

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS**

MESTRADO PROFISSIONAL

PATRICK ALLAN DOS SANTOS FAUSTINO

**DINÂMICA MOLECULAR DA LIPASE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
BASEADOS EM LÍQUIDOS IÔNICOS**

ARARAQUARA

2025



PATRICK ALLAN DOS SANTOS FAUSTINO

DINÂMICA MOLECULAR DA LIPASE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
BASEADOS EM LÍQUIDOS IÔNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho

ARARAQUARA

2025

F268d Faustino, Patrick Allan dos Santos.
Dinâmica molecular da lipase em sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos / Patrick Allan dos Santos Faustino. – Araraquara, 2025.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de concentração: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Elías de Souza Monteiro Filho.

1. Dinâmica molecular. 2. Lipase. 3. Sistemas bifásicos aquosos. 4. Líquidos iônicos. 5. Soluções complexas. I. Monteiro Filho, Elías de Souza, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030170PO
Esta ficha não pode ser modificada

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa sobre a dinâmica molecular de lipases em sistemas aquosos bifásicos com líquidos iônicos pode transformar a biotecnologia, otimizando processos industriais, reduzindo custos e impactos ambientais, promovendo desenvolvimento sustentável, fortalecendo a competitividade científica e econômica do Brasil e avançando as áreas de dinâmica molecular e química computacional no cenário global.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The study of the molecular dynamics of lipases in aqueous two-phase systems containing ionic liquids holds significant potential to biotechnology. This research can lead to the optimization of industrial processes, a reduction in costs and environmental impact, and the promotion of sustainable development. Furthermore, it stands to bolster Brazil's scientific and economic competitiveness while advancing the global understanding of molecular dynamics and computational chemistry.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR DA LIPASE EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS BASEADOS EM LÍQUIDOS IÔNICOS.

AUTOR: PATRICK ALLAN DOS SANTOS FAUSTINO

ORIENTADOR: ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO (Participação Virtual)
Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal

Araraquara, 09 de setembro de 2025

À minha família, MARIA JULIA, MINHA FILHA e CRISTAL, pais e irmãos. Em exemplo de superação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, Criador dos céus e da Terra.

Agradeço a minha esposa Maria Julia Dantas Marcondes Faustino pelo companheirismo e dedicação que tem para com nossa família.

Agradeço aos meus pais José Roberto Faustino e Carla Bhetts Silva dos Santos Faustino, que me ensinaram o melhor caminho na vida.

Aos meus irmãos Caique Italo Santos Faustino e Andria Mara Santos Faustino, que sempre estiveram perto de mim.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr. Elias Monteiro de Souza Filho, responsável pela concretização deste trabalho, me orientando sempre de perto de forma técnica, precisa, simples e humildade ímpar.

Aos professores e pessoas que de alguma forma, contribuíram com orientações neste trabalho: Leandro Martinez e ArieH Ben-Naim.

Esta pesquisa tornou-se possível graças aos recursos computacionais disponibilizados pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

As obras do Senhor são grandes, estudadas por todos os que tem prazer nelas.

Salmos 111.2 (BKJ)

RESUMO

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) com líquidos iônicos (LI) representam a tecnologia promissora para a purificação de enzimas de interesse comercial, mas a influência da estrutura do líquido iônico na estabilidade enzimática durante a partição permanecia pouco compreendida. Neste contexto, este trabalho investigou, através de técnicas computacionais, o impacto do comprimento da cadeia alquílica de ânions à base de colina no particionamento e a integridade estrutural da lipase. Para isso, empregaram-se simulações de dinâmica molecular (MD) combinadas com análises termodinâmicas e estruturais avançadas. Os resultados demonstraram que a lipase se comportou como hidrofílica, e que o aumento da cadeia alquílica do ânion intensificou seu particionamento para a fase aquosa. Contudo, essa maior eficiência de partição veio acompanhada de uma transição conformacional complexa: observou-se aumento da área de superfície acessível ao solvente (SASA) simultâneo a diminuição do raio de giro (RG). A análise de estrutura secundária (DSSP) revelou que este rearranjo se deveu à formação de α -hélices na superfície da enzima, e não a desnaturação generalizada. Adicionalmente, as análises da termodinâmica da solvatação elucidaram um segundo paradoxo: enquanto a MDDF mostrou que os ânions do LI estabeleceram interações fortes e localizadas com a lipase, a análise de KBI indicou que, em média, foram mais excluídos que o cátion colina, que interagiu de forma mais difusa. O estudo, portanto, concluiu que o design da cadeia alquílica do líquido iônico modula um delicado equilíbrio entre a eficiência da extração e a estabilidade da enzima, fornecendo mecanismo molecular detalhado que é crucial para o desenvolvimento racional de bioprocessos.

Palavras-chave: dinâmica molecular; lipase; sistemas bifásicos aquosos; líquidos iônicos; soluções complexas.

ABSTRACT

Ionic liquid (IL)-based aqueous two-phase systems (ATPS) are a promising technology for enzyme purification, yet the influence of the ionic liquids structure on enzymatic stability during partitioning has remained poorly understood. In this context, this work investigated, through computational techniques, the impact of the anion alkyl chain length in choline-based ILs on the partitioning and structural integrity of lipase. To this end, molecular dynamics (MD) simulations were combined with advanced thermodynamic and structural analyses. The results demonstrated that the lipase exhibited hydrophilic behavior, and that increasing the anion's alkyl chain length enhanced its partitioning into the aqueous phase. However, this improved partitioning efficiency was accompanied by a complex conformational transition, featuring a simultaneous increase in the solvent-accessible surface area (SASA) and a decrease in the radius of gyration (RG). Secondary structure analysis (DSSP) revealed that this rearrangement was due to the formation of α -helices on the enzyme's surface, rather than to general denaturation. Furthermore, solvation thermodynamics analyses elucidated a second paradox: while Minimum Distance Distribution Functions (MDDF) showed strong, localized interactions between the anions and the lipase, Kirkwood-Buff Integral (KBI) analysis indicated that, on a volumetric average, these anions were more excluded from the protein's vicinity than the more diffusely interacting choline cation. This study, therefore, concludes that the anion design modulates a delicate balance between extraction efficiency and enzyme stability, providing a detailed molecular mechanism that is crucial for the rational design of bioprocesses.

Keywords: molecular dynamics; lipases; aqueous two-phase systems; ionic liquids; complex solutions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Energias e termos de interações em uma molécula.	20
Figura 2 - Etapas de caixa de simulação.	21
Figura 3 - Esquema de integração numérica da dinâmica molecular.	25
Figura 4 - Diagrama de fases de uma mistura ternária.	33
Figura 5 – Diagrama de fases ternário simplificado.	35
Figura 6 - Moléculas utilizadas nas simulações.	42
Figura 7 – Fase superior aquosa constituída por EstA, líquido iônico e polímero.	44
Figura 8 – Fase inferior orgânica constituída por EstA, líquido iônico e polímero.	45
Figura 9 – Diferença entre os tipos de funções de distribuição	49
Figura 10 – Coeficiente de partição ($\log K$) em função das cadeias alquílicas	50
Figura 11 – Parâmetro preferencial de solvatação para as fases	51
Figura 12 – MDDF: 1UKC/Água na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114	53
Figura 13 - MDDF: 1UKC/Água na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114	54
Figura 14 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114	55
Figura 15 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114	55
Figura 16 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114	56
Figura 17 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114	56
Figura 18 – KBI: 1UKC/Água na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114	57
Figura 19 - KBI: 1UKC/Água na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114	58
Figura 20 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114	59
Figura 21 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114	59
Figura 22 – Mapa de Densidade: 1UKC/Acetato na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114	61
Figura 23 - Mapa de Densidade: 1UKC/Colina na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114	61
Figura 24 - Mapa de Densidade: 1UKC/Acetato na fase orgânica para Colina/Acetato/Triton X-114	62
Figura 25 - Mapa de Densidade: 1UKC/Colina na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114	62

Figura 26 - MDDF: 1UKC/Líquido iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114	63
Figura 27 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114	64
Figura 28 - Mapa de Densidade: 1UKC/Hexanoato na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114	64
Figura 29 - Mapa de Densidade: 1UKC/Hexanoato na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114	65
Figura 30 - SASA – 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114	67
Figura 31 - SASA – 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114	67
Figura 32 – SASA - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	68
Figura 33 - SASA - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	68
Figura 34 - RG - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114	70
Figura 35 - RG - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114	70
Figura 36 - RG - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	71
Figura 37 - RG - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	71
Figura 38 - DSSP - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114	72
Figura 39 - DSSP - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114	73
Figura 40 - DSSP - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	74
Figura 41 - DSSP - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	74
Figura 42 - RMSF - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114	76
Figura 43 - RMSF - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114	76
Figura 44 - RMSF - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	77
Figura 45 - RMSF - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens para cada composição de uma SAB	31
Tabela 2 – Propriedades e fatores envolvidos na extração líquido-líquido	32
Tabela 3 – Frações mássicas de cada componente para as fases	44
Tabela 4 – SASA e RG para a lipase nos sistemas e fases estudados	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MD	Molecular Dynamics
SAB	Sistema Aquoso Bifásico
KBI	Kirkwood-Buff Integrals
CID	PubChem Compound Identification
PDB	Protein Data Bank
MDDF	Minimum-Distance Distribution Functions
SASA	Solvent Accessible Surface Area
RG	Radial Gyrate
LI	Líquido Iônico
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
DSSP	Dictionary of Secondary Structure of Proteins

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	DINÂMICA MOLECULAR	16
3.1.1	Preparo da topologia da biomolécula	17
3.1.2	Definindo a caixa de simulação	21
3.1.3	Minimização do sistema	22
3.1.4	Equilíbrio NVT e NPT	23
3.1.5	Produção da dinâmica molecular	24
3.2	ENZIMAS LIPASES	26
3.3	SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E LÍQUIDOS IÔNICOS	29
3.4	TEORIA DE KIRKWOOD-BUFF E FUNÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	ARQUIVOS DE ENTRADA	41
4.2	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM GROMACS	45
4.3	INTEGRAIS DE KIRKWOOD-BUFF	46
4.4	FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE DISTÂNCIA MÍNIMA	48
4.5	USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	49
5	RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO	50
5.1	PREFERÊNCIA DE SOLVATAÇÃO RELATIVA	50
5.2	TERMODINÂMICA DA SOLVATAÇÃO	52
5.3	ANÁLISE ESTRUTURAL DA LIPASE	66
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE A – DECLARAÇÕES DE DISPONIBILIDADE DE DADOS	90
	DADOS CURRICULARES	91

1 INTRODUÇÃO

Lipases são classes de enzimas biocatalisadoras capazes de promover lises de lipídeos, representam um dos pilares da biotecnologia moderna devido à impressionante versatilidade e aplicabilidade em uma vasta gama de setores industriais como a produção de fármacos e biocombustíveis. Contudo, para que o potencial seja plenamente aproveitado, um processo de purificação eficiente, conhecido como particionamento, é absolutamente crucial. O particionamento, no contexto da biotecnologia, é uma técnica de separação e purificação, sendo a extração líquido-líquido a mais proeminente, representada neste estudo pelos sistemas aquosos bifásicos (SAB).

Devido as características de complexidade relacionada a peculiaridades individuais para cada biomolécula existente e dos componentes químicos que constituem os SAB, estudos com simulações de dinâmica molecular (MD) são de extrema importância nos planejamentos e previsões no desenvolvimento de técnicas biotecnológicas que buscam ampliar para escala industrial e comercial o uso de uma biomolécula de interesse.

Os SAB têm se destacado como ferramenta eficiente para a extração e purificação de biomoléculas, devido à biocompatibilidade e seletividade. Recentemente, a incorporação de líquidos iônicos (LI) a esses sistemas tem despertado crescente interesse científico, uma vez que esses compostos oferecem vantagens significativas, como a afinidade ajustável e baixa toxicidade. Neste contexto, a compreensão detalhada das interações moleculares em SAB baseados em LI é essencial para otimizar processos de separação e purificação de enzimas, como a lipase.

As simulações MD surgem como ferramenta poderosa para explorar o comportamento conformacional e a solvatação de biomoléculas em soluções complexas. Através de simulações de MD, é possível obter informações detalhadas sobre as interações intermoleculares, a estabilidade estrutural e os parâmetros de solvatação de biomoléculas em diferentes ambientes. Além disso, a teoria de Kirkwood-Buff fornece base teórica robusta para relacionar propriedades

microscópicas com grandezas termodinâmicas macroscópicas, como compressibilidade isotérmica, coeficiente de atividade e volumes molares.

Neste estudo, é utilizado simulações de MD para investigar a influência das propriedades físico-químicas de líquidos iônicos sobre o comportamento conformacional e a solvatação da lipase em sistemas aquosos bifásicos. O trabalho tem se concentrado na modificação estrutural da cadeia alquílica da região aniônica dos líquidos iônicos à base de sais de colina, a fim de avaliar como essas alterações impactam a estabilidade estrutural, a partição enzimática e a seletividade do SAB.

2 OBJETIVO

Este estudo tem aprofundado, de forma inovadora, a compreensão do comportamento de enzimas e proteínas em sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por líquidos iônicos (LI). Para tanto, são empregadas simulações de dinâmica molecular (MD) com o propósito de avaliar parâmetros conformacionais e propriedades físico-químicas da lipase. A investigação se concentrou na modificação estrutural da cadeia alquílica da região aniônica de LI à base de sais de colina, para delimitar como essas alterações influenciam os processos de solvatação e particionamento.

Por meio da dinâmica molecular, o estudo tem buscado atingir os seguintes objetivos específicos:

1. Compreender interações moleculares em SAB:
 - Analisar as interações intermoleculares entre a lipase e os componentes das fases líquidas do sistema bifásico, avaliando como essas interações determinam a distribuição da enzima entre as fases.
2. Avaliar a estabilidade estrutural e conformacional da lipase:
 - Investigar o impacto das condições físico-químicas de diferentes sistemas bifásicos sobre a estabilidade e a conformação da lipase, destacando a influência de cadeias alquílicas aniônicas.
3. Otimização de condições de separação em SAB:
 - Identificar os parâmetros operacionais e estruturais que aumentem a seletividade e eficiência do sistema aquoso bifásico para a separação e purificação da lipase.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DINÂMICA MOLECULAR

Para investigar as propriedades dinâmicas de uma molécula, a comunidade científica emprega um método conhecido como Dinâmica Molecular (MD, do inglês *Molecular Dynamics*). Esse método permite estudar a movimentação de um sistema molecular composto por moléculas, biomoléculas e solventes ao longo do tempo, levando em consideração as interações moleculares que ocorrem nesse ambiente.

A MD é ferramenta extremamente poderosa por diversas razões (Hollingsworth; Dror, 2018). Em primeiro lugar, proporciona controle preciso e refinado em comparação com técnicas experimentais. No caso de biomoléculas, por exemplo, é possível ajustar parâmetros como estados de protonação, temperatura, pressão e a presença de ligantes, permitindo análise detalhada do sistema sob diferentes condições (Allen; Tildesley, 2017b). Além disso, a MD possibilita a observação de eventos moleculares em escalas de tempo variáveis, considerando processos altamente dinâmicos, como flutuações conformacionais, até interações intermoleculares de longo prazo, como a estabilização de complexos biomoleculares.

Devido a essas vantagens, os pesquisadores utilizam amplamente as simulações de MD para obter informações e predições sobre sistemas moleculares em escala atômica. Com isso, as simulações fornecem visão atomística que complementa a descrição macroscópica obtida por meio de análise experimental.

O método da MD baseia-se na aplicação da segunda lei de Newton para determinar as forças atuantes em cada átomo a partir das condições iniciais do sistema. O algoritmo, então, usa essas forças para calcular as posições dos átomos no próximo intervalo de tempo e repete esse processo continuamente ao longo da simulação. Além disso, diferentes parâmetros de simulação podem ser ajustados para refletir a realidade experimental de maneira mais fiel, incluindo ajustes de potenciais intermoleculares, solventes explícitos ou implícitos, e a inclusão de modelos de campos de forças externos que possam influenciar as interações moleculares.

Com o avanço da capacidade computacional e o desenvolvimento de algoritmos mais eficientes, a aplicação da MD tem se expandido para diversas áreas, incluindo biofísica, bioquímica, ciência dos materiais e nanotecnologia (Allen; Tildesley, 2017a, 2017c; Berendsen; van der Spoel; van Drunen, 1995). Essa abordagem permite não apenas a compreensão detalhada do comportamento molecular, mas também a modelagem e o design de novos materiais e fármacos, tornando-se ferramenta indispensável na pesquisa científica e no desenvolvimento tecnológico.

A realização de simulações de MD requer o uso de softwares amplamente difundidos e estabelecidos no meio acadêmico, sendo os principais o GROMACS (Berendsen; van der Spoel; van Drunen, 1995; Abraham *et al.*, 2015), AMBER (Case *et al.*, 2005), NAMD (Phillips *et al.*, 2020), LAMMPS (Thompson *et al.*, 2022) e OpenMM (Eastman *et al.*, 2024).

As etapas básicas de uma simulação de dinâmica molecular utilizando GROMACS (Abraham *et al.*, 2015; Berendsen; van der Spoel; van Drunen, 1995; Lemkul, 2024) compreendem:

- Preparo da topologia da biomolécula;
- Definindo a caixa de simulação;
- Minimização do sistema;
- Equilíbrio NVT e NPT, e;
- Produção da dinâmica molecular.

3.1.1 Preparo da topologia da biomolécula

A etapa inicial de uma simulação de Dinâmica Molecular (MD) consiste na preparação da topologia da molécula, um processo fundamental para garantir a precisão dos cálculos ao longo da simulação. Esse preparo envolve a obtenção das coordenadas iniciais da biomolécula de interesse, as quais geralmente se extraem de bancos de dados públicos e repositórios, como o *Protein Data Bank* (PDB) e *PubChem/Nation Institute Health*. Para a obtenção de bons resultados, recomenda-se o emprego de estruturas com resolução inferior a 2,5 Å.

Após a obtenção da estrutura da biomolécula de interesse, gera-se o arquivo de topologia, o qual contém todas as informações relacionadas aos potenciais de interação do sistema, extraídas do campo de força escolhido. Esse arquivo especifica os parâmetros necessários para os cálculos das forças atuantes sobre cada átomo. Para a geração da topologia é necessário a escolha do modelo de campo de força mais adequado ao sistema de estudo (Namba; Silva; Silva, 2008). Os modelos de campos de força determinam como as interações moleculares atuam e influenciam diretamente a precisão dos resultados da simulação. Os modelos amplamente utilizados incluem:

- CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) (MacKerell *et al.*, 1998): frequentemente empregado para proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, destaca-se por seu detalhamento e por ter sido parametrizado com funções suaves. Utiliza uma versão modificada do modelo de água TIP3P.
- AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) (Sprenger; Jaeger; Pfaendtner, 2015): desenvolvido com foco em biomoléculas, como proteínas e RNA. Emprega o modelo de água TIP3P, sendo o uso dos modelos TIP4P e SPC não recomendado para este campo de força.
- GROMOS (*GROningen MOlecular Simulation*) (Schuler; Daura; van Gunsteren, 2001): projetado para simulações de solvatação e estudos da dinâmica de macromoléculas, utiliza o modelo de água SPC.
- OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) (Doherty *et al.*, 2017; Doherty; Acevedo, 2018; Jorgensen *et al.*, 2024; Jorgensen; Maxwell; Tirado-Rives, 1996): utilizado em estudos de pequenos compostos orgânicos, biomoléculas e solventes. É compatível com os modelos de água TIP4P ou TIP3P.

A escolha do modelo de campo de força ideal depende das características do sistema estudado, da disponibilidade de parâmetros para as moléculas envolvidas e da forma como se representam essas interações na simulação. A seleção apropriada desse conjunto de parâmetros é essencial para garantir que os resultados obtidos reproduzam de maneira fiel o comportamento da biomolécula no ambiente simulado.

De forma geral, a energia potencial total (E) de um sistema, conforme descrita por um campo de força, é dada pela seguinte expressão matemática (Rapaport, 2004):

$$E = \sum_{\text{ligações}} E_{\text{estiramento}} + \sum_{\text{ângulos}} E_{\text{dobra}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{torção}} + \sum_{\text{pares}} E_{\text{não-ligação}} \quad (1)$$

A energia total do sistema (E), representada na Equação 1 e ilustrado na Figura 1, decompõe-se em duas contribuições principais: interações de ligação ($E_{\text{estiramento}}$, E_{dobra} e $E_{\text{torção}}$) e interações de não-ligação ($E_{\text{eletrostáticas}}$ e E_{vdW}). Cada uma dessas energias é definida como se segue:

- Energia de estiramento ($E_{\text{estiramento}}$): representam as variações no comprimento das ligações covalentes entre átomos.

$$E_{\text{estiramento}} = \sum_i \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 \quad (2)$$

onde k_i , l_i e $l_{i,0}$ representam respectivamente a constante de estiramento, o comprimento final e inicial da ligação covalente entre os átomos.

- Energia de dobra (E_{dobra}): referem-se às mudanças nos ângulos de ligação entre três átomos ligados.

$$E_{\text{dobra}} = \sum_i \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 \quad (3)$$

onde k_i , θ_i e $\theta_{i,0}$ representam respectivamente a constante angular típica, o ângulo final e inicial da interação entre os átomos.

- Energia de torção ($E_{\text{torção}}$): estão associados às torções ao redor das ligações químicas, considerando quatro átomos ligados.

$$E_{\text{torção}} = \sum_i \frac{V_i}{2} (1 + \cos(i\omega - \gamma)) \quad (4)$$

onde V_i , ω e γ representam respectivamente o potencial referencial e as constantes dos diedros típicos das interações entre os átomos.

- Termos eletrostáticos ($E_{\text{eletrostáticas}}$): referem-se à polarização da molécula e as forças de Coulomb entre cargas parciais distribuídas na estrutura molecular.

$$E_{\text{eletrostáticas}} = \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (5)$$

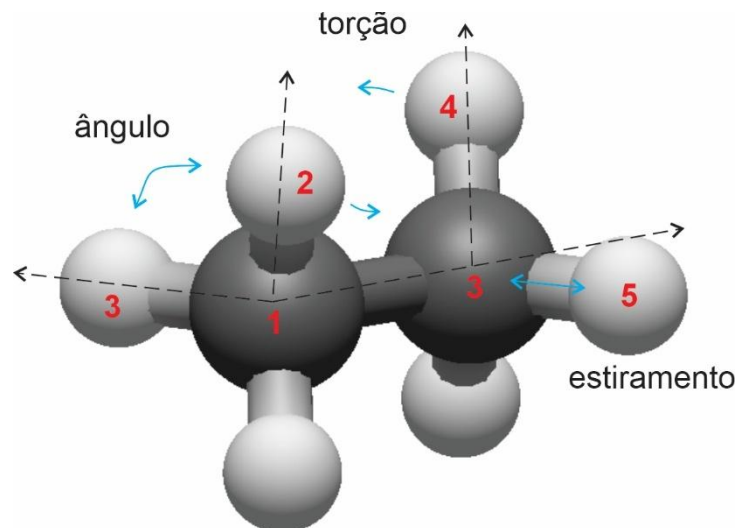
onde $q_i q_j$, ϵ_0 e r_{ij} representam respectivamente as cargas elétricas pontuais, a constante eletrostática típica e o raio de interação das cargas elétricas.

- Termos de Van der Waals (E_{vdW}): representam as forças de atração e repulsão entre os átomos não ligados diretamente, modeladas pela equação de Lennard-Jones.

$$E_{\text{vdW}} = \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (6)$$

onde σ_{ij} , ϵ_0 e r_{ij} representam respectivamente as distâncias finitas de interação, a constante eletrostática típica e o raio de interação das cargas elétricas.

Figura 1 – Energias e termos de interações em uma molécula.



Fonte: autor (2025).

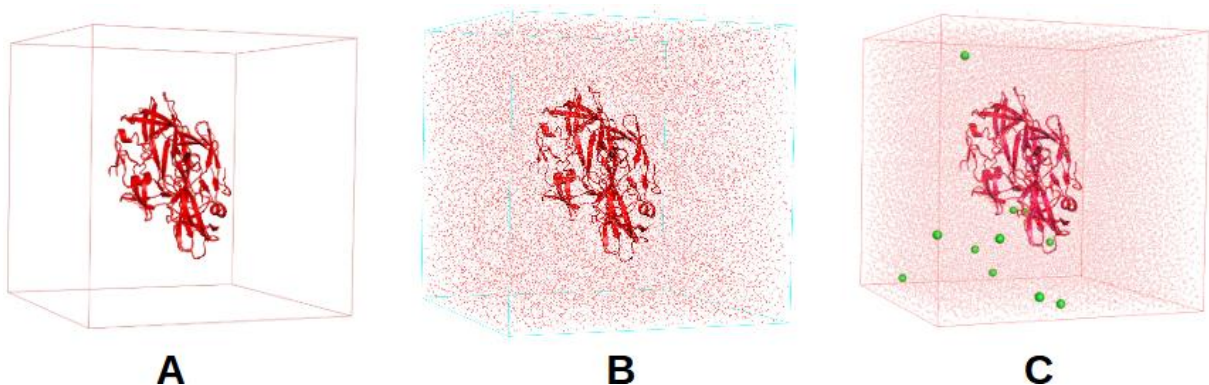
Legenda: átomos de uma molécula orgânica demonstrando as interações existentes entre si. Os átomos 2-1-3 representam movimentos angulares, átomos 2-1-3-4 expressam movimentos de torção entre si e os átomos 3-5 são movimentos de estiramento da ligação covalente. Cores artificiais.

3.1.2 Definindo a caixa de simulação

Para a definição da caixa de simulação, após a geração dos arquivos de topologia na etapa anterior, especifica-se o tamanho e o formato da caixa que conterá o sistema molecular. Essa etapa é fundamental para a aplicação das condições de contorno periódico (Figura 2A), garantindo que as interações entre moléculas sejam tratadas corretamente durante a simulação.

Após a definição da caixa, adicionam-se moléculas de água para solvatar o sistema adequadamente e, se necessário, incorporam-se outros cossolventes para simular condições específicas (Figura 2B). Por fim, neutraliza-se o sistema com a adição de íons apropriados, a fim de equilibrar a carga total da simulação (Figura 2C).

Figura 2 - Etapas de caixa de simulação.



Fonte: autor (2025).

Legenda: proteína PDB ID: 1A8K. Cores artificiais.

