

AVALIAÇÃO *in silico* DO BIOPROCESSO DA SOD3 RECOMBINANTE COM FOCO NA ESTABILIDADE EM CULTIVO DE MELAÇO E TERMODINÂMICA DE PURIFICAÇÃO

G. D. Cardoso¹, E. A. Soares², D. Tinôco¹

¹Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
(gdallocardoso@eq.ufrj.br)

² Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Este estudo avaliou *in silico* a produção e purificação da enzima recombinante SOD3. O objetivo foi simular o ambiente *mainstream* (meio contendo melaço a 18 °C) e otimizar a etapa *downstream* via cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. Utilizou-se a dinâmica molecular para estudar a estabilidade estrutural da enzima no biorreator. O acoplamento molecular demonstrou uma interação favorável da cauda His-tag com a resina Ni-NTA (-4,2 kcal/mol), fundamentando o bioprocessamento preditivo.

Palavras-chave: Dinâmica molecular; Docking molecular; GROMACS; Proteína; Bioprocessamento.

INTRODUÇÃO

A Superóxido Dismutase 3 (SOD3), também denominada ECSOD (do inglês, Superóxido Dismutase Extracelular) (Figura 1), é uma metaloenzima glicoproteica homotetramérica que desempenha um papel fisiológico crucial na eliminação de radicais livres de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no espaço extracelular e nos fluidos biológicos. Diferenciando-se das isoformas homólogas intracelular SOD1 (citoplasmática) e SOD2 (matriz mitocondrial), a SOD3 requer íons de Cobre (Cu^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}) como cofatores catalíticos e estruturais essenciais (ANTONYUK *et al.*, 2009).

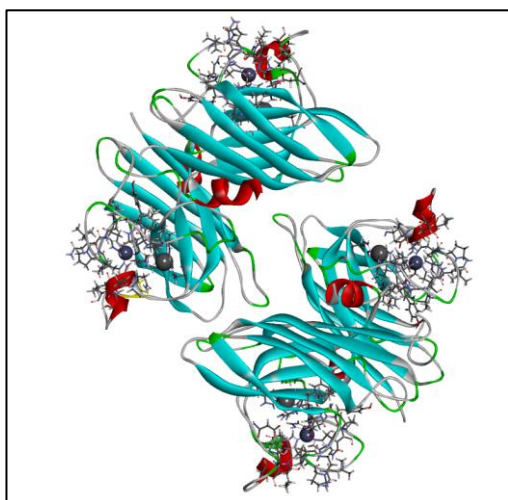


Figura 1. Modelo cristalográfico da SOD3 após remoção de solventes. Fonte: Autoria própria.

Devido à sua capacidade única de mitigar o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) em tecidos periféricos, a SOD3

possui um alto valor agregado com aplicações estratégicas na indústria cosmecêutica, em formulações *anti-aging*, e no setor biomédico/farmacêutico (LEE *et al.*, 2021; NIOD, 2022).

Transpor o potencial terapêutico da SOD3 para a escala industrial impõe significativos desafios de engenharia. A obtenção de proteínas complexas com alto grau de pureza possui frequentemente gargalos de processo nas operações unitárias de recuperação e purificação (etapa *downstream*), que podem representar mais de 50% dos custos totais de produção de um bioproduto (RAMAKRISHNAN; SADANA, 2000).

Na prática industrial, a otimização da etapa *downstream* e a formulação de condições ideais de cultivo dependem majoritariamente de abordagens empíricas. Esse modelo tradicional demanda longos ciclos de desenvolvimento, elevada quantidade de reagentes e resinas cromatográficas de alto custo, limitando a viabilidade econômica do processo comercial (RAMAKRISHNAN; SADANA, 2000).

Nesse cenário, a modelagem molecular surge como uma ferramenta de engenharia preditiva indispensável para o *design* racional de bioprocessos. Ao invés de realizar diversos testes na escala laboratorial, a simulação computacional

permite mapear, em nível atômico, os fenômenos termodinâmicos e físico-químicos que governam a estabilidade da macromolécula. Ao avaliar *in silico* a integridade estrutural da proteína frente a variáveis operacionais, como a composição do meio reacional, temperatura e afinidade por ligantes, a engenharia molecular fornece dados fundamentais para prever o rendimento de separação e mitigar falhas antes do escalonamento (*scale-up*), garantindo uma transição custo-efetiva para a planta piloto (ROUHANI *et al.*, 2018).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade conformacional da enzima recombinante SOD3-HisTag em ambiente reacional de indução a 18 °C e simular preditivamente sua interação físico-química com o complexo Ni-NTA (do inglês, ácido nitrilotriacético de níquel), utilizando as ferramentas de Dinâmica Molecular (DM) e *Docking* Molecular, de modo a validar a viabilidade técnica e otimizar as etapas *mainstream* e *downstream* do bioprocessos.

O cenário de referência usado neste estudo foi a expressão heteróloga da enzima na cepa hospedeira recombinante *Escherichia coli* BL21(DE3). O modelo molecular do construto baseou-se na inclusão de uma cauda de poli-histidina (His-tag) na região terminal da proteína, com o intuito de viabilizar de forma preditiva as etapas subsequentes de purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (do inglês, IMAC).

