ser150, and the oxygen atom present in the carbonyl group of vanillin (lengths from 2.1 to 2.4 Å; DHA angles from 124.5° to 144.6°), which may contribute to the stability of the β -lg-VAN complex. In addition, the vanillin aromatic ring center formed a π -sigma interaction with the Leu133 side chain, whereas alkyl-alkyl and π -alkyl interactions were formed between the methoxyl –CH₃ group of vanillin and the β -lg residues Leu140 and Phe136, respectively.

For the V3 complex, even though vanillin penetrated A-site cleft (at the contact between the two protein monomers), it was displaced compared to its location in complexes V1 and V2. The vanillin molecule formed two strong hydrogen bonds (both with lengths from 2.5 Å; DHA angles from 150.1° and 111.0°) involving the atoms carbonyl oxygen and the hydroxyl hydrogen and, respectively, the amino acids residues Asn152 and Ser27. A hydrophobic π -sigma interaction between the vanillin aromatic ring center and the Ile29 residue was also identified. In addition, three carbon-oxygen hydrogen bonds were formed between methoxyl and hydroxyl groups of vanillin and the Asp28 and Ile162 residues.

In the V4 complex, the vanillin molecule bound in the B-site cleft. Tyr20, Trp19 and Val43 were directly involved in three hydrogen bonds with the carbonyl oxygen

and hydroxyl hydrogen of vanillin (lengths from 2.1 to 2.7 Å; DHA angles from 96.6° to 151.3°). The vanillin aromatic ring center formed a π -anion interaction with the Glu44 side chain carboxylate. Furthermore, one alkyl-alkyl and two π -alkyl interactions were formed between the methoxyl –CH₃ group of vanillin and the residues Leu156, Tyr20 and His161, respectively.

Last, in the V5 complex, the vanillin molecule also bound in the B-site cleft, but with an orientation slightly different from that observed in the complex V4. Similarly, three hydrogen bonds between the residues Tyr20, Trp19, Val43 and the carbonyl oxygen and hydroxyl hydrogen of vanillin (lengths from 2.4 to 2.8 Å; DHA angles from 112.2° to 142.2°) were formed. As in the case of V4, the vanillin aromatic ring center formed a π -anion interaction with the Glu44 residue. Moreover, one carbon-oxygen hydrogen bond was formed between the carbonyl carbon of vanillin and the Glu157 residue, and three hydrophobic interactions involving the vanillin methoxyl –CH₃ group and the β -lg residues Leu156, Tyr20 and His161 were formed.

These analyses of molecular docking results for the five β -lg-VAN putative complexes, together with data from fluorescence spectroscopy, allowed the following inferences:

- i) both hydrogen bonds and hydrophobic interactions are involved in the vanillin/ β -lg complexation.
- ii) hydrogen bonds between vanillin and β -lg were detected for complexes in the protein A-site (V1, V2, and V3) and B-site (V4 and V5).
- iii) in the A-site, the hydrogen bonds formed between vanillin and β -lg presented smaller lengths (< 2.4 Å) and larger angles (all DHA angles > 110°), which are indicative of stronger and potentially more stable H-bonds [58,59].
- iv) in the B-site, even if intermolecular hydrogen bonds were weaker (greater lengths and smaller DHA angles, in average), vanillin also formed hydrophobic interactions – in particular, involving β -lg aromatic amino acid residues.
- v) The B-site, comprises amino acid residues Trp19 and Tyr20. It is known that the intrinsic fluorescence of β -lg is mainly given by Trp19 residue [67].

The conjoint analysis of these inferences led us to the hypothesis that the B-site of β -lg seems more likely to be the binding site for the vanillin. This hypothesis is to be further investigated by applying other molecular modelling tools allowing a quantitative

assessment of the temporal stability of both conformations and positions of the vanillin molecule in each complex, as well as of the intermolecular interactions identified.