Nessa etapa, a escolha do modelo de água requer atenção especial. Existem modelos de água rígidos e flexíveis, variam em seus sítios de interação. Os mais comuns são:

- SPC (Simple Point Charge) (Berendsen *et al.*, 1981): considerado o modelos mais antigos, este modelo de três sítios contém um átomo de oxigênio com carga negativa e dois hidrogênios com carga positiva, utilizando um potencial Lennard-Jones apenas no oxigênio.
- SPC/E (Extended Simple Point Charge) (Berendsen; Grigera; Straatsma, 1987): representa uma versão aprimorada do modelo SPC, com ajustes na

carga e nos parâmetros de interação a fim de reproduzir com maior fidelidade as propriedades termodinâmicas e estruturais da água líquida.

- SPC/Fw (Flexible Simple Point Charge) (Wu; Tepper; Voth, 2006): é a versão flexível do modelo SPC, caracterizada por permitir variações na geometria da molécula.
- TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points) (Jorgensen *et al.*, 1983): é o modelo amplamente utilizado em simulações biomoleculares. Apresenta estrutura semelhante à do modelo SPC, com diferentes parâmetros de carga e interação.
- TIP4P (Chialvo; Bartók; Baranyai, 2006; Jorgensen *et al.*, 1983): este modelo introduz um quarto sítio, conhecido como ponto M (um polo fictício), localizado próximo ao átomo de oxigênio. Essa característica aprimora a representação do momento de dipolo da molécula, resultando em maior precisão na descrição de diversas propriedades físicas.
- TIP4P/2005 (Abascal; Vega, 2005): é uma versão ajustada do TIP4P para reproduzir com maior exatidão a densidade, o ponto de fusão e as propriedades estruturais da água sob diferentes temperaturas e pressões.

Para simulações biomoleculares, utilizam-se amplamente os modelos TIP3P e SPC/E devido à sua compatibilidade com os principais campos de força (CHARMM, AMBER, OPLS, GROMOS). Para simulações que exigem alta precisão na estrutura da água, recomenda-se o uso de modelos como o TIP4P/2005. Em contextos que exigem flexibilidade molecular, modelos como o SPC/Fw mostram-se mais adequados. Portanto, a escolha do modelo ideal está condicionada às propriedades específicas da água que se deseja reproduzir com maior fidelidade, uma vez que cada modelo apresenta vantagens e limitações distintas (Mark; Nilsson, 2001).

3.1.3 Minimização do sistema

Nesta etapa, minimiza-se a energia do sistema por meio do método da descida mais íngreme. O objetivo desse processo é reduzir a energia potencial do sistema,

ajustando as coordenadas dos átomos de forma a eliminar colisões atômicas ou sobreposições não realistas.

A minimização de energia é passo essencial antes de iniciar a simulação de MD, pois garante que o sistema esteja em uma configuração estrutural estável e fisicamente plausível. Esse procedimento é relativamente simples e eficiente, permitindo que a estrutura molecular alcance o estado de menor energia sem a introdução de grandes distorções estruturais.

3.1.4 Equilíbrio NVT e NPT

Após o sistema atingir uma energia potencial suficientemente baixa, submete-se o mesmo a um processo de equilibração dentro do conjunto canônico estatístico adequado. Esse procedimento, realizado antes da fase de produção da MD, assegura que as variáveis termodinâmicas de interesse (como temperatura, pressão e volume) se estabilizem, garantindo que o sistema represente um estado físico realista antes da simulação produtiva (Ke *et al.*, 2022).

O processo de equilibração compreende duas etapas, que utilizam dois conjuntos canônicos estatísticos distintos:

NVT: neste conjunto, mantêm-se constantes o número de partículas (N), o volume (V) e a temperatura (T). O objetivo é estabilizar a energia cinética do sistema, garantindo que a distribuição de velocidades das partículas siga a distribuição de Maxwell-Boltzmann para a temperatura alvo.

- NPT: nesse conjunto, mantêm-se fixos o número de partículas (N), a pressão (P) e a temperatura (T), o que permite ao volume do sistema flutuar naturalmente até atingir uma densidade de equilíbrio. Essa condição é essencial para simular sistemas em condições experimentais realistas.

Para o conjunto NVT, realiza-se a manutenção da temperatura do sistema por meio de algoritmos denominados termostatos. Esses algoritmos ajustam a velocidade

das partículas do sistema para regular a energia cinética e, conseqüentemente, estabilizar a temperatura. Se a temperatura estiver abaixo do valor desejado, aumenta-se a velocidade das partículas, enquanto uma temperatura acima da temperatura alvo desejado resulta na redução das velocidades. Entre os termostatos mais conhecidos, incluem-se: Berendsen (Berendsen, 1991; Berendsen *et al.*, 1984), Nosé-Hoover (Hoover, 1985; Nosé, 1984), Andersen (Andersen, 1980) e V-rescale (Bussi; Donadio; Parrinello, 2007). O uso do termostato V-rescale é o padrão recomendado no GROMACS, pois este algoritmo oferece excelente equilíbrio entre estabilidade e precisão estatística na regulação da temperatura do sistema durante as simulações.

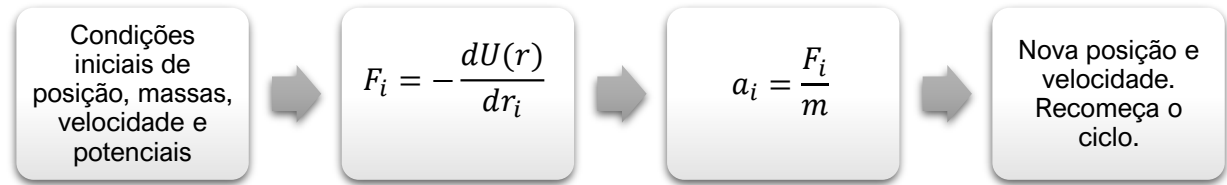
No conjunto NPT, realiza-se a manutenção da pressão do sistema por meio de algoritmos denominados barostatos. Esses algoritmos regulam o volume da caixa de simulação para manter a pressão em valor específico, permitindo que o sistema alcance o estado de equilíbrio adequado às condições experimentais desejadas. Entre os barostatos mais conhecidos, incluem-se: Berendsen (Berendsen, 1991; Berendsen *et al.*, 1984), Parrinello-Rahman (Parrinello; Rahman, 1980, 1981) e C-rescale (Bernetti; Bussi, 2020). O barostato C-rescale é o padrão recomendado no GROMACS.

3.1.5 Produção da dinâmica molecular

Por fim, na etapa de produção, calculam-se todas as velocidades, posições e acelerações de átomos e moléculas por um determinado período. A segunda lei de Newton governa o movimento das partículas. Para determinar a posição e a velocidade dos átomos ao longo do tempo, utilizam-se algoritmos de integração numérica e expansões de Taylor, conhecidos como integradores de equações de movimento. Esses métodos calculam a evolução temporal do sistema a partir das forças aplicadas sobre cada partícula.

Para cada molécula, os átomos possuem coordenadas de posição definidas. Dadas as condições iniciais de posição, massas, velocidades e potenciais para cada átomo, são obtidas as acelerações e forças atuantes, e então uma nova posição e velocidade é fornecida, recomeçando novamente o ciclo, conforme Figura 3.

Figura 3 - Esquema de integração numérica da dinâmica molecular.



Fonte: autor (2025)

Legenda: integração numérica básica realizada durante uma dinâmica molecular.

Dentre os principais integradores utilizados, destacam-se:

- Verlet (VERLET, 1968): trata-se de um dos integradores mais clássicos e amplamente utilizados em MD. Seu método calcula as posições futuras dos átomos com base nas posições atuais e anteriores, o que elimina a necessidade de armazenar as velocidades de forma explícita. Apesar da simplicidade, o algoritmo de Verlet oferece boa conservação de energia, embora a precisão no cálculo das velocidades possa ser limitada, exigindo etapas computacionais adicionais para a obtenção de valores exatos.
- Leap-Frog (Hockney, 1970): representa a variação otimizada do método Verlet, na qual se calculam as velocidades em intervalos de tempo intermediários aos passos de posição, o que melhora a estabilidade e a precisão numérica da simulação. Em virtude da eficiência computacional, da robusta conservação das propriedades do sistema e da menor sensibilidade a erros acumulativos, posiciona-se como dos métodos mais implementados em pacotes de MD, como o GROMACS.
- Velocity Verlet (Swope *et al.*, 1982): este algoritmo constitui melhoria do método Verlet, caracterizado pelo cálculo simultâneo de posições, velocidades e acelerações em cada passo da simulação. Embora mantenha as vantagens do Verlet tradicional (simplicidade e boa conservação de energia), oferece maior precisão na determinação das velocidades. Essa característica o torna

particularmente útil em simulações que exigem controle rigoroso de variáveis termodinâmicas, como aquelas que empregam termostatos e barostatos.

- Estocástico (Langevin ou Browniano) (Li *et al.*, 2017; Tanygin; Melchionna, 2024): esta classe de integradores se caracteriza por adicionar um termo aleatório às equações de movimento, simulando os efeitos de um banho térmico. O integrador de Langevin, como exemplo proeminente, implementa essa abordagem por meio da inclusão de uma força dissipativa e um ruído estocástico, permitindo modelar sistemas em contato com um reservatório térmico. Embora o método seja eficiente para simulações com solventes implícitos e para sistemas que exigem controle preciso da temperatura, a dinâmica de longo alcance da biomolécula pode ser alterada devido ao amortecimento imposto pelo algoritmo.

Diversos textos abordam de maneira detalhada e abrangente os mais variados aspectos das simulações de MD (Allen; Tildesley, 2017a, 2017b; Lemkul, 2024; Namba; Silva; Silva, 2008). O Manual de Referência do GROMACS (Abraham *et al.*, 2025) destaca-se como o ponto de partida e material de aprofundamento fundamental para a realização de simulações por dinâmica molecular.

Toda a abordagem teórica e prática detalhada nesta dissertação, bem como os materiais de apoio correspondentes, encontram-se disponíveis para consulta no repositório oficial do autor em <https://github.com/patrickallanfaustino/tutorials-md> (Faustino, 2025).

3.2 ENZIMAS LIPASES

As lipases (Triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe de enzimas do grupo das hidrolases, cuja função canônica é catalisar a hidrólise de ligações éster em triacilgliceróis insolúveis em água, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Distribuídas amplamente na natureza, essas enzimas desempenham papéis fisiológicos vitais no metabolismo de lipídios em animais, vegetais e microrganismos. Além de sua importância biológica, as lipases emergiram como biocatalisadores de imenso interesse para a ciência e a indústria. Sua

capacidade de atuar sob condições reacionais brandas, aliada a uma notável estabilidade e alta especificidade, as posiciona como ferramentas poderosas e sustentáveis para uma vasta gama de processos biotecnológicos (Nascimento *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2024).

A ubiquidade das lipases permite sua obtenção a partir de diversas fontes, que podem ser classificadas em três grandes grupos: microbianas, animais e vegetais.

- Fontes Microbianas: Este grupo representa a principal fonte de lipases para fins comerciais, devido às vantagens como alto rendimento, facilidade de cultivo em larga escala, estabilidade e simplicidade na recuperação do produto, uma vez que muitas são extracelulares. Entre os microrganismos produtores, destacam-se:
 - Fungos: Espécies como *Candida antarctica* (notória pela lipase B, CALB, uma das mais estudadas e utilizadas), *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* são amplamente empregadas industrialmente.
 - Bactérias: Gêneros como *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. fluorescens*) e *Bacillus* são conhecidos por produzirem lipases com características particulares, como elevada termoestabilidade.
- Fontes Animais: A lipase pancreática suína é o exemplo clássico, sendo fundamental para o processo digestivo em mamíferos. Contudo, seu uso industrial é limitado devido aos custos de extração e purificação, além de questões éticas e de estabilidade.
- Fontes Vegetais: Lipases são encontradas em sementes oleaginosas, como as de mamona, soja e girassol, onde atuam na mobilização das reservas lipídicas durante a germinação. Apesar de seu potencial, sua aplicação em escala industrial ainda é incipiente quando comparada às fontes microbianas.

A grande maioria das lipases compartilha uma estrutura tridimensional comum, conhecida como enovelamento α/β hidrolase (α/β hydrolase fold). No coração catalítico dessa estrutura encontra-se a tríade catalítica, um arranjo espacialmente conservado de três resíduos de aminoácidos – geralmente Serina (Ser), Histidina (His) e um

resíduo ácido (Aspartato ou Glutamato) – responsável pela clivagem da ligação éster (Sampaio *et al.*, 2022).

Um dos fenômenos mais fascinantes e que define funcionalmente as lipases é a ativação interfacial. Em meio homogêneo aquoso, o sítio ativo da enzima encontra-se frequentemente inacessível, coberto por uma alça peptídica anfifílica denominada "tampa" (*lid*). Contudo, na presença de uma interface óleo-água, a enzima sofre uma alteração conformacional. A tampa se desloca, expondo o sítio ativo hidrofóbico e permitindo a adsorção da enzima na interface e o acesso ao substrato lipídico. Este mecanismo confere às lipases uma atividade catalítica mínima em solução aquosa, que aumenta drasticamente na presença de seu substrato agregado, distinguindo-as funcionalmente das esterases (Nascimento; Pereira; de Carvalho Santos-Ebinuma, 2019).

O conjunto de propriedades das lipases as qualifica para um número crescente de aplicações industriais:

- Indústria de Alimentos: Na modificação de óleos e gorduras para produção de margarinas com baixo teor de gorduras *trans*; na maturação de queijos para desenvolvimento de aroma.
- Indústria de Detergentes: São aditivos em formulações de sabões em pó e líquidos para promover a remoção eficiente de manchas de gordura em ciclos de lavagem a frio, resultando em economia de energia.
- Produção de Biocombustíveis: Atuam como catalisadores verdes na transesterificação de óleos vegetais e gorduras residuais para a produção de biodiesel, oferecendo uma alternativa sustentável aos catalisadores químicos convencionais.
- Indústria Farmacêutica e Química Fina: São empregadas na resolução cinética de compostos racêmicos para a produção de fármacos puros, como anti-inflamatórios e agentes antivirais.

A pesquisa contínua na área de lipases foca em superar limitações intrínsecas e expandir seu potencial biotecnológico, seguindo tendências de vanguarda no estado

da arte. Uma das frentes de maior destaque é a imobilização de enzimas, estratégia que consiste na fixação do biocatalisador a um suporte sólido para aumentar sua estabilidade operacional, facilitar a separação do meio reacional e, crucialmente, permitir sua reutilização em múltiplos ciclos, viabilizando economicamente os processos industriais. Paralelamente, a engenharia de proteínas, utilizando ferramentas como a evolução dirigida e a mutagênese sítio-dirigida, permite a modificação racional da estrutura enzimática para aprimorar propriedades como termoestabilidade, especificidade de substrato e atividade catalítica sob condições não convencionais. Adicionalmente, para além da otimização de enzimas já conhecidas, a bioprospecção em ambientes extremos representa uma fronteira promissora, concentrando-se na descoberta de novas lipases de organismos extremófilos que possuam características de robustez inatas, ideais para as condições severas encontradas na indústria. Em conjunto, essas linhas de pesquisa são fundamentais para consolidar o papel das lipases como ferramentas centrais e cada vez mais eficientes da química verde e da biotecnologia moderna (Geow *et al.*, 2021).

3.3 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS E LÍQUIDOS IÔNICOS

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são misturas compostas por dois ou mais componentes que, embora individualmente solúveis em água, tornam-se mutuamente imiscíveis sob determinadas condições, separando-se espontaneamente em duas fases líquidas distintas (Bekavac *et al.*, 2024; Iqbal *et al.*, 2016). Esses sistemas têm amplo uso em processos de extração e purificação de biomoléculas, metais e fármacos, devido à sua biocompatibilidade, seletividade e eficiência. No entanto, os mecanismos da partição são complexos e imprevisíveis.

O princípio da técnica baseia-se no controle de diversos fatores que promovem o particionamento seletivo: a biomolécula de interesse acumula-se preferencialmente em uma das fases, enquanto as impurezas migram para a fase oposta. Esse processo, conhecido como extração líquido-líquido, consiste na transferência de massa de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis (ou parcialmente imiscíveis) postas em contato, entre as quais ocorre a distribuição do composto de interesse determinado pelo equilíbrio termodinâmico (Kula; Kroner; Hustedt, 1982; Silva; Franco, 2000).

O coeficiente de partição (K), que quantifica a distribuição de um soluto entre as fases superior e inferior do SAB, é definido pela Equação 7:

$$K = \frac{[A]_{superior}}{[A]_{inferior}} \quad (7)$$

onde $[A]_{superior}$ e $[A]_{inferior}$ são respectivamente a concentração do componente A na fase superior e na fase inferior, ambos em equilíbrio.

As enzimas constituem alvos frequentes de processos de extração devido à sua relevância biológica e industrial. São moléculas de origem biológica e susceptíveis as condições ambientais. No entanto, a manutenção da integridade funcional durante esses procedimentos é essencial para preservar a atividade catalítica. Métodos tradicionais de extração podem ser agressivos, frequentemente resultando em desnaturação enzimática e perda de atividade, o que torna esses processos ineficientes para aplicações biotecnológicas. (Geow *et al.*, 2021). Nesse contexto, os SAB surgem como alternativa mais suave e eficiente, pois oferecem ambiente menos agressivo à estrutura enzimática. Além de minimizar a desnaturação, esses sistemas promovem altos rendimentos e seletividade aprimorada, o que garante a preservação da funcionalidade enzimática e facilita a purificação e recuperação para aplicações industriais e científicas.

Tradicionalmente, formam-se os SAB a partir da combinação de polímeros, sais inorgânicos e solventes orgânicos. No entanto, nos últimos anos, os líquidos iônicos (LI) têm emergido como componentes alternativos para a geração dessas fases, oferecendo vantagens como a ajustabilidade das propriedades físico-químicas, menor toxicidade em sistemas biológicos e maior capacidade de estabilização de biomoléculas. (Janicka *et al.*, 2022). Essa nova abordagem amplia as aplicações dos SAB, o que os consolida como plataforma promissora para processos bioseparativos e para o desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis na química e biotecnologia.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens para cada composição de uma SAB.

	Polímero- Polímero	Sal-Polímero	Sal-Álcool	Líquido Iônico
Vantagens	- Não tóxico - Alta biocompatibilidade - Efetividade na separação	- Simplicidade e custo - Alta seletividade - Ajustabilidade	- Baixa viscosidade - Simplicidade e custo - Efetividade para pequenas biomoléculas	- Alta eficiência de extração - Alta ajustabilidade
Desvantagens	- Alta viscosidade - Dificuldade na recuperação do polímero para reuso	- Sal pode causar desnaturação - Concentração de sal influencia na separação	- Álcool pode causar desnaturação - Solubilidade de álcoois	- Alto custos - Dificuldade na separação de fases.

Fonte: autor (2025).

Diversos fatores influenciam a partição, processo que corresponde à transferência da biomolécula alvo de uma fase para outra fase. Esses fatores classificam-se em dois grupos principais:

- Propriedades enzimáticas: Características intrínsecas da biomolécula – como hidrofobicidade, carga, peso molecular e conformação estrutural –, as quais podem afetar a distribuição entre as fases.
- Propriedades da fase: Parâmetros relacionados à composição do sistema – incluindo a concentração dos componentes, o pH, a temperatura e os pesos moleculares dos constituintes –, que influenciam a solubilidade e a seletividade do ambiente para a biomolécula alvo.

Considerando os fatores que influenciam a partição, a Equação 8 decompõe o coeficiente de partição (K), nas contribuições individuais na forma logarítmica:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eletro} + \ln K_{hidrofob} + \ln K_{afinid} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf} \quad (8)$$

onde os índices representam respectivamente os fatores padrões, eletroquímicos, hidrofobicidade, afinidade, tamanho e conformação.

Tabela 2 - Propriedades e fatores envolvidos na extração líquido-líquido.

Propriedades	Fatores
Coefficiente de Partição	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrofobicidade: enzimas com regiões hidrofóbicas preferem particionar em fases que contêm alta concentração de componentes hidrofóbicos. - Carga líquida: enzimas carregadas podem interagir com íons na fase aquosa. - Tamanho e conformação: enzimas maiores ou com conformação específicas apresentam comportamento de partição diferente devido a impedimentos estéricos.
Composição da Fase	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração de solventes e cossolventes: os componentes de cada fase influenciam na solvatação e na interação com a enzima. - pH: o pH afeta a estabilidade e o estado de protonação da enzima, influenciando na partição. - Afinidade: nesse caso, os componentes que possuem maior afinidade podem aumentar a seletividade. Enzimas possuem seletividade diferentes com os solventes e cossolventes.
Condições	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura: a temperatura influencia na estabilidade da enzima e no equilíbrio de fase. Geralmente, temperaturas por volta de 30 °C são ideais para a atividade enzimática. - Agitação: promove efetivo contato entre os componentes, aumentando a transferência de massa e o equilíbrio entre as fases.

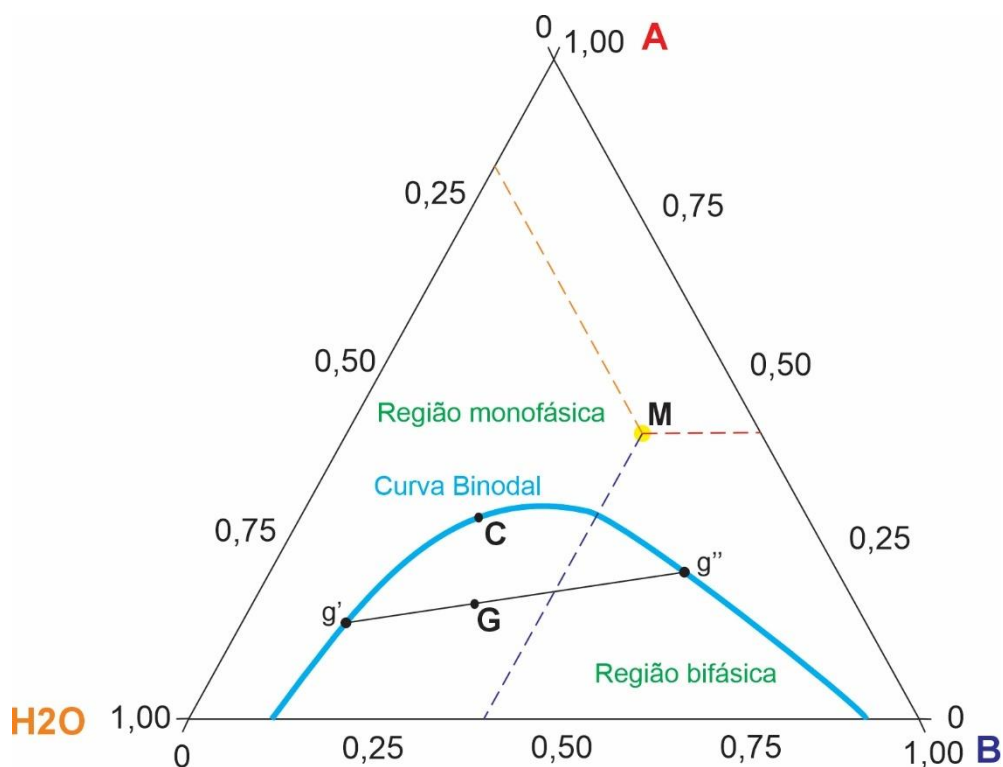
Fonte: autor (2025)

O estabelecimento de um sistema aquoso bifásico (SAB) requer que um dos seus componentes seja um composto cosmotrópico (solvente-isolante) e o outro, caotrópico. Os compostos cosmotrópicos caracterizam-se por raios iônicos menores e cargas mais elevadas, o que lhes permite interagir fortemente com as moléculas de água. Essas interações reforçam a organização molecular da água, promovendo a separação de fases ao atrair as moléculas de água para vizinhança e, conseqüentemente, deslocar o componente caotrópico para a outra fase. Esse efeito facilita a formação de duas fases bem definidas. Em contraste, os compostos caotrópicos possuem raios iônicos maiores e cargas mais baixas, resultando em interações mais fracas com a água. Tais interações reduzidas desorganizam a estrutura

da água, o que promove ambiente menos ordenado e favorece a separação do sistema (Berton *et al.*, 2019).

A representação visual típica de um SAB é um diagrama de fases, que ilustra as condições sob as quais o sistema se separa em duas fases distintas. Embora um SAB seja, na realidade, um sistema ternário (Figura 4), composto por dois componentes químicos e água, frequentemente se representa de forma binária para fins de simplificação (Figura 5).

Figura 4 - Diagrama de fases de uma mistura ternária.



Fonte: autor (2025).

Legenda: diagrama de uma mistura de três componentes: A, B e água. Composição mássica global (ponto G) $x_A = 0,30$; $x_B = 0,20$ e $x_{H_2O} = 0,50$. Composição mássica da fase superior (ponto g') $x_A = 0,15$; $x_B = 0,15$ e $x_{H_2O} = 0,70$; e Composição mássica da fase inferior (ponto g'') $x_A = 0,20$; $x_B = 0,55$ e $x_{H_2O} = 0,25$.

No diagrama de fases de uma mistura ternária, como o exemplificado na Figura 4, observa-se que o componente B não apresenta miscibilidade total em água, uma vez que a região bifásica se localiza justamente entre esses dois componentes. A chamada curva binodal delimita essa região, separando-as em região monofásica e bifásica do sistema. Os pontos situados na região bifásica, como o ponto G destacado

no diagrama, indicam composições globais para as quais a mistura se separa em duas fases distintas, cada uma com uma composição específica de um dos três componentes. O ponto crítico (C) é o ponto específico na curva binodal onde as composições das duas fases se tornam idênticas e a distinção desaparece. A linha de amarração (*tie-line*, *TLL*) é utilizada para identificar a separação dessas fases. Cada extremidade da linha de amarração, representadas por g' e g'' , indica a composição exata de uma das fases coexistentes: uma representa a fase rica em água (g'), enquanto a outra representa a fase rica no componente B (g'') (Murari *et al.*, 2015). Esse comportamento permite obter, a partir de uma única mistura global, duas fases com características distintas – propriedade fundamental em processos como extração líquido-líquido.

A composição das fases no diagrama ternário determina-se por meio da leitura das linhas paralelas às bases dos vértices de cada componente. Por exemplo, o ponto M apresenta uma composição em fração mássica de $x_A = 0,40$; $x_B = 0,40$ e $x_{H_2O} = 0,20$, o que indica as proporções de cada componente na mistura considerada. Dessa forma, o diagrama de fases ternário não apenas evidencia os limites de miscibilidade entre os componentes, mas também serve como ferramenta indispensável para prever o comportamento das misturas e planejar processos de separação ou formulação.

No contexto de sistemas ternários contendo, por exemplo, água, um solvente orgânico (componente B) e um terceiro componente (A), a região bifásica do diagrama corresponde às composições em que a mistura não é homogênea, resultando na formação de duas fases em equilíbrio: a fase aquosa e a fase orgânica. Geralmente, a fase aquosa, por ser menos densa, constitui a fase superior, enquanto a fase orgânica, mais densa, compõe a inferior. Essa ordem, entretanto, pode se inverter a depender da densidade relativa dos componentes do sistema.