Como diferencial de sustentabilidade econômica e inserção nos conceitos de economia circular, o ambiente reacional mimetizado computacionalmente baseou-se em uma formulação de meio de cultura que substitui fontes de carbono puras por melaço de cana-de-açúcar, um subproduto agroindustrial abundante no Brasil (FILOSO *et al.*, 2015). Essa composição complexa, contendo açúcares e sais minerais essenciais, foi transposta para os parâmetros de solvatação da simulação, permitindo avaliar a estabilidade da proteína frente às condições operacionais de um biorreator.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da estrutura, inserção da His-tag e investigação estrutural

As coordenadas atômicas tridimensionais da enzima Superóxido Dismutase Extracelular humana (SOD3) foram inicialmente obtidas a partir do repositório *Protein Data Bank* (RCSB PDB), sob o código de identificação 2JLP (ANTONYUK *et al.*, 2009).

A modelagem estrutural preparatória subsequente, que compreendeu a inserção *in silico* da cauda de poli-histidina (His-tag) na extremidade N-terminal

da enzima recombinante, foi executada no software PyMOL *Molecular Graphics System* (Schrödinger, LLC, 2026).

Para a etapa de avaliação pós-simulação, a investigação das trajetórias de Dinâmica Molecular e a análise tridimensional foram conduzidas de forma complementar utilizando o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) em conjunto com o PyMOL.

As ferramentas computacionais foram empregadas para o alinhamento das conformações extraídas ao longo do tempo, permitindo a verificação qualitativa das flutuações estruturais do cerne proteico e de sua cauda flexível. A inspeção visual baseou-se na sobreposição espacial dos modelos e na representação gráfica das superfícies moleculares. Além de possibilitarem o mapeamento detalhado das redes de interações não covalentes no complexo de ancoragem, o PyMOL foi adotado como a ferramenta principal para a renderização em alta resolução das imagens que ilustram os resultados espaciais deste estudo.

Dinâmica molecular e mimetização do ambiente reacional

A validação computacional e a análise da estabilidade conformacional da enzima recombinante SOD3 no ambiente reacional mimetizado (etapa *mainstream*) foram conduzidas no *software* GROMACS 2026, utilizando o campo de força atômico CHARMM36 (BROOKS *et al.*, 2009). A Dinâmica Molecular (DM) clássica baseia-se na integração numérica das Equações de Movimento de Newton. O potencial termodinâmico do sistema é governado pelo campo de força, cuja energia potencial total, $V(r)$, é descrita matematicamente pelo somatório da Equação 1.

A função de energia é dividida em interações ligadas e não-ligadas. O primeiro termo da equação contabiliza os estiramentos de ligação, em que k_b é a constante de força da ligação, e $(b - b_0)$ é a distância de deslocamento em relação ao comprimento de equilíbrio. O segundo termo refere-se aos ângulos de ligação entre três átomos, sendo k_θ a constante de força angular, e $(\theta - \theta_0)$ o desvio em relação ao ângulo de equilíbrio. O terceiro termo descreve os ângulos diedros (ou ângulos de torção), em que k_ϕ é a constante de força do diedro, n é a multiplicidade da função, ϕ é o ângulo diedro em si, e δ representa o deslocamento de fase.

Para garantir a planaridade de certos grupos, o quarto termo contabiliza os diedros impróprios (dobramento fora do plano), com k_ω como a constante de força, e $(\omega - \omega_0)$ representando o ângulo

fora do plano. O quinto termo incorpora o componente de Urey-Bradley, que consiste em um termo cruzado para o dobramento de ângulo utilizando interações não-ligadas do tipo 1,3, sendo k_u a respectiva constante de força, e u a distância entre os átomos em um potencial harmônico.

Por fim, as interações não-ligadas entre pares de átomos (i,j) são representadas pelos dois últimos termos e aplicadas exclusivamente a pares de átomos separados por pelo menos três ligações. A energia de Van der Waals é calculada por um potencial clássico de Lennard-Jones 12-6, em que $R_{min,ij}$ é o ponto onde o potencial cruza o eixo das abscissas (e não o mínimo do potencial). A energia eletrostática de longo alcance é modelada por meio de um potencial Coulombiano, dependente das cargas parciais q_i e q_j , e da distância interatômica r_{ij} .

$$V = \sum_{\text{ligadas}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedros}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{\text{impróprios}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u (u - u_0)^2 + \sum_{\text{não ligadas}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (1)$$

Para propagar o sistema no tempo com um passo de integração de $\Delta t = 2$ fs, as vibrações rápidas envolvendo átomos de hidrogênio foram congeladas utilizando o algoritmo de restrições lineares LINCS. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo método PME (*Particle Mesh Ewald*), cuja formulação divide o cálculo de Coulomb em suas frações real e recíproca.

A trajetória de simulação foi precedida por um rigoroso protocolo de relaxamento estrutural e equilíbrio termodinâmica, garantindo a mimetização das condições operacionais do biorreator. A partir do arquivo .pdb da proteína (2JLP) foram retirados os solventes residuais da cristalização e criado uma caixa cúbica com volume de 1203,45 nm³, contendo 50 moléculas de sacarose, 50 moléculas de glicose e 50 íons de amônio, além da SOD3. Por fim, o sistema foi integralmente solvatado com 37.327 moléculas de água, garantindo a representação explícita e termodinamicamente realista do meio reacional aquoso.

O primeiro passo para a realização da DM foi a minimização de energia por meio do algoritmo de *Steepest Descent*. Após essa etapa, realizou-se a equilibração a volume constante (NVT), que foi conduzida por 100 ps (0,1 ns), totalizando 50.000 passos de integração. Nessa etapa, empregou-se o integrador de dinâmica estocástica, assegurando o acoplamento térmico preciso do sistema a 291,15 K (18 °C). Posteriormente, a equilibração a pressão constante (NPT) foi realizada introduzindo o barostato isotrópico *C-rescale*.

