UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL
DA LUSOFONIA AFRO - BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE – PGEA

FRANCISCO LENNON BARBOSA DA SILVA

QUÍMICA COMPUTACIONAL: ESTUDO IN SÍLICO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DA ENZIMA LACASE NA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5(RB5).

REDENÇÃO - CE
2024

FRANCISCO LENNON BARBOSA DA SILVA

QUÍMICA COMPUTACIONAL: ESTUDO IN SÍLICO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DA ENZIMA LACASE NA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5(RB5).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PGEA da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, como requisitos à aprovação no componente curricular obrigatório código MAEA0005: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Orientador: Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

REDENÇÃO - CE

2024

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Silva, Francisco Lennon Barbosa da.

S586q

Química computacional: Estudo in sílico das interações moleculares da enzima lacase na biodegradação do corante preto reativo 5rb5 / Francisco Lennon Barbosa da Silva. - Redenção, 2024.
50f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico Em Energia E Ambiente, Programa De Pós-graduação Em Energia E Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2024.

Orientador: Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Enzima lacase (Trametes versicolor). 2. Biodegradação. 3. Corante. 4. Docking molecular. I. Título

CE/UF/BSCA CDD 000

FRANCISCO LENNON BARBOSA DA SILVA

QUÍMICA COMPUTACIONAL: ESTUDO IN SÍLICO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DA ENZIMA LACASE NA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5(RB5).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PGEA da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, como requisitos à aprovação no componente curricular obrigatório código MAEA0005: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

_____
PROF. DR. ALUISIO DA FONSECA MARQUES
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

_____
PROF. DR. JORGE FERNANDO SILVA DE MENEZES
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

_____
PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS DA SILVA BARROS
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

_____
PROF. DR. JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Dedico a minha querida irmã que possa ver que os sonhos são possíveis.

AGRADECIMENTOS

Aos Deuses do velho e novo mundo, pela minha vida e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho e não só a ele, mas ao tempo em todo o mestrado.

Não poderia deixar de reservar uma parte para eles, que me ajudaram tanto a não desistir do mestrado.

Minha irmã Karine, que me apoia desde sempre e a quem dedico meus trabalhos de conclusão. Seu amor é muito importante para minha chegada aqui. Seu incentivo é de grande importância para minha evolução e buscar por mais conquistas.

Iêsa Matos, agradeço de coração todo o apoio que você me deu, das noites de altos papos, dos cafés, de me escutar e isso me fez um bem grandioso. Você é uma pessoa incrível na minha vida, e na última hora você vem e me salva.

Felipe Meneses, sua aparição na minha vida veio em uma boa hora... já estava meio que cansado com as dificuldades e você veio para somar e me impulsionar com seu amor e cuidados. Sou grato de todo coração por estar ao meu lado e nas noites em claro sem vontade de escrever, seu apoio foi de grande importância para não desistir.

Kaiany Moreira, presente da Pós-Unilab, agradeço de coração as conversas nas horas de aflição nas disciplinas, dos cafés à tarde com muita fofoca e alegria. Você é uma peça de apoio fundamental para minha conquista no mestrado.

Juliana Serpa, outro lindo presente da Pós-Unilab, te agradeço muito pelos conselhos e incentivo a buscar sempre novos caminhos para viver neste mundo. Seu testemunho de vida nos ensina muita coisa. Também agradeço os cafés da tarde com muita alegria e fofoca.

Adriana Barbosa, sou muito grato pelo apoio às aulas de laboratório, no apoio emocional. Nossos momentos no laboratório e na cantina foram únicos. O que seria de mim sem o seu apoio? Muito obrigado.

Vanessa Ketlyn, não poderia deixar de escrever teu nome aqui, sou muito grato pelo ensino médio. O seu amor, carinho, coragem, bravura, talento me deram forças para lutar no mestrado. Quando estou com você, meu ânimo se elevará e sinto que posso fazer qualquer coisa.

Mãe Verônica, minha mãe adotiva do coração, que sempre me apoiou desde o momento que nos conhecemos e que me incentiva a ser melhor. Está sempre evoluindo. Sou muito grato por seu amor e seus cuidados.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. Em especial, meu orientador, Aluísio Marques da Fonseca, que me guiou nessa jornada, chamada de dissertação.

A banca por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Química Computacional: Estudo in sílico das interações moleculares da enzima lacase na biodegradação do corante preto reativo 5(RB5).

Francisco Lennon Barbosa da Silva[1], Aluísio Marques da Fonseca

[1] Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, 62790-970, Fortaleza, Ceará – Brazil; lennonsilva1717@gmail.com (F.L.B.S);

[2] Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, 62790-970, Fortaleza, Ceará – Brazil; aluisiomf@unilab.edu.br (A.M.F)

Resumo:

O corante preto reativo 5 (RB5) é um dos corantes da família azo mais utilizados na indústria têxtil por seu valor de mercado e por seus resultados no tingimento de tecidos, mas este corante tem resistência na sua degradação que se não for bem tratada pode causar problemas ambientais em corpos hídricos afetando a fauna e a flora aquática. Sob a ótica da biorremediação, as lacases desempenham um papel fundamental ao auxiliar os microrganismos na degradação de corantes, incluindo seus metabólitos intermediários. Embora tenha sido observado que a enzima auxilia na degradação de corantes, o mecanismo exato pelo qual essa enzima opera durante esse processo ainda não está completamente elucidado. Para eliminar de forma eficaz os corantes tóxicos do sistema, é de suma importância obter uma compreensão aprofundada da função molecular da enzima e do corante envolvidos nesse processo. Como resultado, a interação da lacase com o corante RB5 foi investigada utilizando docking molecular. Com base na melhor energia de ligação foi escolhido a melhor pose de interação enzima-corante, esta pose teve energia livre de -7,7 kcal/mol e um RMSD de 1,772 Å. a pose de melhor estabilidade mostrou fortes interações por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos Thr 147, Thr 182, Leu 185 e Val 187. Além das interações com os íons de Cu^{2+}. As simulações de dinâmica molecular evidenciaram uma notável estabilidade, com valores baixos de RMSD, o que sinaliza que as conformações de acoplamento selecionadas foram apropriadas para permitir a ocorrência da reação sem obstáculos. No entanto, não podem garantir com confiabilidade o desempenho dos sistemas propostos em ambientes experimentais, uma vez que diversas outras variáveis, como a atividade das enzimas, os mecanismos de inibição do catalisador e as mudanças no equilíbrio reacional, entre outras, têm potencial para impactar substancialmente a dinâmica do processo.

Keywords: lacase; biodegradação; corante; Docking molecular

Computational Chemistry: In silicon study of the molecular interactions of the laccase enzyme in the biodegradation of the reactive black dye 5(RB5).

Francisco Lennon Barbosa da Silva[1], Aluísio Marques da Fonseca

[1] Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, 62790-970, Fortaleza, Ceará – Brazil; lennonsilva1717@gmail.com (F.L.B.S);

[2] Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, 62790-970, Fortaleza, Ceará – Brazil; aluisiomf@unilab.edu.br (A.M.F)

Abstract:

Reactive black dye 5 (RB5) is one of the most widely used azo dyes in the textile industry due to its market value and its results in dyeing fabrics, but this dye is resistant to degradation and if not treated properly can cause environmental problems in water bodies, affecting aquatic fauna and flora. From a bioremediation perspective, laccases play a fundamental role in helping microorganisms degrade dyes, including their intermediate metabolites. Although it has been observed that the enzyme assists in the degradation of dyes, the exact mechanism by which this enzyme operates during this process has not yet been fully elucidated. In order to effectively eliminate toxic dyes from the system, it is of the utmost importance to gain an in-depth understanding of the molecular function of the enzyme and dye involved in this process. As a result, the interaction of laccase with the RB5 dye was investigated using molecular docking. Based on the best binding energy, the best enzyme-dye interaction pose was chosen; this pose had a free energy of -7.7 kcal/mol and an RMSD of 1.772 Å. The pose with the best stability showed strong interactions through hydrogen bonds with residues Thr 147, Thr 182, Leu 185 and Val 187. In addition to interactions with Cu2+ ions. The molecular dynamics simulations showed remarkable stability, with low RMSD values, which indicates that the coupling conformations selected were appropriate to allow the reaction to occur without obstacles. However, they cannot reliably guarantee the performance of the proposed systems in experimental environments, since several other variables, such as enzyme activity, catalyst inhibition mechanisms and changes in reaction equilibrium, among others, have the potential to substantially impact the dynamics of the process.

Keywords: laccase; biodegradation; dye; molecular docking

Sumário

1. INTRODUÇÃO 9
2. OBJETIVOS 11
2.1 Geral 11
2.2 Específicos 11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
3.1.Corantes da Industria Têxteis e seus impactos ambientais 12
3.2. Corante Azo e o Corante Preto Reativo 5 (RB5) 13
3.3. Biotecnologia e Biorremediação 14
3.4. Lacase 15
3.5. Simulações computacionais na área da Química 17
3.6. Modelagem Molecular e Docking Molecular 18
4.METODOLOGIA 21
4.1. Preparação de ligantes e proteínas 21
4.2. Molecular Docking 22
4.3. Molecular Dynamic 23
4.4. Cálculos MM/GBSA 24
4.5. Atlas computado de topografia de superfície de proteínas (CASTp) 24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
5.1. Análise do sítio ativo (CASTp). 25
5.2. Molecular Docking 26
5.3. Molecular dynamics 29
5.4. Análise RMSD 30
5.5. Análise RMSF 31
5.6. Análise de ligações H 32
5.7. Cálculos SASA 33
5.8. Cálculos MM/GBSA 34
CONCLUSÃO 36

1. INTRODUÇÃO

A indústria têxtil, embora fundamental para a economia global, enfrenta desafios ambientais consideráveis decorrentes dos efluentes residuais gerados em seus processos. Entre os principais poluentes, destacam-se os corantes sintéticos, cuja degradação apresenta desafios significativos (Chopra et al., 2023; Ihsanullah et al., 2020; Jafari et al., 2023). Este setor, reconhecido como uma das principais fontes de contaminação de reservatórios de água, utiliza volumes substanciais de recursos hídricos em seus procedimentos, resultando na produção de efluentes ricos em corantes, metais pesados e outros contaminantes (Huang et al., 2023; J. Sharma et al., 2021).

A escala global da produção de corantes sintéticos para a indústria têxtil atinge aproximadamente 7 x 10^7 toneladas, com quase 10% desse volume sendo inadvertidamente liberado no meio ambiente após os processos de tingimento. A intensa coloração desses efluentes não apenas prejudica a atividade fotossintética das plantas aquáticas, mas também representa riscos para os ecossistemas aquáticos e a saúde humana (Chandanshive et al., 2018; Tkaczyk et al., 2020; Zosenko et al., 2022).

Um dos corantes usados pela indústria têxtil é o preto reativo 5 (RB5) que é um corante azo reativo sintético amplamente empregado nas indústrias têxteis para a coloração de tecidos (Alaguprathana et al., 2022). A utilização prolongada do RB5 pode desencadear reações alérgicas no sistema respiratório e aumentar o risco de câncer em seres humanos (Al-Tohamy et al., 2020; Droguett et al., 2020). Por conseguinte, é fundamental realizar a remoção eficaz e economicamente viável do RB5 das águas residuais antes de serem liberadas no ambiente natural. O rb5 faz parte do grupo de corantes azo, que são caraterizados pela presença de uma ou duas ligações R^2-N=N-R^2 (Barciela et al., 2023). Essas ligações podem ser reduzidas enzimaticamente, produzindo aminas aromáticas, elas também podem ter propriedades anfotéricas devido à presença de grupos funcionais carboxila, hidroxila, amino ou sulfonila(Jiale Liu et al., 2023). É estimado que os corantes azo compreendiam cerca de 80% da produção anual total de corantes comerciais em escala global(Fuentes et al., 2019).

Com base na literatura uma enzima que vem se mostrando um potencial na degradação de corantes e em questões ambientais é a enzima lacase (*Trametes versicolor)* de origem fúngica (Jeyabalan et al., 2023). As enzimas são proteínas capazes de regular e controlar a taxa de diversas reações nos organismos vivos (Mohajershojaei et al., 2014). Elas atuam como

catalisadores em reações químicas específicas, interagindo com substratos específicos em locais precisos desses substratos (Germano de Sousa et al., 2022).

A enzima lacase pertence a família das oxidases que pode ser amplamente encontrada em microrganismos e plantas (Zhou et al., 2021). A capacidade catalítica dessa enzima é assegurada pela presença de quatro átomos de cobre integrados em sua estrutura. Estes átomos de cobre consistem em um cobre paramagnético de cor azul, conhecido como Tipo I (T1), um cobre paramagnético não azul do Tipo II (T2) e dois pares de átomos de cobre diamagnéticos acoplados por spin do Tipo III (T3)(Gutiérrez-Antón et al., 2023). A figura 2 representa a lacase. Assim, a configuração geral da lacase consiste em uma estrutura de três domínios com extensas alças de cupredoxina. O cobre do Tipo I (T1) desempenha o papel de local de oxidação do substrato devido ao seu elevado potencial redox com uma orientação trigonal. Por sua vez, o cobre do Tipo II (T2) e do Tipo III (T3) facilita a liberação de água através da redução do oxigênio (Jiashu Liu et al., 2023; Pardo & Camarero, 2015; Rodrigues et al., 2023).