4. CONCLUSIONS

The molecular coupling of β -lg dimers and vanillin (VAN) was studied by combining fluorescence spectroscopic and computational molecular docking assays. Estimated thermodynamic parameters estimation revealed that $\Delta G_{VAN/\beta\text{-lg}} < 0$, $\Delta H_{VAN/\beta\text{-lg}} < 0$, and $\Delta S_{VAN/\beta\text{-lg}} < 0$, indicating that the formation of β -lg/VAN complexes was spontaneous and enthalpically driven, at the pH and temperatures studied, with both hydrogen bonding and hydrophobic interactions as the main forces sustaining β -lg/VAN supramolecular structures. These results also pointed that only one site was needed to promote the β -lg/VAN interaction. *In silico* molecular docking results corroborated most of these findings. According to such calculations, the cleft between the two β -lg monomers (namely A-site) can shelter one vanillin molecule, with the formation of strong hydrogen bonds and a few hydrophobic interactions. Also, the vanillin may bind within the β -barrel entrance (namely "B-site"), forming some hydrogen bond interactions and different hydrophobic interactions, especially involving aromatic amino acid residues of the protein. Together, these results allowed raising the hypothesis that the B-site of is more likely to be the binding site of β -lg for the vanillin molecule. Such hypothesis is now under a deeper investigation by our team, by means of the application molecular dynamics calculations on the putative β -lg/VAN complexes obtained by molecular docking experiments.

REFERENCES

1. C.A. Forestell, *Annals of Nutrition and Metabolism*. 70, 17–25 (2017). <https://doi.org/10.1159/000478759>
2. S.M. van Ruth, J.P. Roozen, In *Food Flavour Technology*. Taylor A. J., Ed.; Sheffield Academic Press Ltd., biom 167 (2002).
3. M.E.C. Menis-Henrique, *Current Opinion in Food Science* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.005>
4. N.J. Gallage, B.L. Møller, *Biotechnology of Natural Products*, 3–24 (2018). https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_1
5. S.S. Arya, J.E. Rookes, D.M. Cahill, S.K. Lenka, *Advances in Traditional Medicine*. 21(3), 1–17. (2021) <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w>
6. J.M. Li, Y.C. Lee, C.C. Li, et al., *J. Agric Food Chem*. 66(22): 5563-5573 (2018) <https://doi.org/10.1021/acs.jafc>
7. M.P. Ciciliato,; M.C. de Souza, C.M. Tarran, A.L.T. de Castilho, A.J. Vieira, A.L. Rozza, *Pharmaceutics*. 14, 755 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040755>
8. S.S. Arya, M.M. Sharma, J.E. Rookes, D.M. Cahill, S.K. Lenka, *Biologia*. 76(2), 781–791 (2020). <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00617-5>
9. M. Weerawatanakorn, J.C. Wu, M.H. Pan, C.T. Ho, *J. Food Drug Anal*. 23(2), 176–190 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.001>
10. A. Ammari, A., K. Schroen, *J. Agric Food Chem* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04459>
11. W. Temthawee, A. Panya, K.R. Cadwallader, I. Suppavorasatit, *LWT*. 109676, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109676>
12. J.S.S. Yadav, S. Yan, S. Pilli, L. Kumar, R.D Tyagi, R.Y. Surampalli, *Food Sci. Biotechnol*. 33(6), 756–774 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
13. K. Broersen, *Foods*. 9(7), 874 (2020). <https://doi.org/10.3390/foods9070874>
14. S. Brownlow, J.H.M. Cabral, R.Cooper, D.R. Flower, S.J. Yewdall, I. Polikarpov, A.C.T North, L. Sawyer, *Structure*, 5, 481–495 (1997).
15. S. Khan, R. Ipsen, K. Almdal, B. Svensson, P. Harris, *J. Biol. J. omol*. 19(7), 2905–2912 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00471>
16. E.G.P. Stender, J. Birch, C. Kjeldsen, L.D. Nielsen, J.Ø Duus, B.B. Kragelund, B. Svensson, *ACS Omega*. 4(4), 6165–6174 (2019). <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03532>
17. L. Sawyer, *Advanced Dairy Chemistry*, edited by P. McSweeney & P. Fox, pp. 211–259. Boston: Springer (2013).
18. J. Xu, M. Hao, Q. Sun, L. Tang, *J. Biol. Macromol*. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.05>