Ao preparar uma mistura cuja composição global se encontra na região bifásica do diagrama ternário (por exemplo, no ponto G), a separação espontânea origina uma fase rica em água (fase aquosa – superior) e outra rica no componente orgânico (fase orgânica – inferior). Neste cenário, a regra da alavanca (*lever rule*) permite determinar, de forma quantitativa, as proporções em massa de cada uma dessas fases formadas

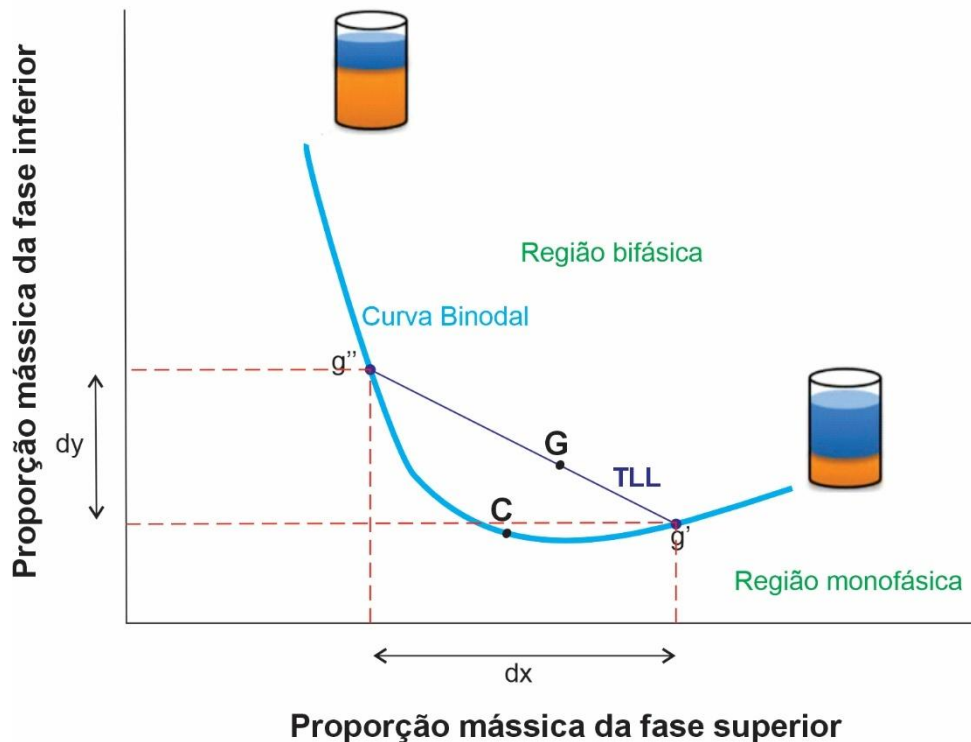
após o equilíbrio, o que é expresso pelas Equações 9 e 10 (Bekavac *et al.*, 2024; Williamson, 2021).

$$x_{superior} = \frac{L_{inferior}}{L} \quad (9)$$

$$x_{inferior} = \frac{L_{superior}}{L} \quad (10)$$

onde $x_{superior}$ e $x_{inferior}$ são respectivamente as proporções da fase superior e inferior; $L_{inferior}$ e $L_{superior}$ são respectivamente a distância entre o ponto G e g'' para $L_{inferior}$ e G e g' para $L_{superior}$; e L é a distância total da linha de amarração.

Figura 5 – Diagrama de fases ternário simplificado.



Fonte: autor (2025).

Legenda: representação simplificada das regiões para cada fase de um SAB. Cores artificiais.

A linha que conecta o ponto g' ao g'' sobre a curva binodal denomina-se linha de amarração (*tie-line*, TLL), conforme mencionado anteriormente (Figura 5). O comprimento dessa linha é dado pela Equação 11:

$$TLL = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (11)$$

Os líquidos iônicos são sais orgânicos que permanecem no estado líquido abaixo de 100°C (Nascimento *et al.*, 2019; Patel; Kumari; Khan, 2014; Piccoli; Martínez, 2022; Schindl *et al.*, 2019). A baixa volatilidade, alta estabilidade térmica e ajustabilidade química os fazem uma classe promissora de solventes para diversas aplicações. A incorporação de líquidos iônicos na formação de SAB pode modificar as propriedades físico-químicas do sistema, como a seletividade na partição de biomoléculas, a solubilidade de compostos orgânicos e a eficiência na extração de substâncias específicas.

Dentre as aplicações desses sistemas, destacam-se a recuperação de proteínas e enzimas, a extração de metais de interesse tecnológico e ambiental, a purificação de fármacos e o fracionamento de biomoléculas complexas. Para otimizar essas aplicações, o estudo desses sistemas por meio de simulações de MD permite uma compreensão detalhada das interações intermoleculares que regem a separação de fases e a partição de solutos, contribuindo para o desenvolvimento de novos solventes e processos mais eficientes.

3.4 TEORIA DE KIRKWOOD-BUFF E FUNÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO

A complexidade estrutural de algumas biomoléculas exige a compreensão das interações com as moléculas do solvente em solução. Para entender o processo de dissolução de um soluto genérico em solução aquosa, é fundamental analisar os princípios termodinâmicos que governam essa interação. A dissolução de uma substância em um solvente ocorre de forma espontânea quando há redução da energia de Gibbs, que expressa a viabilidade termodinâmica do processo.

Os estudos computacionais oferecem abordagem poderosa para a análise microscópica do comportamento de biomoléculas em solução, permitindo a investigação detalhada das interações moleculares envolvidas (Varela *et al.*, 2015). Um dos aspectos fundamentais desse tipo de análise é a estrutura de solvatação, que descreve a organização das moléculas do solvente ao redor da proteína.

Para caracterizar essa estrutura, pode-se calcular a densidade de um determinado componente da solução (como moléculas de água, íons ou outros solutos) em função da distância a partir da superfície da proteína. Realiza-se esse estudo por meio da obtenção das funções de distribuição, as quais quantificam a variação da densidade do solvente à medida que a distância em relação à proteína aumenta (Levine; Stone; Kohlmeyer, 2011).

A função de distribuição radial, $g(r)$, é grandeza estatística que descreve a probabilidade relativa de se encontrar uma partícula em uma casca esférica de espessura dr , a uma distância r de um sítio de referência. Essa probabilidade é calculada em comparação com uma distribuição ideal em que as partículas se distribuiriam uniformemente pelo solvente, considerada a mesma densidade global.

Matematicamente, a Equação 12 define a função $g(r)$ como a razão entre a densidade local de partículas na vizinhança de um ponto de referência e a densidade média da solução:

$$g(r) = \frac{n(r)}{4\pi r^2 \rho \Delta r} \quad (12)$$

Quando $g(r) = 1$, a distribuição do solvente ao redor do sítio de referência é homogênea, indicando ausência de influência específica da partícula central. Valores de $g(r) > 1$ indicam regiões de maior probabilidade de ocorrência das partículas do solvente, sugerindo interações preferenciais ou efeitos de solvatação estruturada. Já valores de $g(r) < 1$ sugerem redução da densidade local, indicando repulsão ou exclusão do solvente naquela região. O cálculo de $g(r)$ é amplamente utilizado em simulações de MD, sendo método essencial para investigar a estrutura de solvatação ao redor de biomoléculas, efeitos de interações intermoleculares e o comportamento de soluções em nível microscópico.

O cálculo tradicional das funções de distribuição radial toma o centro de massa das espécies químicas como sítio de referência. No entanto, essa abordagem apresenta limitação: não considera explicitamente o formato da espécie química, o que pode comprometer a representação precisa das interações entre as moléculas do

solvente e a sua superfície. Portanto, uma função de distribuição que considere o formato do soluto deve fornecer uma caracterização mais precisa e intuitiva da sua estrutura de solvatação. Neste contexto, as funções de distribuição de mínima distância (MDDF) surgem como alternativa mais adequada, pois levam em conta a geometria molecular do soluto (Martínez, 2022; Martínez; Shimizu, 2017).

A Teoria de Kirkwood-Buff (Ben-Naim, 2023; Kirkwood; Buff, 1951) fornece uma ponte rigorosa entre o mundo microscópico das interações moleculares e o mundo macroscópico das propriedades termodinâmicas, o que o torna ferramenta valiosa para o estudo de soluções. Baseia-se em integrais de funções de distribuição, que descrevem a probabilidade de encontrar uma partícula a uma distância determinada.

O significado físico da integral de Kirkwood-Buff (KBI) relaciona-se diretamente com a quantidade de excesso ou déficit de uma espécie ao redor de outra em uma solução, comparado a uma distribuição homogênea. Em outras palavras, os KBIs descrevem a extensão e a intensidade das flutuações de densidade e das correlações entre partículas em soluções líquidas (Newman, 1994; Ploetz; Benteñitis; Smith, 2010). A representação matemática é dada pela Equação 13:

$$G_{AB} = \int_0^{\infty} [g(r) - 1] \cdot 4\pi r^2 dr \quad (13)$$

Sendo G_{AB} a KBI obtida, se $G_{AB} > 0$, a espécie B está preferencialmente associada a espécie A, ou seja, existe um excesso de B ao redor de A comparando uma solução ideal. Para $G_{AB} < 0$, a espécie B está preferencialmente excluída da vizinhança de A, indicando uma repulsão efetiva entre as duas espécies químicas.

A inversão das integrais de Kirkwood-Buff (KBI) (Ben-Naim, 2006), permite relacioná-las diretamente com grandezas macroscópicas termodinâmicas, como compressibilidade isotérmica, coeficiente de atividade, volumes molares, potenciais químicos e parâmetros de solvatação. Essas propriedades são cruciais para a compreensão de sistemas complexos – como soluções biomoleculares, misturas líquidas e processos de solubilização –, o que possibilita a interpretação de fenômenos químicos e biológicos em nível atômico e macroscópico.

Em destaque, o parâmetro de solvatação preferencial (Γ) constitui uma grandeza termodinâmica fundamental para compreender as interações entre os componentes de uma solução e solutos complexos, como proteínas e outras biomoléculas. Esse parâmetro quantifica o grau de solvatação diferencial de uma espécie química do meio multicomponente, indicando se uma determinada espécie do solvente se acumula preferencialmente na vizinhança do soluto ou é dela excluída.

No contexto de proteínas, o parâmetro de solvatação preferencial auxilia na caracterização do efeito do solvente sobre a estabilidade, estrutura e atividade biológica dessas biomoléculas, permitindo descrever preferências de solvatação sob diferentes condições experimentais. Essa análise é crucial para a compreensão de mecanismos como desnaturação proteica, interações proteína-soluto e seletividade de solvatação em misturas de solventes (Shimizu; Smith, 2004; Timasheff, 2002).

Para uma solução multicomponente, constituída por um solvente (3), um cossolvente (2) e um soluto (1), a Equação 14 define o parâmetro de solvatação preferencial em relação ao cossolvente (2):

$$\Gamma_{2,3} = \rho_3(G_{2,3} - G_{2,1}) \quad (14)$$

onde $\Gamma_{2,3}$ é o parâmetro de solvatação preferencial do cossolvente (2) em relação ao solvente (3); ρ_3 é a densidade do solvente (3); $G_{2,3}$ e $G_{2,1}$ são respectivamente as KBI do cossolvente (2) e solvente (3), e o cossolvente (2) e o soluto (1). A interpretação do sinal do parâmetro de solvatação preferencial (Γ) é a seguinte:

- Um valor negativo ($\Gamma < 0$) indica hidratação preferencial. Nesse caso, a biomolécula interage preferencialmente com o solvente (água), o que resulta na exclusão do cossolvente de sua camada de solvatação.
- Um valor positivo ($\Gamma > 0$) indica solvatação preferencial pelo cossolvente. Nesse cenário, as moléculas do cossolvente acumulam-se preferencialmente na vizinhança da biomolécula.

A aplicação da dinâmica molecular no estudo do equilíbrio de fases tem implicações significativas em diversas áreas científicas e industriais. Na engenharia

química, por exemplo, a compreensão detalhada das transições de fase é crucial para o design eficiente de processos de separação e purificação. Na ciência dos materiais, a MD auxilia no desenvolvimento de novos materiais com propriedades específicas, enquanto na biologia molecular, contribui para o entendimento de processos como o dobramento de proteínas e a interação entre biomoléculas. Portanto, os estudos de dinâmica molecular são fundamentais para a compreensão e controle dos fenômenos associados ao equilíbrio de fases em sistemas complexos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ARQUIVOS DE ENTRADA

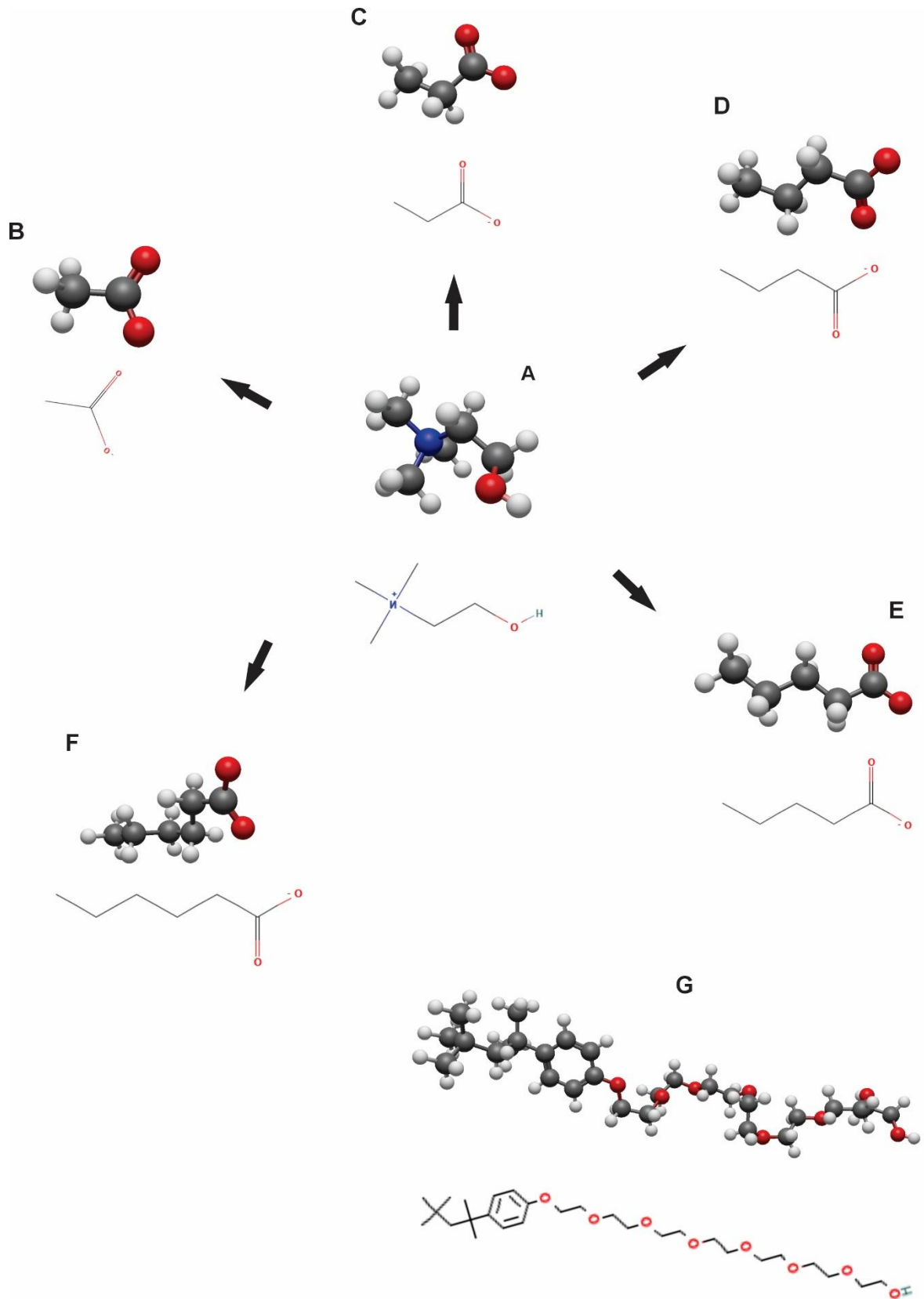
Obtiveram-se os arquivos de coordenadas das moléculas utilizadas a partir do banco de dados PubChem (*National Institutes of Health*). As moléculas, com os respectivos identificadores de composto (CID) e representações na Figura 6, foram: íon colina (CID 305; Figura 6A), íon acetato (CID 175; Figura 6B), íon propanoato (CID 104745; Figura 6C), íon butanoato (CID 104775; Figura 6D), íon pentanoato (CID 114781; Figura 6E), íon hexanoato (CID 4398339; Figura 6F) e o polímero Triton® X-114 (CID 75622; Figura 6G).

Posteriormente, geraram-se as topologias e as coordenadas de entrada por meio dos *softwares* LigParGen (Dodda *et al.*, 2017) e BOSS 5.1, compatíveis com o campo de força OPLS-AA (versão 2020) (Jorgensen *et al.*, 2024; Jorgensen; Maxwell; Tirado-Rives, 1996). A molécula de colina constituiu a única exceção, para a qual se aplicaram manualmente parâmetros do modelo de campo de força OPLS-2009IL (Doherty *et al.*, 2017), por serem específicos para líquidos iônicos (LI).

A estrutura da lipase (sigla EstA) foi obtida do banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB), sob o código de acesso PDB ID 1UKC¹. O arquivo corresponde à estrutura cristalográfica da Estearase A de *Aspergillus niger*, determinada por difração de raios X com resolução de 2,10 Å. A topologia de entrada, por sua vez, foi gerada com o software GROMACS, utilizando o campo de força OPLS-AA/M (versão 2015) (Robertson; Tirado-Rives; Jorgensen, 2015).

¹ <https://www.rcsb.org/structure/1UKC>

Figura 6 - Moléculas utilizadas nas simulações.



Fonte: autor (2025).

Legenda: fundo branco com as moléculas utilizadas nas simulações. Cores artificiais. A – colina, B – acetato, C – propanoato, D – butanoato, E – pentanoato, F – hexanoato, e G – polímero Triton® X-114.

Para as simulações de dinâmica molecular, denominou-se cada fase como "fase superior aquosa" (Figura 7) e "fase inferior orgânica" (Figura 8). Simulou-se cada uma separadamente, dada a impossibilidade técnica de analisar o sistema bifásico completo em uma única simulação.

A composição de cada fase determinou-se a partir da razão volumétrica e da composição global do sistema, dados obtidos da literatura (NASCIMENTO et al., 2019a). Para este cálculo, empregou-se um algoritmo desenvolvido em Python que determinava a quantidade de moléculas de cada componente com base na fração mássica, em relação a um número fixo de moléculas de água (Equação 15).

$$n = \frac{m}{MM} * N_A \quad (15)$$

Partiu-se de um sistema com composição global em fração mássica de 0,08 para o LI, 0,07 para o polímero e 0,85 para a água. Estabeleceu-se a razão volumétrica (R_v) de 0,7, com predomínio de volume da fase superior aquosa. A partir dessas condições, determinaram-se as frações mássicas parciais e o conseqüente número de moléculas para cada componente nas fases de equilíbrio. Esse cálculo realizou-se por meio de algoritmo desenvolvido em Python, que aplicava a regra da alavanca (Equações 16 e 17).

$$C_{global} = \frac{V_s C_s + V_i C_i}{V_s + V_i} \quad (16)$$

dado que $R_v = \frac{V_i}{V_s}$, substituindo e reorganizando na equação acima:

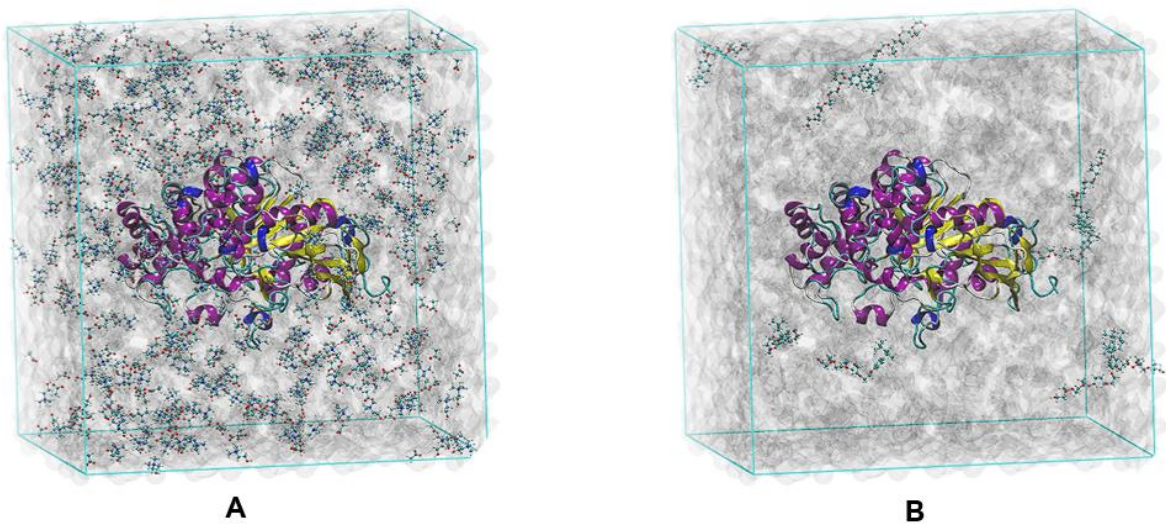
$$C_{global} = \frac{C_s + R_v C_i}{R_v + 1} \quad (17)$$

A Tabela 3 demonstra as frações mássicas parciais de cada componente para as fases, utilizadas para todas as simulações de MD.

Tabela 3 - Frações mássicas de cada componente para as fases.

Fases	Líquido iônico	Polímero Triton® X-114	Água
Superior aquosa	0,10	0,01	0,89
Inferior orgânica	0,05	0,15	0,80

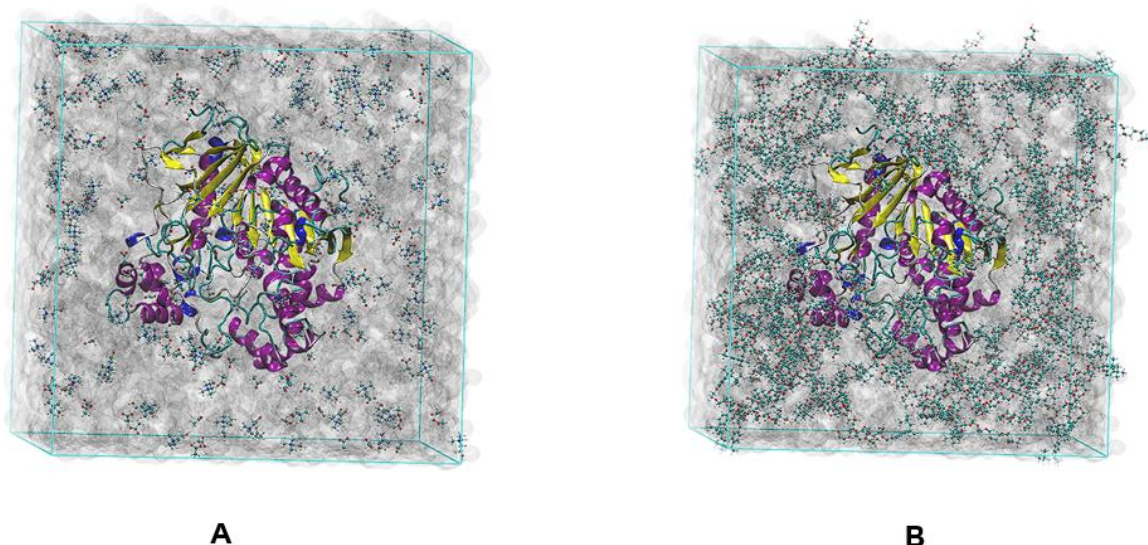
Fonte: autor (2025).

Figura 7 – Fase superior aquosa constituída por EstA, líquido iônico e polímero.

Fonte: autor (2025).

Legenda: fundo branco com as caixas preparadas para a fase aquosa com a lipase ao centro. Apenas para efeito de visualização, uma vez que ambas são mesma fase sendo uma caixa única. Figura A – EstA com os íons de colina e acetato. Figura B – EstA com as moléculas de polímero Triton® X-114. Cores artificiais

Figura 8 – Fase inferior orgânica constituída por EstA, líquido iônico e polímero.



Fonte: autor (2025).

Legenda: fundo branco com as caixas preparadas para a fase orgânica com a lipase ao centro. Apenas para efeito de visualização, uma vez que ambas são mesma fase sendo uma caixa única. Figura A – EstA com os íons de colina e acetato. Figura B – EstA com as moléculas de polímero Triton® X-114. Cores artificiais

4.2 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM GROMACS²

Realizou-se a simulação de MD com o *software* GROMACS 2025.2 (Abraham *et al.*, 2015; Berendsen; van der Spoel; van Drunen, 1995). Geraram-se os parâmetros da topologia com base no modelo de campo de força OPLS atualizado, utilizando-se o modelo de água TIP4P (Jorgensen *et al.*, 1983). Para a integração numérica, empregou-se o algoritmo Verlet *leap-frog* (Hockney, 1970; VERLET, 1968) com passo de tempo de 2 fs. As interações de curto alcance e de Lennard-Jones foram tratadas com raio de corte de 1,0 nm. A simulação transcorreu em uma caixa cúbica com condições de contorno periódicas.

Inicialmente, minimizou-se o sistema logo após a adição das moléculas de água na caixa de simulação. Em seguida, neutralizou-se o sistema com NaCl a 0,9% (m/m) para simular condições biológicas. Posteriormente, realizou-se nova minimização a fim de eliminar possíveis conflitos estéricos entre as moléculas.

² <https://github.com/patrickallanfaustino>

A equilibração do sistema ocorreu em múltiplas etapas. Primeiramente, relaxou-se o sistema a 298,15 K por 200 ps com o termostato Berendsen (Berendsen, 1991; Berendsen *et al.*, 1984), aplicando-se restrições de posição à lipase para estabilizar o solvente. Em seguida, equilibrou-se o sistema no conjunto NPT por 200 ps, utilizando o termostato V-rescale (BUSSI *et al.*, 2007) a 298,15 K (constante de tempo de 1,0 ps) e o barostato Berendsen a 1,0 bar (constante de tempo de 3,0 ps). Posteriormente, substituiu-se o barostato pelo C-rescale (BERNETTI & BUSSI, 2020) para uma equilibração adicional de 600 ps, mantendo-se as restrições de posição na lipase.