Neste estudo, conduzimos uma análise in silico da enzima lacase, utilizando métodos computacionais avançados para avaliar suas interações com o corante RB5. Nosso objetivo é identificar as regiões críticas do corante que desempenham um papel significativo nos sítios de ligação da enzima lacase, estabelecendo bases para estratégias eficazes de remoção desses corantes dos efluentes têxteis. Essa abordagem visa contribuir para práticas mais sustentáveis na indústria têxtil, alinhando ganhos financeiros com responsabilidade ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial da enzima lacase de *Trametes versicolor* no processo de biodegradação de corantes da indústria têxtil, por meio de estudos de simulação computacionais.

2.2 Específicos

- Realizar o Levantamento Bibliográfico, coletando informações relevantes por meio de revisão bibliográfica.
- Organizar a Estrutura da Metodologia da Pesquisa, Definindo a metodologia que será utilizada no estudo.
- Calcular as Interações Energéticas Individuais e Totais entre a Lacase (*Trametes versicolor*) e o Corante
- Avaliar as interações entre a enzima lacase e o corante.
- Realizar cálculos para determinar as energias envolvidas nas ligações entre os dois.
- Identificar as Regiões dos Corantes Mais Importantes para seu Acoplamento nos Sítios de Ligação da Enzima Lacase:
- Localizar as áreas-chave do corante que se ligam à enzima.
- Analisar os sítios de ligação e identificar os resíduos específicos envolvidos na interação.
- Determinar o Raio de Convergência de Estabilização dos Complexos Ligante-Receptor:
- Estabelecer a distância crítica para a estabilidade dos complexos formados.
- Calcular a distância entre o ligante (corante) e o receptor (enzima) que resulta em uma interação estável.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescente uso de corantes pelas indústrias têxtil e a falta de tratamentos dos efluentes provenientes dos processos industriais, a dificuldade de degradação de alguns corantes e a questão que a água é recurso necessário para manutenção e desenvolvimento da vida, se faz necessário uma fundamentação teórica no que desrespeito ao tema do trabalho, como corantes da indústria têxteis e seus impactos ambientais, corantes industriais, corante preto reativo 5 (RB5), biotecnologia e biorremediação, lacase e modelagem molecular e Docking molecular.

3.1.Corantes da Industria Têxteis e seus impactos ambientais

Os corantes são compostos químicos que podem se ligar a superfícies de materiais, a exemplo dos tecidos, para obtenção de cor. Os corantes são formados por moléculas orgânicas complexas, apresentando elevada resistência a alguns agentes, tais como a ação dos detergentes e sabões (Husain, 2006). Os corantes são utilizados em diversos segmentos da indústria, como por exemplo, o têxtil, produção de couro, processos alimentícios, plásticos, cosméticos, indústria de látex e tinturaria (Yagub et al., 2014).

Um dos setores mais poluidores do mundo é o ramo das indústrias têxteis, principalmente pelo fato de produzirem de 1000 a 2700 m3 de água residual por dia, sendo que aproximadamente 30% dos corantes orgânicos e sintéticos utilizados são descartados no efluentes (Araújo-Chaves et al., 2019; Borba et al., 2019; Holanda et al., 2015).

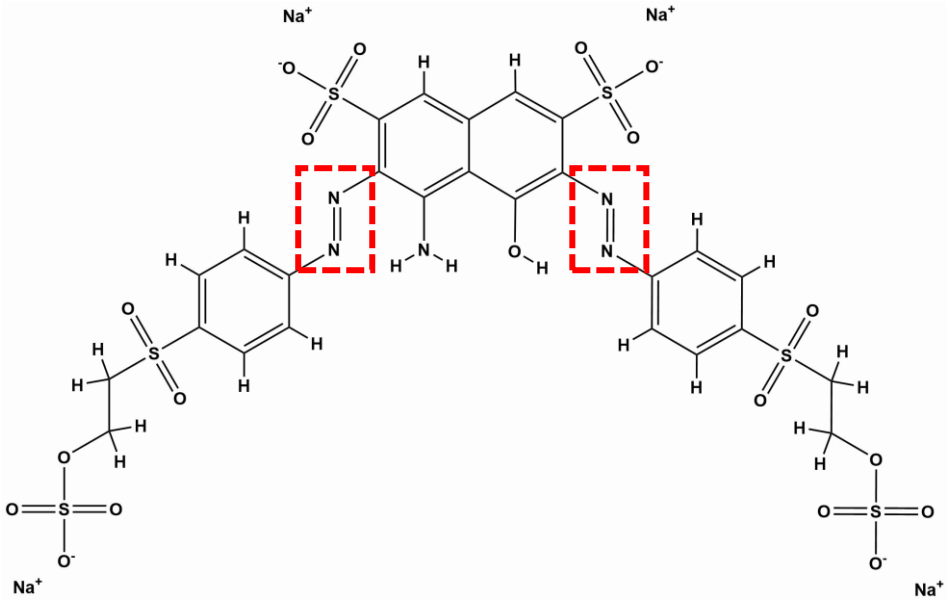
Esses corantes em ambientes aquáticos, pode atrapalhar nos processos de fotossíntese dos seres vivos que vivem neste ambiente. Além disso algumas classes de corantes, assim como seus subprodutos, têm características carcinogênicos ou mutagênicos. Outras substâncias do setor têxtil podem conter metais pesados (Catanho et al., 2006). Estes influentes têm uma caracterização geralmente por possuírem um pH básico e uma elevada carga orgânica, além de sua toxidade que representa risco ambiental pelo fato que descartados incorretamente prejudicam o solo ou a água (Borba et al., 2019).

A preocupação crescente com os resíduos gerados por esse setor é notória pelo fato que são ricos em corantes, estes resíduos afetam a atividade ecológica nos sistemas hídricos, por absorverem e restringirem a penetração da luz solar, reduzindo o nível de oxigênio presente no meio e são bioacumulativos de efeito toxico (Holanda et al., 2015).

3.2. Corante Azo e o Corante Preto Reativo 5 (RB5)

Os corantes são pequenas moléculas, que na sua formação contêm dois importantes componentes que são o cromóforo, que tem a característica de colorir e o grupo funcional que é responsável pela fixação do corante na fibra. Dentro do mundo dos corantes existe os corantes azos que correspondem a mais de 65% dos corantes usados em cores sintéticas. A fabricação desses corantes sintéticos se dar pelo processo simples de diazotização e acoplamento podendo ser preparados tonalidades de cores desejáveis e com sua solubilidade melhorada (Monisha et al., 2023). Uma outra característica na sua formação química é na sua estrutura ter grupos -N=N- como pode ser visto na figura 1 , que são categorizados com base em sua composição elementar e uso, são o foco principal da química de cores (Khanum et al., 2023).

Figura 1 - Estrutura do corante Preto reativo 5 (RB5).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Uma caraterística forte nos corantes sintéticos é a resistência a degradação por métodos convencionais sendo eles sedimentação, absorção, oxidação com hipoclorito de sódio, filtração, coagulação, floculação e biodegradação (Cortazar-Martínez et al., 2012).

Dentro da lista de corantes da família azo existe o corante preto reativo 5 (RB5) é um dos corantes azoicos mais comumente usados para tingir algodão, lã, náilon e outras fibras celulósicas (El Bouraie & El Din, 2016). Uma das suas características importantes para seu uso na indústria têxtil é sua alta estabilidade química, resistência e entregar de coloração em seu uso de tingimento, sendo um dos corantes azo mais utilizados da indústria têxtil (Malik & Patel, 2023).

O RB5 é um dos corantes que tem menos afinidade de degradação por luz em comparação com os outros corantes devido a sua estrutura química complexa (Pasini et al., 2021). Sua estrutura pode ser observada na Figura 1 (Mahmoud et al., 2021).

3.3. Biotecnologia e Biorremediação

Com o desenvolvimento tecnológico nasce a biotecnologia que é definida como uso de sistemas biológicos, constituído por partes do organismo vivo ou por organismo inteiro, para obtenção de conhecimento ou lidar com problemas da sociedade (Ripoll et al., 2023). Consiste também em uma área do conhecimento que pode integralizar diversos temas do conhecimento como a microbiologia, a engenharia química, a zootecnia, a genética, a bioquímica, a engenharia genética, bioinformática, dentre outras áreas (de Oliveira, 2018). Dentro da biotecnologia existe dois fortes eixos que é a criação de produtos ou a resolução de problemas através da implementação de algumas tecnologias que podem ser aplicadas em entidades biológicas (AL-Eitan & Alnemri, 2022).

A prática da biotecnologia é algo que vem desde a origem das civilizações, quando o homem usou de conhecimentos biológicos para melhoria do seu dia a dia como uso do processo fermentativo na produção de bebidas alcoólicas como vinho, produção de iogurtes, da seleção de melhores espécies para produzir melhor gado e até suas plantações (Gupta et al., 2017)

Ao lado da biotecnologia existe uma outra área que é a biorremediação, é um dos métodos com grande eficiência usado para degradação de uma ampla gama de contaminantes antropogênicos que usa de microrganismo e de suas atividades catalíticas (Dash & Osborne, 2023). Uma caraterística forte é desta abordagem é o baixo custo, o menor impacto ambiental facilidade de aplicação, especificidade e aplicações flexíveis para uma variedade de substratos possíveis (Pinto et al., 2020).

A biorremediação vem sendo usada também no tratamento de águas residuais, um foco bastante é biodegradação de corantes usados no ramo têxtil. Por ser uma área que utiliza de

seres vivo ou parte deles existe uma variedade de enzimas bacterianas incluindo redutases, lacase as oxigenasses têm potencial de degradação via quebra redutiva de ligações azo por degradação anaeróbica e, finalmente, transformação biológica de aminas aromáticas em condições aeróbicas (Mustafa et al., 2021). outras enzimas usadas no auxílio do processo de degradação são celulase, amilase, protease, fosfatases e peroxidase (Jardine et al., 2018).

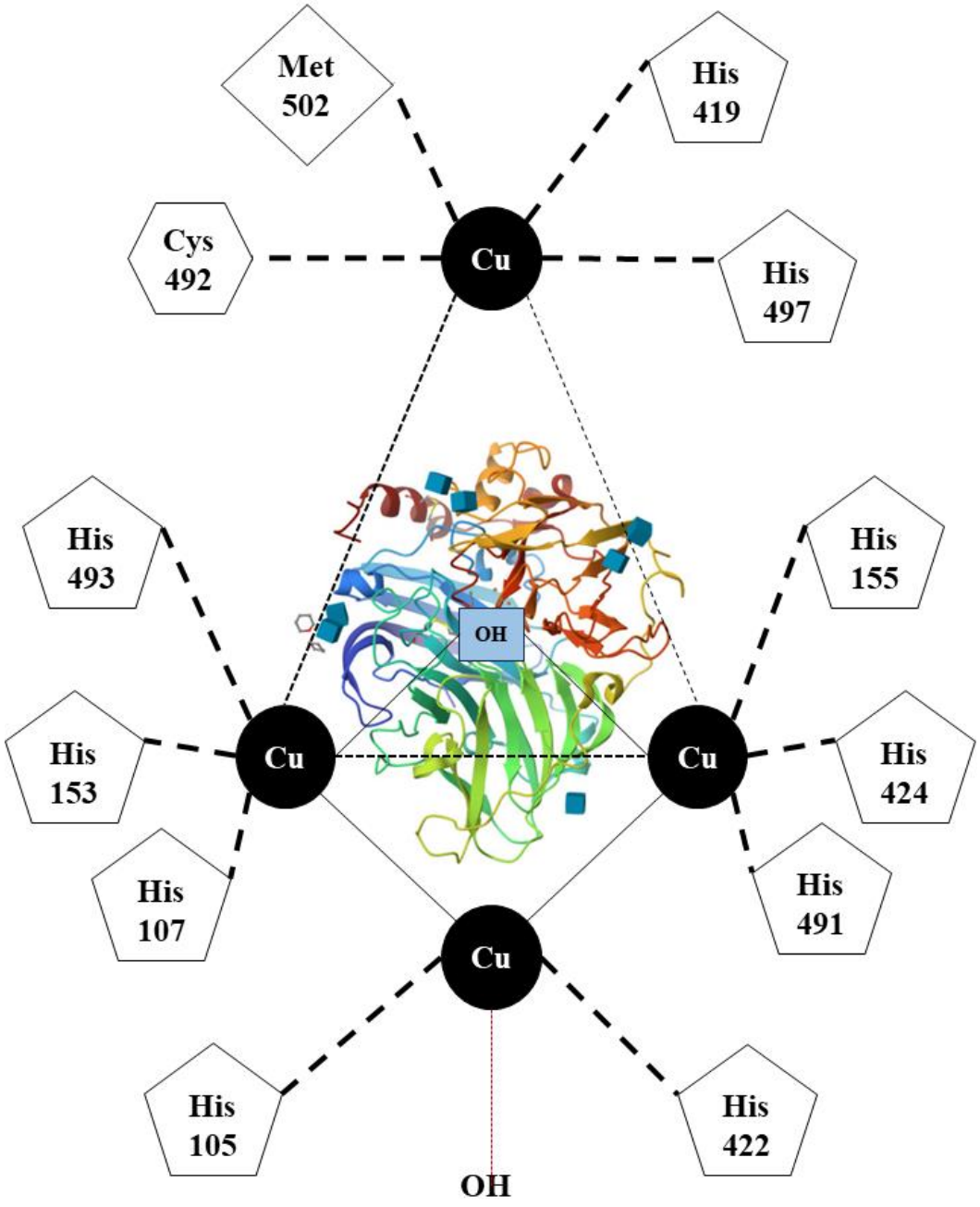
3.4. Lacase

A enzima lacase (benzenodiol oxigênio redutases, EC 1.10.3.2), fig.2 (Bertrand et al., 2002), são enzimas que fazem parte da classe oxidorredutases (Figura 2). Elas são glicoproteínas monoméricas contendo cerca de 500 aminoácidos e com teor de 25% de carboidratos. Em seu sítio ativo é formado por quatro átomos de cobre caracterizadas por uma ampla especificidade de substrato. Sendo três parte de um grupo redox: tipo-1 (T1), tipo-2 (T2), tipo-3 (T3) como pode ser visto na figura 3. O tipo-1 é o cobre que tem o maior potencial redox (Eº) e é o sítio de oxidação do substrato. O tipo 2 e 3 formam um aglomerado trinuclear, local em que oxigênio molecular é reduzido e a água é liberada (Alvarado-Ramírez et al., 2021; Polak & Jarosz-Wilkolazka, 2012; K. K. Sharma & Kuhad, 2008).