19. C. Wang, X. Zhou, H. Wang, X. Sun, M. Guo, *Molecules*. 24(11), 2151 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24112151>
20. K. Abdollahi, L. Condict, A. Hung, S. Kasapis, *Food Chem.* 360, 130059 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.13005>
21. I. Baruah, C. Kashyap, K. Ankur, Guha, G. Borgohain, *ACS Omega*. 7 (27), 23083-23095 (2022). <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00336>
22. P. Chanphai, H.A. Tajmir-Riahi, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1–6 (2020). <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1784290>
23. I. Khosravi, M. Sahihi, *J. Biol. Macromol Nutr. Part B*, 53(9), 1591–1600 (2014). <https://doi.org/10.1080/00222348.2014.946844>
24. F. Zhan, S. Ding, W. Xie, X. Zhu, J. Hu, J. Gao, Y. Chen, *Food Hydrocoll.* 105767(2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105767>
25. J. Zhu, X. Sun, S. Wang, Y. Xu, D. Wang, *Food Hydrocoll.* 63, 391–403 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.027>
26. S. Geng, Z. Jiang, H. Ma, Y. Wang, B. Liu, G. Liang, *Food Chem.* 312, 126066 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.1260>
27. Y. Yue, S. Geng, Y. Shi, G. Liang, J. Wang, B. Liu, *Food Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.08>
28. D.E. Epps, T.J. Raub, V. Caiolfa, A. Chiari, M. Zamai, *J Pharmacy Pharm Sci.* 51(1), 41–48 (1999). <https://doi.org/10.1211/0022357991772079>
29. K.P. Silva, T.V. Seraphim, J.C. Borges, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 1834(1), 351–361(2013). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.004>
30. E. Dufour, C. Genot, T. Haertlé, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1205(1), 105–112 (1994). [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90098-1)
31. L. Liang, M. Subirade, *J. Physical Chem. B.* 114(19), 6707–6712 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp101096r>
32. B. Ghalandari, A. Divsalar, M. Eslami-Moghadam, A.A. Saboury, T. Haertlé, M. Amanlou, K. Parivar, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175(2), 974–987 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1341-0>
33. J.H. Van't Hoff, *E'tudes De Dynamique Chimique* ("Studies in Chemical Dynamics"), Frederik Muller, Amsterdam (1884).
34. L. Vijayalakshmi, R. Krishna, R. Sankaranarayanan, M. Vijayan. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 71(1), 241–249 (2008). <https://doi.org/10.1002/prot.21695>
35. J. Loch, A. Polit, A. Górecki, P. Bonarek, K. Kurpiewska, M. Dziedzicka-Wasylewska, K. Lewiński, *J.Molecular Recognition.* 24(2), 341–349 (2010). <https://doi.org/10.1002/jmr.1084>

36. C. Oostenbrink, A. Villa, A.E Mark, W.F. Van Gunsteren, J. Comput. Chem. 25(13), 1656–1676 (2004). <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>
37. T.V. De Oliveira, A.P. Guimarães, G.C. Bressan, E.R. Maia, J.S. Coimbra, M.D. Polêto, E.B. De Oliveira, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1–29 (2020). <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.173024>
38. M.D. Polêto, M.P. Alves, R. Ligabue-Braun, M.R. Eller, De Carvalho. Antonio Fernandes, Food Chem. 286, 309–315 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.20>
39. O. Trott, A.J. Olson, J. Comput. Chem. NA–NA (2009). <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
40. S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal, 28(31), 4600–4607 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.029>
41. Chua HN, Ning K, Sung WK, Leong HW, Wong L. CSB. 97-109 (2007).
42. M.M. Alanazi, A.A. Almehizia, A.H. Bakheit, N.A. Alsaif, H.M. Alkahtani, T.A. Wani, Saudi, Pharm J. 27(3):341–7 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.12.001>
43. J.R. Lakowicz, In Principles of fluorescence spectroscopy. Boston. MA: Springer (1983). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7658-7_11
44. J. Jia, X. Gao, M. Hao, L. Tang, Food Chem. 228, 143–151 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.13>
45. N. Abdulatif Al-Shabib, J. Masood Khan, A. Malik, M. Tabish Rehman, M.F. AlAjmi, F. Mabood Husain, N. Altwaijry, N. Saudi, J. Pharm sci(2020). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.01.002>
46. J.R. Albani, J. Vogelaer, L. Bretesche, D. Kmiecik, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 91, 144–150 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.12.015>
47. S. Damodaran, J.E. Kinsella, J. of Agric. Food Chem. 29, 1249-1253 (1981).
48. S. Damodaran, Fennema's Food Chem. 4th ed.. Boca Raton, FL: CRC Press, 217-329 (2008).
49. M.P. Gianelli, M. Flores, F. Toldrá, J Agr Food Chem. 51(23): 6828-6834 (2003)
50. P.D. Ross, S. Subramanian, Biochemistry. 20(11), 3096–3102 (1981). <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
51. J. Cheng, J.H, Liu, G. Prasanna, P. Jing, J. Biol. Macromol. 105,965972 (2017) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.11>
52. P. Pu, X. Zheng, L. Jiao, L. Chen, H. Yang, Y. Zhang, G. Liang, Food Chem. 339, 128106 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128106>
53. B.J, Harvey, E. Bell, L. Brancaleon, The Journal of Physical Chemistry B. 111(10), 2610–2620 (2007). <https://doi.org/10.1021/jp065783a>
54. S. Roufik, S.F. Gauthier, X. Leng, S.L. Turgeon, J. Biol. Macromol. 7(2), 419–426 (2006). <https://doi.org/10.1021/bm050229c>

