

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

Utilização de resinas cromatográficas para a recuperação de enzimas presentes em processo biológico completo: uma abordagem computacional.

PEDRO H. MARIANO¹, THAIS S. MILESSI ESTEVES², OSMAIR V. DE OLIVEIRA³, LEANDRO J. BENEDINI³

¹ Aluno do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Campus Catanduva, p.mariano@aluno.ifsp.edu.br;

² Docente do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos;

³ Docente do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio, IFSP, Campus Catanduva.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.06.02.03-3 Operações de Separação e Mistura

RESUMO: O Processo biológico completo (PBC) utiliza microrganismos para quebrar matéria lignocelulósica e convertê-la em etanol de segunda geração dentro de um único biorreator. Apesar de seu grande potencial, a recuperação das enzimas envolvidas ainda apresenta desafios, com poucos métodos eficazes documentados. Nesse contexto, este estudo busca por técnicas *in silico* compreender a interação das enzimas hidrolíticas do PCB com uma resina cromatográfica, baseando-se em pesquisas anteriores sobre a recuperação de proteínas do caldo do processo biológico completo. Para o estudo, foram usadas ferramentas como *PubChem*, *Protein Data Bank*, *PyRx* e *GROMACS*. A estrutura da resina cromatográfica foi obtida em formato “.sdf” e a da enzima alvo em formato “.pdb”. Técnicas de docking molecular e dinâmica molecular foram aplicadas. Essas técnicas se mostraram fundamentais para aprimorar a compreensão da interação enzimática. O docking molecular ajudou a identificar a interação entre a resina e a enzima, enquanto a dinâmica molecular, configurada no CHARMM-GUI e executada no GROMACS, forneceu gráficos da energia total e do potencial de interação ao longo do tempo. Os resultados mostraram que a resina interage eficientemente com a enzima alvo, com um RMSD de 0,935 Å, indicando uma interação precisa e eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Liquanase; Sephadex; docking molecular; dinâmica molecular

Use of Chromatographic Resins for the Recovery of Enzymes Present in the Complete Biological Process: A Computational Approach.

ABSTRACT: The Complete Biological Process (CBP) utilizes microorganisms to break down lignocellulosic material and convert it into second-generation ethanol within a single bioreactor. Despite its great potential, the recovery of the involved enzymes still presents challenges, with few effective methods documented. In this context, this study seeks *in silico* techniques to understand experimental results regarding the recovery of the hydrolytic enzymes involved in the CBP using chromatographic resin, based on previous research on the recovery of proteins from the complete biological process broth. For the study, tools such as *PubChem*, *Protein Data Bank*, *PyRx*, and *GROMACS* were used. The structure of the chromatographic resin was obtained in “.sdf” format and the target enzyme in “.pdb” format, and molecular docking and molecular dynamics techniques were applied. These techniques proved fundamental for enhancing enzymatic recovery. Molecular docking helped identify the interaction between the resin and the enzyme, while molecular dynamics, configured in CHARMM-GUI and executed in GROMACS, provided graphs of total energy and interaction potential over time. The results showed that the resin interacts efficiently with the target enzyme, with an RMSD of 0.935 Å, indicating a precise and effective interaction.

KEYWORDS: Liquanase; Sephadex; molecular docking; molecular dynamics

INTRODUÇÃO

O processo biológico completo (PCB) é uma técnica inovadora que emprega microrganismos para secretar enzimas hidrolíticas capazes de transformar compostos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis e, subsequentemente, em etanol de segunda geração (2G). Apesar do seu grande potencial, a recuperação dessas enzimas ainda é uma área de pesquisa em desenvolvimento, com poucas metodologias científicas publicadas (Milessi, 2017). Este trabalho visa explorar novas abordagens para a recuperação dessas enzimas usando resina cromatográfica, com base em experimentos anteriores sobre recuperação de proteínas do caldo do processo biológico completo. A aplicação de métodos *in silico*, como o docking molecular e a dinâmica molecular, se mostram como métodos interessantes para a compreensão da interação entre adsorvente e adsorvato. O docking molecular é uma técnica que apresenta um substancial grau de precisão, que possibilita prever a conformação espacial de pequenos ligantes dentro do local de ligação da molécula alvo (Ferreira et al., 2015; Verli et al., 2012). Já a dinâmica molecular integra as equações do movimento, provenientes da mecânica quântica, com condições de contorno e parâmetros iniciais do problema, para então realizar uma descrição do comportamento do sistema ao longo de um intervalo de tempo (Rino e Costa, 2013).