Figura 2 - Estrutura da cadeia A da enzima Lacase (EC 1.10.3.2).

Fonte: Ge et al (2010).

Figura 3 - Representação da estrutura lacase



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Essas enzimas são consideradas versáteis e capazes de oxidar um grande de moléculas fenólicas e não fenólicas devido a característica de baixa especificidade de substrato. São também amplamente encontradas na natureza; podendo ser obtidos de plantas, fungos,

bactérias, insetos e liquens, cada lacase proveniente de cada espécie exibe características e sequencias catalíticas única (Arregui et al., 2019).

Uma característica importante que distingue as lacases de outras enzimas lignolíticas é que elas não necessitam da adição de cofatores para sua atividade. O fato de essas enzimas serem geralmente secretadas naturalmente e serem altamente estáveis fora da célula lhes confere uma vantagem importante em aplicações ambientais (Toker et al., 2021).

As enzimas lacases tem desempenhado um papel de importância em várias aplicações biotecnológicas, incluindo a degradação de corantes e a biorremediação de alguns resíduos químicos produzidos pelas indústrias e os desenvolvimentos de biossensores (Mansouri & Benslama, 2022).

3.5. Simulações computacionais na área da Química

As simulações computacionais desempenham um papel fundamental no avanço da Química, oferecendo uma abordagem complementar e, em muitos casos, indispensável aos métodos experimentais tradicionais (Di Felice et al., 2023). Desde os primeiros dias da computação científica, essas simulações têm se mostrado valiosas ferramentas para investigar e compreender uma ampla gama de fenômenos químicos, fornecendo insights detalhados em escalas atômicas e moleculares que frequentemente estão além do alcance das técnicas experimentais diretas. Nesta lauda, exploraremos algumas das principais contribuições das simulações computacionais para a Química, destacando seu impacto em diversas áreas, como o design de novos materiais, a compreensão de reações químicas e a predição de propriedades moleculares (Tanabe & Tsumoto, 2023).

Uma das áreas mais promissoras impulsionadas por simulações computacionais é o design de novos materiais. Através de técnicas como dinâmica molecular e simulações de Monte Carlo, os cientistas podem investigar as propriedades estruturais e termodinâmicas de materiais em escala atômica, permitindo a identificação de estruturas com propriedades desejadas, como resistência, condutividade elétrica ou capacidade de armazenamento de energia (Lacerda, 2015). Essas simulações também são fundamentais para entender os processos de auto ensaio e formação de estruturas cristalinas, auxiliando no desenvolvimento de materiais mais eficientes para uma variedade de aplicações, desde dispositivos eletrônicos até materiais para armazenamento de energia (Florio et al., 2004).

As simulações computacionais desempenham um papel crucial na compreensão de reações químicas. Ao simular o comportamento de sistemas moleculares em diferentes condições, os cientistas podem elucidar os mecanismos de reação, identificar estados intermediários e prever cinéticas de reações. Isso não apenas fornece insights fundamentais sobre como as reações ocorrem a nível molecular, mas também pode orientar o desenvolvimento de novos catalisadores e estratégias para otimizar processos químicos industriais, visando eficiência energética e sustentabilidade (Arai, 1995).

Além disso, as simulações computacionais são amplamente utilizadas na predição de propriedades moleculares, como energia de ligação, polaridade e espectros de absorção(De Sousa et al., 2021). Métodos de cálculo ab initio, como a teoria do funcional de densidade (DFT), permitem calcular com precisão propriedades eletrônicas e estruturais de moléculas e materiais, fornecendo informações valiosas para interpretar dados experimentais e orientar o design de novos compostos com propriedades específicas (Nascimento de Castro et al., 2022).

3.6. Modelagem Molecular e Docking Molecular

A modelagem molecular e simulação computacional é uma área que desenvolve soluções com base no estudo de estruturas moleculares, seja na previsão de interações, otimização e controle de reações ou no projeto de novos produtos (Silva et al., 2021). Usando de métodos teóricos e computacionais para modelar e investigar propriedades e a dinâmica das moléculas no seu nível microscópico (Patel & Kukol, 2021). Sendo uma ferramenta muito utilizada nos ramos da engenharia, química, biologia, física e farmácia.

Dentro da modelagem molecular existem vários métodos que podem ser empregados para o estudo das interações atômicas e moleculares que são mecânica molecular, cálculos Ab-initio, método semi-empírico, teoria do funcional da densidade DFT e Docking Molecular (Carvalho et al., 2003).

Os métodos empregados no estudo da simulação de substâncias química podem ser divididos em três classes que são método clássico (empírico), método quântico e híbrido (de Oliveira, 2018). No quadro 1 a seguir mostra síntese de métodos.

Quadro 1 - Síntese dos conceitos dos métodos empregados na modelagem molecular

Método Empírico

Definição: assim chamado para diferenciar-se dos métodos quânticos que, ao contrário deste, são baseados em propriedades atômicas fundamentais.	
Subclasses	
Mecânica Molecular	esta estratégia interpreta a estrutura da molécula unicamente em termos da mecânica clássica de newton, ou seja, baseia-se no modelo de "bolas e molas" como representação.
Método Quântico	empregam a funções de onda dados elétrons, em diferentes níveis de aproximação.
Método semiempírico	
Definição: baseados em soluções aproximadas da equação de Schroedinger, empregam parâmetros experimentais como forma de substituir o cálculo de determinadas integrais que oneram o cálculo.	
Subclasses	
Ab initio	cálculo das funções de onda é baseado na resolução da equação de Schroedinger no seu nível mais acurado, não empregando parâmetros experimentais como forma de simplificação dos cálculos. Em lugar disso, a única aproximação permitida é o cálculo da função de onda do núcleo feito separadamente da função de onda dos elétrons.
Teoria do funcional de densidade DFT	baseando na descrição da estrutura de moléculas e átomos a partir de sua densidade eletrônica. E mais rápido que ab initio, embora possa ser considerado um desdobramento deste, mas com nível de acuracidade comparável.
Métodos híbridos	
Definição: O conjunto molecular é tratado com base tanto nos pressupostos da mecânica molecular quanto da mecânica quântica.	

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

No estudo computacional pode se utilizar a dinâmica molecular MD que simula o movimento microscópico de moléculas e átomos para estudar a base da estrutura e a relação estrutura-função. No MD o programa de simulação especifica os parâmetros de simulação com base da estrutura já conhecida, e então é realizado a trajetória da molécula, o processo de mudança conformacional, e a informações cinéticas do processo. Na pratica os átomos são representados como bolinhas pequenas e as ligações como molas conectadas as bolas. A trajetória é fornecida com base nos cálculos de movimento de newton e as interações pela lei de Hooke. MD permite uma análise mais aprofundada de rearranjos conformacionais às

mudanças no ambiente circundante, o que pode proporcionar informações complementares aos experimentos (Jiang et al., 2022).

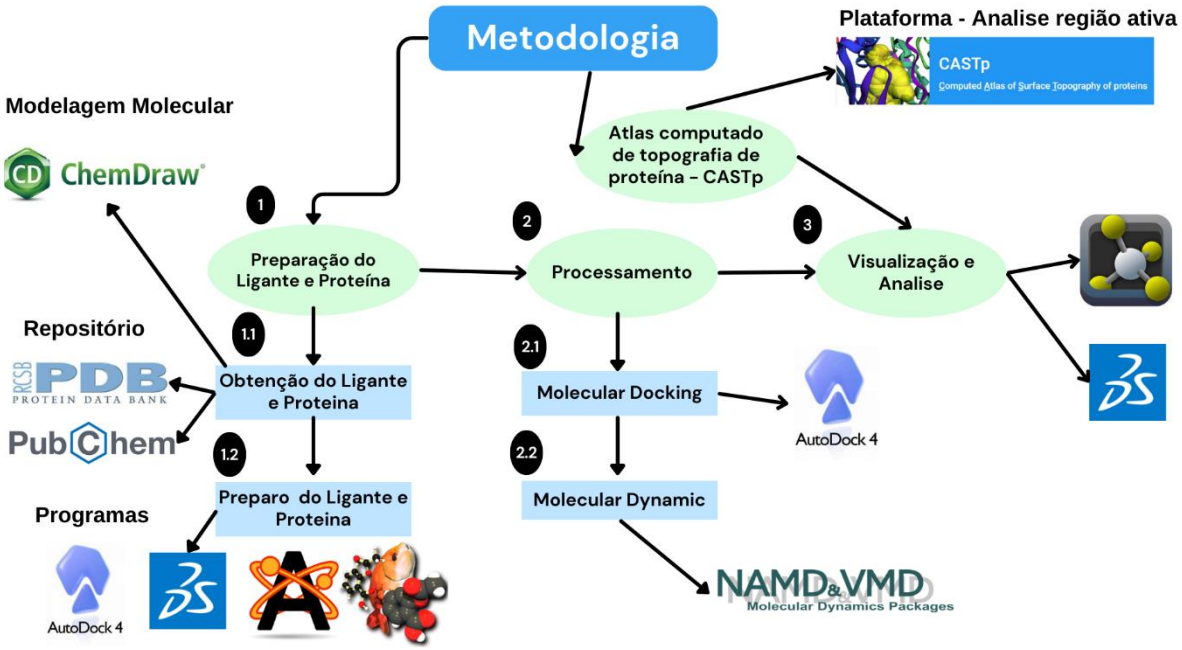
O Docking Molecular DM (tradução em inglês: ancoramento) é um método que prevê a ligação de melhor interação de uma molécula com o sítio ativo de um alvo macromolecular. Podendo também indica a força da conexão entre o ligante e a proteína fornecendo uma classificação com base nas melhores interações (Porto & Porto, 2022).

Para a ancoragem de proteína-ligante são definidos por três funções centrais: (1) A representação computacional de proteína e ligante. (2) O algoritmo de encaixe, que é usado para resolver o problema de otimização de encaixar o ligante no bolso de ligação da proteína e gerar possíveis poses de ligação. (3) A função de pontuação (SF) visa quantificar a qualidade das referidas poses de ligação calculadas (Temml & Kutil, 2021).

4.METODOLOGIA

O presente estudo foi uma abordagem qualitativa-quantitativa, usando como temática o estudo *in silico* da enzima lacase na degradação do corante preto reativo 5 (RB5) usado na indústria têxtil, sendo usado da modelagem molecular e simulação da iteração proteína e ligante em programas de computadores e interpretadas com base na literatura (Cavalcante et al., 2022; Marques da Fonseca et al., 2021, 2023).

Figura 4 – Fluxo Metodológico



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

4.1. Preparação de ligantes e proteínas

A molécula do corante preto reativo 5 (RB5) foi criada pelo software Chem3D (Ahmadi et al., 2005), Figura 1, nas configurações de auto otimização, foi aplicado o campo de força MMFF94S. (Wahl et al., 2019), a fim de gerar conformações bioativas por meio da minimização de conformadores gerados aleatoriamente, com o algoritmo Steepest Descente (Petrova & Solov'ev, 1997), Step per Update 4 (Sutton et al., 2016), pelo software AVOGADRO (Hanwell et al., 2012). O arquivo com ligante foi convertido para o formato correspondente (.pdbqt) com adição de ionização e estados tautomáticos em pH 7,4 usando o software OpenBabel ver. 3.0.0

(O'Boyle et al., 2011). Esta estrutura pode ser encontrada também pelo código 135442967, no repositório PubChem (Tan et al., 2020).