Após as fases de equilibração, a simulação de produção de DM foi executada por 1 ns (500.000 passos de integração). O sistema continuou a ser propagado utilizando o integrador de dinâmica estocástica para a manutenção estrita da temperatura a 291,15 K, com o barostato *C-rescale* para assegurar a pressão de 1 bar e uma compressibilidade isotérmica ajustada para a água. As coordenadas do sistema foram armazenadas a cada 10 ps (*nstxout-compressed* = 5000) para a posterior extração de dados e análise estrutural da trajetória.

Docking molecular e simulação da IMAC

Para prever quantitativamente a eficiência de purificação de SOD3 por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (do inglês, IMAC) (etapa *downstream*), realizou-se o acoplamento molecular estocástico utilizando o AutoDock Vina 1.2.0. O ligante metálico foi modelado acoplado o íon de Níquel (Ni²⁺) ao Ácido Nitrilotriacético (NTA) usando o *software* Avogadro.

A predição da interação termodinâmica entre a resina e a cauda de poli-histidina da enzima foi realizada utilizando a função de escore híbrida do *software*. A Energia Livre de Ligação ($\Delta G_{\text{ligação}}$) estimada pelo Vina é descrita matematicamente pela somatória ponderada das interações intermoleculares, conforme Equação 2.

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \frac{\sum_{i < j} f_{itj}(r_{ij})}{1 + wN_{\text{rot}}} \quad (2)$$

Nessa formulação matemática, o denominador depende de N_{rot} (número de ligações rotativas ativas do ligante) e do seu peso associado (w), que atua como uma penalização entrópica, refletindo a perda de graus de liberdade conformacionais após a ligação. O numerador consiste no somatório de todas as interações aos pares entre os átomos i e j .

A função de interação f_{itj} é avaliada com base na distância de superfície (d_{ij}) interatômica, compreendendo uma soma ponderada de interações estéricas modeladas por duas funções gaussianas

para forças atrativas de dispersão, e um termo quadrático para penalizar repulsões e sobreposições severas, além de termos específicos para afinidade hidrofóbica e ligações de hidrogênio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação termodinâmica do ambiente reacional (etapa *mainstream*)

A primeira etapa computacional foi realizada para validar o comportamento termodinâmico do ambiente reacional mimetizado (etapa *mainstream* - biorreator operando com meio de cultura à base de melaço de cana-de-açúcar a 18 °C) e a integridade estrutural da enzima SOD3 nativa antes das etapas de separação e purificação. Para mimetizar rigorosamente a complexidade dessa formulação no modelo computacional, a solvatação do sistema

incluiu, além do solvente explícito, moléculas de sacarose e glicose, representando as principais fontes de carbono do subproduto agroindustrial. Considerando o volume da caixa de simulação de 1203,45 nm³, a adição de 50 moléculas de sacarose e 50 moléculas de glicose resultou em concentrações efetivas de 23,6 e 12,4 g/L, respectivamente.

A estabilidade global do sistema de simulação foi atestada pela análise das propriedades termodinâmicas macroscópicas ao longo da trajetória de produção. A Figura 2 ilustra a flutuação da temperatura do sistema, evidenciando que o integrador de dinâmica estocástica foi eficiente em manter o acoplamento térmico rigorosamente em torno do *setpoint* operacional de 291,15 K (18 °C), condição ideal para indução heteróloga em *E. coli*, visando minimizar a formação de corpos de inclusão.

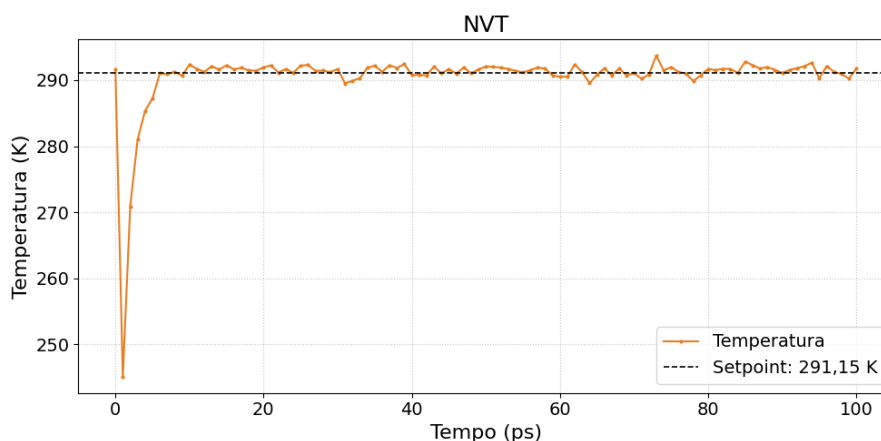


Figura 2. Perfil de temperatura do sistema reacional mimetizado a 18 °C para produção de SOD3.

Concomitantemente, a evolução da densidade do sistema, conforme observado na Figura 3, demonstrou uma rápida convergência e estabilização em um platô característico de meios aquosos complexos. A ausência de derivas significativas na densidade ao longo do tempo de simulação confirmou que o barostato *C-rescale* acomodou adequadamente o volume da caixa,

garantindo que a inserção dos componentes densos do melaço (sacarose e glicose) não causasse instabilidades de pressão (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; BROOKS *et al.*, 2009; CICCOTTI *et al.*, 2022; FILOSO *et al.*, 2015; LINDAHL; HESS; VAN DER SPOEL, 2001).