Na etapa de produção final, removeram-se as restrições e conduziu-se a simulação por 50 ns.

4.3 INTEGRAIS DE KIRKWOOD-BUFF

Calcularam-se as integrais de Kirkwood-Buff (KBI) (Ben-Naim, 2023; Newman, 1994) a partir das funções de distribuição para obter propriedades físico-químicas que permitiram a compreensão das interações entre a lipase e os componentes das fases. Por meio dessas integrais, avaliaram-se as preferências de solvatação, os potenciais químicos, os coeficientes de partição e as interações intermoleculares na solução complexa. Para este cálculo, utilizou-se a Equação 13, descrita anteriormente.

O parâmetro de solvatação preferencial relativo, por sua vez, obtém-se a partir da diferença entre as integrais de Kirkwood-Buff (KBI) dos componentes em relação à lipase:

$$\Gamma_{B,C} = \rho_C(G_{BC} - G_{BA}) \quad (18)$$

onde os subscritos B, C e A correspondem, respectivamente, à lipase, aos cossolventes e à água. Um valor positivo de $\Gamma_{B,C}$ indica que a KBI do cossolvente é maior que a da água, então a lipase é preferencialmente solvatada pelo cossolvente.

O parâmetro de solvatação preferencial relativo relaciona-se diretamente com a variação do potencial químico da lipase, induzida pela adição de cossolventes à solução. O potencial químico (μ) de um componente em uma solução, por sua vez,

define-se como a soma de três contribuições: o potencial químico no estado padrão (μ^0), a contribuição entrópica ideal de mistura ($RT \ln x_B$) e o termo de excesso, que representa o desvio da idealidade da solução ($RT \ln \gamma_B$):

$$\Delta\mu_B = RT \ln(x_B\gamma_B) = RT \ln x_B + RT \ln \gamma_B \quad (19)$$

onde $RT \ln \gamma_B$ é dado por:

$$RT \ln \gamma_B = -RT \ln \Gamma_B \quad (20)$$

Substituindo a Equação 20 em 19, temos:

$$\Delta\mu_B = RT \ln x_B - RT \ln \Gamma_B \quad (21)$$

O potencial químico (μ) e a variação da energia livre de solvatação (ΔG_{solv}) são grandezas intimamente relacionadas na termodinâmica de soluções (Baynes; Trout, 2003; Matubayasi, 2017). O potencial químico de um soluto depende da concentração e das interações com o solvente, sendo a solvatação o processo que modula esse potencial. A energia livre de solvatação, por sua vez, quantifica a variação de energia livre quando a molécula de soluto é transferida do vácuo (fase gasosa) para o interior de um solvente, refletindo a magnitude das interações soluto-solvente. Portanto, tanto o potencial químico, quanto a energia livre de solvatação, indicam a tendência de uma substância sofrer mudanças e transferências de fase.

Calculou-se o logaritmo do coeficiente de partição (Bannan *et al.*, 2016), por meio da relação entre o potencial químico e a energia livre de solvatação, conforme a seguinte expressão:

$$\log K = -\left(\frac{\Delta G_{transf}}{RT \ln 10}\right) \quad (22)$$

onde ΔG_{transf} corresponde a diferença entre as energias livres de solvatação da fase inferior orgânica e da fase superior aquosa. Valores negativos para $\log P$ indica

que a lipase preferencialmente se distribui na fase aquosa, ou seja, quanto menor $\log K$ maior o caráter hidrofílico.

4.4 FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE DISTÂNCIA MÍNIMA

Para o cálculo da função de distribuição de distâncias mínimas (MDDF), utilizou-se o *software* ComplexMixture v2.14.4 (Martínez, 2022; Martínez; Shimizu, 2017), desenvolvido em linguagem Julia (Bezanson *et al.*, 2017). Para cada sistema, ajustou-se manualmente o intervalo do *bulk range*, com um raio de corte de 1,5 nm, a fim de que o valor da MDDF convergisse para 1,0 (adimensional). Adicionalmente, decompuseram-se as contribuições em grupos de átomos das moléculas do sistema, o que permitiu a interpretação em termos da natureza química das espécies envolvidas nas interações soluto-solvente.

Neste trabalho, adotou-se a função de distribuição utilizando distâncias mínimas (MDDF) para a análise das interações soluto-solventes. O uso da MDDF é particularmente adequado para sistemas envolvendo solutos geometricamente complexos, como proteínas, pois permite calcular a distribuição do solvente ao redor do soluto considerando diretamente a superfície molecular, refletindo com maior precisão as interações entre o soluto e os solventes ou cossolventes (Figura 9B).

Por outro lado, as funções de distribuição do tipo radial calculam a distribuição do solvente em relação ao centro de massa das moléculas envolvidas (Figura 9A). Essa abordagem pode introduzir um desvio na média das distribuições dos solventes e cossolventes em relação à superfície do soluto, potencialmente resultando em descrição menos precisa das interações nesses sistemas.

Figura 9 – Diferença entre os tipos de funções de distribuição



Fonte: autor (2025).

Legenda: representação de uma proteína em vermelho com sua superfície geometricamente complexa e solventes ao redor em azul. Cores artificiais. A – Distribuição radial em função do centro de massa da proteína. B – Distribuição de distância mínima em função da superfície da proteína.

4.5 USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Em conformidade com a Resolução UNESP N° 13, de 22 de abril de 2025, que orienta o uso ético de ferramentas de Inteligência Artificial (IA) na produção acadêmica, declara-se que recursos de IA foram utilizados na fase de revisão deste trabalho. A aplicação de tais tecnologias limitou-se estritamente ao aprimoramento da revisão gramatical e à otimização da clareza da escrita científica. Ressalta-se que a concepção do projeto, a formulação da ideia central, a execução de todas as atividades de pesquisa e a interpretação dos resultados são de inteira autoria e responsabilidade do autor, com a devida supervisão de seu orientador. A IA foi, portanto, empregada como uma ferramenta de suporte textual, sem interferir no mérito intelectual e no conteúdo original desta dissertação.

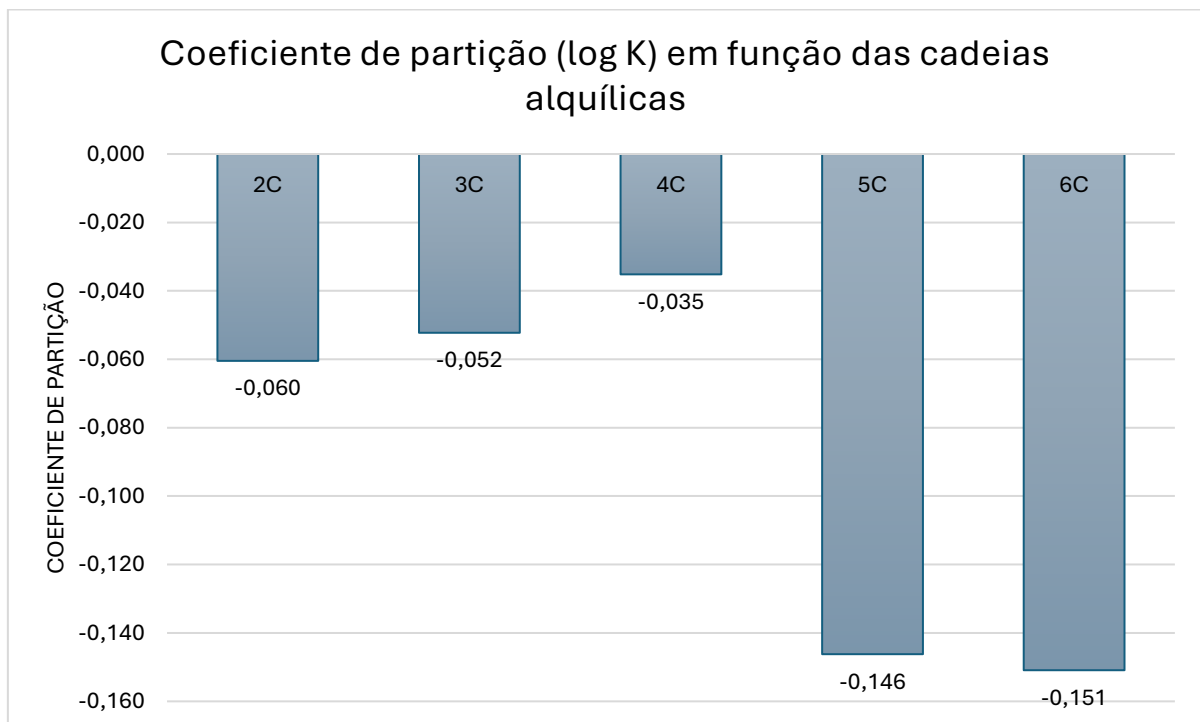
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREFERÊNCIA DE SOLVATAÇÃO RELATIVA

A análise dos parâmetros de solvatação preferencial relativos é fundamental para determinar como a modificação da cadeia alquílica na região aniônica do líquido iônico influencia a predileção da lipase por uma das fases. Esses parâmetros permitem identificar em qual fase a lipase se solvata preferencialmente. Um valor elevado do parâmetro preferencial relativo indica que a integral de Kirkwood-Buff (KBI) do líquido iônico é superior à da água, o que sugere solvatação preferencial da lipase pelo líquido iônico.

A fim de facilitar a discussão dos resultados, adotou-se a seguinte convenção para os ânions de cadeia alquílica: 2C para o acetato, 3C para o propanoato, 4C para o butanoato, 5C para o pentanoato e 6C para o hexanoato. Para as fases adotou-se FSA para a fase superior aquosa e FIO para a fase inferior orgânica. A Figura 10 a seguir estão os coeficientes de partição obtidos.

Figura 10 – Coeficiente de partição (log K) em função das cadeias alquílicas



Fonte: autor (2025).

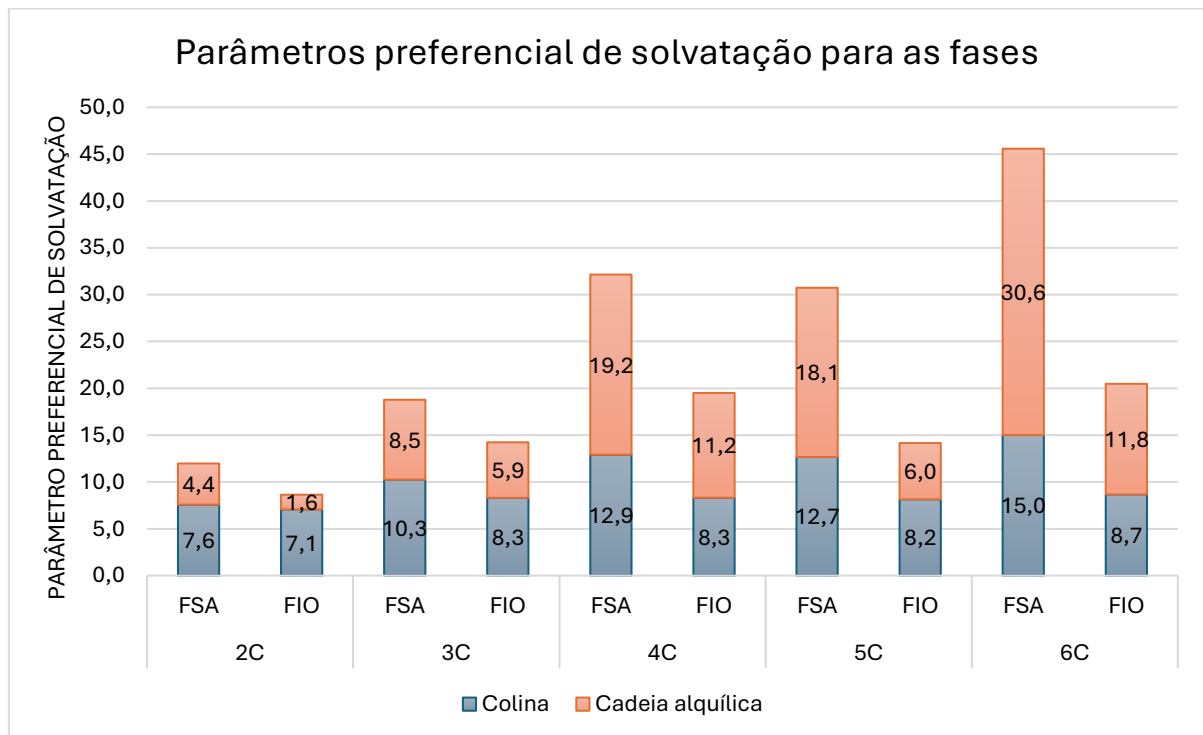
Legenda: coeficientes de partição, em log K, obtidos de acordo com a modificação da cadeia alquílica.

Observaram-se valores de log K negativos para todos os sistemas analisados (Figura 10), o que indicou a predileção da lipase pela fase superior aquosa. Portanto, a lipase mostrou-se hidrofílica em todos os casos, apresentando maior afinidade pela fase aquosa do SAB.

A interpretação do coeficiente de partição (log K) permite avaliar a afinidade da biomolécula pelas fases. Um valor de log K = 0 ($K = 1$) indica que a biomolécula não apresenta afinidade preferencial por nenhuma das fases. Quando $\log K < 0$ ($K < 1$), a biomolécula é hidrofílica e demonstra maior tendência de partição na fase aquosa. Por outro lado, se $\log K > 0$ ($K > 1$), a biomolécula é hidrofóbica e acumula-se preferencialmente na fase orgânica. Adicionalmente, a magnitude do valor indica o grau dessa afinidade: quanto menor o valor de log K, maior o caráter hidrofílico da biomolécula, o que reflete maior solubilidade na fase aquosa.

A análise conjunta das Figuras 10 e 11 revelou aumento no parâmetro de solvatação preferencial relativo com o alongamento da cadeia alquílica do ânion do LI.

Figura 11 – Parâmetro preferencial de solvatação para as fases



Fonte: autor (2025).

Legenda: contribuição de cada componente nas fases aquosas e orgânicas.

Esse efeito foi particularmente pronunciado para os sistemas contendo os íons pentanoato (5C) e hexanoato (6C). Este resultado indicou que o aumento da cadeia alquílica promoveu o particionamento e a bioconcentração da lipase na fase superior aquosa. De fato, o parâmetro de solvatação preferencial para todas as fases superiores aquosas mostrou-se consistentemente mais elevado que o parâmetro correspondente nas fases inferiores orgânicas, independentemente do comprimento da cadeia alquílica.

A análise também permitiu discernir a contribuição relativa do cátion colina e da cadeia alquílica do ânion para a solvatação da lipase. Para os ânions de cadeia curta — acetato (2C) e propanoato (3C) —, observou-se que o cátion colina exerceu maior influência. Em contraste, para os ânions de cadeia longa — pentanoato (5C) e hexanoato (6C) —, verificou-se a tendência oposta, na qual a influência da cadeia alquílica do ânion superou a do cátion. Portanto, os resultados indicam que o aumento no comprimento da cadeia alquílica do ânion torna a contribuição para o processo de solvatação progressivamente mais dominante.

Não foram obtidos dados suficientes para a análise concreta da influência do polímero Triton® X-114. De acordo com poucos dados obtidos relacionados ao polímero, indicou que o polímero Triton® X-114 não exerceu influência significativa no processo de particionamento.

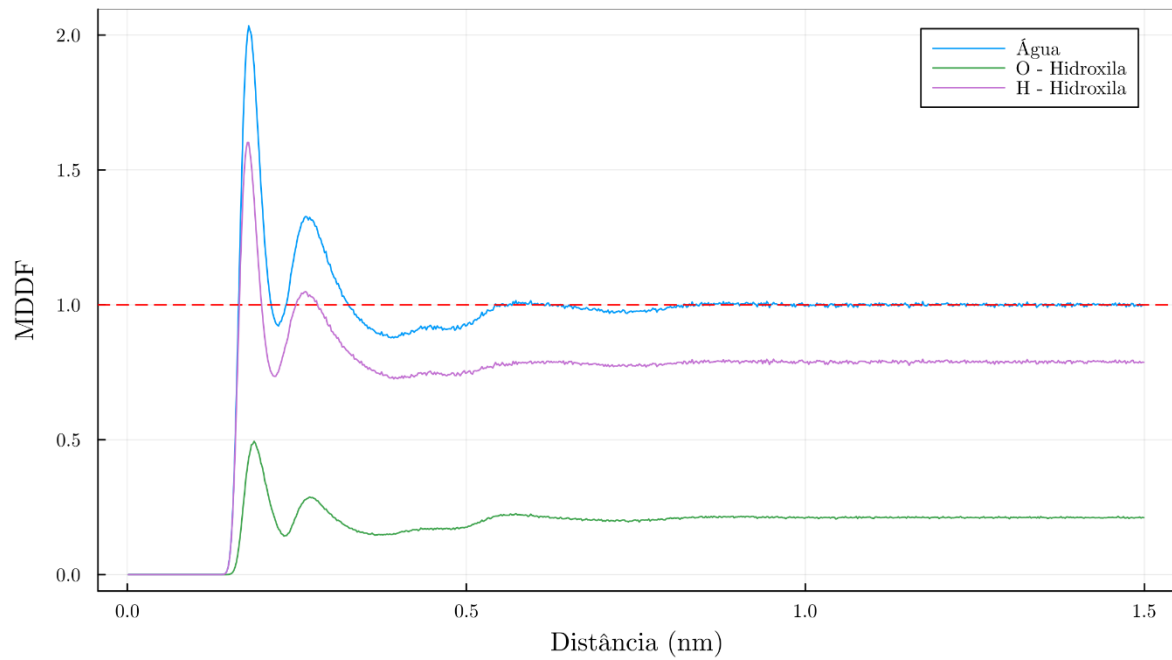
5.2 TERMODINÂMICA DA SOLVATAÇÃO

Para aprofundar a análise, realizou-se estudo criterioso da termodinâmica da solvatação da lipase, com o objetivo de elucidar, sob perspectiva molecular, as razões para a solvatação preferencial na fase superior aquosa, observada anteriormente. Para tanto, analisaram-se as funções de distribuição de distâncias mínimas (MDDF), decompostas nas contribuições dos diferentes componentes do sistema, em conjunto com as integrais de Kirkwood-Buff (KBI).

Nas Figuras 12 e 13, observa-se pico em aproximadamente 0,18 nm e outro em 0,30 nm, correspondentes, respectivamente, à primeira e à segunda camada de solvatação da água em ambas as fases estudadas. A presença dessas camadas reflete

interações específicas, principalmente ligações de hidrogênio. O primeiro pico (~0,18 nm) é característico da distância aceitador-hidrogênio em tais ligações, onde o oxigênio atua como aceitador.

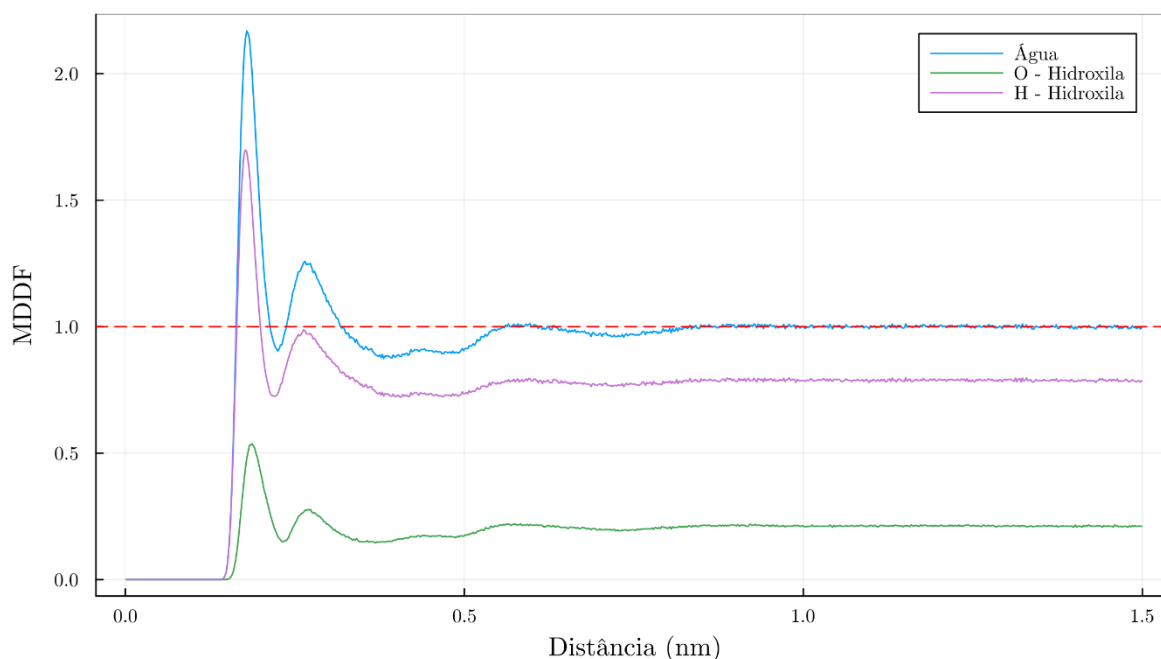
Figura 12 – MDDF: 1UKC/Água na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Água na Fase Aquosa com Ch+/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: interações das moléculas de água na fase superior aquosa com a lipase 1UKC.

Figura 13 - MDDF: 1UKC/Água na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114
 1UKC/Água na Fase Orgânica com Ch⁺/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

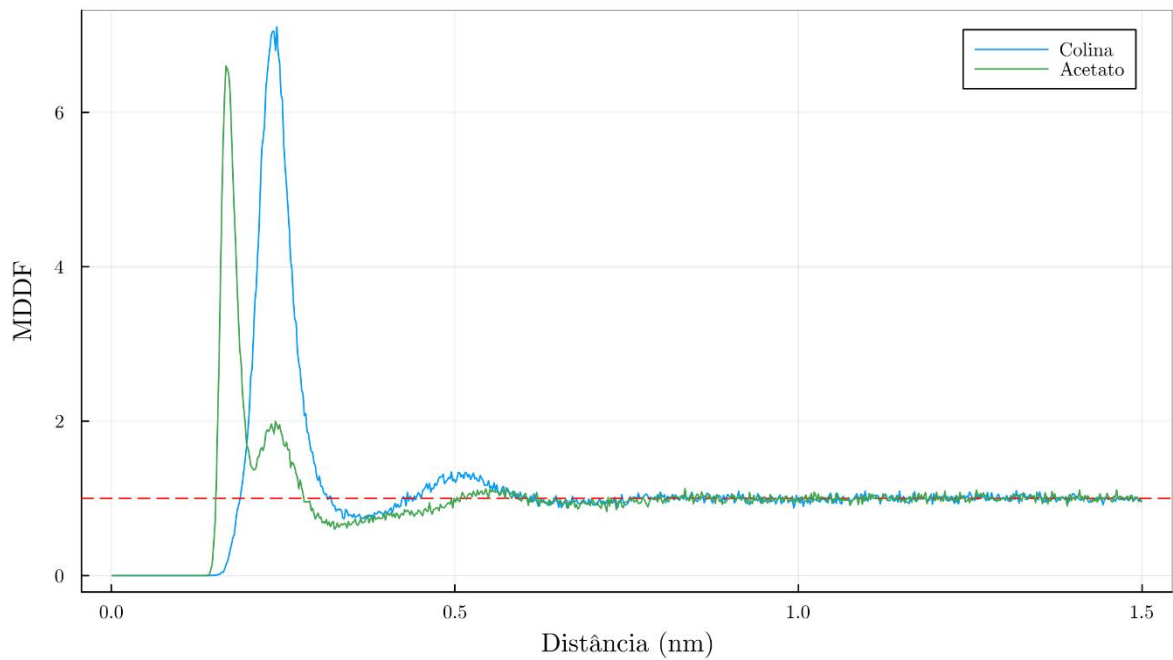
Legenda: interações das moléculas de água na fase inferior orgânica com a lipase 1UKC.

Dessa forma, a análise evidencia a formação de rede de ligações de hidrogênio entre a lipase, a água e os cossolventes na primeira camada de solvatação. Este comportamento mostrou-se predominante em todas as simulações realizadas, independentemente do comprimento da cadeia alquílica do ânion do LI.

Para facilitar a análise dos comportamentos comuns a todos os sistemas, a discussão a seguir focou-se na comparação entre o íon acetato (2C) e o íon hexanoato (6C). Adotou-se essa abordagem, pois esses dois ânions representam os extremos de menor (2C) e maior (6C) comprimento da cadeia alquílica investigada.

As Figuras 14 a 17 revelam que, tanto na fase aquosa quanto na orgânica, o ânion do LI interage mais proximamente com a lipase em comparação com o cátion colina. Observa-se pico acentuado e bem definido para o ânion a uma distância de aproximadamente 0,18 nm. Essa posição é característica de ligações de hidrogênio formadas entre o grupo carboxilato (COO^-) do ânion e a superfície da proteína, o que sugere interação forte e específica. O cátion colina, por sua vez, apresenta seu pico de maior probabilidade a uma distância superior, em torno de 0,30 nm.

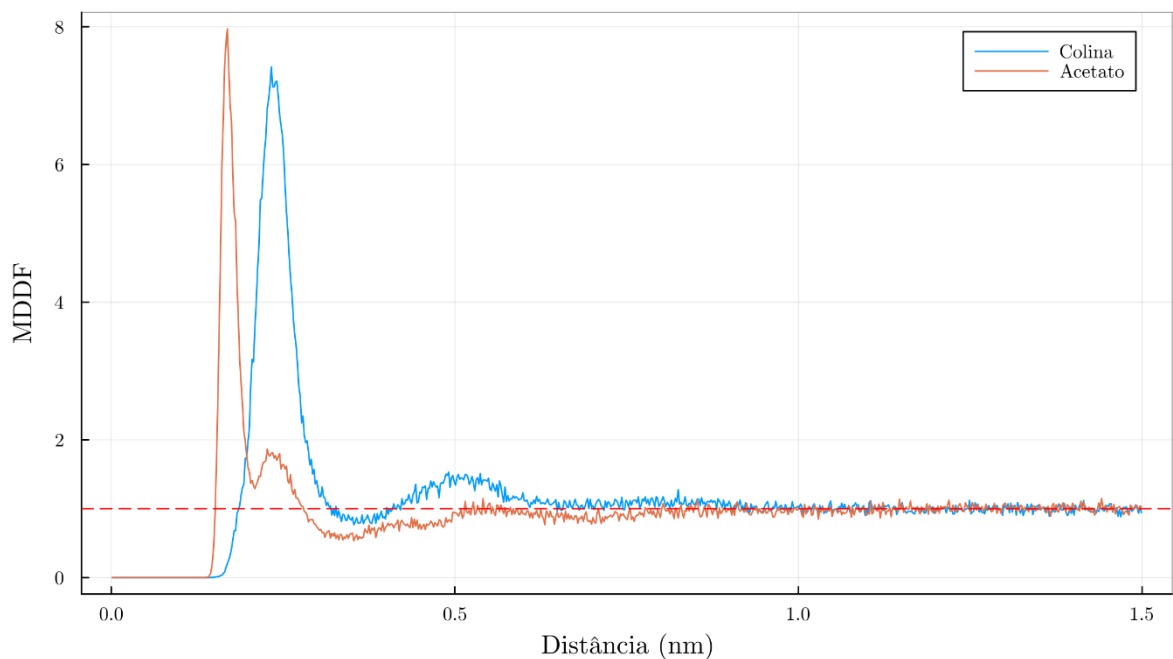
Figura 14 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Aquosa com Ch^+ /Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: interações do líquido iônico na fase superior aquosa com a lipase 1UKC.