O receptor em estudo foi a estrutura da enzima lacase (E.C 1.10.3.2), Código 1KYA foi obtida no repositório internacional da Protein Data Bank (Bertrand et al., 2002; Carlson et al., 2014), cuja estrutura cristalina foi obtida por difração de raios X complexa. As informações específicas das enzimas foram mostradas na Tabela 1. Para possibilitar o acoplamento molecular, os resíduos interferentes, as moléculas de água e o inibidor sintético foram removidos. Hidrogênios polares foram adicionados aos ligantes, separadamente, e à proteína, e foram adicionadas as cargas parciais de Kollman (Araújo & Azevedo, 2020; Silva Neto, 2017). Essa técnica tem como objetivo pesquisar dentro de bancos de dados de possíveis ligantes virtuais para um determinado alvo de proteína. O software usado foi o Autodock tools (Morris et al., 2009). Os estados de protonação dos resíduos foram considerados levando-se em conta o respectivo pH de trabalho (pH 5,0 para lacase fúngica)(Yin et al., 2019). As cargas âmbar foram usadas para os átomos de proteína e as cargas RESP foram calculadas para o corante (Cornell et al., 1993).

Tabela 1. As informações de quatro lacases representativos.

PDB ID		1KYA
Type Source		*T. versicolor*
Resolution		1.4 Å
Number of amino acids		499
Acidic amino acid residues		95
Basic amino acid residues		36
Difference value		59
pl		4.51
The amino acid residues in the binding pocket	Alkaline	His 395, His 458
	Acidic	Asp 206
	Polar-non charged	Asn 208, Thr 335
T1 copper sites	Length	10.5 Å
	Width	9.1 Å
	Area	95.55 $Å^2$

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

4.2. Molecular Docking

O acoplamento molecular foi realizado pelo AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009) empregando multithreading de 3 vias, foi realizada a genética Lamarkiana. Para o acoplamento da principal Lacase (1KYA), foram usados os seguintes parâmetros: número de pontos de grade

em xyz (34 34 34), espaçamento (0,642), centro da grade em xyz (-5,378 -0,914 39,320). Outros parâmetros foram definidos como padrão. Os ligantes de entrada com hidrogênios polares foram usados no formato .pdbqt. Foram realizadas entre dez e quarenta execuções de acoplamento molecular, e o número de simulações que foram repetidas na mesma região do receptor biológico. Assim, para validar o desempenho da simulação e quantificar a qualidade dos acoplamentos, foi adotado o critério de pontuação RMSD (root mean square deviation), que sugere que um acoplamento bem-sucedido exibe um valor RMSD rmsd ≤ 2,0 Å (Sutherland et al., 2007), e, em paralelo, o uso da rede neural NNScore com a medição em concentração molar da melhor pose (Durrant & McCammon, 2010, 2011; Sutherland et al., 2007), e o critério de menor energia de ligação sugere que, no complexo previsto pelo acoplamento molecular, presume-se que a menor energia de ligação esteja mais próxima do estado do sítio ativo da enzima, onde pode ser associada a uma constante de afinidade (Fu et al., 2018; Havranek & Islam, 2021).

Os dados de simulação com as principais interações receptor-ligante foram visualizados pelo software Discovery Studio (Biovia, 2016) e PyMOL (DeLano, 2002).

4.3. Molecular Dynamic

As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas com o programa NAMD (Jia et al., 2023). As melhores conformações obtidas no acoplamento molecular foram resolvidas em 15.980 moléculas de água do tipo retangular, com distância entre bordas de 6,0 Å, no modelo TIP3P (Kato et al., 2021), no campo de força CHARMM36 e adição de 70 íons Na+ e 45 íons Cl- para neutralizar a carga total do sistema (0,15 M). Por fim, ele foi submetido à minimização de energia pelo método Steepest Descent. Em seguida, o sistema foi apresentado aos balanços NVT e NPT nas condições descritas por Langevin (Farago, 2019). As simulações de produção do sistema foram realizadas com um tempo de 100 ns. A qualidade das estruturas obtidas em MDs foi avaliada usando os seguintes parâmetros com o NAMD:

- Energia potencial (kcal/mol)(Diez et al., 2014);
- Energia de interação proteína-ligante (kcal/mol);
- O desvio quadrático médio das posições atômicas de proteínas, ligantes e distâncias entre eles (RMSD, Å) e o desvio quadrático médio das posições atômicas de proteínas, ligantes e distâncias entre eles (RMSD, Å);

- As ligações de hidrogênio foram avaliadas com o Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996).
- A flutuação quadrática média das distâncias mínimas entre as proteínas e os ligantes foi observada na MD (RMSF, Å) (Arshia et al., 2021). Os gráficos foram gerados usando o programa Qtrace (Jia et al., 2023; Lima et al., 2012).

4.4. Cálculos MM/GBSA

Com base no arquivo de registro MD do software NAMD (Jia et al., 2023), o MM/GBSA foi calculado por MolAICal (Bai et al., 2021) e foi estimado pelas equações 1-3.

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad \text{Eq. 1}$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{internal} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde ΔE_{MM}, ΔG_{sol}, e $T\Delta S$ representam a energia MM da fase gasosa, a energia livre de solvatação (soma da contribuição polar ΔG_{GB} e contribuição não polar ΔG_{SA}) e a entropia conformacional, respectivamente (Gohlke et al., 2003; Gohlke & Case, 2004). ΔE_{MM} contém a energia de Van Der Waals ΔE_{vdw}, eletrostático ΔE_{ele} e $\Delta E_{internal}$ de vínculo, ângulo e energias diédricas. Se não houver alterações estruturais induzidas por ligação no processo de simulações MD, o cálculo da entropia poderá ser omitido (DasGupta et al., 2017).

4.5. Atlas computado de topografia de superfície de proteínas (CASTp)

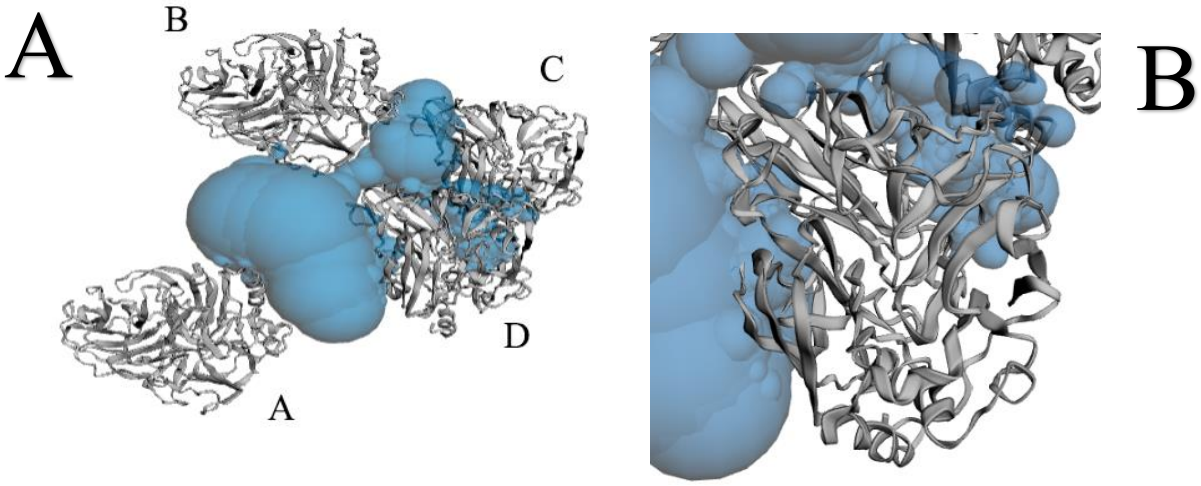
As propriedades topológicas e geométricas da lacase *Trametes versicolor* (1KYA) foram determinadas por meio do servidor online CASTp (Tian et al., 2018)(https://sts.bioe.uic.edu/castp/ acessado em 20 de setembro de 2023). Esta ferramenta localizou, delineou e mensurou as bolsas e cavidades presentes nas estruturas proteicas. No contexto da geometria computacional, o CASTp é fundamentado no princípio da forma alfa, utilizando o algoritmo de bolsos (Aldossari et al., 2023). Através da utilização dos modelos de superfície molecular (conhecido como superfície de Connolly) e o modelo de superfície acessível ao solvente (conhecido como superfície de Richard), este servidor online permite calcular a área e o volume de cada bolsão e vazio (Zaheer et al., 2023).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

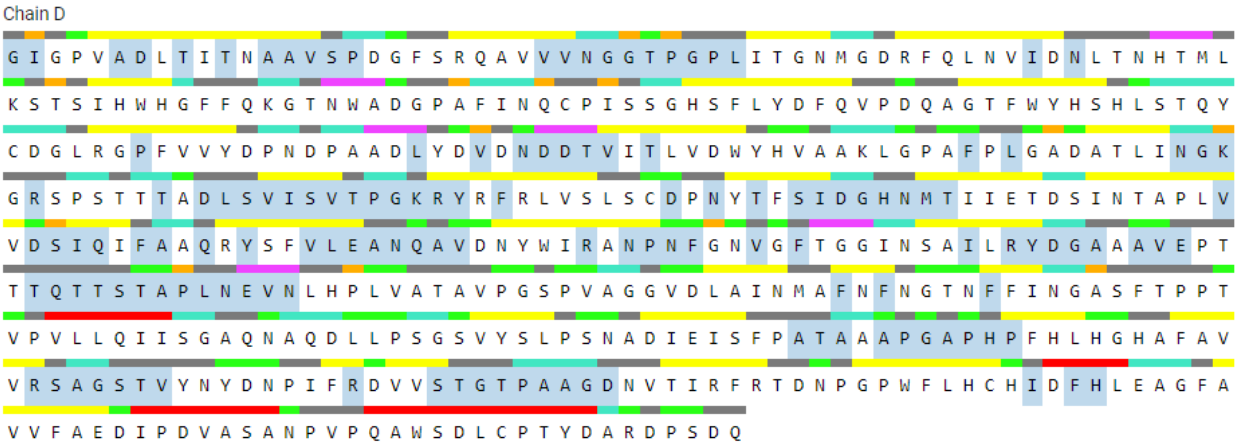
5.1. Análise do sítio ativo (CASTp).

Foi empregado o cálculo do Atlas Computadorizado de Topografia de Superfície de Proteínas (CASTp) para a análise dos bolsões acessíveis ao substrato, bem como a confirmação dos locais ativos das lacases representativas. A parte 5C da figura 5 exibe os resíduos de aminoácidos ativos da proteína. Este achado revelou a localização da região ativa na proteína, corroborando a ligação do ligante ao sítio ativo, como ilustrado na figura 7 . De acordo com os resultados obtidos pelo CASTp, foram identificadas várias áreas de bolsos na enzima lacase, como apresentado na parte 5A da figura.

Figura 5 - local de ligação ativa na proteína 1kya (4 regiões) região azul (A), local D de ligação ativa na proteína região azul (B) e resíduos (destacados em cinza) envolvidos na ligação ativa (C).



C



Fonte: Elaborado pelo Autor(2024).

5.2. Molecular Docking

Com base na literatura (Cavalcante et al., 2022; Fonseca et al., 2020; N. Liu et al., 2012) e com algumas adaptações (Fonseca et al., 2020) Esse estudo de simulação de acoplamento molecular foi usado para elucidar a reação de interação entre a RB5 e a enzima lacase.

Por meio da molécula de acoplamento pelo Autodock vina, foi possível listar a afinidade e as energias RMSD dos ligantes, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2 - Resultado de acoplamento molecular com suas pontuações de acoplamento.

Compounds	Energy affinity (kcal/mol)	RMSD	Lipase
RB5	-7.7	1.772 Å	Lacase

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

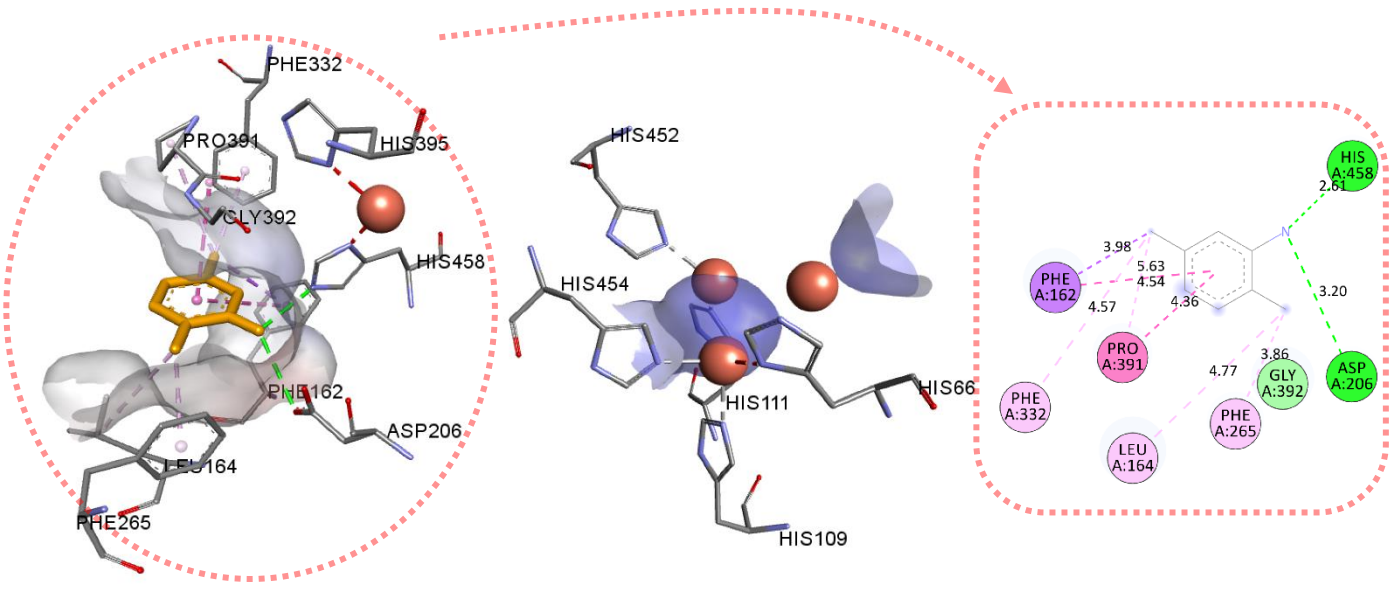
Embora todos estejam alocados na mesma região do local ativo da proteína, que geralmente é constituído pela tríade catalítica (Ser-His-Asp), No caso da lacase, a simulação sugere uma observação inicial de suas características redox, além disso, às vezes o impedimento estérico do substrato pode afetar amplamente a proficiência nas reações, no caso da lacase, que demonstrou um potencial redox (0,79 e 0,46 V)(Tadesse et al., 2008). A distância entre dois resíduos de fenilalanina (Phe332 e 265) que marcam a entrada no local ativo pode representar o limite estrutural para a biorremediação de substratos com potencial redox compatível.