55. B.C. Swain, J. Rout, U. Tripathy, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1–10 (2020). <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835731>
56. J.I. Loch, J. Barciszewski, J. Sliwiak, P. Bonarek, P. Wrobel, K. Pokrywka, I.G. Shabalin, W. Minor, M. Jaskolski, K. Lewinski, *IUCrJ* 9, 386-398 (2022). <https://doi.org/10.1107/S2052252522004183>
57. E.A Meyer, R.K.Castellano, F. Diederich, *C. Angewandte, International Edition*.42(11), 1210–1250 (2003). <https://doi.org/10.1002/anie.200390319>
58. S. Tsuzuki, (n.d.) *Structure and Bonding*, 149–193. <https://doi.org/10.1007/b135618>
59. E. Sperlich, A. Kelling, G. Kwesiga, B. Schmidt, *CrystEngComm*, 24,26, The Royal Society of Chemistry, 4731-4739, (2022) <https://doi.org/10.1039/D2CE00169A>
60. S. Horowitz, R.C. Trievel, *J. Bio Chem.* 287(50), 41576–41582 (2012). <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.4185741>
61. R.J. Fick, M.C. Clay, L. Vander Lee, S. Scheiner, H. Al-Hashimi, R.C. Trievel, *Biochem.* 57(26), 3733–3740 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00375>
62. R.J. Fick, S. Horowitz, B.G. McDole, M.C. Clay, M.C., R.A. Mehl, H.M. Al-Hashimi, R.C. Trievel, *Biochem* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01141>
63. J.I. Loch, J. Barciszewski, J. Sliwiak, P. Bonarek, P. Wrobel, K. Pokrywka, I. G. Shabalin, W. Minor, M. Jaskolski, M.K. Lewinski, *IUCrJ* 9, 386-398 (2022). <https://doi.org/10.1107/S2052252522004183>
64. F. Guo, S.C. Li, L. Wang, D. Zhu, *BMC Bioinform.* 13(1) (2012).
65. A.T. Girgih, R. He, R.E. Aluko, *J. Agric Food Chempha.* 62(18), 4135–4144 (2014). <https://doi.org/10.1021/jf5002606>
66. A. Shahi, and E. Arunan, *J. Sci. Chem.* 128(10), 1571–1577 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12039-016-1156-3>
67. N. Stănciuc, G. Râpeanu, G.Bahrim, I. & Aprodu, (2020) *Biomolecules*, 10(8), 1096. <https://doi.org/10.3390/biom10081096>

CAPÍTULO 3.

Conclusões

CONCLUSÕES GERAIS

Através do presente estudo com a investigação conjunta de metodologias “*in vitro*” e “*in silico*”, pôde-se elucidar de forma mais detalhada o mecanismo de interação entre a β -lg e a vanilina, obtendo resultados promissores para imensuráveis campos de aplicação e avanços tecnológicos em diversos ramos, principalmente na indústria de alimentos.

Por intermédio da tabulação dos resultados advindos da espectroscopia de fluorescência, foi possível determinar informações sobre o comportamento da β -lg com a adição gradual de vanilina em diferentes temperaturas, além de estimar parâmetros termodinâmicos que forneceram informações sobre o tipo de interações envolvidas na formação dos complexos e o número de sítios necessários para a ocorrência da interação.

Os resultados das simulações de *docking*, foram visualizados através das superfícies de Connolly, onde os dois sítios formados (Sítio A: interface do dímero e Sítio B: entrada do β -barril) foram identificados. Os dados fornecidos em escala molecular referentes aos tipos, ângulos, distâncias das interações e resíduos de aminoácidos envolvidos foram fatores determinantes para a inferência do sítio mais favorável para alocação da vanilina.

Conclui-se que o Sítio B possui grande potencial para ser o sítio para a vanilina e, possivelmente, para outros compostos aromáticos estruturalmente semelhantes. Os resultados obtidos neste estudo servirão de ponto de partida para futuras simulações de dinâmica molecular a fim de validar, otimizar e analisar em escala temporal o comportamento dos referidos complexos.