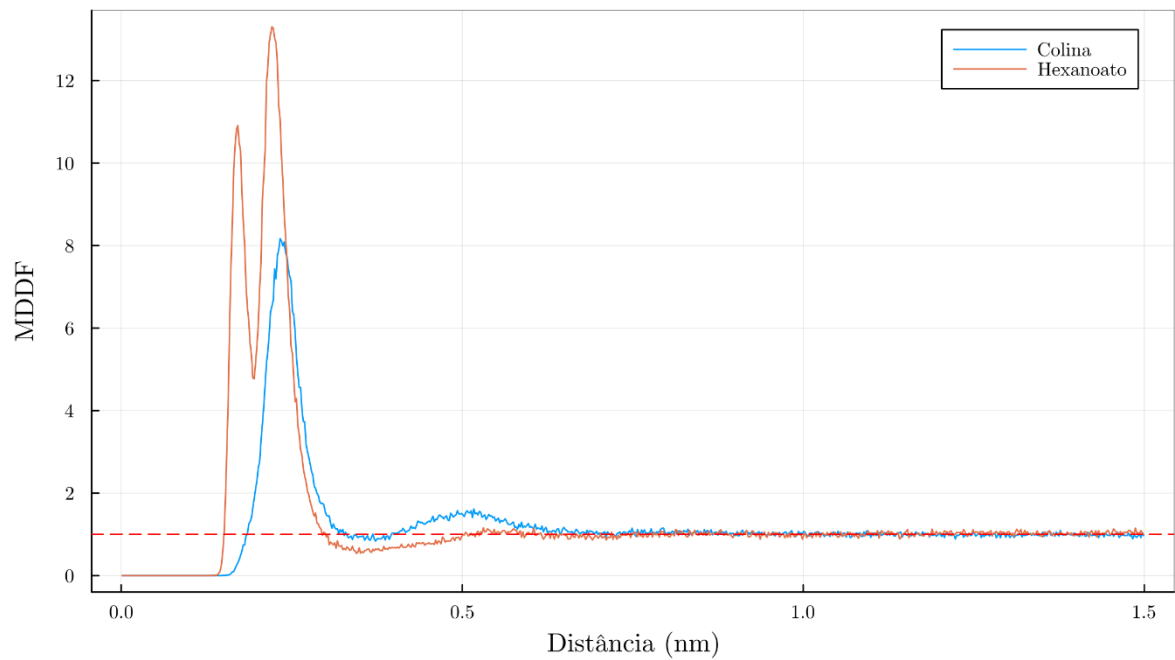
Figura 15 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Orgânica com Ch^+ /Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: interações do líquido iônico na fase inferior orgânica com a lipase 1UKC.

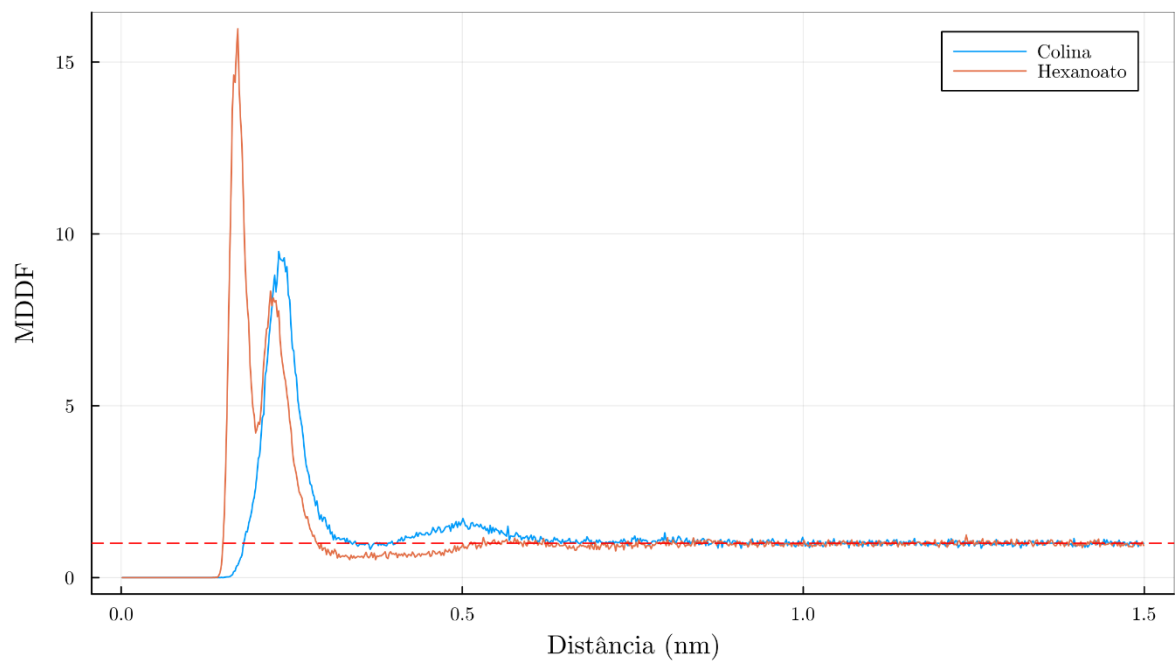
Figura 16 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114
 1UKC/Líquido Iônico na Fase Aquosa com Ch^+ /Hexanoato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: interações do líquido iônico na fase superior aquosa com a lipase 1UKC.

Figura 17 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114
 1UKC/Líquido Iônico na Fase Orgânica com Ch^+ /Hexanoato/Triton X-114



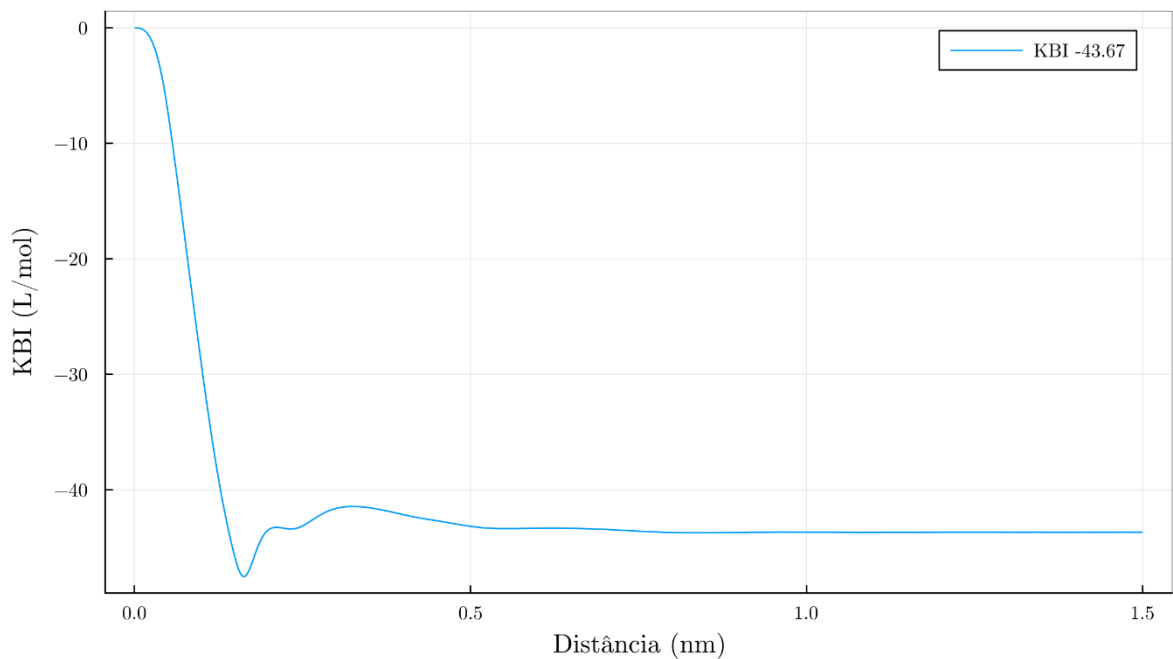
Fonte: autor (2025).

Legenda: interações do líquido iônico na fase inferior orgânica com a lipase 1UKC.

Nas Figuras 18 e 19, observa-se que a integral de Kirkwood-Buff (KBI) para a água se torna altamente negativa a curtas distâncias, o que indica déficit de moléculas (volume de exclusão) na vizinhança imediata da lipase em comparação com uma distribuição homogênea. Embora o valor da integral comece a aumentar a partir de aproximadamente 0,18 nm, com a formação das camadas de solvatação, esse aumento não é suficiente para compensar o déficit inicial.

Figura 18 – KBI: 1UKC/Água na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114

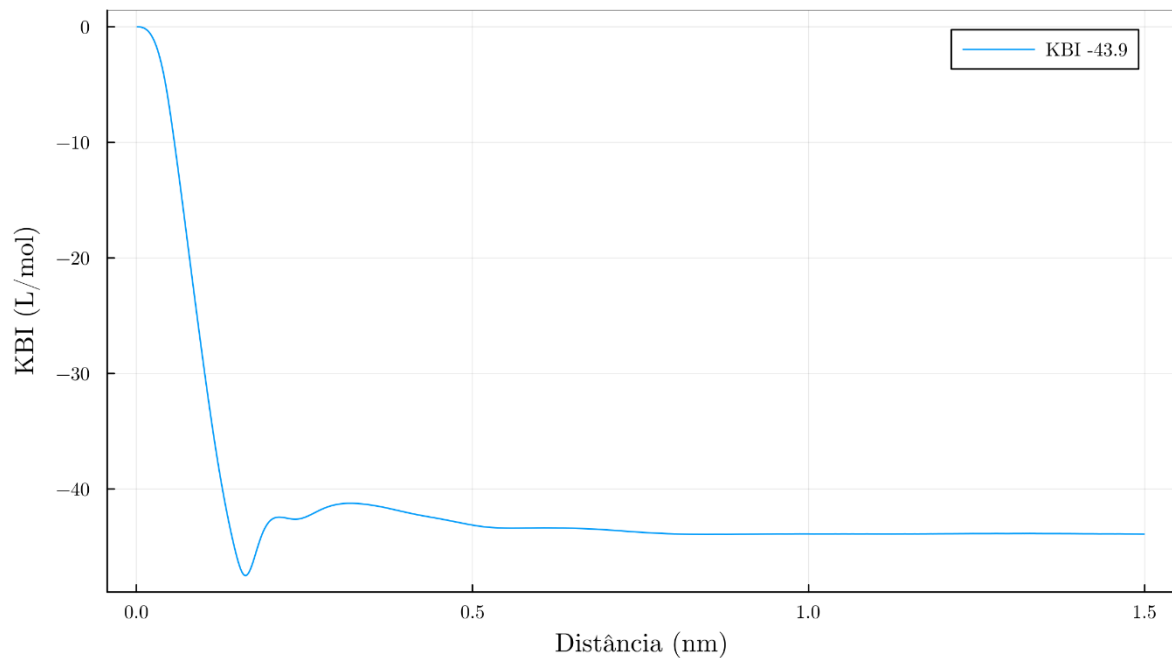
1UKC/Água na Fase Aquosa para Ch⁺/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: KBI da água na fase superior aquosa para o sistema formado pela Colina, Acetato e Triton X-114.

Figura 19 - KBI: 1UKC/Água na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Água na Fase Orgânica para Ch⁺/Acetato/Triton X-114



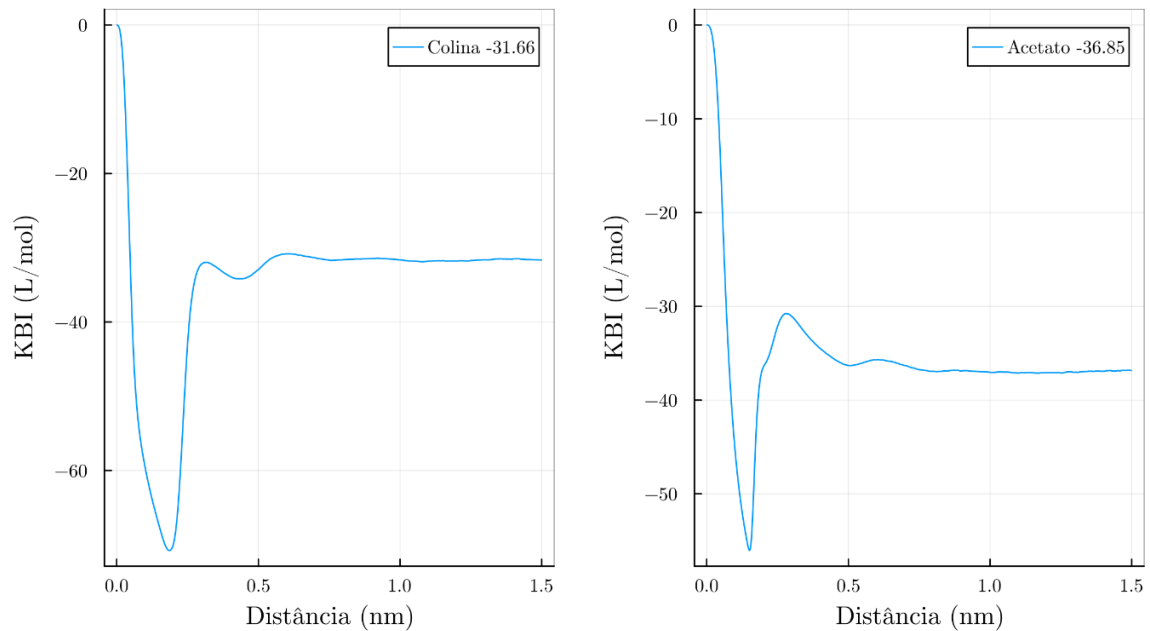
Fonte: autor (2025).

Legenda: KBI da água na fase inferior orgânica para o sistema formado pela Colina, Acetato e Triton X-114.

Esse resultado agregado, portanto, sugere a exclusão preferencial da água, o que evidencia a solvatação da enzima pelos cossolventes e corrobora maior afinidade pelos líquidos iônicos. Ressalta-se que esse comportamento foi o mesmo para quaisquer sistemas.

Nas Figuras 20 e 21, se observa que as integrais de Kirkwood-Buff (KBI) para o íon colina são consistentemente menos negativas do que as de seu ânion correspondente, em ambas as fases. Este resultado indica que, sob perspectiva volumétrica, os íons colina são menos excluídos da vizinhança da lipase.

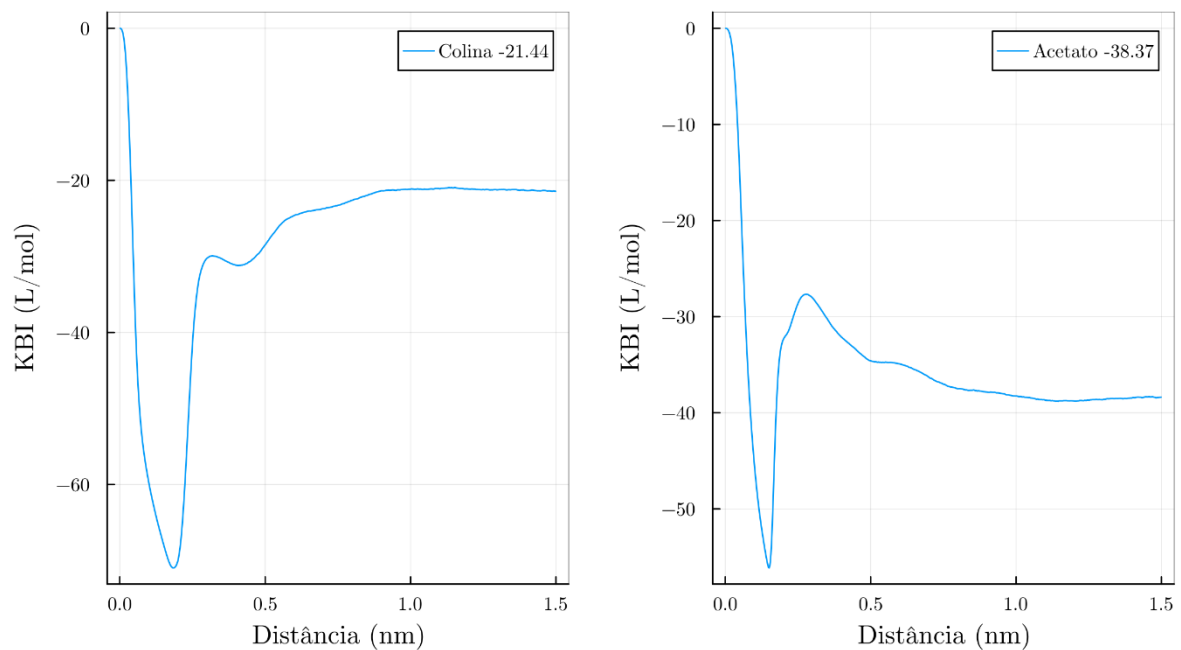
Figura 20 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FSA para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Aquosa para Ch^+ /Acetato/Triton X-1.



Fonte: autor (2025).

Legenda: KBI do líquido iônico, separado em íon colina e íon acetato, na fase superior aquosa para o sistema formado pela Colina, Acetato e Triton X-114.

Figura 21 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FIO para Colina/Acetato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Orgânica para Ch^+ /Acetato/Triton X-1



Fonte: autor (2025).

Legenda: KBI do líquido iônico, separado em íon colina e íon acetato, na fase superior aquosa para o sistema formado pela Colina, Acetato e Triton X-114.

À primeira vista, essa observação poderia sugerir contradição com os dados da MDDF (Figuras 14 e 15), que mostraram o ânion acetato interagindo a distâncias mais curta com a proteína. No entanto, a chave para conciliar esses resultados está no equilíbrio entre a afinidade de interação específica e a ocupação volumétrica.

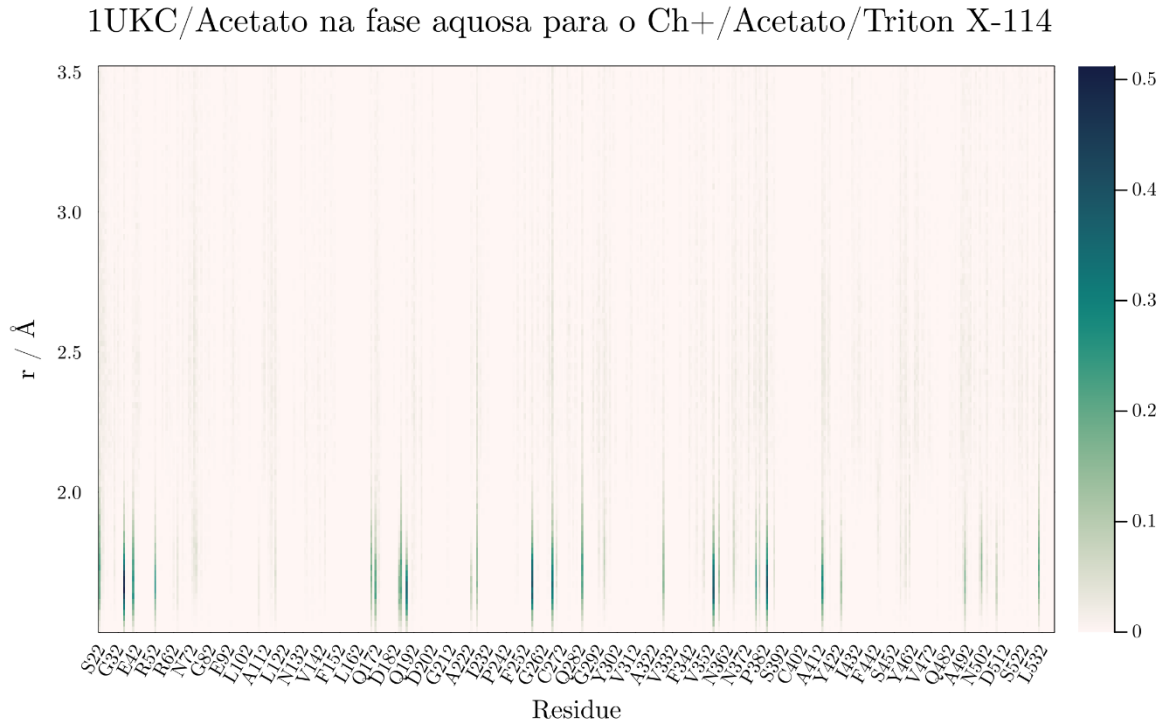
O pico do íon acetato nas Figuras 14 e 15 indicou que a interação com a lipase é forte e altamente localizada a uma distância de $\sim 0,18$ nm. Isso sugere a formação de ligações de hidrogênio, nas quais o oxigênio do acetato atua como aceptor. Em contraste, o pico correspondente ao íon colina surge distância maior, o que reforça que o acetato apresenta atração específica e mais intensa a curta distância.

No entanto, as Figuras 20 e 21 revelaram que a KBI do íon acetato é mais negativa que a do íon colina, indicando maior exclusão, em média, da vizinhança da lipase. Esse aparente paradoxo é, na verdade, o comportamento característico de espécies que estabelecem interações muito fortes, porém altamente localizadas em determinadas regiões da lipase.

Isso sugere que o íon acetato se liga fortemente à lipase, mas apenas em sítios específicos e de forma altamente localizada (Figura 22). Consequentemente, a maioria das moléculas de acetato permanece mais distante da superfície, o que resulta em menor densidade espacial média na vizinhança.

Em contraste, os íons colina interagem de maneira mais fraca, porém mais difusa, por toda a superfície da lipase (Figura 23). Como resultado, apesar de não possuírem afinidade pontual tão pronunciada, densidade espacial média ao redor da lipase é superior à do íon acetato.

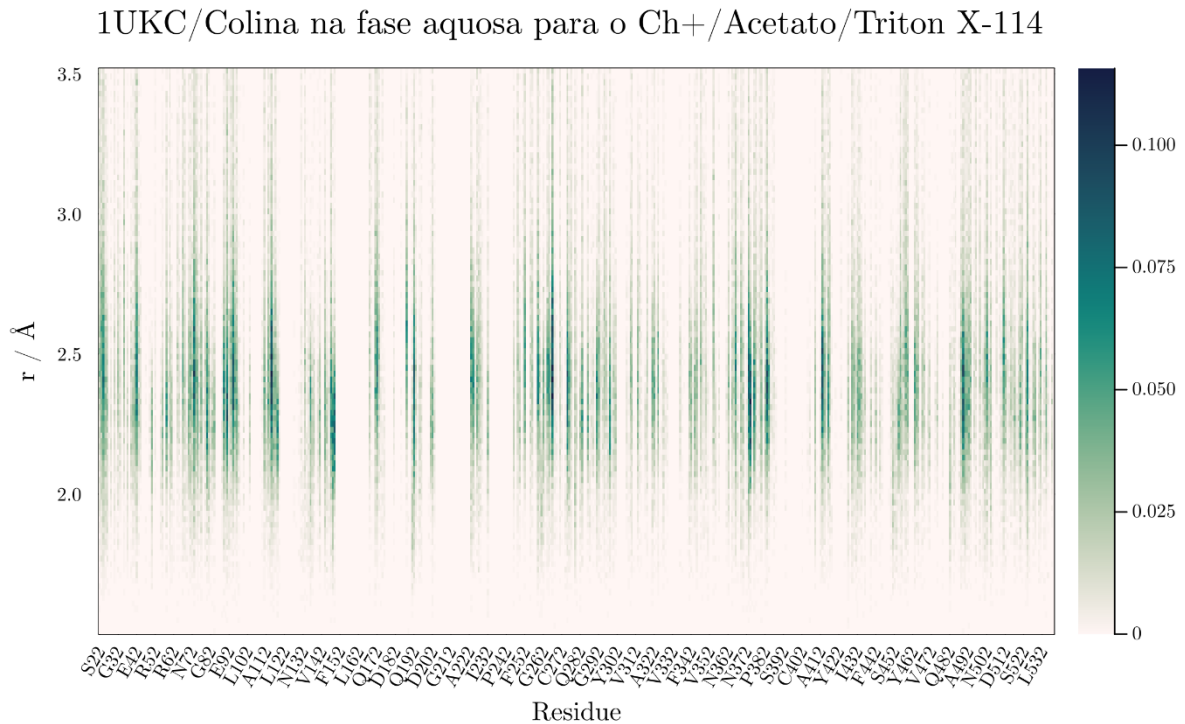
Figura 22 – Mapa de Densidade: 1UKC/Acetato na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: mapa de densidade da interação do íon acetato com os resíduos da lipase 1UKC.

Figura 23 - Mapa de Densidade: 1UKC/Colina na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114

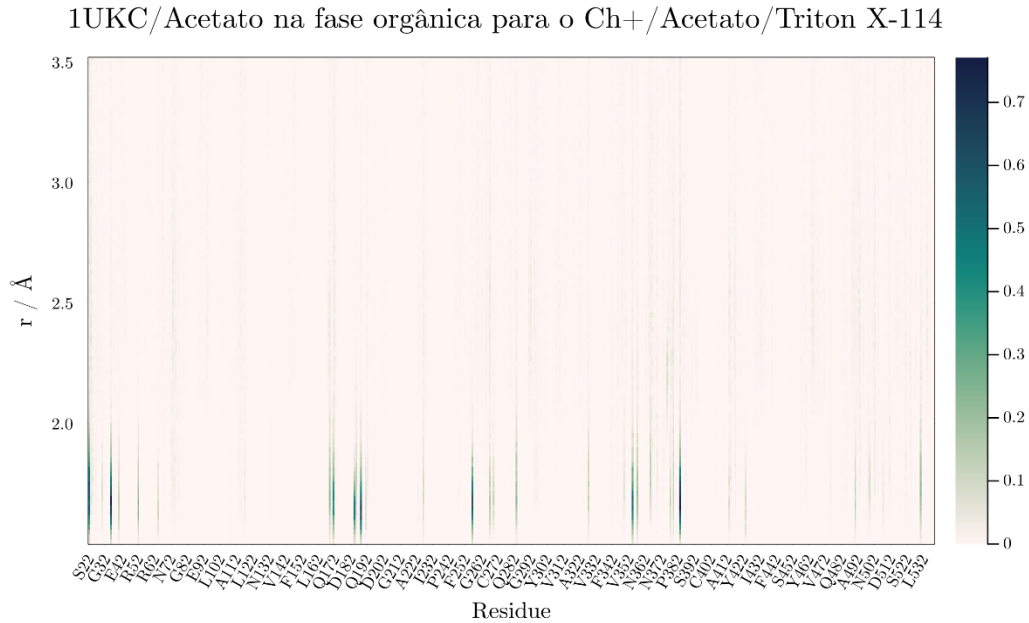


Fonte: autor (2025).