A superfície do sítio ativo de *T. versicolor* consiste em Phe 162, Phe 265, Phe 332, Phe 337, Gly 334, Gly 392, Leu 164, Pro 391, Asp 206, Asn 264, His 458 e His 395, que são principalmente resíduos hidrofóbicos e aromáticos (Delavari, 2016).

Por ser uma lacase fúngica com alto valor potencial redox esta enzima foi obtida na forma cristalizada com o ligante 2,5-xilidina (XYD) (Bertrand et al., 2002). Seu modo de ligação com a xillidina é mostrado na figura 6. Portanto, o XYD apresentou ligações no sítio ativo por meio de ligação de hidrogênio nos resíduos Asp 206 e Hist 458. A distância entre -NH de His 458 e -N na XYD é de 2.61 Å. O hidrogênio de His é apontado para -N de xillidina que torna possível a transferência eletrônica. Os resultados do acoplamento mostraram que os compostos contêm -OH e -NOH em sua estrutura ligada no bolso de ligação de lacase. Estes compostos ligados perto de His 458 em uma orientação que o átomo de oxigênio do grupo hidroxila se torna próximo a -NH da Histidina. Além disso, o anel destes compostos tem interações π-π com Phe162 e Pro 391. Outra observação é que as lacases catalisam a oxidação de substratos com concomitante redução de oxigênio à água. Recentemente, foi verificado que os resíduos polares estão localizados em túneis que levam aos íons Cu^{2+} e Cu^{3+} controlam a entrada de oxigênio (His 111) e o transporte de prótons (His 452) de lacase de dois domínios (2D).

Em alguns casos -OH grupo dos compostos indicam interação com Thr e eles estão na orientação entre estes dois resíduos, tais como, o corante RB5.

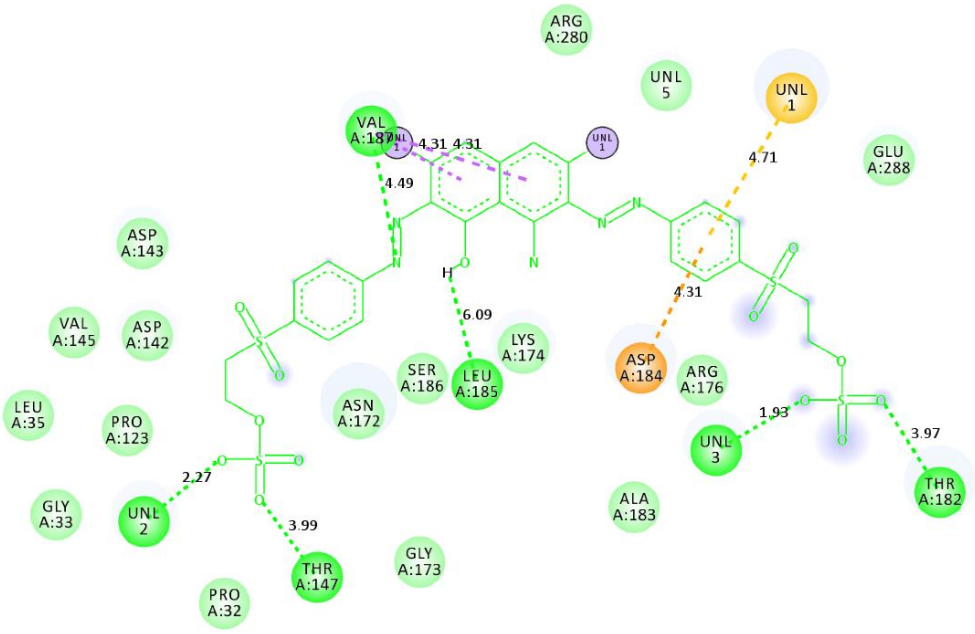
Figura 6 - Posição da xilidina na bolsa de ligação do TvL. Ela se ligou à bolsa de ligação da lacase de T. versicolor (entrada 1KYA do pdb), mostrando as cadeias laterais que envolvem o ligante.

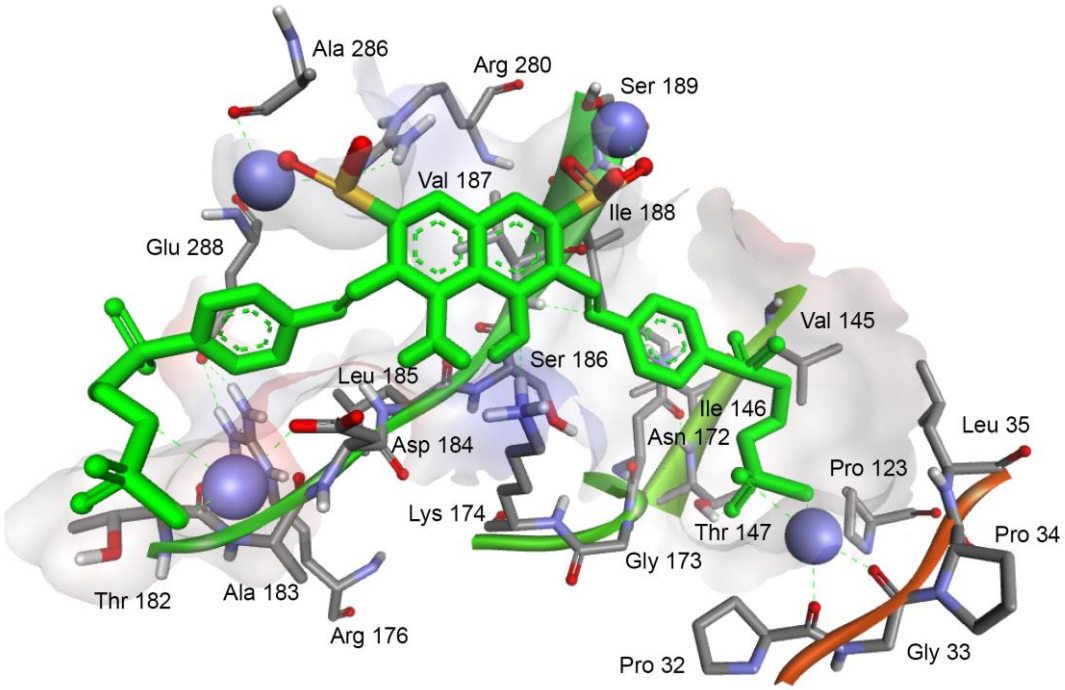


Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

No corante RB5 a pose de melhor estabilidade mostrou fortes interações por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos Thr 147, Thr 182, Leu 185 e Val 187. Além das interações com os íons de Cu^{2+}, como mostrado na figura 7.

Figura 7 - Posição do corante preto reativo 5 (RB5) na bolsa de ligação do TvL. Ela se ligou à bolsa de ligação da lacase de *T. versicolor* (entrada 1KYA do pdb), mostrando as cadeias laterais que envolvem o ligante.





Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

As ligações de hidrogênio têm uma importância fundamental na catálise enzimática, conferindo especificidade ao sítio ativo e ajudando a identificar possíveis locais de ligação (Bhatt et al., 2023; Zhang et al., 2023). Estas ligações confere uma estabilidade de ligação proteína-ligante. Os íons de cobre fazem parte do centro ativo catalítico da enzima, permitindo a ativação do oxigênio molecular e a formação de intermediários reativos (Ayodeji et al., 2022). Esses intermediários são capazes de quebrar as ligações químicas complexas presentes nos corantes, levando à sua degradação e conversão em produtos mais simples e menos poluentes. Em estudos experimentais a enzima lacase chegar a degradar um percentual entre 92% a 97% do corante RB5(Alam et al., 2023).

5.3. Molecular dynamics

A investigação de um sistema termodinâmico composto de soluto e solvente pode ser representada de forma eficaz por meio da modelagem de um complexo que envolve proteínas, ligantes, solventes e íons. Esse complexo é notável por abrigar uma diversidade de forças intermoleculares e por permitir a troca de energia térmica entre as moléculas e os íons (Arcon et al., 2017; Beretta, 2020). As leis fundamentais da termodinâmica determinam que a relação

entre esses elementos moleculares e a forma como ocorre a transferência de calor está intrinsecamente ligada a diversas mudanças de energia, conforme documentado em estudos anteriores na literatura (Chinaka, 2021; Struchtrup, 2020).

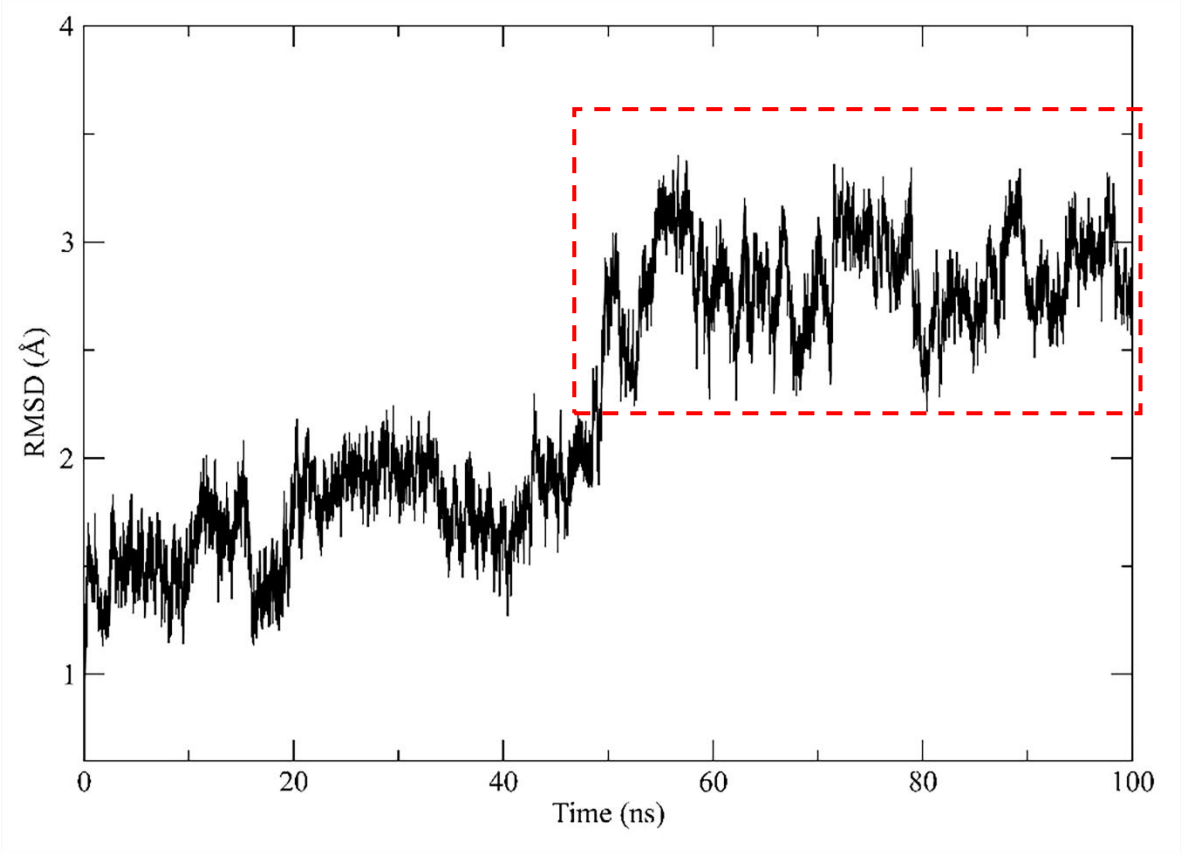
Em seguida, para aprofundar nossa compreensão do comportamento desses complexos proteína-ligante, foram realizadas simulações de dinâmica molecular usando o software NAMD (Jia et al., 2023). Essas simulações tinham como objetivo avaliar possíveis alterações conformacionais globais, a estabilidade das proteínas após cada alteração conformacional e fornecer informações sobre os mecanismos de interação em nível molecular dentro desses complexos. Estudos recentes utilizaram com sucesso essa técnica para obter informações valiosas sobre a estrutura e a função dos complexos proteína-ligante (Byléhn et al., 2021). Os resultados dessas simulações têm implicações significativas, não apenas para o avanço da nossa compreensão dos fenômenos ambientais, mas também para a otimização de processos químicos destinados a melhorar a eficiência das reações (Du et al., 2016). Portanto, as ramificações dessas simulações se estendem por uma ampla gama de domínios científicos e industriais, desde a biotecnologia até a ciência dos materiais (Vamathevan et al., 2019).