Neste trabalho, serão apresentadas abordagens de modelagem molecular e docking molecular para estudar a interação específica de uma enzima produzida no PBC com uma resina cromatográfica, com o objetivo de aprimorar a recuperação enzimática e contribuir para o avanço dessa área de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o uso de um computador e de bancos de dados químicos como o *protein data bank* (PDB), *Pubchem*, e *Uniprot*, em conjunto com os *softwares* de docking molecular PyRx, e de dinâmica molecular GROMACS.

Utilizando o *PubChem*, uma base de dados de química mantida pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi possível obter a estrutura tridimensional da molécula de resina cromatográfica Sephadex (Figura 1). Esta estrutura foi salva em um arquivo no formato “.sdf”, que é comumente usado para armazenar e compartilhar informações sobre a estrutura e propriedades de compostos químicos. O arquivo “.sdf” inclui representações tridimensionais das moléculas, detalhando a configuração dos átomos e suas ligações, além de dados sobre características como ponto de fusão, solubilidade e outras propriedades relevantes, bem como nomes alternativos e identificadores.

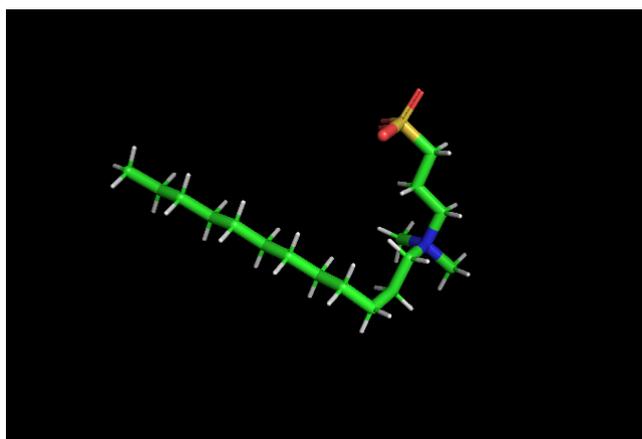


FIGURA 1. Estrutura molecular da resina cromatográfica Sephadex.

Fonte: Os autores

Na sequência, foi acessado o PDB para obter e salvar a estrutura da enzima alvo Liquefina no formato “.pdb” (Figura 2). Este formato é utilizado para armazenar a estrutura tridimensional de moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, incluindo a posição dos átomos, a conectividade entre eles e a sequência de aminoácidos ou nucleotídeos. O arquivo “.pdb” também

fornece informações sobre a estrutura secundária e metadados relacionados à determinação da estrutura da proteína, sendo amplamente usado para análise e visualização de macromoléculas.

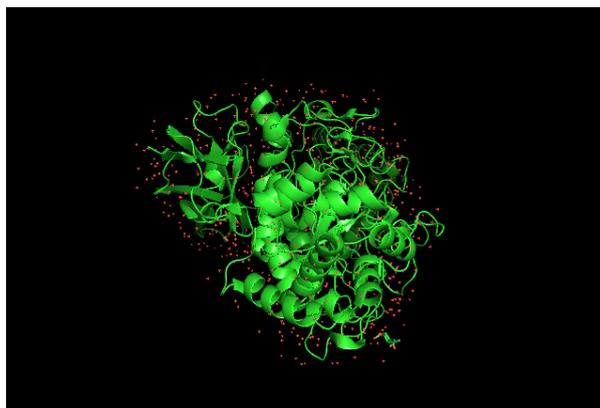


FIGURA 2. Estrutura tridimensional da Liquefina. Fonte: Os autores

O próximo passo envolveu o docking molecular. Inicialmente, o sistema foi pré-preparado removendo moléculas de água do arquivo “.pdb” e o ligante inibidor presente com a proteína. Após essas simplificações, o docking foi realizado para determinar a melhor posição de interação entre a Sephadex e a enzima, buscando minimizar a energia total do sistema e obter a configuração mais estável possível Figura 3.

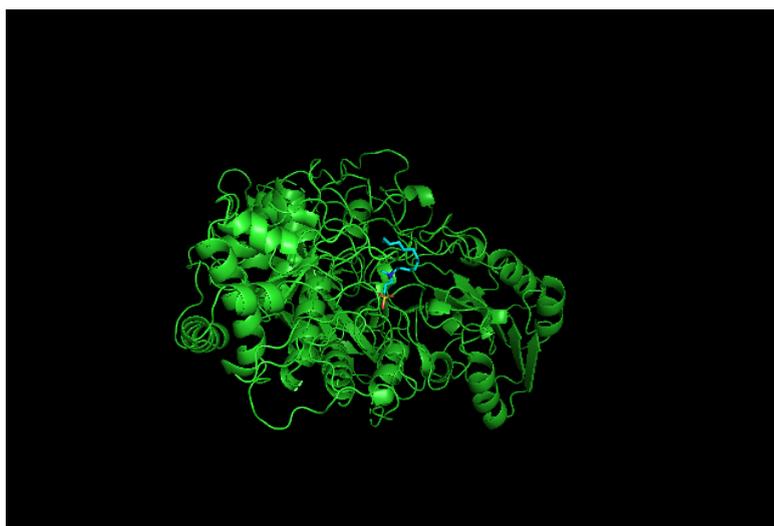


FIGURA 3. Complexo de ligação Liquefina e Sephadex obtido através de docking molecular. Fonte: Os autores