Legenda: mapa de densidade da interação do íon colina com os resíduos da lipase 1UKC.

Na fase inferior orgânica, a água e os íons colina demonstraram comportamento molecular análogo ao observado na fase aquosa (Figuras 24 e 25).

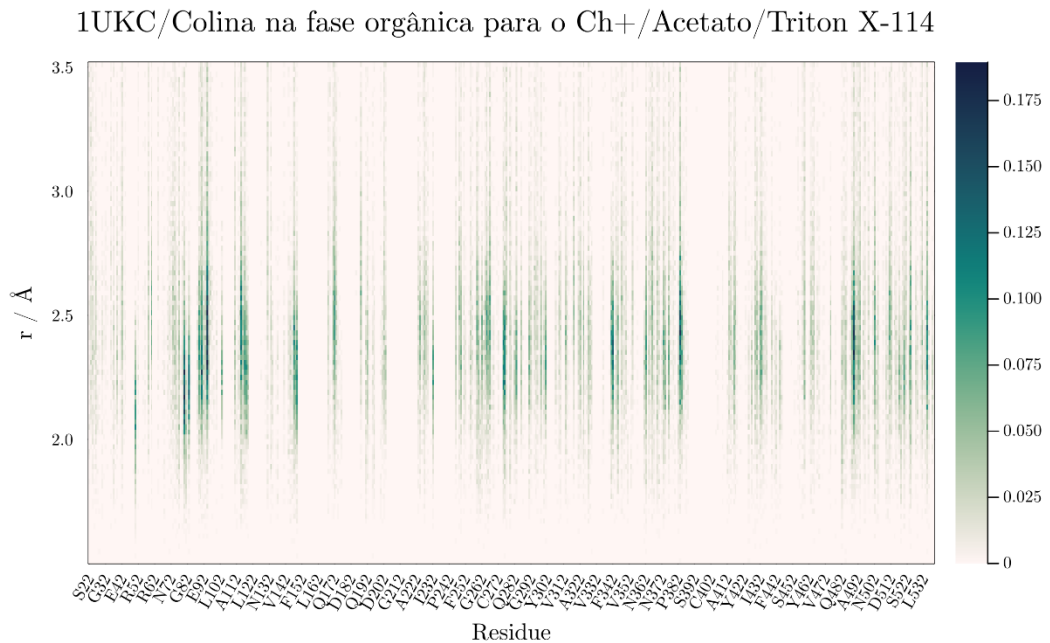
Figura 24 - Mapa de Densidade: 1UKC/Acetato na fase orgânica para Colina/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: mapa de densidade da interação do íon acetato com os resíduos da lipase 1UKC.

Figura 25 - Mapa de Densidade: 1UKC/Colina na fase aquosa para Colina/Acetato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

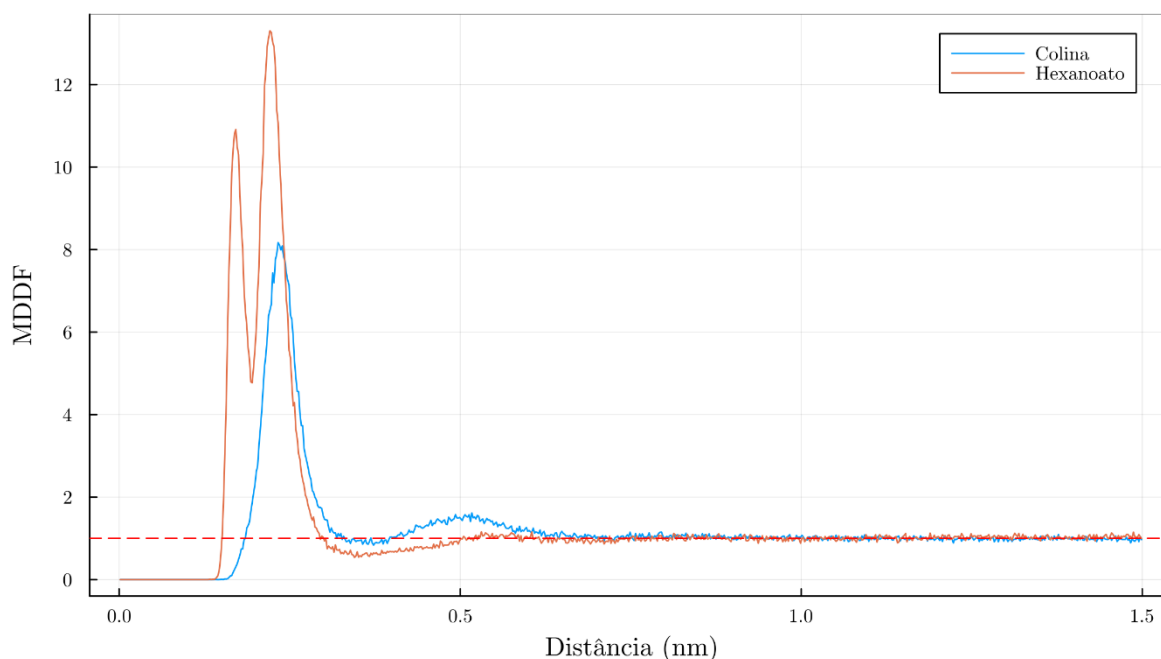
Legenda: mapa de densidade da interação do íon colina com os resíduos da lipase 1UKC.

Analisou-se, em seguida, o sistema SAB formado com o íon hexanoato. Neste caso, observou-se o mesmo padrão de interação descrito anteriormente para o íon acetato, para ambas as fases, porém com maior intensidade.

O ânion hexanoato apresentou forte interação a curtas distâncias, de forma específica e localizada (Figura 26 e 27). O cátion colina, em contraste, manteve padrão de interação mais difuso por toda a superfície da lipase (Figura 28 e 29).

Para o hexanoato (6C), o KBI do ânion torna-se menos negativo que o da colina, indicando acúmulo médio do 6C na vizinhança da lipase. Esse resultado decorre da adsorção anfifílica do 6C: o carboxilato ancora por interações de hidrogênio a curtas distâncias (MDDF), enquanto a cauda alquílica estabiliza contatos hidrofóbicos em sítios superficiais, aumentando o tempo de residência e a ocupação volumétrica. A reorganização superficial observada para 6C cria microambientes ainda mais favoráveis à retenção do ânion, revertendo o verificado no acetato, no qual interações locais fortes coexistem com exclusão média.

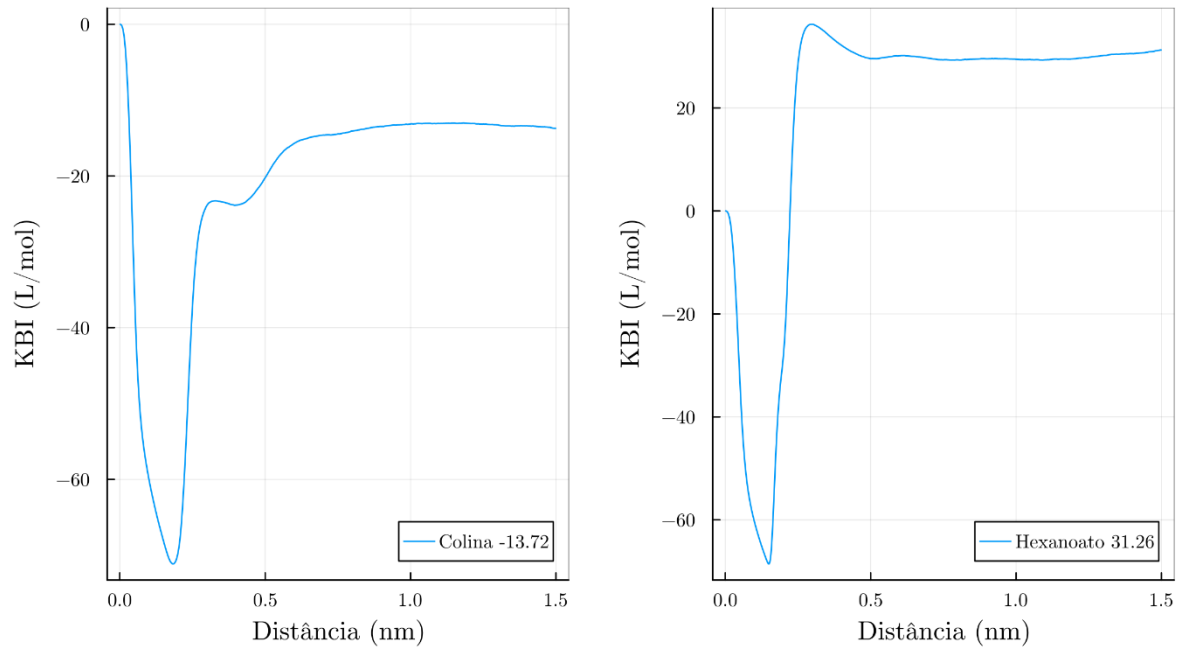
Figura 26 - MDDF: 1UKC/Líquido Iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Aquosa com Ch⁺/Hexanoato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: interações do líquido iônico na fase superior aquosa com a lipase 1UKC.

Figura 27 - KBI: 1UKC/Líquido iônico na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114
1UKC/Líquido Iônico na Fase Aquosa para Ch⁺/Hexanoato/Triton X-

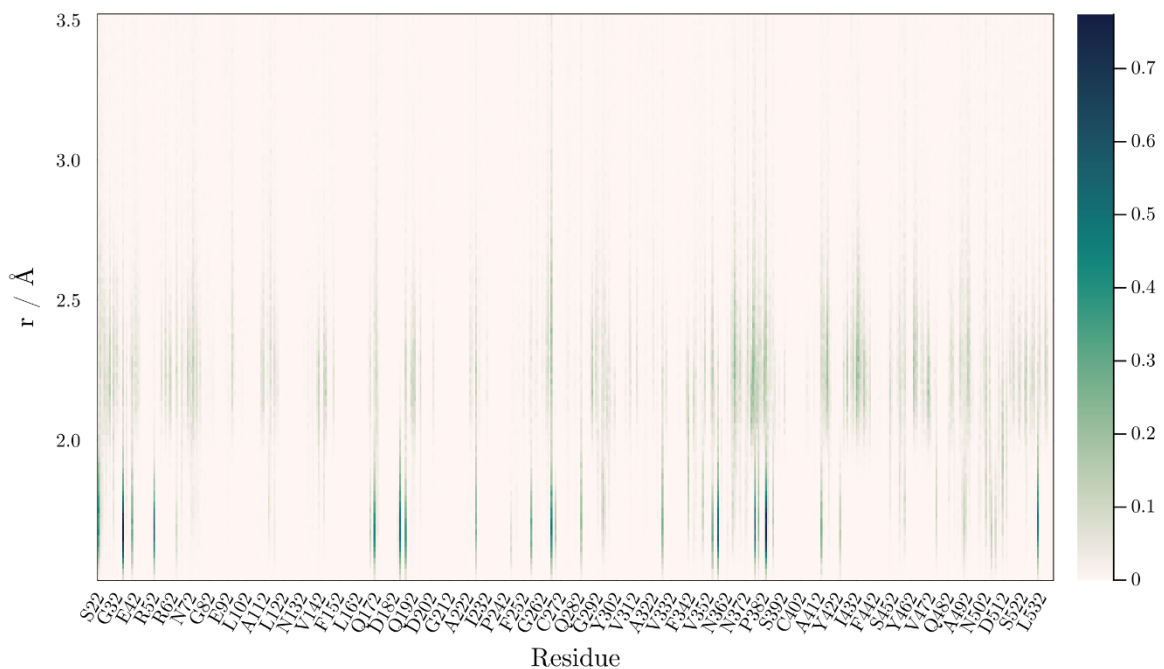


Fonte: autor (2025).

Legenda: KBI do líquido iônico, separado em íon colina e íon acetato, na fase superior aquosa para o sistema formado pela Colina, Hexanoato e Triton X-114.

Figura 28 - Mapa de Densidade: 1UKC/Hexanoato na FSA para
Colina/Hexanoato/Triton X-114

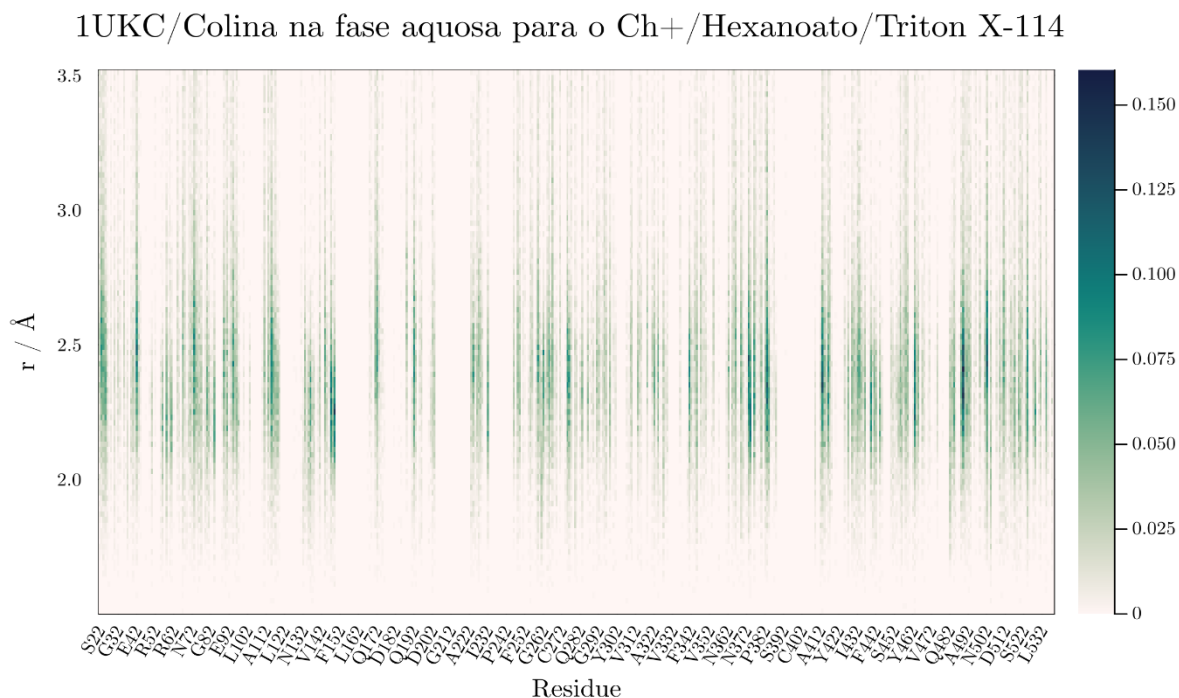
1UKC/Acetato na fase aquosa para o Ch⁺/Hexanoato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: mapa de densidade da interação do íon hexanoato com os resíduos da lipase 1UKC.

Figura 29 - Mapa de Densidade: 1UKC/Hexanoato na FSA para Colina/Hexanoato/Triton X-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: mapa de densidade da interação do íon colina com os resíduos da lipase 1UKC.

Os íons de cadeia intermediária — propanoato (3C), butanoato (4C) e pentanoato (5C) — apresentaram comportamento análogo e intermediário aos casos extremos analisados (2C e 6C). Verificou-se o aumento progressivo na intensidade das interações observadas, que se mostrou diretamente proporcional ao alongamento da cadeia alquílica.

A análise de apenas alguns resultados obtidos indicou que o polímero Triton® X-114 não exerceu influência significativa nos processos de solvatação investigados. Devido a essa baixa influência e à alta complexidade conformacional inerente a polímeros, não se realizou análise mais aprofundada do comportamento.

Cabe ressaltar, contudo, que o número de moléculas de Triton® X-114 permaneceu constante em todas as simulações e fases. Manteve-se essa condição a fim de garantir que o polímero atuasse apenas como componente formador de fase, sem introduzir interações indesejadas na análise das interações.

5.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DA LIPASE

A Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) é métrica que quantifica a porção da superfície de uma biomolécula que está exposta e pode ser contactada pelas moléculas do solvente. Essa medida é crucial para avaliar mudanças conformacionais e a estabilidade da estrutura.

Uma diminuição no valor de SASA geralmente indica maior enovelamento e compactação da biomolécula. Esse processo é frequentemente impulsionado pelo soterramento de resíduos hidrofóbicos, que se escondem do contato com a água, resultando em um estado mais estável. Inversamente, o aumento no SASA sugere processo de desenovelamento, no qual a biomolécula se torna mais expandida e flexível, expondo área maior ao meio circundante.

O Raio de Giro (RG) é a métrica que quantifica as dimensões totais de uma biomolécula, medindo a distribuição dos átomos em relação ao centro de massa e, portanto, refletindo o grau de compactação da estrutura.

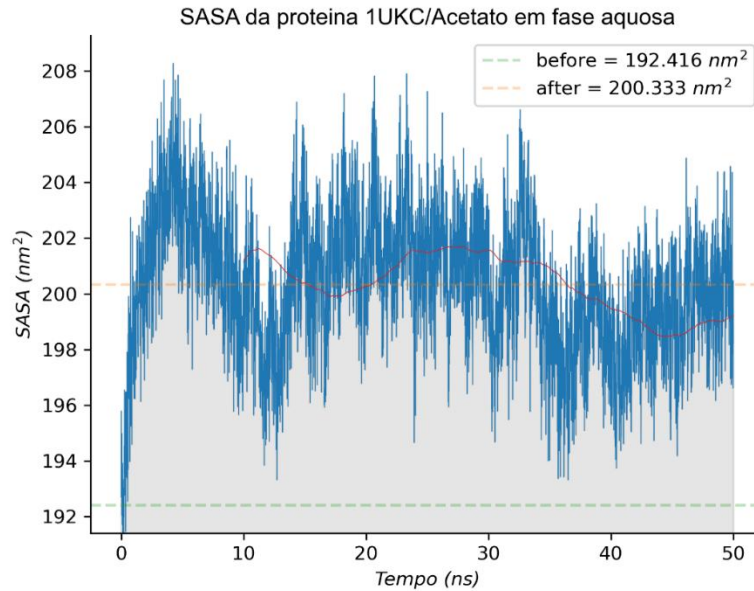
Em simulação, valores de RG baixos e estáveis ao longo do tempo são indicativos de proteína que mantém sua estrutura compacta e bem enovelada. O aumento do RG sinaliza um processo de desenovelamento ou expansão estrutural, enquanto a redução no valor pode indicar maior enovelamento ou processo de agregação.

A análise termodinâmica, apresentada na seção anterior, estabeleceu que a lipase interagiu preferencialmente com o líquido iônico, o que resultou no particionamento para a fase superior aquosa. Para complementar essa perspectiva, investigou-se o impacto estrutural dessas interações, a fim de determinar se houve a desnaturação da enzima.

As Figuras 30 a 33 estão as SASA para os sistemas com 2C e 6C. Estudos recentes demonstraram que o aumento na Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) está frequentemente associado à ação desnaturante da espécie química que

se acumula preferencialmente na superfície da biomolécula (Piccoli; Martínez, 2022, 2024).

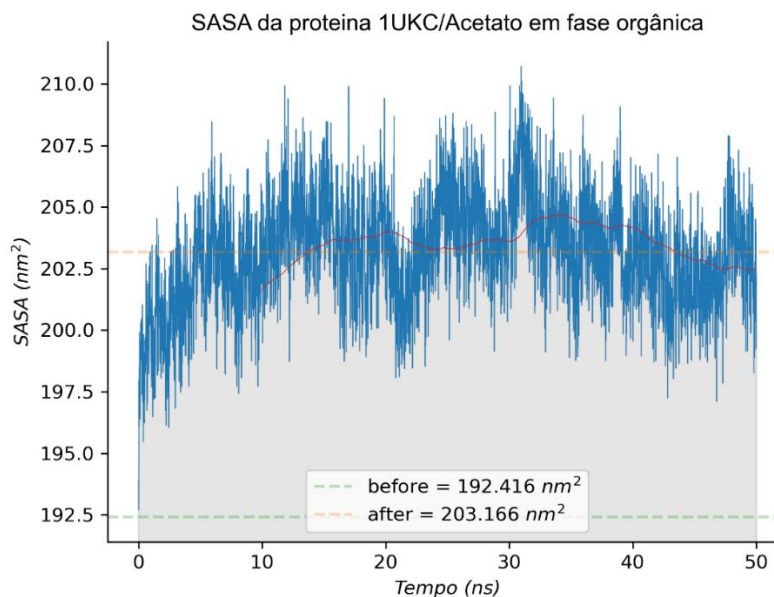
Figura 30 - SASA – 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise da média área de superfície acessível ao solvente da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/acetato/triton x-114.

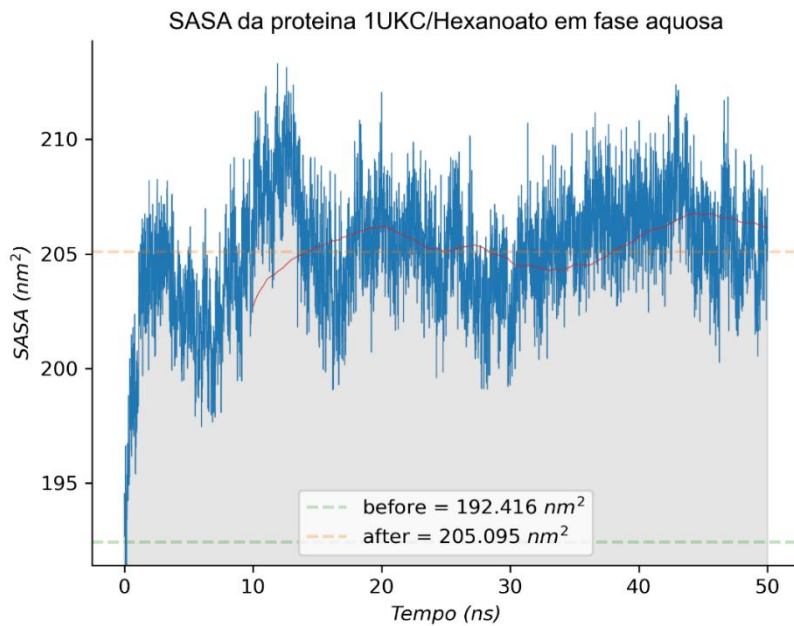
Figura 31 - SASA – 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise da média área de superfície acessível ao solvente da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/acetato/triton x-114.

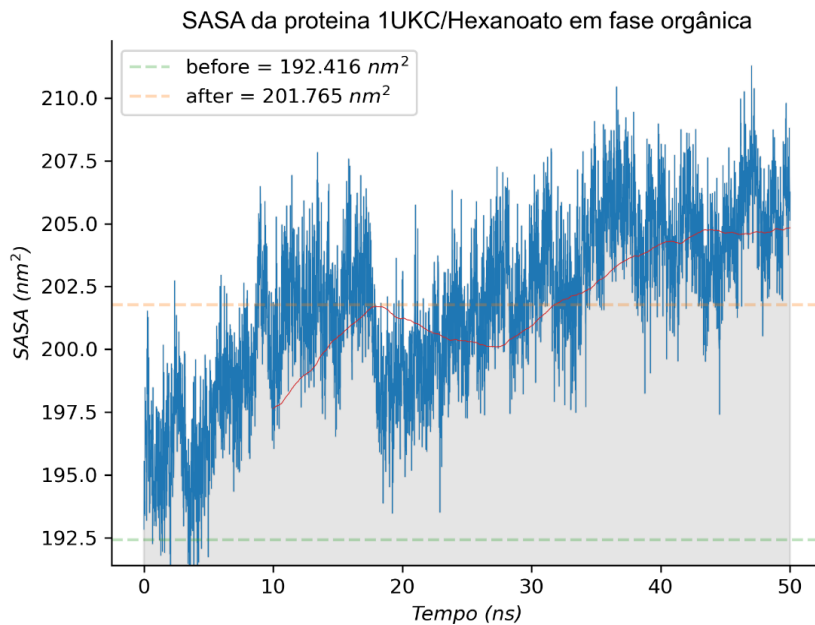
Figura 32 – SASA - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise da média área de superfície acessível ao solvente da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

Figura 33 - SASA - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise da média área de superfície acessível ao solvente da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

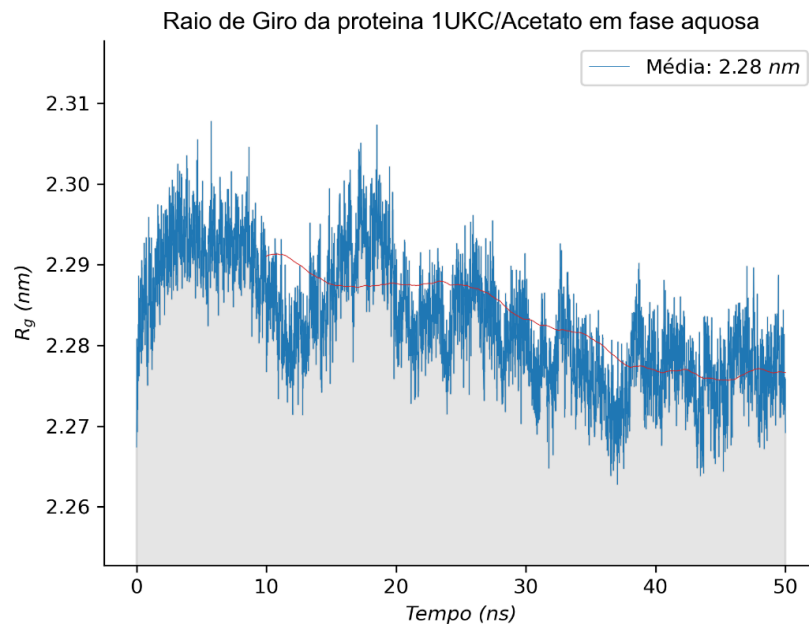
A Tabela 4 resume os valores da Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) e do Raio de Giro (RG) para a lipase em cada sistema e fase. Calcularam-se esses valores a partir da média obtida ao final de cada simulação de dinâmica molecular. Como referência, adotou-se o valor da SASA da estrutura nativa (cristalográfica) da lipase, que corresponde a 192,416 nm².