5.4. Análise RMSD

Logo após o docking molecular, o complexo constituído pela enzima lacase e a melhor pose do corante RB5 foram selecionados por apresentarem as melhores energias de ligação para o estudo da dinâmica molecular, de acordo com o sítio catalítico da literatura (Figura 8).

A simulação revelou que o valor médio de RMSD para a lacase permaneceu em torno de 1,62 Å ao longo das etapas de produção até 51 ns, mas atingiu sua estabilização no valor de 2,8 Å. O corante RB5 apresentou valores estáveis com um RMSD médio de 2,4 Å ao longo de sua rota, o que é consistente com estudos anteriores que usaram simulações de MD para avaliar a estabilidade de uma lacase em uma solução aquosa com diferentes ligantes contendo níveis variados de hélice α e folhas β. (Cavallari et al., 2006). Além dessa observação, também deve ser enfatizado que os desvios quadráticos médios (RMSD) foram usados para descrever as alterações conformacionais da proteína observadas durante as simulações de MD (Miyamoto et al., 2014).

Figura 8 - Desvio quadrático médio (RMSD), referente à confirmação inicial do complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) na etapa de simulações de produção do MD



Fonte: Elaborado Pelo Autor (2024).

5.5. Análise RMSF

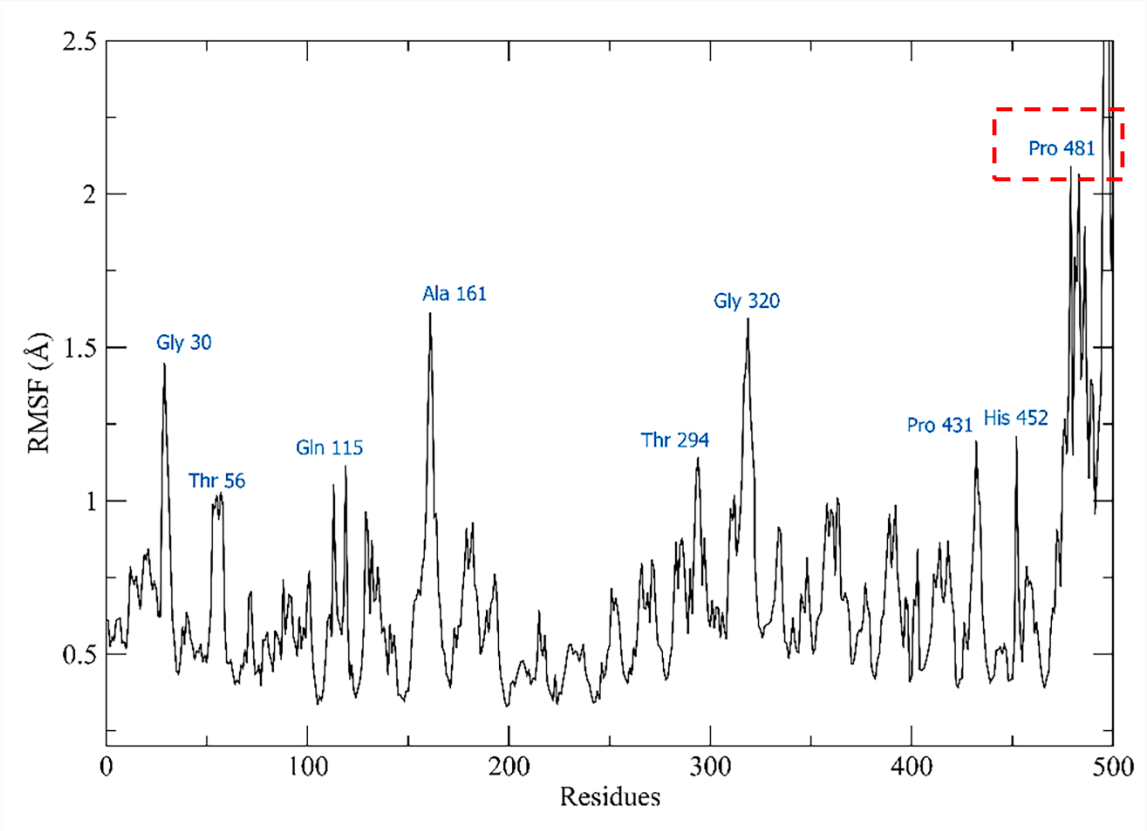
Com base na análise do desvio quadrático médio (RMSD), a estabilidade dos complexos foi confirmada. No entanto, para obter uma compreensão mais profunda das mudanças conformacionais observadas na proteína durante as simulações de dinâmica molecular, calculamos as flutuações na estrutura média da proteína em termos do Desvio Quadrático Médio das Raízes das Posições Atômicas (RMSF) (Vorobjev, 2001).

Esse cálculo forneceu informações mais detalhadas sobre a dinâmica da proteína durante as simulações, o que nos permitiu avaliar o impacto das interações com os complexos formados (Karplus et al., 1977).

O RMSF do sistema foi realizado para compreender o deslocamento e a estabilidade de cada resíduo de proteína ao longo dos 100 nanossegundos da trajetória da simulação. A Figura 9 ilustra as principais interações do complexo em estudo, sugerindo mudanças conformacionais significativas na enzima corante-laca durante a simulação. Os resultados indicam que a trajetória da simulação de dinâmica molecular para o complexo exibiu oscilações médias com correlações significativas relativas a resíduos críticos na replicação (Qin et al., 2021; Roe &

Brooks, 2020). Somente os resíduos próximos ao Pro 481 apresentaram valores ligeiramente superiores a 2,0 Å. Apesar das flutuações observadas, os resultados indicam uma excelente estabilidade da estrutura em solução aquosa. A conformação obtida a partir da simulação de MD para a proteína complexada por meio da técnica de acoplamento forneceu informações essenciais sobre os modos de ligação de moléculas pequenas em diferentes estados de dobramento enzimático. (Thirumalai et al., 2020).

Figura 9 - Root Mean Square Fluctuation (RMSF), referente à confirmação inicial do complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) na etapa de simulações de produção do MD com RB5/lacase.



Fonte: Elaborado Pelo Autor (2024).

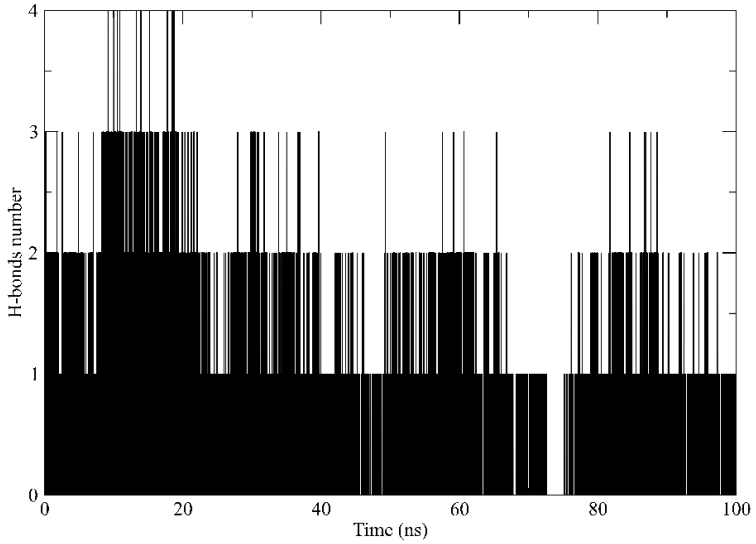
5.6. Análise de ligações H

A avaliação do número de ligações de hidrogênio desempenha uma função crucial na determinação da estabilidade de um complexo em um sistema dinâmico (Mascoli et al., 2021). Após 100 nanossegundos de simulação, foi possível analisar as ligações de hidrogênio formadas entre a lacase e seu ligante correspondente (RB5), conforme mostrado na Figura 10. Durante a simulação, observamos variações nas redes de ligações de hidrogênio, com o número de

interações oscilando entre 3 e 4 para a lacase. No caso do complexo lacase-RB5, a presença de ligações de hidrogênio isoladas e um número médio moderado de ligações de hidrogênio por período (até 4 ligações) indicaram que as redes de ligações de hidrogênio eram relativamente estáveis e consistentes. Essas conexões se formaram de forma coerente ao longo da trajetória da simulação (Ragunathan et al., 2018).

A persistência dessas conexões em momentos significativos sugere que essa interação contribuiu para a estabilidade do complexo, independentemente do tamanho e das características dos compostos envolvidos (Qin et al., 2021). Portanto, podemos observar correlações complementares ao comparar as ligações de hidrogênio formadas durante a dinâmica molecular com aquelas obtidas anteriormente por meio do processo de acoplamento (Coimbra et al., 2021). Portanto, isso indica a importância da convergência de um método inicialmente estático para um processo contínuo em um sistema dinâmico (Schlosser & Korda, 2020).

Figura 10 - Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as etapas da simulação.



Fonte: Elaborado Pelo Autor (2024).

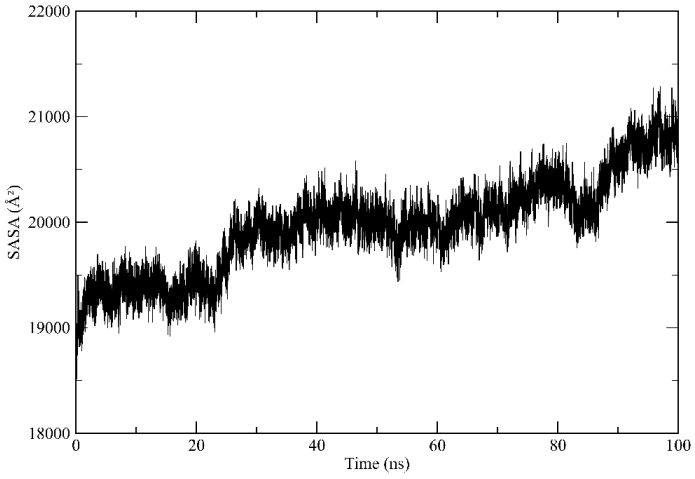
5.7. Cálculos SASA

A sigla "SASA" representa a "Área de Superfície Acessível ao Solvente" e é uma ferramenta fundamental na Simulação de Dinâmica Molecular (MD) para estimar a porção da superfície de uma proteína que se torna disponível para interações com o solvente, principalmente a água, possibilitando a análise das interações entre a proteína e o ambiente

solúvel (Pande et al., 2022). Consequentemente, observamos que os valores de SASA ocorreram um aumento, no complexo enzima-corante ao longo da simulação de dinâmica molecular de 100 ns (como é visto na figura 11), indicando houve um relaxamento na estrutura da enzima (Nobre et al., 2023; Pande et al., 2022). Como resultado, as moléculas de água obtiveram acesso à cavidade recentemente exposta à medida que os aminoácidos da lacase revelaram sua estrutura compacta na presença de corante RB5. Isso aponta para a importância crítica dos canais e cavidades nas enzimas/proteínas no contexto da catalisação envolvida na biorremediação de RB5.

Em resumo, a análise dos valores de SASA durante as simulações MD forneceu informações importantes sobre a dinâmica e estabilidade dos complexos. Os resultados deste estudo poderiam potencialmente ser usados para informar o comportamento de um sistema que interagem mais efetivamente com a superfície da proteína, ou para otimizar as condições sob as quais os complexos proteicos são formados.

Figura 11. Área de superfície acessível ao solvente (SASA) da lacase em função do tempo das simulações de MD. As curvas são médias de execução dos dados brutos com uma janela de 100 ns.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

5.8. Cálculos MM/GBSA

O cálculo das energias livres de um complexo receptor pode ser feito calculando energias de mecânica molecular combinadas com a solvatação generalizada de Born e área de superfície contínua (MM/GBSA) (Genheden & Ryde, 2015). MolAICal, portanto, é uma

ferramenta computacional que estima rapidamente a energia livre de um sistema, com base na abordagem de três trajetórias obtidas por dinâmica molecular e sem entropia de ligantes.

O complexo RB5/lacase, baseado em sua energia livre, apresentou um valor de -22.03 kcal/mol. Esse resultado está apresentado na Tabela 3.

O termo variação de entropia diz respeito à perda de graus de liberdade resultante da formação de uma ou mais interações, pois anteriormente havia apenas duas moléculas (ligante e proteína), que podiam acessar quaisquer graus de liberdade rotacional, translacional ou vibracional, agora há um complexo onde o movimento das moléculas é muito mais limitado (Ben-Tal et al., 2000; Wright et al., 2014).