Com o sistema preparado, o próximo passo foi configurar a simulação de dinâmica molecular no CHARMM-GUI. O arquivo contendo a Liquefina e a Sephadex foi carregado, e o sistema foi configurado, incluindo a solvatação em uma caixa de água e ajuste do pH para 5, com a temperatura definida para 303 K. O CHARMM-GUI gerou a topologia e as coordenadas para ambas as moléculas e adicionou íons para neutralizar o sistema. (CHARMM-GUI)

Depois da preparação, os arquivos resultantes foram exportados para o GROMACS, onde foram configurados e iniciados os procedimentos de minimização, equilíbrio e a simulação propriamente dita. Finalmente, ao concluir os cálculos da dinâmica molecular, foram produzidos gráficos mostrando a energia total do sistema e o potencial de interação ao longo do tempo (GROMACS).

Outro parâmetro analisado foi o *root mean square deviation* (RMSD) do inglês, desvio quadrático médio, que deve apresentar valores menores ou iguais a 3, e tem por objetivo quantificar a variação estrutural da hidrolase durante todo o tempo de simulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a finalização das dinâmicas moleculares da enzima com a resina, foram geradas a Figura 4, que apresenta o gráfico da energia total do sistema, e a Figura 5, que mostra o gráfico da energia de interação do ligante com a proteína. Este último gráfico representa a soma dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb, que são fundamentais para entender as interações intermoleculares envolvidas.

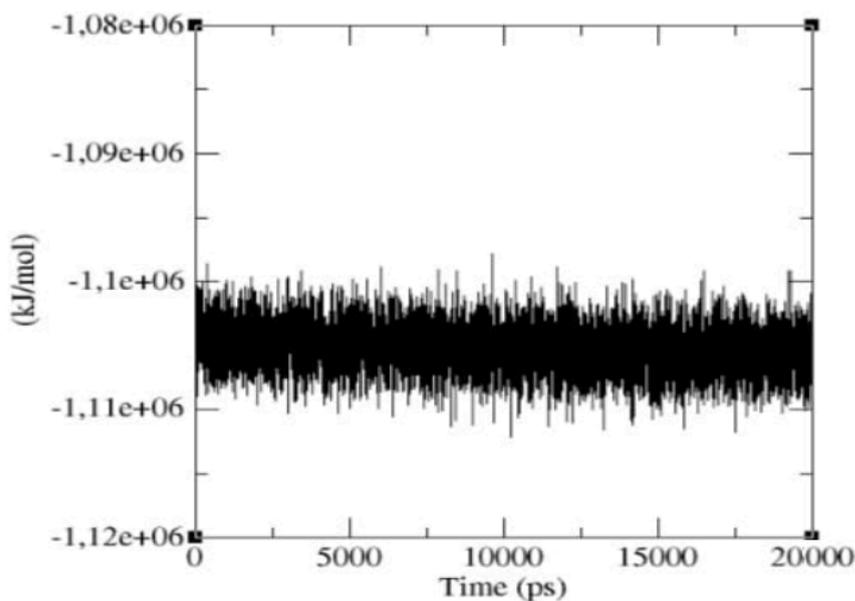


FIGURA 4. Energia total do Sistema de dinâmica da Liquanase com a Sephadex. Fonte: Os autores