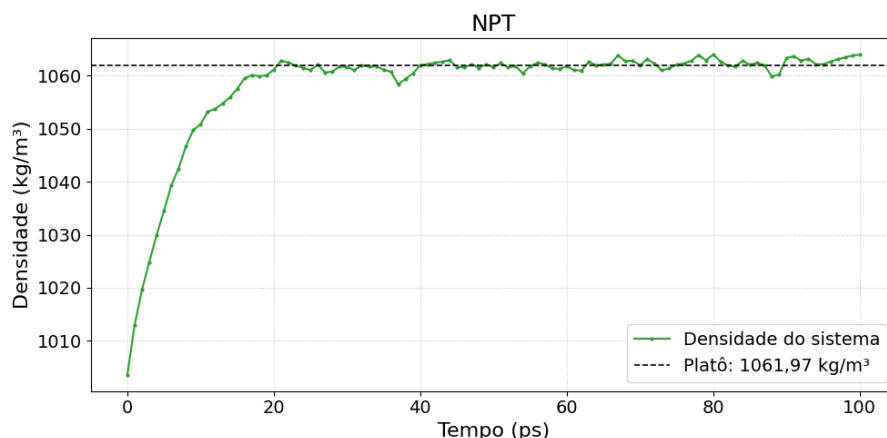


Figura 3. Estabilização da densidade do sistema reacional durante a simulação de produção de SOD3

Estabilidade conformacional da SOD3 e interação com os açúcares do melaço

Para avaliar se as condições físico-químicas do meio complexo poderiam induzir a desnaturação da proteína, o desvio quadrático médio (do inglês, RMSD) do esqueleto carbônico da SOD3 foi monitorado em relação à sua estrutura cristalográfica inicial. Conforme apresentado na Figura 4, após o

relaxamento inicial das cadeias laterais, o RMSD atingiu um platô estável. Essa estabilidade estrutural *in silico* foi considerado um forte indicativo preditivo de que a enzima manteve seu enovelamento tridimensional nativo nas condições de temperatura e solvatação do biorreator (ANTONYUK *et al.*, 2009; FRENKEL; SMIT, 2002; ROUHANI *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2022).

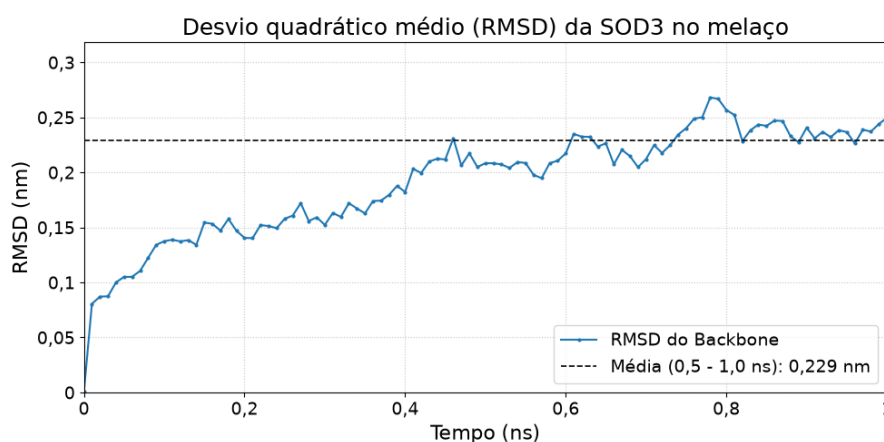


Figura 4. Desvio quadrático médio (do inglês, RMSD) do esqueleto carbônico da SOD3.

Além da integridade estrutural, avaliou-se a interação direta dos solutos do meio com a superfície proteica. A análise de distância mínima (*mindist*) entre a enzima e as moléculas de sacarose (Figura 5A) e glicose (Figura 5B) revelou a

formação de uma camada de solvatação estável. As curtas distâncias registradas ao longo da trajetória indicaram que os açúcares interagiram de forma contínua com os resíduos polares da superfície da

SOD3. Essa rede de interações pode atuar na estabilização termodinâmica da macromolécula por meio de ligações de hidrogênio e efeitos de exclusão de volume, fenômenos frequentemente associados à crioproteção e osmorregulação por polióis e açúcares em bioprocessos (HÂNDEL *et al.*, 2013; LATOUR, 2008; LEACH, 2001; OZBOYACI *et al.*, 2016).

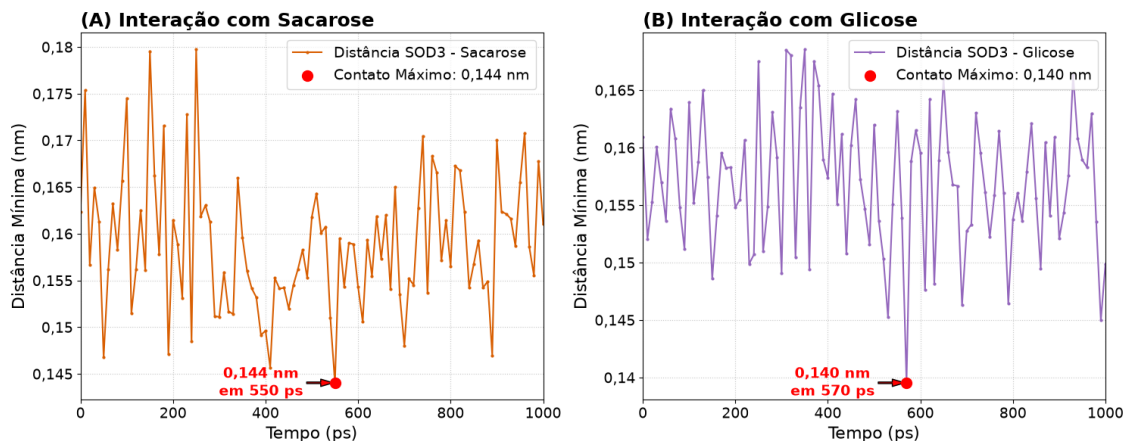


Figura 5. Distância mínima entre a SOD3 e as moléculas de sacarose (A) e glicose (B) do meio reacional