Esta estimativa pode então ser obtida a partir dos cálculos dos modos normais para os dois sistemas. Assim, para um complexo macromolecular com um alvo e um ligante, a energia de interação deve ser estimada de acordo com as equações 7, 8 e 9 (Emirik, 2022; Šponer et al., 1999).

$$\Delta A_{interaction}^{(vac)} = \left(E_{complex}^{MM} - E_{target}^{MM}\right) - \left(E_{complex}^{MM} - E_{ligand}^{MM}\right) + T\Delta S_{NORMODS} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\Delta A_{interaction}^{(vac)} = E_{complex}^{MM} - E_{target}^{MM} - E_{complex}^{MM} + E_{ligand}^{MM} + T\Delta S_{NORMODS} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\Delta A_{interaction}^{(vac)} = E_{ligand}^{MM} - E_{target}^{MM} + T\Delta S_{NORMODS} \quad \text{Eq. 9}$$

Tabela 3. Dados de estimativa de energia livre do RB5 contra a lacase.

Complex	$\Delta E_{ele} + \Delta G_{sol}$ **(kcal/mol)**	ΔE_{vdw} **(kcal/mol)**	ΔG_{bind} **(kcal/mol)**	**Standard deviation**
RB5/Lacase	17.038	-39.0662	-22.03	+/- 0.0149

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

CONCLUSÃO

O estudo mencionado descreve uma modelagem bem-sucedida das interações entre a enzima lacase e o corante RB5, destacando o potencial catalítico da lacase no processo de biodegradação do corante. A análise in silico revelou que o corante RB5 se liga próximo ao local ativo da enzima com uma energia livre favorável e várias interações, como ligações de hidrogênio, interações π-σ, π-ânion e π-enxofre. Além disso, as simulações de dinâmica molecular indicaram boa estabilidade do complexo enzima-substrato, com baixos valores de RMSD, sugerindo que as posturas de acoplamento utilizadas foram apropriadas para permitir a reação sem impedimentos.

A avaliação MMGBSA sugeriu que o complexo formado entre a lacase e o corante RB5 teve a melhor estimativa de energia livre, indicando uma interação favorável entre a enzima e o substrato. No entanto, é importante ressaltar que, embora as simulações computacionais forneçam uma ferramenta valiosa para a triagem inicial de interações enzima-substrato, as aplicações subsequentes in vitro e em escala expandida enfrentam desafios adicionais, como condições de transporte, atividade catalítica real, possíveis efeitos de inibição da enzima, equilíbrio químico e características físico-químicas do sistema em condições reais, que requerem mais estudos e considerações.

Com base nos objetivos estabelecidos, concluímos que a avaliação do potencial da enzima lacase de *Trametes versicolor* no processo de biodegradação de corantes da indústria têxtil por meio de estudos de simulação computacionais é uma abordagem promissora. O levantamento bibliográfico e a organização da metodologia forneceram uma base sólida para o estudo. Os cálculos das interações energéticas entre a lacase e os corantes permitiram uma avaliação precisa das ligações envolvidas. A identificação das regiões dos corantes mais importantes para o acoplamento nos sítios de ligação da enzima e a determinação do raio de convergência de estabilização dos complexos ligante-receptor são contribuições significativas para a compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação dos corantes. Esses resultados fornecem insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis para o tratamento de efluentes têxteis, contribuindo assim para a redução do impacto ambiental da indústria têxtil.

Portanto, o estudo sugere que a lacase pode desempenhar um papel significativo como catalisador no processo de biodegradação do corante RB5. No entanto, são necessários mais pesquisas e experimentos para confirmar e compreender completamente seu potencial nesse contexto específico. Como futuras direções de pesquisa, podem ser realizadas análises com outras estruturas da enzima lacase e diferentes corantes, ampliando assim o escopo de aplicabilidade. Além disso, a comparação dos resultados obtidos com outras enzimas de potencial biodegradante pode oferecer insights adicionais sobre a eficácia e a especificidade da lacase em relação a outros sistemas enzimáticos. Essas abordagens complementares podem contribuir para o avanço do conhecimento e o desenvolvimento de estratégias mais abrangentes para o tratamento de efluentes têxteis.

Referências

Ahmadi, M., Jahed Motlagh, M., Rahmani, A. T., Zolfagharzadeh, M. M., Shariatpanahi, P., Chermack, T. J., Coons, L. M., Cotter, J., Eyiah-Donkor, E., & Poti, V. (2005). Chem3D 15.0 user guide. *Macromolecules*, *24*(2), 1–61.

AL-Eitan, L., & Alnemri, M. (2022). Biosafety and biosecurity in the era of biotechnology: The Middle East region. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, *4*(2), 130–145. https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.11.002

Al-Tohamy, R., Sun, J., Fareed, M. F., Kenawy, E. R., & Ali, S. S. (2020). Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated Sterigmatomyces halophilus SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69304-4

Alaguprathana, M., Poonkothai, M., Ameen, F., Ahmad Bhat, S., Mythili, R., & Sudhakar, C. (2022). Sodium hydroxide pre-treated Aspergillus flavus biomass for the removal of reactive black 5 and its toxicity evaluation. *Environmental Research*, *214*, 113859. https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113859

Alam, R., Mahmood, R. A., Islam, S., Ardiati, F. C., Solihat, N. N., Alam, M. B., Lee, S. H., Yanto, D. H. Y., & Kim, S. (2023). Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, Trametes hirsuta D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by in silico simulations and toxicity assessment. *Chemosphere*, *313*, 137505. https://doi.org/10.101a6/J.CHEMOSPHERE.2022.137505

Aldossari, R. M., Ali, A., Rashid, S., Rehman, M. U., Bilal Ahmad, S., & Ahmad Malla, B. (2023). Insights on in-silico approaches for identifying potential bioactive inhibitors for TNF-α and IL-6 proteins associated with rheumatoid arthritis. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(11), 105200. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2023.105200

Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M., Rodríguez-Rodríguez, J., Castillo-Zacarías, C., Sosa-Hernández, J. E., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2021). Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 683–696. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.175

Arai, Y. (1995). Computational chemistry on catalyst technology and international collaboration. *Catalysis Today*, *23*(4), 439–448. https://doi.org/10.1016/0920-5861(94)00161-T

Araújo-Chaves, J. C., Bellini, B., Santos, H. F. dos, Rosa, D. S., & Nantes-Cardoso, I. L. (2019). Duplo Benefício Ambiental pela Remoção de Corantes Fotosensibilizadores da Água com Uso de Resíduo Sólido Particulado. *Matéria (Rio de Janeiro)*, *24*(3). https://doi.org/10.1590/s1517-707620190003.0715

Araújo, L. de L. C., & Azevedo, F. H. C. (2020). Estudo da enzima beta-lactamase e sua relação com a resistência aos antibióticos. *Research, Society and Development*, *9*(7), e663974594. https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4594

Arcon, J. P., Defelipe, L. A., Modenutti, C. P., López, E. D., Alvarez-Garcia, D., Barril, X., Turjanski, A. G., & Martí, M. A. (2017). Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein–Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free

Energy Predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *57*(4), 846–863. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00678

Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 200. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0

Arshia, A. H., Shadravan, S., Solhjoo, A., Sakhteman, A., & Sami, A. (2021). De novo design of novel protease inhibitor candidates in the treatment of SARS-CoV-2 using deep learning, docking, and molecular dynamic simulations. *Computers in Biology and Medicine*, *139*, 104967. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104967

Ayodeji, F. D., Shava, B., Iqbal, H. M. N., Ashraf, S. S., Cui, J., Franco, M., & Bilal, M. (2022). Biocatalytic Versatilities and Biotechnological Prospects of Laccase for a Sustainable Industry. *Catalysis Letters 2022 153:7*, *153*(7), 1932–1956. https://doi.org/10.1007/S10562-022-04134-9

Bai, Q., Tan, S., Xu, T., Liu, H., Huang, J., & Yao, X. (2021). MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm. *Briefings in Bioinformatics*, *22*(3). https://doi.org/10.1093/bib/bbaa161

Barciela, P., Perez-Vazquez, A., & Prieto, M. A. (2023). Azo dyes in the food industry: Features, classification, toxicity, alternatives, and regulation. *Food and Chemical Toxicology*, *178*, 113935. https://doi.org/10.1016/J.FCT.2023.113935

Ben-Tal, N., Honig, B., Bagdassarian, C. K., & Ben-Shaul, A. (2000). Association Entropy in Adsorption Processes. *Biophysical Journal*, *79*(3), 1180–1187. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76372-7

Beretta, G. P. (2020). The fourth law of thermodynamics: steepest entropy ascent. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *378*(2170), 20190168. https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0168

Bertrand, T., Jolivalt, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., & Mougin, C. (2002). Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics ,. *Biochemistry*, *41*(23), 7325–7333. https://doi.org/10.1021/bi0201318

Bhatt, P., Bhatt, K., Chen, W.-J., Huang, Y., Xiao, Y., Wu, S., Lei, Q., Zhong, J., Zhu, X., & Chen, S. (2023). Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin, and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. *Journal of Hazardous Materials*, *443*, 130319. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130319

Biovia, D. S. (2016). Discovery studio modeling environment, release 2017 Dassault Systèmes. *San Diego, CA, USA*.

Borba, F. H., Pellenz, L., Bueno, F., Antes, B. dos S., & Inticher, J. J. (2019). Investigação da Toxicidade Aguda (Lactuca sativa) e da Degradação do Corante Índigo Carmim pelo Processo de Oxidação Foto-Fenton. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, *8*(2), 307–332. https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i2.p307-332

Byléhn, F., Menéndez, C. A., Perez-Lemus, G. R., Alvarado, W., & de Pablo, J. J. (2021).

Modeling the Binding Mechanism of Remdesivir, Favilavir, and Ribavirin to SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. *ACS Central Science*, *7*(1), 164–174. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01242

Carlson, A., Justo, A., & Hibbett, D. S. (2014). Species delimitation in Trametes : a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia*, *106*(4), 735–745. https://doi.org/10.3852/13-275

Carvalho, I., Pupo, M. T., Borges, Á. D. L., & Bernardes, L. S. C. (2003). Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, *26*(3), 428–438. https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300023

Catanho, M., Malpass, G. R. P., & Motheo, A. de J. (2006). Evaluation of electrochemical and photoelectrochemical methods for the degradation of three textile dyes. *Quimica Nova*, *29*(5), 983–989. https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000500018

Cavalcante, F. T. T., da Fonseca, A. M., Holanda Alexandre, J. Y. N., & dos Santos, J. C. S. (2022). A stepwise docking and molecular dynamics approach for enzymatic biolubricant production using Lipase Eversa® Transform as a biocatalyst. *Industrial Crops and Products*, *187*, 115450. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115450

Cavallari, M., Ghio, C., Monti, S., Ferrario, M., Maritan, A., & Carloni, P. (2006). Partially folded states of HIV-1 protease: Molecular dynamics simulations and ligand binding. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *769*(1–3), 111–121. https://doi.org/10.1016/j.theochem.2006.04.042

Chandanshive, V. V., Kadam, S. K., Khandare, R. V., Kurade, M. B., Jeon, B.-H., Jadhav, J. P., & Govindwar, S. P. (2018). In situ phytoremediation of dyes from textile wastewater using garden ornamental plants, effect on soil quality and plant growth. *Chemosphere*, *210*, 968–976. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.064

Chinaka, T. W. (2021). Introducing the second law of thermodynamics using Legitimation Code Theory among first year chemistry students. *Cypriot Journal of Educational Sciences*, *16*(3), 981–994. https://doi.org/10.18844/cjes.v16i3.5772

Chopra, N. K., Singhal, D., Saini, R., & Sondhi, S. (2023). Structure analysis and molecular docking studies of laccase from "Bacillus licheniformis NS2324." *Sustainable Chemistry for the Environment*, *1*, 100004. https://doi.org/10.1016/J.SCENV.2023.100004

Coimbra, J. T. S., Feghali, R., Ribeiro, R. P., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2021). The importance of intramolecular hydrogen bonds on the translocation of the small drug piracetam through a lipid bilayer. *RSC Advances*, *11*(2), 899–908. https://doi.org/10.1039/D0RA09995C

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., & Kollman, P. A. (1993). Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(21), 9620–9631. https://doi.org/10.1021/ja00074a030

Cortazar-Martínez, A., González-Ramírez, C. A., Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J. A., Castro-Rosas, J., & Villagómez-Ibarra, J. R. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y Ciencia*, *28*(2), 187–199.

DasGupta, D., Mandalaparthy, V., & Jayaram, B. (2017). A component analysis of the free energies of folding of 35 proteins: A consensus view on the thermodynamics of folding at

the molecular level. *Journal of Computational Chemistry*, *38*(32), 2791–2801. https://doi.org/10.1002/jcc.25072

Dash, D. M., & Osborne, W. J. (2023). A systematic review on the implementation of advanced and evolutionary biotechnological tools for efficient bioremediation of organophosphorus pesticides. *Chemosphere*, *313*, 137506. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137506

de Oliveira, A. M. (2018). *Introdução à modelagem Molecular para Química, Engenharia e Biomédicas: fundamentos e exercícios*. Appris Editora e Livraria Eireli-ME.