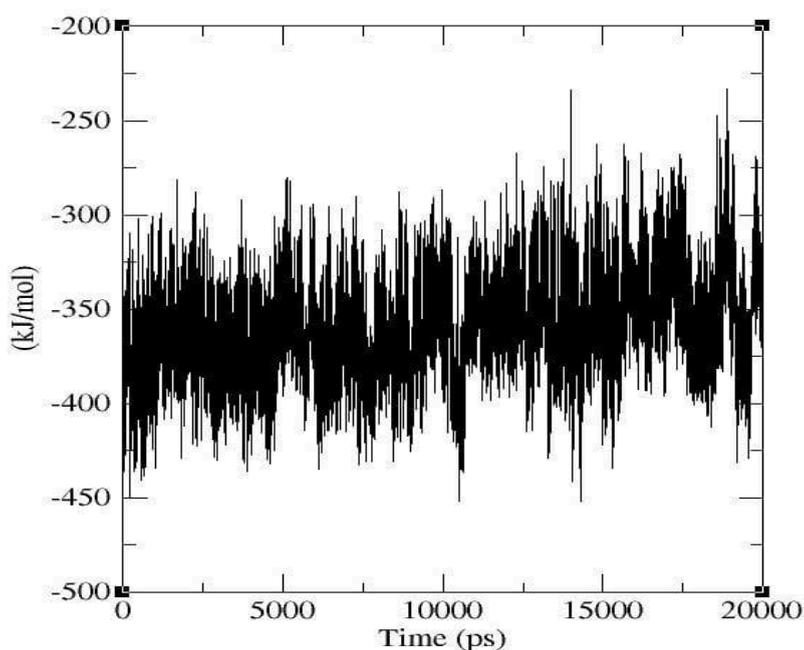


FIGURA 5. Gráfico do potencial de interação entre a Liquanase e a Sephadex ao longo do tempo de simulação. Fonte: Os autores

A análise das energias totais e de interação, conforme mostrado nas Figuras 4 e 5, revela que tanto a energia total do sistema quanto a energia de interação entre a resina Sephadex e a Liquanase são negativas. Esses valores negativos são significativos, pois indicam a ausência de forças repulsivas

entre a hidrolase e a resina cromatográfica. Ao contrário, a predominância de interações de caráter atrativo durante todo o tempo de simulação sugere uma forte afinidade entre as moléculas, o que é crucial para a eficiência na recuperação das enzimas.

A estabilidade da proteína durante a simulação foi avaliada por meio do cálculo do RMSD, que resultou em um valor de 0,935 Å. Esse baixo valor de RMSD indica uma variação estrutural mínima da Liquefanase ao longo do tempo, o que é um indicativo de que a enzima mantém sua conformação original durante a interação com a Sephadex. A estabilidade estrutural observada é um ponto positivo, pois sugere que a enzima não sofreu desnaturação ou alterações conformacionais significativas que poderiam comprometer sua atividade catalítica.

Esses resultados não apenas reforçam a viabilidade do uso da resina Sephadex para a recuperação da Liquefanase, mas também apontam para a importância de interações atrativas em sistemas biomoleculares, onde a estabilidade da proteína pode ser um fator determinante na eficiência do processo. Além disso, esses resultados dão abertura para futuras investigações sobre a otimização das condições de interação entre enzimas e resinas, visando melhorar a recuperação enzimática e a aplicação industrial dessas biomoléculas.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a resina Sephadex pode ser uma boa opção para a recuperação da enzima Liquefanase no processo biológico completo (PCB). As análises *in silico*, por meio de docking molecular e dinâmica molecular, mostraram que a resina se liga de forma eficiente à enzima, com um baixo RMSD de 0,935 Å, indicando que a estrutura da Liquefanase permanece estável durante a interação. As energias totais e de interação negativas indicam que não há forças repulsivas entre a enzima e a resina, sugerindo uma ligação atrativa. No entanto, ainda se faz necessário expandir o tempo simulacional da dinâmica molecular realizada entre a Liquefanase com a Sephadex, com o objetivo de verificar o comportamento da interação ao decorrer de um intervalo de tempo maior.

Observação: Os nomes da resina e da enzima testada foram suprimidos por questões de patente.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

P.H.M.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Redação do manuscrito original

O.V.O.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Redação do manuscrito original

T.M.E.: Conceitualização, Recebimento de financiamento, Pesquisa, Administração do projeto, Supervisão

L.J.B.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Supervisão.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal de São Paulo, por fornecer a bolsa PIBIFSP que possibilitou execução dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

CLAES, Arne; DEPARIS, Quinten; FOULQUIÉ-MORENO, María R.; THEVELEIN, Johan M. **Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates.** *Metabolic Engineering*, [S.l.], v. 22, p. 1-10, 2014. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/meteng>. Acesso em: 2 ago. 2023.

CHARMM-GUI. CHARMM-GUI: a web-based interface for CHARMM. Disponível em: <https://www.charmm-gui.org/>.

FERREIRA, Leonardo G.; SANTOS, Ricardo N. dos; OLIVA, Glaucius; ANDRICOPULO, Adriano D. **Molecular docking and structure-based drug design strategies**. *Molecules*, v. 20, n. 8, p. 13384-13418, jul. 2015. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/molecules>. Acesso em: 1 jul. 2024.

GROMACS. GROMACS: High-Performance Molecular Simulations. Disponível em: <https://www.gromacs.org/>.

MILESSI, T.S.S. Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, [s.l.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/nfscar:9179>.

RINO, José Pedro; COSTA, Bismarck Vaz da. *ABC da simulação computacional*. 1. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2013.

VERLI, Hugo. *Bioinformática da biologia para a flexibilidade molecular*. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014.