A inspeção visual da trajetória de simulação corroborou os achados quantitativos de estabilidade. A Figura 6 apresenta uma fotografia representativa da trajetória, permitindo a observação direta da manutenção da estrutura quaternária nativa da SOD3 e da complexa rede de interações com o solvente e os açúcares do melaço ao longo do tempo.

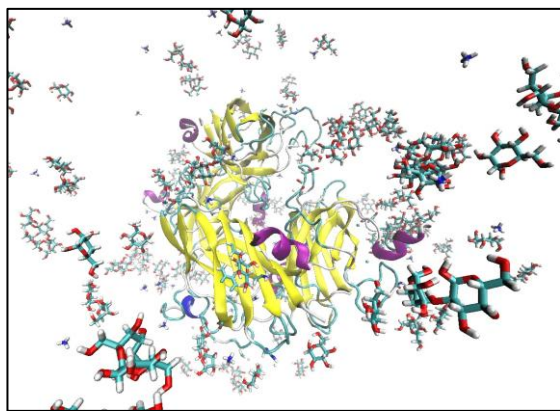


Figura 6. Visualização da SOD3 durante a Dinâmica Molecular através do *software* VMD.

Design do construto recombinante e flexibilidade da cauda His-tag

Uma vez validada a integridade e estabilidade da enzima SOD3 nativa no ambiente reacional do biorreator, a etapa subsequente de engenharia do bioprocesso consistiu no *design* do construto recombinante para viabilizar a separação e recuperação do bioproduto (etapa *downstream*). O desafio técnico residia na separação seletiva da enzima a partir de um meio complexo rico em

proteínas contaminantes da cepa hospedeira e resíduos do melaço. Para contornar esse problema, a estratégia adotada foi a incorporação estrutural de uma cauda de poli-histidina (His-tag) na

extremidade terminal da macromolécula, procedimento realizado *in silico* usando o *software* PyMOL, o que permitiu a futura utilização da IMAC. A Figura 7 ilustra a SOD3 com 6 histidinas em cada uma das suas quatro subunidades, que foram representadas na forma de *sticks*.

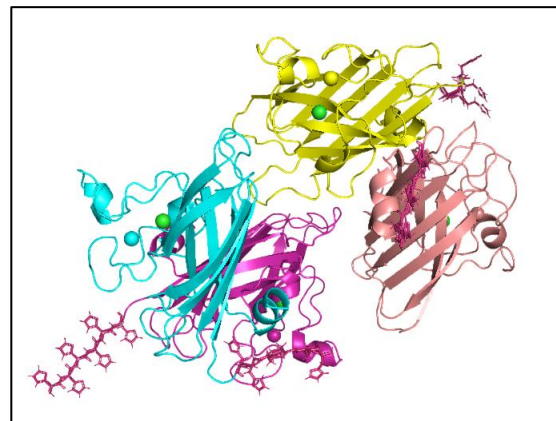


Figura 7. SOD3 com as quatro caudas com seis histidinas cada adicionadas via PyMol.

Após a inserção das histidinas, realizou-se a DM para validar a estabilidade e cálculos termodinâmicos, garantindo que a adição desse apêndice peptídico não comprometesse a estabilidade do cerne (*core*) da SOD3. Para mensurar o impacto estrutural local dessa inserção, calculou-se a Flutuação Quadrática Média (do inglês, RMSF) dos resíduos de aminoácidos a partir das trajetórias de simulação. A Figura 8 apresenta o perfil de mobilidade atômica individual por resíduo, o que revelou que as quatro caudas, alocadas na porção N-terminal da proteína, estavam disponíveis em solução para interagir com a coluna cromatográfica.

A análise do RMSF revelou ainda flutuações severamente restritas nas regiões de estrutura secundária (alfa-hélices e folhas-beta) bem definida do centro da enzima, corroborando o platô de RMSD e indicando uma alta rigidez estrutural da porção funcional. Ao contrário, a região N-terminal, correspondente à cauda His-tag, apresentou picos proeminentes de flutuação. Esse elevado grau de mobilidade terminal foi considerado físico-quimicamente favorável para o bioprocesso. A alta

flexibilidade indicou que a cauda não se encontrava colapsada sobre a superfície hidrofóbica da proteína, mantendo-se estendida e totalmente solvatada. Essa exposição otimizada é considerada um pré-requisito crucial para maximizar a probabilidade de contato e o acoplamento seletivo com os sítios ativos da matriz cromatográfica nas etapas subsequentes (LEE *et al.*, 2021; SALVALAGLIO *et al.*, 2009; STANEVICH; OYENIRAN; SOMANI, 2024).