Tabela 4 - SASA e RG para a lipase nos sistemas e fases estudados.

Sistema	Fase	RG (nm)	SASA (nm²)	Diferença (Δ nm²)
2C	FSA	2,28	200,333	7,917
	FIO	2,29	203,166	10,750
3C	FSA	2,29	205,894	13,478
	FIO	2,29	202,803	10,387
4C	FSA	2,30	204,223	11,807
	FIO	2,30	203,502	11,086
5C	FSA	2,30	205,183	12,767
	FIO	2,29	202,295	9,879
6C	FSA	2,29	205,095	12,679
	FIO	2,29	201,765	9,349

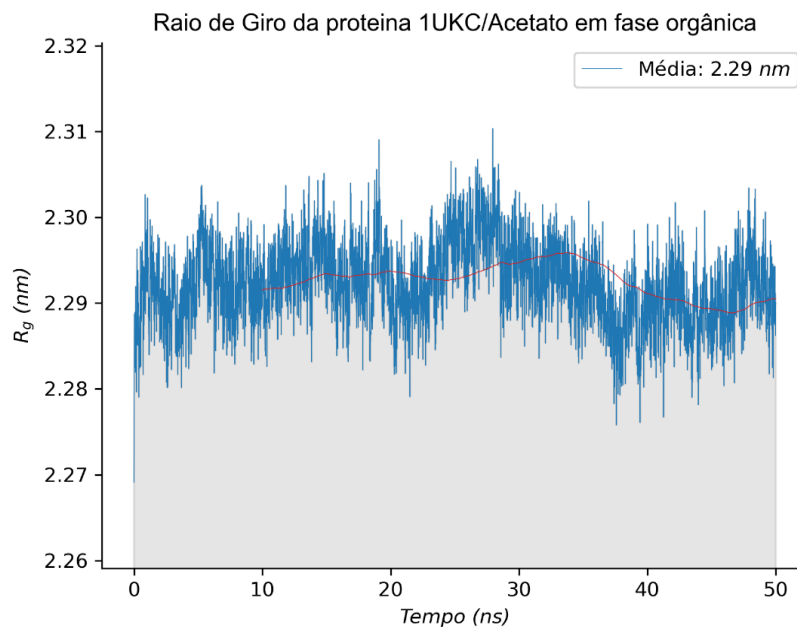
Fonte: autor (2025).

A comparação entre a SASA da estrutura inicial (cristalográfica) e a média final obtida nas simulações indicou que, para a maioria dos sistemas, o maior aumento desta métrica ocorreu na fase superior aquosa. Este resultado, a princípio, sugeriu possível processo de desnaturação ou desenovelamento da enzima. Contudo, uma observação contraditória emergiu da análise do RG (Figuras 34 a 37). Verificou-se que, ao longo da simulação, o RG diminuiu sutilmente antes de atingir platô estável, o que apontou, na verdade, para leve compactação da estrutura.

Figura 34 - RG - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114

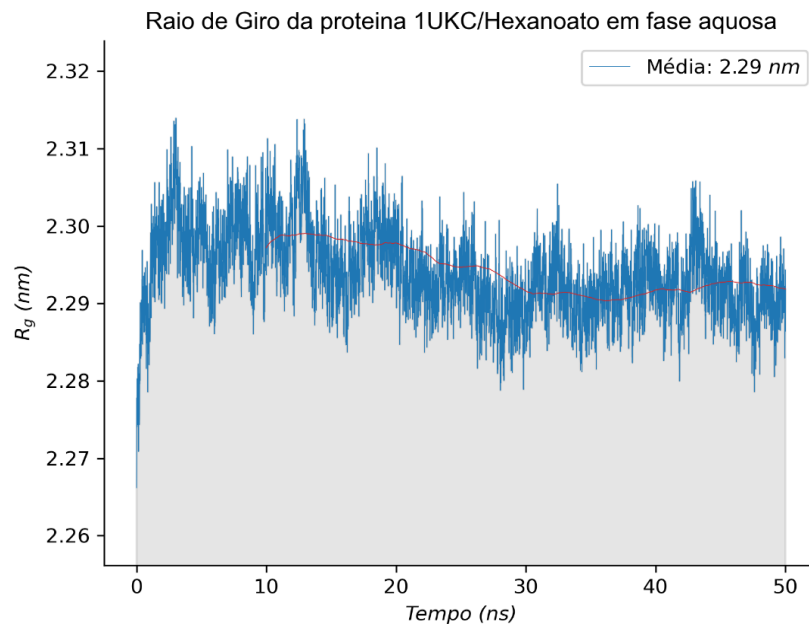
Fonte: autor (2025).

Legenda: análise do raio de giro da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/acetato/triton x-114.

Figura 35 - RG - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114

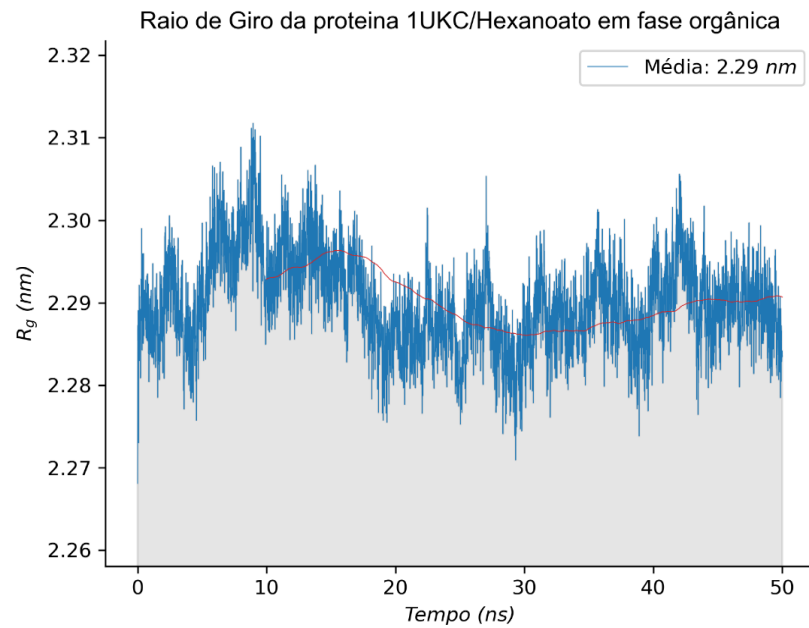
Fonte: autor (2025).

Legenda: análise do raio de giro da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/acetato/triton x-114.

Figura 36 - RG - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114

Fonte: autor (2025).

Legenda: análise do raio de giro da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

Figura 37 - RG - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114

Fonte: autor (2025).

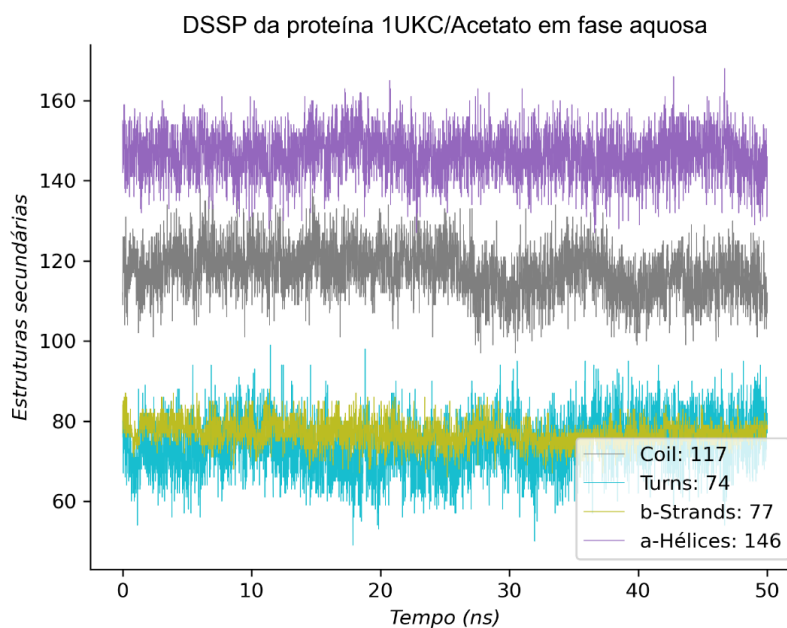
Legenda: análise do raio de giro da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

Um cenário no qual a SASA aumenta enquanto o Raio de Giro (RG) diminui sutilmente não indica, necessariamente, instabilidade, mas sim a transição conformacional para um estado distinto. Esse novo estado é, simultaneamente, mais compacto e possui superfície mais complexa e exposta ao solvente.

Esse fenômeno ocorre quando a estrutura central da proteína (o *core*) se torna mais compacta, o que reduz o RG. Como consequência desse rearranjo, alças ou domínios flexíveis que estavam previamente mais internalizados projetam-se para o exterior. São essas alças recém-expostas que aumentam a SASA, sem, contudo, alterar significativamente as dimensões gerais da molécula, refletidas no RG.

A análise da estrutura secundária, realizada por meio do algoritmo DSSP (*Dictionary of Secondary Structure of Proteins*), permite identificar e quantificar os diferentes tipos de arranjos, como α -hélices e folhas- β em uma biomolécula (Gorelov *et al.*, 2024). É importante notar que o DSSP não prevê a estrutura, mas sim a atribui a cada resíduo com base na análise do padrão de ligações de hidrogênio ao longo do esqueleto polipeptídico (o *backbone*). São os padrões específicos e repetitivos dessas ligações que definem cada tipo de estrutura secundária.

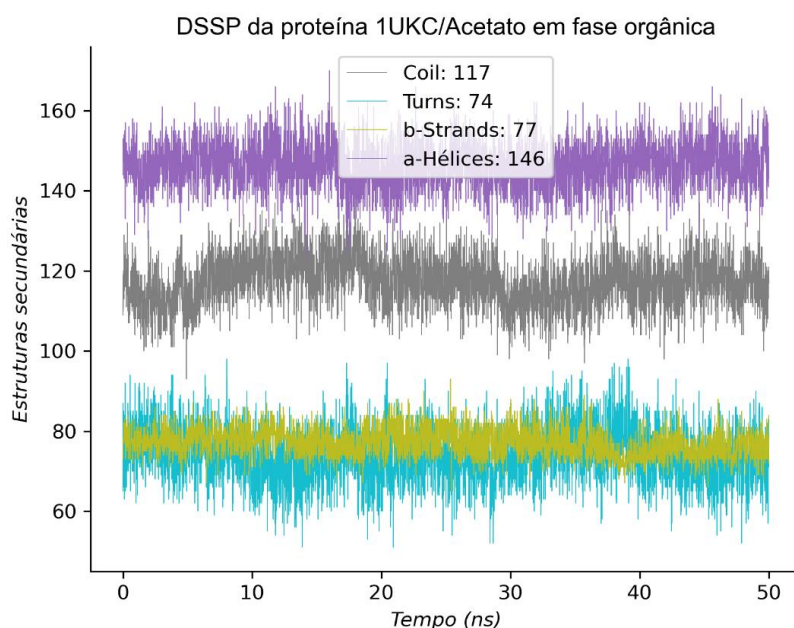
Figura 38 - DSSP - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise DSSP da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/acetato/triton x-114.

Figura 39 - DSSP - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114

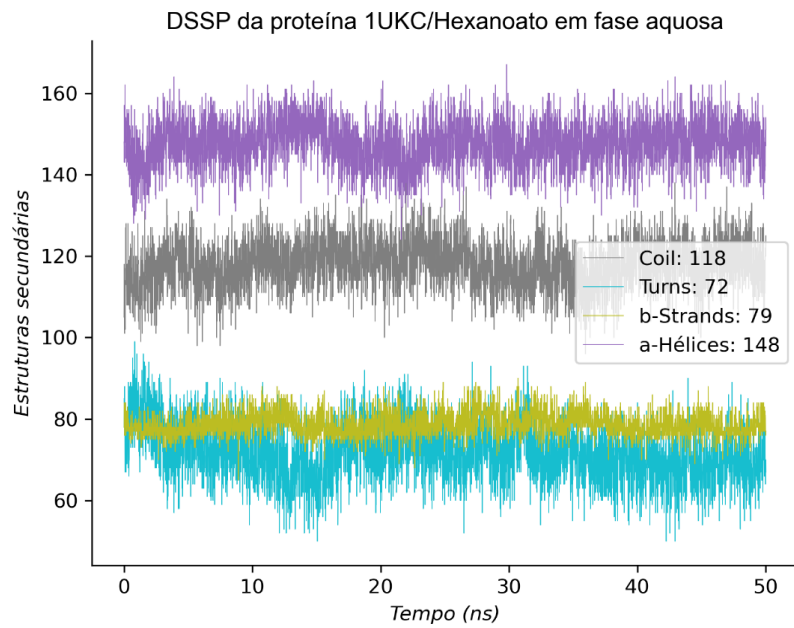


Fonte: autor (2025).

Legenda: análise DSSP da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/acetato/triton x-114.

A análise das estruturas secundárias (Figuras 38 e 39) revelou que o sistema formado com o íon acetato (2C) não apresentou alterações significativas na estrutura secundária da lipase. Em contraste, no sistema com o ânion de cadeia longa, o hexanoato (6C), a lipase sofreu alterações estruturais distintas entre as fases, conforme Figuras 40 e 41. Na fase superior aquosa, observou-se aumento no conteúdo de α -hélices, enquanto na fase inferior orgânica houve predominância de estruturas de laço (*coil*). Essa observação é consistente com os resultados de RG e SASA discutidos anteriormente: o aumento de α -hélices (estruturas mais ordenadas) corrobora compactação indicada pela redução do RG, enquanto a formação dessas novas hélices na superfície da proteína explica o aumento simultâneo da SASA.

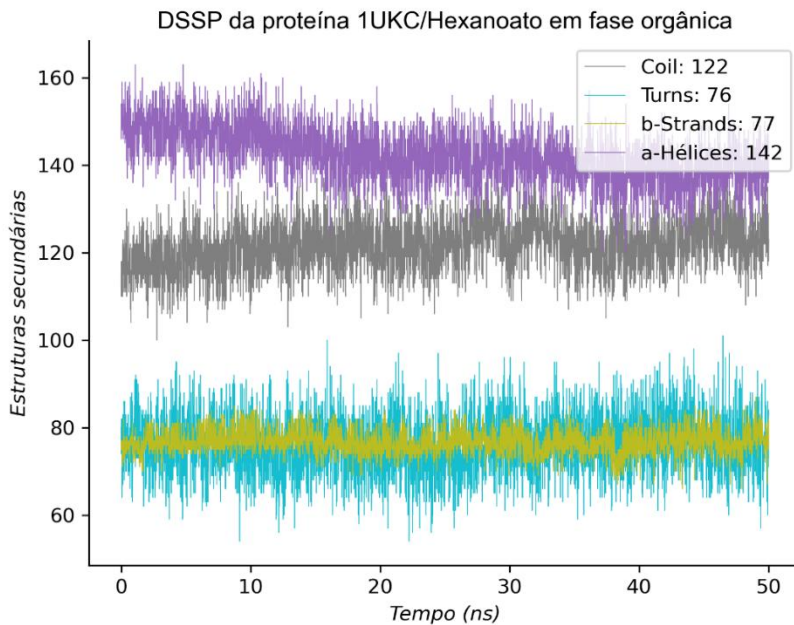
Figura 40 - DSSP - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise DSSP da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

Figura 41 - DSSP - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

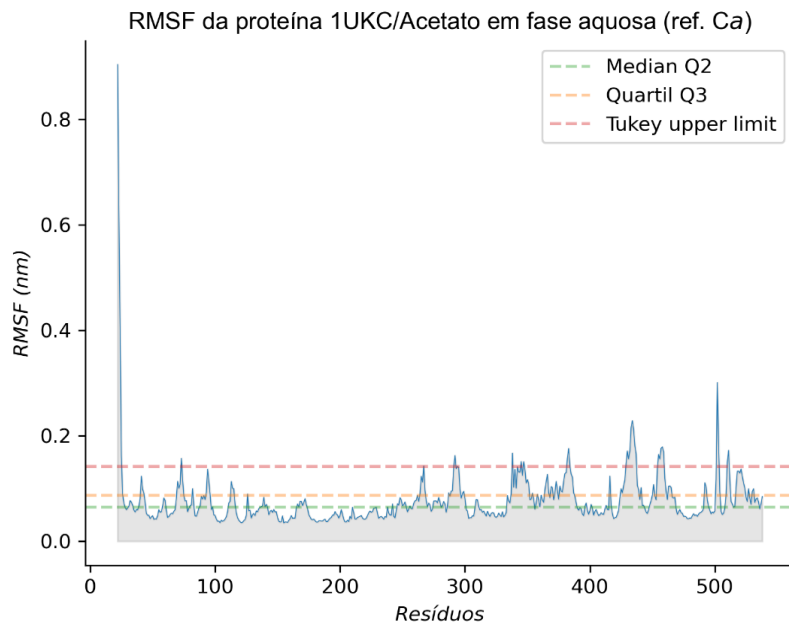
Legenda: análise DSSP da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

A Flutuação Média Quadrática (RMSF) é a métrica essencial em dinâmica molecular para caracterizar a flexibilidade de resíduos individuais de uma proteína ao longo da simulação. Diferentemente do RMSD, que avalia a estabilidade estrutural global, o RMSF calcula o desvio médio da posição de cada resíduo em relação à sua própria posição média durante a trajetória. Isso gera perfil de mobilidade ao longo da cadeia polipeptídica, permitindo a identificação precisa de quais partes da molécula são inerentemente rígidas e quais são mais dinâmicas.

A interpretação do gráfico de RMSF permite correlacionar a dinâmica com a estrutura secundária e a função da proteína. Regiões com baixos valores de RMSF geralmente correspondem a elementos estruturais estáveis, como α -hélices e folhas- β , que formam o núcleo da proteína. Por outro lado, picos de alta flutuação indicam regiões de maior mobilidade, como alças (*loops*) e as extremidades N- e C-terminais. Essas regiões flexíveis são frequentemente cruciais para a função biológica, estando envolvidas em processos como o reconhecimento de ligantes, a catálise enzimática e as interações proteína-proteína, onde a plasticidade conformacional é necessária.

A análise do RMSF (Figuras 42 e 43) para o sistema com íon acetato revelou aumento localizado de flexibilidade na fase inferior orgânica, especificamente na região entre os resíduos 350 e 450. Ressaltou-se, contudo, que esse aumento de mobilidade não provocou alterações significativas na estrutura secundária da lipase. Essa instabilidade localizada, portanto, corrobora menor afinidade da lipase pela fase inferior orgânica, reforçando a conclusão de que a enzima se encontra mais estável na fase superior aquosa, para a qual demonstrou preferência.

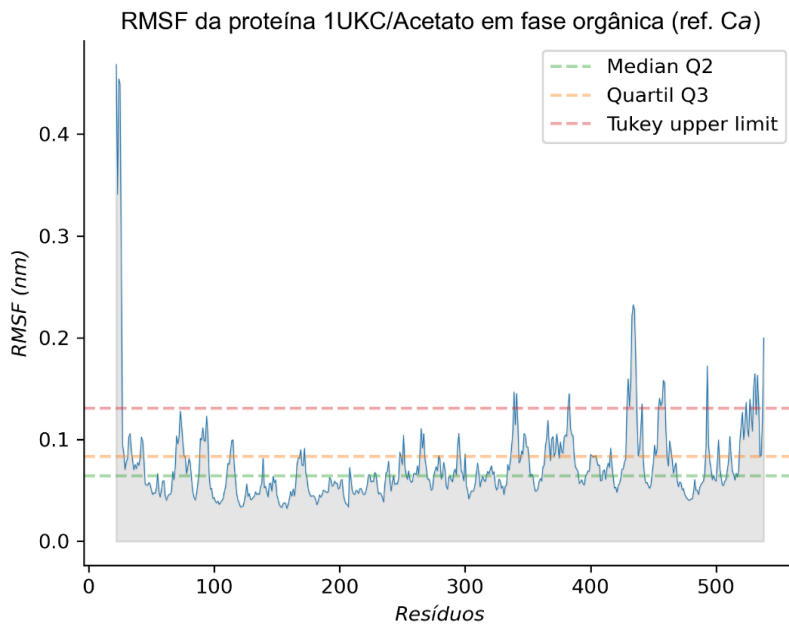
Figura 42 - RMSF - 1UKC na FSA para o sistema colina/acetato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise das flutuações médias dos resíduos da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/acetato/triton x-114.

Figura 43 - RMSF - 1UKC na FIO para o sistema colina/acetato/triton x-114

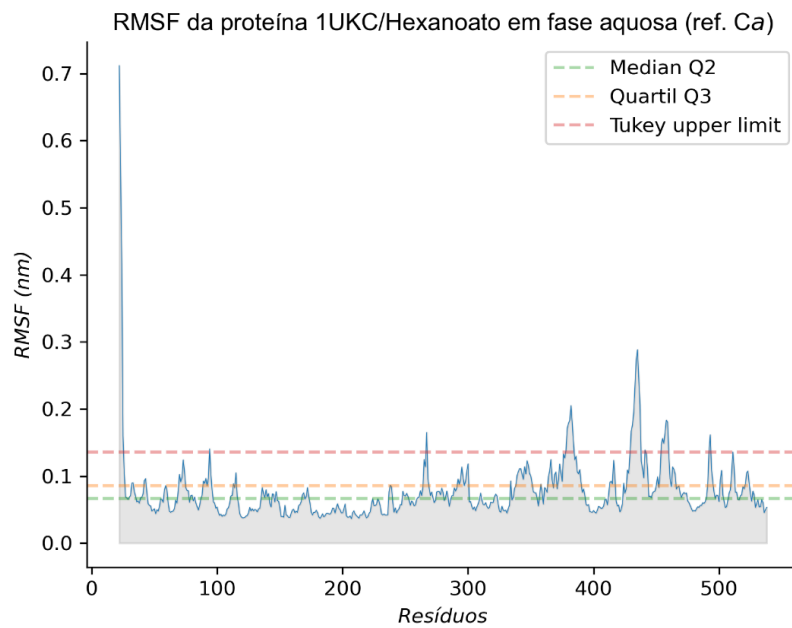


Fonte: autor (2025).

Legenda: análise das flutuações médias dos resíduos da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/acetato/triton x-114.

Para o ânion de cadeia mais longa, o hexanoato (6C), observou-se acentuação do comportamento descrito anteriormente (Figuras 44 e 45). Neste caso, a instabilidade localizada foi significativa a ponto de provocar alteração na estrutura secundária da lipase, conforme se verificou na análise de DSSP.

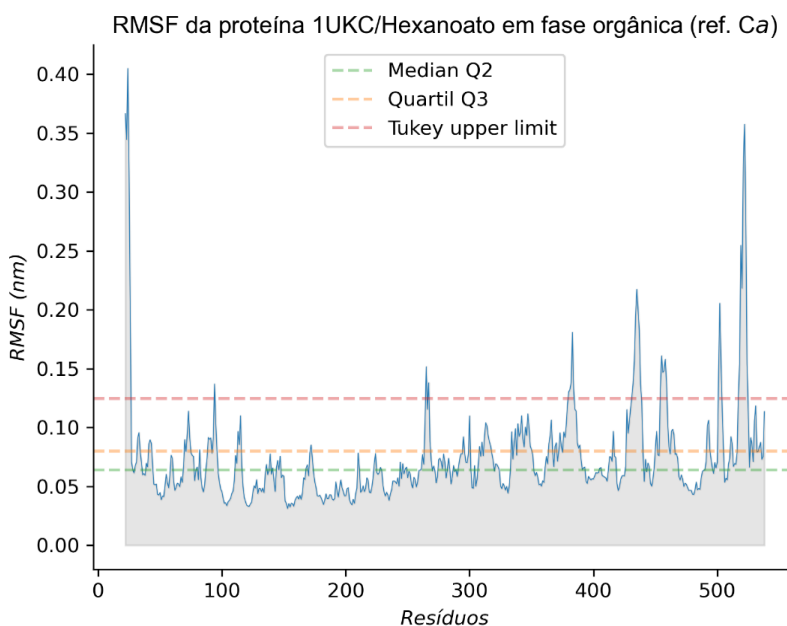
Figura 44 - RMSF - 1UKC na FSA para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise das flutuações médias dos resíduos da lipase na fase superior aquosa para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

Figura 45 - RMSF - 1UKC na FIO para o sistema colina/hexanoato/triton x-114



Fonte: autor (2025).

Legenda: análise das flutuações médias dos resíduos da lipase na fase inferior orgânica para o sistema colina/hexanoato/triton x-114.

A consolidação e a expansão deste trabalho abrem diversas avenidas promissoras para investigações futuras. Uma etapa prioritária consiste na validação experimental dos resultados computacionais aqui obtidos. A corroboração dos dados de simulação, como densidades, viscosidades e parâmetros estruturais, por meio de técnicas laboratoriais como espalhamento de raios-X, calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia vibracional (FTIR/Raman) e reologia, é fundamental para atestar o poder preditivo dos modelos utilizados. Em paralelo, vislumbra-se o desenvolvimento e a implementação de algoritmos mais sofisticados para o cálculo de equilíbrios de fases, com foco especial na complexidade dos sistemas envolvendo líquidos iônicos. A criação de rotinas computacionais otimizadas, possivelmente integrando métodos de Monte Carlo no ensemble Gibbs (GEMC) com a dinâmica molecular, é essencial para prever com maior acurácia e eficiência diagramas de fase, superando os desafios impostos pela baixa volatilidade e alta viscosidade desses compostos. Finalmente, a acurácia de qualquer simulação é intrinsecamente dependente da qualidade do modelo matemático que descreve as interações atômicas. Nesse sentido, uma terceira frente de pesquisa será dedicada ao

desenvolvimento e refinamento de campos de força específicos para líquidos iônicos. Isso envolve a parametrização de termos de energia a partir de dados quânticos de alto nível (*ab initio*) e dados experimentais, e, em um estágio mais avançado, a exploração de campos de força polarizáveis, capazes de capturar os efeitos de indução eletrônica que são cruciais em sistemas com alta densidade de carga. A sinergia entre essas três frentes – validação experimental, avanço algorítmico e aprimoramento dos campos de força – permitirá a criação de uma metodologia multiescala poderosa e confiável para o design racional de processos e materiais baseados em líquidos iônicos.

6 CONCLUSÕES

Este estudo de dinâmica molecular permitiu elucidar, em nível atômico, como modificações estruturais na cadeia alquílica aniônica de líquidos iônicos à base de colina modulam simultaneamente a partição e a estabilidade conformacional da lipase em sistemas aquosos bifásicos.