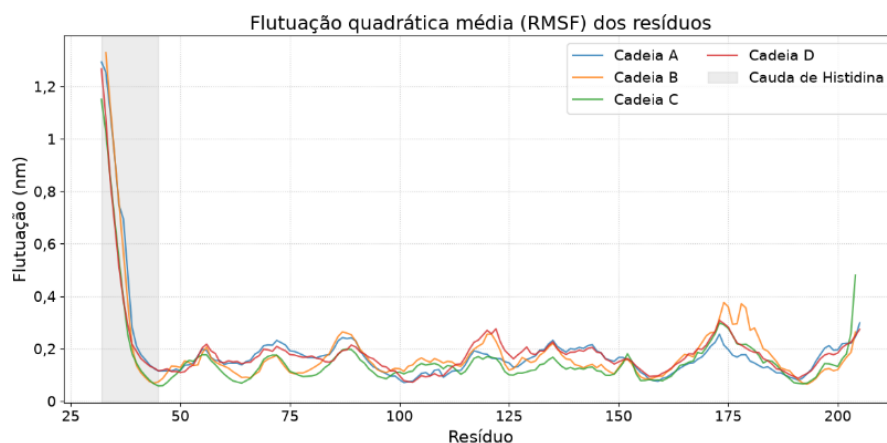


Figura 8. Flutuação quadrática média (do inglês, RMSF) da SOD3 com as quatro caudas de histidina.

Predição da eficiência de purificação por IMAC

Com a flexibilidade e a exposição da cauda His-tag atestadas pela DM, procedeu-se aos cálculos preditivos da interação cromatográfica. O rigor técnico da etapa prévia permitiu que o *docking* estocástico no AutoDock Vina fosse executado utilizando uma conformação termodinamicamente realista e relaxada da enzima. O objetivo do acoplamento molecular foi prever a Energia Livre de Ligação ($\Delta G_{\text{ligação}}$) e mapear as interações intermoleculares entre os resíduos de histidina da cauda flexível e o complexo resina-ligante (Ni-NTA).

Os resultados do acoplamento molecular evidenciaram uma afinidade termodinâmica favorável entre o construto recombinante e a matriz cromatográfica. A Tabela 1 sumariza as nove conformações (modos) energeticamente mais favoráveis geradas pelo algoritmo estocástico do AutoDock Vina, ranqueadas de acordo com os respectivos $\Delta G_{\text{ligação}}$ e RMSD em relação à melhor pose.

O modo de ligação primário (modo 1) apresentou a maior afinidade predita, com um ΔG de -4,206 kcal/mol, configurando-se como o estado conformacional de maior estabilidade e probabilidade de ocorrência. Essa magnitude de

energia livre atestou a viabilidade termodinâmica e a espontaneidade do acoplamento entre os anéis imidazólicos dos resíduos de histidina da cauda N-terminal e os íons de níquel imobilizados na resina. Do ponto de vista operacional, esse valor refletiu uma interação reversível forte o suficiente para reter a proteína alvo de forma seletiva durante as etapas de lavagem das impurezas do melaço, ideal para a cromatografia. Ao mesmo tempo, foi considerada suficientemente branda para permitir uma eluição eficiente por competição com imidazol, preservando a integridade da enzima sem a necessidade de condições extremas de pH (EBERHARDT *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2026; MENG *et al.*, 2011; NOCEDAL; WRIGHT, 2000; TROTT; OLSON, 2010).

Quanto aos parâmetros estruturais, o algoritmo estocástico forneceu dois cálculos de desvio em relação à melhor conformação: o RMSD *lower bound* (*l.b.*), que calcula o melhor ajuste possível sem exigir uma correspondência estrita (1:1) na numeração dos átomos, sendo altamente útil para contabilizar a simetria molecular e avaliar o quão próxima uma pose está da referência, independentemente da orientação; e o RMSD *upper bound* (*u.b.*), que permite uma comparação rigorosa átomo a átomo (1:1) entre duas conformações, medindo o desvio máximo possível. A amplitude

observada nesses desvios ao longo dos diferentes modos (chegando a variações superiores a 7 Å) indicou a existência de múltiplas orientações espaciais sobre a superfície de contato, gerando diversos estados de ancoragem viáveis. Esse comportamento refletiu a alta flexibilidade intrínseca da His-tag, corroborada previamente pela análise de RMSF, e a capacidade dos múltiplos resíduos de histidina atuarem de forma redundante no processo de quelação (CLEMENTE; PRIETO; MARTÍ, 2024; KHARE; GREWAL; BUEHLER, 2023; RAMAKRISHNAN; SADANA, 2000; SANGARE *et al.*, 2025).

Tabela 1. Resultados do *Docking Molecular*.

Modo	$\Delta G_{\text{ligação}}$ (kcal/mol)	RMSD <i>l.b.</i> (Å)	RMSD <i>u.b.</i> (Å)
1	-4,206	0,000	0,000
2	-4,052	8,856	10,12
3	-3,966	4,979	6,735
4	-3,776	2,136	3,441
5	-3,713	5,789	6,861
6	-3,684	2,139	3,421
7	-3,605	9,262	10,25
8	-3,584	5,731	7,356
9	-3,492	5,567	6,787

$\Delta G_{\text{ligação}}$ = energia livre de ligação; RMSD *l.b.*= desvio quadrático médio, limite inferior; RMSD *u.b.*= desvio quadrático médio, limite superior.

Para elucidar a rede de contatos em nível atômico responsável por essa afinidade, a inspeção visual das trajetórias de acoplamento foi realizada. As Figuras 9A e 9B apresentam as visualizações tridimensionais da conformação predita geradas *in silico*. A perspectiva aproximada, apresentada na Figura 9C, evidencia as distâncias atômicas favoráveis à formação das ligações de coordenação. A flexibilidade da cauda permitiu que os resíduos de histidina se acomodassem no bolsão de afinidade do ligante, maximizando o contato efetivo.

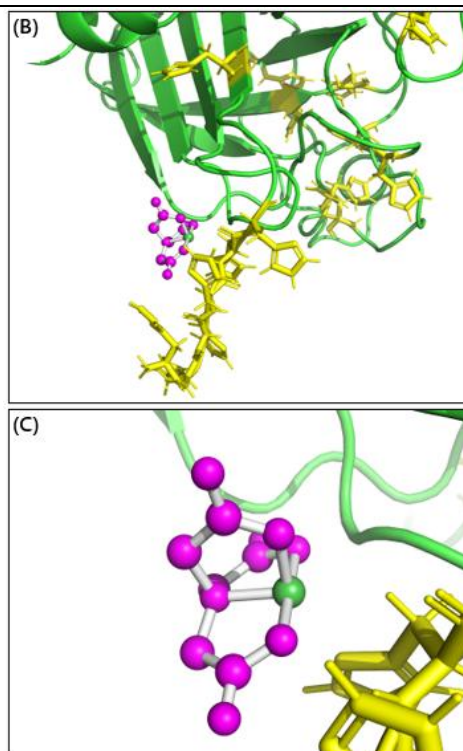
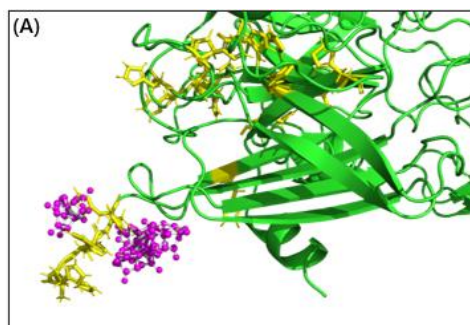


Figura 9. Sobreposição das nove conformações calculadas no AutoDock Vina (A), visualização da interação do modo 1 (B), e aproximação visual da interação do complexo Ni-NTA com as histidinas (C). Em amarelo as caudas de histidina e roxo o complexo Ni-NTA.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade técnica e a fundamentação racional do bioprocessamento de produção e purificação da enzima recombinante SOD3 por meio de ferramentas de engenharia molecular preditiva. No âmbito da etapa *mainstream* do bioprocessamento, as simulações de Dinâmica Molecular comprovaram que o ambiente reacional mimetizado, formado por um meio complexo à base de melaço de cana-de-açúcar, a uma temperatura operacional de 18 °C, foi termodinamicamente estável, preservando o enovelamento quaternário nativo da metaloenzima, o que contribuiu para mitigar os riscos associados à desnaturação estrutural durante o cultivo.

A análise de flutuação atômica também confirmou que a estratégia de inserção da cauda de polihistidina via PyMOL conferiu flexibilidade e exposição espacial necessárias na extremidade N-terminal da SOD3, sem comprometer o cerne proteico estrutural.

Em relação à etapa *downstream* do bioprocessamento, o acoplamento molecular no AutoDock Vina indicou uma interação espontânea e favorável entre a cauda

flexível e o ligante Ni-NTA, apresentando uma energia livre de ligação de -4,206 kcal/mol no modo de maior afinidade. Esse perfil de afinidade moderada e reversível é considerado ideal, pois assegura a retenção seletiva da proteína alvo durante a lavagem dos contaminantes celulares e resíduos do melaço, viabilizando uma eluição competitiva eficiente sob condições brandas de imidazol.

Contudo, é fundamental ressaltar que os modelos preditivos adotados neste trabalho apresentaram simplificações físicas e matemáticas intrínsecas que impuseram um afastamento em relação aos valores reais. Esse distanciamento termodinâmico decorreu principalmente da ausência de um campo de força clássico no AutoDock Vina, o qual utiliza uma função de escore empírica para priorizar a velocidade de varredura estocástica. Com isso, efeitos dinâmicos de solvatação explícita, entropia conformacional detalhada da água, e reorganização da dupla camada elétrica na superfície da resina foram desconsiderados.

Além disso, a adsorção em matrizes de afinidade metálica envolve forças de coordenação química entre os nitrogênios do anel imidazólico da histidina e os orbitais *d* eletronicamente desemparelhados do íon de níquel. Esse fenômeno requer uma descrição por Mecânica Quântica para mapear com exatidão a quebra e formação de ligações de coordenação, os efeitos de polarização eletrônica localizada, e a transferência de carga interatômica, os quais não são integralmente capturados por potenciais clássicos ou equações matemáticas simplificadas de superfície.

Dessa forma, embora a modelagem e o acoplamento molecular constituam uma plataforma rápida e indispensável para o *design* racional de bioprocessos e triagem operacional, o refinamento por abordagens híbridas de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM) e Dinâmica Molecular com solvente explícito representa o próximo passo necessário para estreitar os horizontes preditivos e os rendimentos reais de purificação industrial.

Nesse mesmo contexto, ressalta-se que a simulação de Dinâmica Molecular executada neste trabalho foi conduzida em uma escala de tempo de 1 ns, suficiente para avaliar a estabilidade estrutural inicial e o comportamento conformacional local da proteína no ambiente reacional mimetizado. Todavia, fenômenos biofísicos de maior relevância para a validação do bioprocessos tais como: rearranjos conformacionais de longo alcance, transições entre estados de enovelamento, reequilíbrio da esfera de solvatação e dinâmica coletiva de domínios proteicos tipicamente se manifestam em escalas de tempo da ordem de centenas de nanossegundos a microssegundos.