A lipase exibiu caráter predominantemente hidrofílico, particionando preferencialmente para a fase aquosa. O aumento do comprimento da cadeia alquílica do ânion intensificou essa tendência, indicando que líquidos iônicos com cadeias mais longas favorecem a seletividade da separação enzimática.

No entanto, essa maior eficiência de partição esteve associada a uma transição conformacional complexa: observou-se aumento da área de superfície acessível ao solvente (SASA) acompanhado de redução do raio de giro (RG). A análise de estrutura secundária (DSSP) demonstrou que tal comportamento não correspondeu a uma desnaturação global, mas sim à reorganização superficial da enzima, marcada pela formação de α -hélices expostas. A análise de flutuações (RMSF) confirmou que as mudanças ocorreram em regiões específicas da proteína, sem comprometer a estabilidade estrutural global.

Do ponto de vista da solvatação, verificou-se comportamento contrastante entre ânions curtos e longos. Para o acetato (2C), a função de distribuição de distância mínima (MDDF) revelou interações fortes e localizadas com a lipase, mas o KBI mais negativo indicou que, em média, o ânion foi excluído em relação ao cátion colina, que se manteve mais difusamente associado à superfície. Para o hexanoato (6C), o KBI se tornou menos negativo, refletindo um enriquecimento médio do ânion junto à lipase. Esse efeito decorre da anfifilicidade, combinando a ancoragem eletrostática do grupo carboxilato com interações hidrofóbicas da cauda alquílica em patches apolares da proteína. Tal combinação aumenta o tempo de residência do ânion e a ocupação volumétrica no entorno proteico, revertendo o paradoxo observado para o acetato.

O polímero Triton® X-114 apresentou efeito limitado sobre a partição e estabilidade da lipase, confirmando que o design do ânion é o fator mais relevante na

modulação do equilíbrio entre eficiência de extração e preservação da integridade enzimática.

Em síntese, os resultados demonstram que o desenho estrutural do ânion em líquidos iônicos define equilíbrio delicado entre partição seletiva e estabilidade conformacional da enzima. Esta dissertação fornece, assim, o mecanismo molecular detalhado capaz de orientar o desenvolvimento racional de sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos, contribuindo para a otimização de processos de bioseparação, formulação de SABs mais seletivos e o avanço de bioprocessos sustentáveis em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, J. L. F.; VEGA, C. A general purpose model for the condensed phases of water: TIP4P/2005. **The Journal of Chemical Physics**, v. 123, n. 23, p. 234505, 2005. . DOI: 10.1063/1.2121687.
- ABRAHAM, Mark; ALEKSEENKO, Andrey; ANDREWS, Brian; BASOV, Vladimir; BAUER, Paul; BIRD, Hugh; BRIAND, Eliane; BROWN, Ania; DOJADE, Mahesh; FIORIN, Giacomo; FLEISCHMANN, Stefan; GORELOV, Sergey; GOUAILLARD, Gilles; GRAY, Alan; IRRGANG, M. Eric; JALALYPOUR, Farzaneh; JOHANSSON, Petter; KUTZNER, Carsten; ŁAZARSKI, Grzegorz; LEMKUL, Justin A.; LUNDBORG, Magnus; MERZ, Pascal; MILETIĆ, Vedran; MOROZOV, Dmitry; MÜLLENDER, Lukas; NABET, Julien; PÁLL, Szilárd; PASQUADIBISCEGLIE, Andrea; PELLEGRINO, Michele; PIASENTIN, Nicola; RAPETTI, Daniele; SADIQ, Muhammad Umair; SANTUZ, Hubert; SCHULZ, Roland; SHIRTS, Michael; SHUGAEVA, Tatiana; SHVETSOV, Alexey; TURNER, Philip; VILLA, Alessandra; WINGBERMÜHLE, Sebastian; HESS, Berk; LINDAHL, Erik. GROMACS 2025.1 Manual. 2025. . DOI: 10.5281/zenodo.15006631. Disponível em: <https://zenodo.org/records/15006631>. Acesso em: 23 mar. 2025.
- ABRAHAM, Mark James; MURTOLA, Teemu; SCHULZ, Roland; PÁLL, Szilárd; SMITH, Jeremy C.; HESS, Berk; LINDAHL, Erik. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015. . DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J. Computers and computer simulation. In: ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J.. **Computer Simulation of Liquids**. [S.l.]: Oxford University Press, 2017a. p. 0. . DOI: 10.1093/oso/9780198803195.005.0001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780198803195.005.0001>. Acesso em: 22 mar. 2025.
- ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J. Molecular dynamics. In: ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J.. **Computer Simulation of Liquids**. [S.l.]: Oxford University Press, 2017b. p. 0. . DOI: 10.1093/oso/9780198803195.003.0003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780198803195.003.0003>. Acesso em: 22 mar. 2025.
- ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J. Parallel simulation. In: ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J.. **Computer Simulation of Liquids**. [S.l.]: Oxford University Press, 2017c. p. 0. . DOI: 10.1093/oso/9780198803195.003.0007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780198803195.003.0007>. Acesso em: 22 mar. 2025.
- ANDERSEN, Hans C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. **The Journal of Chemical Physics**, v. 72, n. 4, p. 2384–2393, 1980. . DOI: 10.1063/1.439486.
- BANNAN, Caitlin C.; CALABRÓ, Gaetano; KYU, Daisy Y.; MOBLEY, David L. Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 8, p. 4015–4024, 2016. . DOI: 10.1021/acs.jctc.6b00449.
- BAYNES, Brian M.; TROUT, Bernhardt L. Proteins in Mixed Solvents: A Molecular-Level Perspective. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 50, p. 14058–14067, 2003. . DOI: 10.1021/jp0363996.

BEKAVAC, Nikša; BENKOVIĆ, Maja; JURINA, Tamara; VALINGER, Davor; GAJDOŠ KLJUSURIĆ, Jasenka; JURINJAK TUŠEK, Ana; ŠALIĆ, Anita. Advancements in Aqueous Two-Phase Systems for Enzyme Extraction, Purification, and Biotransformation. **Molecules**, v. 29, n. 16, p. 3776, 2024. . DOI: 10.3390/molecules29163776.

BEN-NAIM, Arieh. **The Kirkwood-Buff Theory of Solutions: With Selected Applications to Solvation and Proteins**. 1. ed. Chantilly: Elsevier Science & Technology, 2023. . DOI: 10.1016/C2023-0-00111-X.

BEN-NAIM, Arieh. **Molecular theory of solutions**. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2006.

BERENDSEN, H. J. C. Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath. In: MEYER, Madeleine; PONTIKIS, Vassilis. **Computer Simulation in Materials Science: Interatomic Potentials, Simulation Techniques and Applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 139–155. . DOI: 10.1007/978-94-011-3546-7_7. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-3546-7_7. Acesso em: 23 mar. 2025.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987. . DOI: 10.1021/j100308a038.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984. . DOI: 10.1063/1.448118.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; HERMANS, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, Bernard. **Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. p. 331–342. . DOI: 10.1007/978-94-015-7658-1_21. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1_21. Acesso em: 23 mar. 2025.

BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1, p. 43–56, 1995. . DOI: 10.1016/0010-4655(95)00042-E.

BERNETTI, Mattia; BUSSI, Giovanni. Pressure control using stochastic cell rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 11, p. 114107, 2020. . DOI: 10.1063/5.0020514.

BERTON, Paula; KELLEY, Steven P.; BRIDGES, Nicholas J.; KLINGSHIRN, Marc A.; HUDDLESTON, Jonathan G.; WILLAUER, Heather D.; BALDWIN, Jeffrey W.; MOODY, Melanie L.; ROGERS, Robin D. Water in Solutions of Chaotropic and Kosmotropic Salts: A Differential Scanning Calorimetry Investigation. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 64, n. 11, p. 4781–4792, 2019. . DOI: 10.1021/acs.jced.9b00222.

BEZANSON, Jeff; EDELMAN, Alan; KARPINSKI, Stefan; SHAH, Viral B. Julia: A Fresh Approach to Numerical Computing. **SIAM Review**, v. 59, n. 1, p. 65–98, 2017. . DOI: 10.1137/141000671.

- BUSSI, Giovanni; DONADIO, Davide; PARRINELLO, Michele. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007. . DOI: 10.1063/1.2408420.
- CASE, David A.; CHEATHAM, Thomas E.; DARDEN, Tom; GOHLKE, Holger; LUO, Ray; MERZ, Kenneth M.; ONUFRIEV, Alexey; SIMMERLING, Carlos; WANG, Bing; WOODS, Robert J. The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668–1688, 2005. . DOI: 10.1002/jcc.20290.
- CHIALVO, Ariel A.; BARTÓK, Albert; BARANYAI, András. On the re-engineered TIP4P water models for the prediction of vapor–liquid equilibrium. **Journal of Molecular Liquids**, v. 129, n. 1, p. 120–124, 2006. . DOI: 10.1016/j.molliq.2006.08.018.
- DODDA, Leela S.; CABEZA DE VACA, Israel; TIRADO-RIVES, Julian; JORGENSEN, William L. LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W331–W336, 2017. . DOI: 10.1093/nar/gkx312.
- DOHERTY, Brian; ACEVEDO, Orlando. OPLS Force Field for Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 43, p. 9982–9993, 2018. . DOI: 10.1021/acs.jpccb.8b06647.
- DOHERTY, Brian; ZHONG, Xiang; GATHIAKA, Symon; LI, Bin; ACEVEDO, Orlando. Revisiting OPLS Force Field Parameters for Ionic Liquid Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 12, p. 6131–6145, 2017. . DOI: 10.1021/acs.jctc.7b00520.
- EASTMAN, Peter; GALVELIS, Raimondas; PELÁEZ, Raúl P.; ABREU, Charles R. A.; FARR, Stephen E.; GALLICCHIO, Emilio; GORENKO, Anton; HENRY, Michael M.; HU, Frank; HUANG, Jing; KRÄMER, Andreas; MICHEL, Julien; MITCHELL, Joshua A.; PANDE, Vijay S.; RODRIGUES, João PGLM; RODRIGUEZ-GUERRA, Jaime; SIMMONETT, Andrew C.; SINGH, Sukrit; SWAILS, Jason; TURNER, Philip; WANG, Yuanqing; ZHANG, Ivy; CHODERA, John D.; DE FABRITIIS, Gianni; MARKLAND, Thomas E. OpenMM 8: Molecular Dynamics Simulation with Machine Learning Potentials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 128, n. 1, p. 109–116, 2024. . DOI: 10.1021/acs.jpccb.3c06662.
- FAUSTINO, Patrick Allan dos Santos. Tutorials and Workflows in Molecular Dynamics. [S.l.]: Zenodo, 2025. . DOI: 10.5281/zenodo.16062830. Disponível em: <https://zenodo.org/records/16062830>. Acesso em: 18 jul. 2025.
- GEOU, Chin Hong; TAN, Mei Ching; YEAP, Swee Pin; CHIN, Nyuk Ling. A Review on Extraction Techniques and Its Future Applications in Industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 123, n. 4, p. 2000302, 2021. . DOI: 10.1002/ejlt.202000302.
- GORELOV, Sergey; TITOV, Anatoly; TOLICHEVA, Olga; KONEVEGA, Andrey; SHVETSOV, Alexey. DSSP in GROMACS: Tool for Defining Secondary Structures of Proteins in Trajectories. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 64, n. 9, p. 3593–3598, 2024. . DOI: 10.1021/acs.jcim.3c01344.
- HOCKNEY, R. W. POTENTIAL CALCULATION AND SOME APPLICATIONS. **Methods Comput. Phys.** **9: 135-211(1970)**., 1970. . Disponível em: <https://www.osti.gov/biblio/4079632>. Acesso em: 23 mar. 2025.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018. . DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.

HOOVER, William G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1985. . DOI: 10.1103/PhysRevA.31.1695.

IQBAL, Mujahid; TAO, Yanfei; XIE, Shuyu; ZHU, Yufei; CHEN, Dongmei; WANG, Xu; HUANG, Lingli; PENG, Dapeng; SATTAR, Adeel; SHABBIR, Muhammad Abu Bakr; HUSSAIN, Hafiz Iftikhar; AHMED, Saeed; YUAN, Zonghui. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 18, 2016. . DOI: 10.1186/s12575-016-0048-8.

JANICKA, Patrycja; PŁOTKA-WASYLKA, Justyna; JATKOWSKA, Natalia; CHABOWSKA, Aneta; FARES, Michel Y.; ANDRUCH, Vasil; KAYKHALI, Massoud; GĘBICKI, Jacek. Trends in the new generation of green solvents in extraction processes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 37, p. 100670, 2022. . DOI: 10.1016/j.cogsc.2022.100670.

JORGENSEN, William L.; CHANDRASEKHAR, Jayaraman; MADURA, Jeffrey D.; IMPEY, Roger W.; KLEIN, Michael L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983. . DOI: 10.1063/1.445869.

JORGENSEN, William L.; GHAREMANPOUR, Mohammad M.; SAAR, Anastasia; TIRADO-RIVES, Julian. OPLS/2020 Force Field for Unsaturated Hydrocarbons, Alcohols, and Ethers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 128, n. 1, p. 250–262, 2024. . DOI: 10.1021/acs.jpcc.3c06602.

JORGENSEN, William L.; MAXWELL, David S.; TIRADO-RIVES, Julian. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1996. . DOI: 10.1021/ja9621760.

KE, Qia; GONG, Xiaoting; LIAO, Shouwei; DUAN, Chongxiong; LI, Libo. Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 365, p. 120116, 2022. . DOI: 10.1016/j.molliq.2022.120116.

KIRKWOOD, John G.; BUFF, Frank P. The Statistical Mechanical Theory of Solutions. I. **The Journal of Chemical Physics**, v. 19, n. 6, p. 774–777, 1951. . DOI: 10.1063/1.1748352.

KULA, Maria-Regina; KRONER, Karl Heinz; HUSTEDT, Helmut. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: **Reaction Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1982. p. 73–118. . DOI: 10.1007/3-540-11699-0_11.

LEMKUL, Justin A. Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 128, n. 39, p. 9418–9435, 2024. . DOI: 10.1021/acs.jpcc.4c04901.

LEVINE, Benjamin G.; STONE, John E.; KOHLMAYER, Axel. Fast analysis of molecular dynamics trajectories with graphics processing units—Radial distribution function

histogramming. **Journal of Computational Physics**, v. 230, n. 9, p. 3556–3569, 2011. . DOI: 10.1016/j.jcp.2011.01.048.

LI, De-zhang; CHEN, Zi-fei; ZHANG, Zhi-jun; LIU, Jian. Understanding Molecular Dynamics with Stochastic Processes via Real or Virtual Dynamics†. **Chinese Journal of Chemical Physics**, v. 30, n. 6, p. 735–760, 2017. . DOI: 10.1063/1674-0068/30/cjcp1711223.

MACKERELL, A. D. Jr.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L. Jr.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, 1998. . DOI: 10.1021/jp973084f.

MARK, Pekka; NILSSON, Lennart. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001. . DOI: 10.1021/jp003020w.

MARTÍNEZ, Leandro. ComplexMixtures.jl: Investigating the structure of solutions of complex-shaped molecules from a solvent-shell perspective. **Journal of Molecular Liquids**, v. 347, p. 117945, 2022. . DOI: 10.1016/j.molliq.2021.117945.

MARTÍNEZ, Leandro; SHIMIZU, Seishi. Molecular Interpretation of Preferential Interactions in Protein Solvation: A Solvent-Shell Perspective by Means of Minimum-Distance Distribution Functions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 12, p. 6358–6372, 2017. . DOI: 10.1021/acs.jctc.7b00599.

MATUBAYASI, Nobuyuki. Free-energy analysis of protein solvation with all-atom molecular dynamics simulation combined with a theory of solutions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 43, p. 45–54, 2017. . DOI: 10.1016/j.sbi.2016.10.005.

MURARI, Gabriella Frade; PENIDO, Jussara Alves; MACHADO, Poliana Aparecida Lopes; LEMOS, Leandro Rodrigues de; LEMES, Nelson Henrique Teixeira; VIRTUOSO, Luciano Sindra; RODRIGUES, Guilherme Dias; MAGESTE, Aparecida Barbosa. Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 406, p. 61–69, 2015. . DOI: 10.1016/j.fluid.2015.07.024.

NAMBA, Adriana Mieco; SILVA, Vinícius Barreto da; SILVA, Carlos Henrique Tomich de Paula da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–23, 2008. . DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v33.4.2008.p13-23.

NASCIMENTO, Paloma A. M.; PICHELI, Flávio P.; LOPES, André M.; PEREIRA, Jorge F. B.; SANTOS-EBINUMA, Valéria C. Effects of cholinium-based ionic liquids on *Aspergillus niger* lipase: Stabilizers or inhibitors. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 5, p. e2838, 2019. . DOI: 10.1002/btpr.2838.

NASCIMENTO, Paloma Andrade Martins; PEREIRA, Jorge Fernando Brandão; CARVALHO SANTOS-EBINUMA, Valéria DE. Insights into the effect of imidazolium-

based ionic liquids on chemical structure and hydrolytic activity of microbial lipase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1235–1246, 2019. . DOI: 10.1007/s00449-019-02121-w.

NEWMAN, Kenneth E. Kirkwood–Buff solution theory: derivation and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 1, p. 31–40, 1994. . DOI: 10.1039/CS9942300031.

NOSÉ, Shūichi. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, n. 2, p. 255–268, 1984. . DOI: 10.1080/00268978400101201.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981. . DOI: 10.1063/1.328693.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. **Physical Review Letters**, v. 45, n. 14, p. 1196–1199, 1980. . DOI: 10.1103/PhysRevLett.45.1196.

PATEL, Rajan; KUMARI, Meena; KHAN, Abbul Bashar. Recent Advances in the Applications of Ionic Liquids in Protein Stability and Activity: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3701–3720, 2014. . DOI: 10.1007/s12010-014-0813-6.

PHILLIPS, James C.; HARDY, David J.; MAIA, Julio D. C.; STONE, John E.; RIBEIRO, João V.; BERNARDI, Rafael C.; BUCH, Ronak; FIORIN, Giacomo; HÉNIN, Jérôme; JIANG, Wei; MCGREEVY, Ryan; MELO, Marcelo C. R.; RADAK, Brian K.; SKEEL, Robert D.; SINGHARROY, Abhishek; WANG, Yi; ROUX, Benoît; AKSIMENTIEV, Aleksei; LUTHEY-SCHULTEN, Zaida; KALÉ, Laxmikant V.; SCHULTEN, Klaus; CHIPOT, Christophe; TAJKHORSHID, Emad. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 4, p. 044130, 2020. . DOI: 10.1063/5.0014475.

PICCOLI, Vinicius; MARTÍNEZ, Leandro. Competitive Effects of Anions on Protein Solvation by Aqueous Ionic Liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 128, n. 32, p. 7792–7802, 2024. . DOI: 10.1021/acs.jpccb.4c03735.

PICCOLI, Vinicius; MARTÍNEZ, Leandro. Ionic liquid solvation of proteins in native and denatured states. **Journal of Molecular Liquids**, v. 363, p. 119953, 2022. . DOI: 10.1016/j.molliq.2022.119953.

PLOETZ, Elizabeth A.; BENTENITIS, Nikolaos; SMITH, Paul E. Kirkwood-Buff integrals for ideal solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 16, p. 164501, 2010. . DOI: 10.1063/1.3398466.

RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. . DOI: 10.1017/CBO9780511816581. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/art-of-molecular-dynamics-simulation/57D40C5ECE9B7EA17C0E77E7754F5874>. Acesso em: 1 ago. 2025.

ROBERTSON, Michael J.; TIRADO-RIVES, Julian; JORGENSEN, William L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. **Journal of**

Chemical Theory and Computation, v. 11, n. 7, p. 3499–3509, 2015. . DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00356.

SAMPAIO, Camila S.; ANGELOTTI, Joeline A. F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; HIRATA, Daniela B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, p. 434–449, 2022. . DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139.

SCHINDL, A.; HAGEN, M.L.; MUZAMMAL, S.; GUNASEKERA, H.A.D.; CROFT, A.K. Proteins in ionic liquids: Reactions, applications, and futures. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. MAY, 2019. . DOI: 10.3389/fchem.2019.00347.

SCHULER, Lukas D.; DAURA, Xavier; GUNSTEREN, Wilfred F. VAN. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1205–1218, 2001. . DOI: 10.1002/jcc.1078.

SHIMIZU, Seishi; SMITH, Derek J. Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, v. 121, n. 2, p. 1148–1154, 2004. . DOI: 10.1063/1.1759615.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - A review paper. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 1–17, 2000. . DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322000000100001>.

SPRENGER, K. G.; JAEGER, Vance W.; PFAENDTNER, Jim. The General AMBER Force Field (GAFF) Can Accurately Predict Thermodynamic and Transport Properties of Many Ionic Liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 18, p. 5882–5895, 2015. . DOI: 10.1021/acs.jpccb.5b00689.

SWOPE, William C.; ANDERSEN, Hans C.; BERENS, Peter H.; WILSON, Kent R. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. **The Journal of Chemical Physics**, v. 76, n. 1, p. 637–649, 1982. . DOI: 10.1063/1.442716.

TANYGIN, Bogdan; MELCHIONNA, Simone. Comparison of effective and stable Langevin dynamics integrators. **Computer Physics Communications**, v. 299, p. 109152, 2024. . DOI: 10.1016/j.cpc.2024.109152.

THOMPSON, Aidan P.; AKTULGA, H. Metin; BERGER, Richard; BOLINTINEANU, Dan S.; BROWN, W. Michael; CROZIER, Paul S.; VELD, Pieter J. IN 'T; KOHLMAYER, Axel; MOORE, Stan G.; NGUYEN, Trung Dac; SHAN, Ray; STEVENS, Mark J.; TRANCHIDA, Julien; TROTT, Christian; PLIMPTON, Steven J. LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales. **Computer Physics Communications**, v. 271, p. 108171, 2022. . DOI: 10.1016/j.cpc.2021.108171.

TIMASHEFF, Serge N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9721–9726, 2002. . DOI: 10.1073/pnas.122225399.

VARELA, L. M.; MÉNDEZ-MORALES, T.; CARRETE, J.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, V.; DOCAMPO-ÁLVAREZ, B.; GALLEGO, L. J.; CABEZA, O.; RUSSINA, O. Solvation of

molecular cosolvents and inorganic salts in ionic liquids: A review of molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 210, p. 178–188, 2015. . DOI: 10.1016/j.molliq.2015.06.036.

VERLET, LOUP. Computer “Experiments” on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. **Physical Review**, v. 165, n. 1, p. 201–214, 1968. . DOI: 10.1103/PhysRev.165.201.

WILLIAMSON, J. Charles. Liquid–Liquid Demonstrations: Phase Equilibria and the Lever Rule. **Journal of Chemical Education**, v. 98, n. 7, p. 2356–2363, 2021. . DOI: 10.1021/acs.jchemed.0c01517.

WU, Yujie; TEPPER, Harald L.; VOTH, Gregory A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. **The Journal of Chemical Physics**, v. 124, n. 2, p. 024503, 2006. . DOI: 10.1063/1.2136877.

XIA, Shuaibo; LIN, Jiale; SAYANJALI, Sara; SHEN, Cai; CHEONG, Ling-Zhi. Lipase-catalyzed production of biodiesel: a critical review on feedstock, enzyme carrier and process factors. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 18, n. 1, p. 291–309, 2024. . DOI: 10.1002/bbb.2561.

APÊNDICE A – DECLARAÇÕES DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Em conformidade com as práticas de ciência aberta e para garantir a reprodutibilidade deste estudo, todos os algoritmos, arquivos de parâmetros e dados relevantes encontram-se publicamente disponíveis no repositório do autor na plataforma GitHub:

<https://github.com/patrickallanfaustino>.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
Nome	PATRICK ALLAN DOS SANTOS FAUSTINO
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	FAUSTINO, P. A. S.; FAUSTINO, Patrick A. S.; FAUSTINO, Patrick Allan dos Santos.; FAUSTINO, P. A. dos S.
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/0920550077635421
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-9323-2489
GITHUB	https://github.com/patrickallanfaustino
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2012/2016	Licenciado em Química e Física. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
ATUAÇÃO PROFISSIONAL	
2023/-	Professor de Ensino Fundamental e Médio. Secretaria de Educação de São Paulo, SEDUC, Brasil.
2016/2023	Professor de Ensino Médio e Técnico. Escola Técnica, CEETEPS, Brasil.
2014/2020	Auxiliar de Docente. Faculdade de Tecnologia, CEETEPS, Brasil.
FORMAÇÃO COMPLEMENTAR	
<ul style="list-style-type: none"> • Aprendizagem de Máquinas, Instituto de Pesquisas Eldorado, Brasil. • Análise de dados com Python, Instituto de Pesquisas Eldorado, Brasil. • Pensamento Computacional com Python, Instituto de Pesquisas Eldorado, Brasil. 	

- Curso de Outono em Escrita Científica, USP, Brasil.
- Python para Data Science, Alura, Brasil.
- Workshop: IA Generativa na Pesquisa Acadêmica, Harrson Santana, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

- BERNARDO, A. S. ; SILVA, A. C. M. ; ASSIS, R. R. ; CHIANEZI, R. A. ; FAUSTINO, P. A. S. ; MADALENO, L. L. . ADIÇÃO DE IMPUREZAS VEGETAIS E QUALIDADE DA MATERIA-PRIMA: ANÁLISES NÃO CONVENCIONAIS. REVISTA CIÊNCIA & TECNOLOGIA: FATEC-JB, v. 10, p. 00, 2018.
- NENE, R. V. ; CARDOSO, C. R. P. ; TEIXEIRA, J. R. ; FAUSTINO, P. A. S. ; CARVALHO, M. R. ; MADALENO, L. L. ; FRIGIERI, M. C. . ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Myrcia bella*, *Arrabidaea brachypoda* e *Hymenaea courbaril*. REVISTA CIÊNCIA & TECNOLOGIA: FATEC-JB, v. 8, p. 00, 2016.
- AMANCIO, L. ; CARDOSO, C. R. P. ; TEIXEIRA, J. R. ; FAUSTINO, P. A. S. ; CARVALHO, M. R. ; MADALENO, L. L. ; FRIGIERI, M. C. . ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *ASTRONIUM FRAXINIFOLIUM*. REVISTA CIÊNCIA & TECNOLOGIA: FATEC-JB, v. 7, p. 82, 2015.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

- MADALENO, L. L.; PAULA, N. F.; FAUSTINO, P. A. S.. Participação em banca de Mayara Cristina Golçalves. Aumento de impurezas vegetais adicionadas à cana crua e influência na qualidade do xarope. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biocombustíveis) - Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- XI Escola de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos. 2024. (Petrópolis, RJ). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

ORIENTAÇÕES