Assim, simulações de duração estendida, na faixa de 100 ns a 1 μ s, são necessárias para confirmar com maior rigor as conclusões aqui apresentadas e descartar eventuais artefatos resultantes do curto horizonte temporal adotado. É importante destacar, contudo, que a simulação de 1 ns não invalida os resultados obtidos: ela estabelece uma linha de base sólida e indica um caminho metodologicamente consistente a ser aprofundado, funcionando como etapa exploratória indispensável para orientar as simulações subsequentes de maior custo computacional.

Nesse sentido, a realização de simulações de Dinâmica Molecular em escalas de tempo estendidas constitui uma das perspectivas centrais para trabalhos futuros, com vistas à consolidação e validação aprofundada dos resultados preditivos aqui apresentados.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Alice Zarur Coelho, pelo suporte teórico durante a realização da disciplina Tópicos especiais - Desenvolvimento de Bioprocessos, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB) da Escola de Química da UFRJ, em que este trabalho foi apresentado.

REFERÊNCIAS

- ANTONYUK, S. V. et al. The Structure of Human Extracellular Copper-Zinc Superoxide Dismutase at 1.7 Å Resolution: Insights into Heparin and Collagen Binding. *Journal of Molecular Biology*, [S.l.], v. 388, n. 2, p. 310-326, 2009. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.03.026.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, [S.l.], v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.
- BROOKS, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, [S.l.], v. 30, n. 10, p. 1545-1614, 2009.
- CICCOTTI, G. et al. Molecular simulations: past, present, and future. *The European Physical Journal B*, [S.l.], v. 95, n. 3, p. 3, 2022.
- CLEMENTE, C. M.; PRIETO, J. M.; MARTÍ, M. Unlocking Precision Docking for Metalloproteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [S.l.], v. 64, n. 5, p. 1475-1487, 2024.
- EBERHARDT, J. et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [S.l.], v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.
- FILOSO, S. et al. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [S. l.], 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.08.012.

FRENKEL, D.; SMIT, B. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications. San Diego: Academic Press, 2002.

HÄNDEL, N. et al. Compensation of the Metabolic Costs of Antibiotic Resistance by Physiological Adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S.l.], v. 57, n. 8, p. 3752–3762, 2013.

HUANG, Y. et al. Deploying the high-throughput virtual screening (HTVS) approach for the identification of new lactate dehydrogenase (LDH) inhibitors with anticancer assets. *Scientific Reports*, [S.l.], v. 16, n. 1, 2026.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996

KHARE, E.; GREWAL, D. S.; BUEHLER, M. J. Bond clusters control rupture force limit in shear loaded histidine-Ni²⁺ metal-coordinated proteins. *Nanoscale*, [S.l.], v. 15, n. 19, p. 8578-8588, 2023.

LATOUR, R. A. Molecular simulation of protein-surface interactions: benefits, problems, solutions, and future directions. *Biointerphases*, [S.l.], v. 3, n. 3, p. FC2-FC12, 2008.

LEACH, A. R. Molecular modelling: principles and applications. Harlow, England; New York: Prentice Hall, 2001.

LEE, M. J. *et al.* Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Skin Aging by Promoting Collagen Production through the Activation of AMPK and Nrf2/HO-1 Cascades. *Journal of Investigative Dermatology*, [S. l.], 2021. DOI: 10.1016/j.jid.2021.02.757.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling*, [S.l.], v. 7, p. 306-317, 2001.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

NIOD. SOD-3: Antioxidant innovation. NIOD, [S. l.], 2022. Disponível em: <https://niod.com/en-us/blog/sod-3-antioxidant-innovation.html>. Acesso em: 23 jun. 2026

NOCEDAL, J.; WRIGHT, S. J. Numerical optimization. New York: Springer, 2000.

OZBOYACI, M. et al. Modeling and simulation of protein-surface interactions: achievements and challenges. *Quarterly Reviews of Biophysics*, [S.l.], v. 49, e4, p. 1-45, 2016.

RAMAKRISHNAN, A.; SADANA, A. Economics of bioseparation processes. *Separation Science and Technology*, [S. l.], v. 2, p. 667-685, 2000. DOI: 10.1016/S0149-6395(00)80065-3.

ROUHANI, M. et al. Molecular dynamics simulation for rational protein engineering: present and future prospectus. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, [S.l.], v. 84, p. 43-53, 2018.

SALVALAGLIO, M. et al. Molecular modeling of Protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, [S.l.], v. 1216, n. 49, p. 8678-8686, 2009.

SANGARE, B. et al. Use of molecular dynamics tools for simulating the adsorption of peptides on metal surfaces to determine the stability of biocomposite hybrid material in a recovery of metal particles context. *Topics in Catalysis*, [S.l.], v. 68, p. 1032-1043, 2025.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System. Versão 3.0. [S. l.]: Schrödinger, LLC, 2026.

STANEVICH, V.; OYENIRAN, O.; SOMANI, S. Modeling chromatography binding through molecular dynamics simulations with resin fragments. *The Journal of Physical Chemistry B*, [S.l.], v. 128, p. 5557-5566, 2024.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, [S.l.], v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

ZHAO, Y. et al. Production of a novel superoxide dismutase by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and analysis of the thermal stability of the enzyme. *Frontiers in Nutrition*, [S.l.], v. 9, 2022.