De Sousa, A. P., Nunes, M. K. dos S., Oliveira, M. da S., Fernandes, D. A., Ferreira, M. D. L., Cordeiro, L. V., Souza, H. D. da S., Souza, M. de F. V. de, Pessoa, H. de L. F., Oliveira Filho, A. A. de, & Sá, R. de C. da S. e. (2021). Avaliação in silico e in vitro dos flavonoides vitexina, tilirosideo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi: Avaliação do FPS e predição da atividade anti câncer. *Scientia Plena*, *16*(12). https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.124601

DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. *Http://Www. Pymol. Org/*.

Delavari, A. (2016). Structure-activity investigation on laccases by computational and site directed mutagenesis studies. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*, *July*.

Di Felice, R., Mayes, M. L., Richard, R. M., Williams-Young, D. B., Chan, G. K. L., de Jong, W. A., Govind, N., Head-Gordon, M., Hermes, M. R., Kowalski, K., Li, X., Lischka, H., Mueller, K. T., Mutlu, E., Niklasson, A. M. N., Pederson, M. R., Peng, B., Shepard, R., Valeev, E. F., … Zimmerman, P. M. (2023). A Perspective on Sustainable Computational Chemistry Software Development and Integration. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *19*(20), 7056–7076. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.3C00419/ASSET/IMAGES/LARGE/CT3C00419_0004.JPEG

Diez, M., Petuya, V., Martínez-Cruz, L. A., & Hernández, A. (2014). Insights into mechanism kinematics for protein motion simulation. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 184. https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-184

Droguett, T., Mora-Gómez, J., García-Gabaldón, M., Ortega, E., Mestre, S., Cifuentes, G., & Pérez-Herranz, V. (2020). Electrochemical Degradation of Reactive Black 5 using two-different reactor configuration. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61501-5

Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., & Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 144. https://doi.org/10.3390/ijms17020144

Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2010). NNScore: A Neural-Network-Based Scoring Function for the Characterization of Protein−Ligand Complexes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *50*(10), 1865–1871. https://doi.org/10.1021/ci100244v

Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). NNScore 2.0: A Neural-Network Receptor–Ligand Scoring Function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*(11), 2897–2903. https://doi.org/10.1021/ci2003889

El Bouraie, M., & El Din, W. S. (2016). Biodegradation of Reactive Black 5 by Aeromonas hydrophila strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. *Sustainable*

Environment Research, *26*(5), 209–216. https://doi.org/10.1016/j.serj.2016.04.014

Emirik, M. (2022). Potential therapeutic effect of turmeric contents against SARS-CoV-2 compared with experimental COVID-19 therapies: in silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(5), 2024–2037. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835719

Farago, O. (2019). Langevin thermostat for robust configurational and kinetic sampling. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, *534*, 122210. https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.122210

Florio, D. Z. de, Fonseca, F. C., Muccillo, E. N. S., & Muccillo, R. (2004). Materiais cerâmicos para células a combustível. *Cerâmica*, *50*(316), 275–290. https://doi.org/10.1590/S0366-69132004000400002

Fonseca, A. M. da, Cavalcante, A. L. G., Carvalho, R. M. M., Amaral, J. F. do, Colares, R. P., Marinho, E. S., & Neto, M. M. (2020). STUDY OF THE INHIBITION POTENTIAL OF REMDESIVIR DERIVATIVES ON MPRO OF SARS-COV-2. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH*, *8*(11), 164–174. https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v8.i11.2020.2342

Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, *2018*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2018/3502514

Fuentes, I., Ccorahua, R., Tinoco, O., León, O., & Ramírez, P. (2019). Draft Genome Sequences of Two Textile Azo Dye-Degrading Shewanella sp. Strains Isolated from a Textile Effluent in Peru. *Microbiology Resource Announcements*, *8*(49). https://doi.org/10.1128/MRA.00836-19/ASSET/8FAEB43E-6FF8-43C8-BEFD-96314F11DCEF/ASSETS/GRAPHIC/MRA.00836-19-F0001.JPEG

Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *10*(5), 449–461. https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936

Germano de Sousa, I., Valério Chaves, A., Luiz Barros de Oliveira, A., da Silva Moreira, K., Gonçalves de Sousa Junior, P., Simão Neto, F., Cristina Freitas de Carvalho, S., Bussons Rodrigues Valério, R., Vieira Lima, G., Amélia Sanders Lopes, A., Cristiane Martins de Souza, M., Marques da Fonseca, A., Basílio Almeida Fechine, P., Carlos de Mattos, M., S dos Santos, J. C., Val erio Chaves, A., Luiz Barros de Oliveira, A., Sim, F., Neto, ao, … S dos Santos, J. C. (2022). A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2144263

Gohlke, H., & Case, D. A. (2004). Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein-protein complex Ras-Raf. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(2), 238–250. https://doi.org/10.1002/jcc.10379

Gohlke, H., Kiel, C., & Case, D. A. (2003). Insights into Protein–Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS Complexes. *Journal of Molecular Biology*, *330*(4), 891–913. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00610-7

Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2017). An Introduction to

Biotechnology. In *Basic and Applied Aspects of Biotechnology* (pp. 1–21). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_1

Gutiérrez-Antón, M., Santiago-Hernández, A., Rodríguez-Mendoza, J., Cano-Ramírez, C., Bustos-Jaimes, I., Aguilar-Osorio, G., Campos, J. E., & Hidalgo-Lara, M. E. (2023). Improvement of Laccase Production by Thielavia terrestris Co3Bag1. Enhancing the Bio-Catalytic Performance of the Native Thermophilic TtLacA via Immobilization in Copper Alginate Gel Beads. *Journal of Fungi*, *9*(3), 308. https://doi.org/10.3390/JOF9030308/S1

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, *4*(1), 17. https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

Havranek, B., & Islam, S. M. (2021). An in silico approach for identification of novel inhibitors as potential therapeutics targeting COVID-19 main protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(12), 4304–4315. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1776158

Holanda, C. A., Souza, J. L., Santos, C. C. dos, Silva, H. A. dos S., Santana, S. A. A., Costa, M. C. P., Schultz, M. S., & Bezerra, C. W. B. (2015). Remoção do Corante Têxtil Turquesa de Remazol Empregando Aguapé (Eichhornia crassipes) como Adsorvente. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, *7*(2 SE-FULL PAPERS). https://periodicos.ufms.br/index.php/orbital/article/view/17883

Huang, Y., Tan, L., Chen, M., Jiao, Y., Tian, J., Li, L., Zhou, C., & Lu, L. (2023). Laccase immobilization on hierarchical micro/nano porous chitin/graphene oxide beads prepared via Pickering emulsion template for dye decolorization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *661*, 130858. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.130858

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5

Husain, Q. (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *26*(4), 201–221. https://doi.org/10.1080/07388550600969936

Ihsanullah, I., Jamal, A., Ilyas, M., Zubair, M., Khan, G., & Atieh, M. A. (2020). Bioremediation of dyes: Current status and prospects. *Journal of Water Process Engineering*, *38*, 101680. https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101680

Jafari, A., Aghebati, S., & Khayati, G. (2023). Decolorization of azo dyes by produced laccase enzyme in solid-state fermentation using biphenyl as an inducer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *52*, 102814. https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2023.102814

Jardine, J. L., Stoychev, S., Mavumengwana, V., & Ubomba-Jaswa, E. (2018). Screening of potential bioremediation enzymes from hot spring bacteria using conventional plate assays and liquid chromatography - Tandem mass spectrometry (Lc-Ms/Ms). *Journal of Environmental Management*, *223*, 787–796. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.089

Jeyabalan, J., Veluchamy, A., V, V. P., Kumar, A., Chandrasekar, R., & Narayanasamy, S. (2023). A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *151*, 105081.

https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2023.105081

Jia, H., Li, T., Sun, J., Gong, Y., Liu, H., Wang, H., Chen, J., Liu, W., Lu, S., Feng, L., Wan, Q., Qian, L., Wang, F., Liu, X., & Sun, X. (2023). A Novel Bispecific Fusion Protein Targeting C3b/C4b and VEGF in Patients With nAMD: A Randomized, Open-Label, Phase 1b Study. *American Journal of Ophthalmology*, *248*, 8–15. https://doi.org/10.1016/J.AJO.2022.11.016

Jiang, W., Yang, F., Chen, X., Cai, X., Wu, J., Du, M., Huang, J., & Wang, S. (2022). Molecular simulation -based research on antifreeze peptides: advances and perspectives. *Journal of Future Foods*, *2*(3), 203–212. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.06.002

Karplus, M., McCammon, J. A., & Gelin, B. R. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*(June), 585–590.

Kato, K., Nakayoshi, T., Kurimoto, E., & Oda, A. (2021). Molecular dynamics simulations for the protein–ligand complex structures obtained by computational docking studies using implicit or explicit solvents. *Chemical Physics Letters*, *781*, 139022. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.139022

Khanum, R., Shoukat Ali, R. A., Rangaswamy, H. R., Santhosh Kumar, S. R., Prashantha, A. G., & Jagadisha, A. S. (2023). Recent review on Synthesis, spectral Studies, versatile applications of azo dyes and its metal complexes. *Results in Chemistry*, *5*, 100890. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100890

Lacerda, A. L. de. (2015). Arte e técnica a serviço do conhecimento: as ilustrações científicas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, *22*(3), 1097–1102. https://doi.org/10.1590/S0104-59702015000300029

Lima, A. H., Souza, P. R. M., Alencar, N., Lameira, J., Govender, T., Kruger, H. G., Maguire, G. E. M., & Alves, C. N. (2012). Molecular Modeling of T. rangeli, T. brucei gambiense, and T. evansi Sialidases in Complex with the DANA Inhibitor. *Chemical Biology & Drug Design*, *80*(1), 114–120. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01380.x

Liu, Jiale, Fan, L., Yin, W., Zhang, S., Su, X., Lin, H., Yu, H., Jiang, Z., & Sun, F. (2023). Anaerobic biodegradation of azo dye reactive black 5 by a novel strain Shewanella sp. SR1: Pathway and mechanisms. *Journal of Environmental Management*, *347*, 119073. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.119073

Liu, Jiashu, Li, B., Li, Z., Yang, F., Chen, B., Chen, J., Li, H., & Jiang, Z. (2023). Deciphering the alkaline stable mechanism of bacterial laccase from Bacillus pumilus by molecular dynamics simulation can improve the decolorization of textile dyes. *Journal of Hazardous Materials*, *443*, 130370. https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.130370

Liu, N., Wang, Y., Zhao, Q., Cui, C., Fu, M., & Zhao, M. (2012). Immobilisation of lecitase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. *Food Chemistry*, *134*(1), 301–307. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.145

Mahmoud, M. E., Amira, M. F., Seleim, S. M., Nabil, G. M., & Abouelanwar, M. E. (2021). Multifunctionalized graphene oxide@nanopolyaniline@zirconium silicate nanocomposite for rapid microwable removal of dyes. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, *11*(4), 645–662. https://doi.org/10.1007/s40097-021-00390-0

Malik, S., & Patel, U. D. (2023). Catalytic activation of peroxymonosulphate with manganese and cobalt coated micro sand particles for the treatment of Floor-wash containing Reactive

Black 5 (RB5) dye. *Materials Today: Proceedings*, *77*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.08.212

Mansouri, N., & Benslama, O. (2022). Reprint of: Molecular docking exploration of the degradation activity of some synthetic hydrocarbons polymers by the laccase enzyme of Streptomyces. *Materials Today: Proceedings*, *53*, A1–A4. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.311

Marques da Fonseca, A., Bezerra de Freitas, Í., Baltazar Soares, N., Aurecio Morais de Araújo, F., Menezes Gaieta, E., Cleiton Sousa dos Santos, J., Carlos Nogueira Sobrinho, A., Silva Marinho, E., & Paulo Colares, R. (2021). Synthesis, Biological Activity, and In silico Study of Bioesters Derived from Bixin by the CALB Enzyme. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *12*(5), 5901–5917. https://doi.org/10.33263/BRIAC125.59015917

Marques da Fonseca, A., Freire da Silva, A., Barbosa da Silva, F. L., Caluaco, B. J., Gaieta, E. M., Nunes da Rocha, M., Colares, R. P., Sobczak, J. F., Marinho, G. S., dos Santos, H. S., & Marinho, E. S. (2023). Isolation, characterization and in silico study of propenamide alkaloids from Hymenoepmecis bicolor poison against active μ -opioid receptor. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–17. https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2183043

Mascoli, V., Liguori, N., Cupellini, L., Elias, E., Mennucci, B., & Croce, R. (2021). Uncovering the interactions driving carotenoid binding in light-harvesting complexes. *Chemical Science*, *12*(14), 5113–5122. https://doi.org/10.1039/D1SC00071C

Miyamoto, Y., Motohashi, H., Suyama, T., & Yokoyama, J. (2014). Langevin description of gauged scalar fields in a thermal bath. *Physical Review D*, *89*(8), 085037. https://doi.org/10.1103/PhysRevD.89.085037

Mohajershojaei, K., Khosravi, A., & Mahmoodi, N. M. (2014). Decolorization of dyes using immobilized laccase enzyme on zinc ferrite nanoparticle from single and binary systems. *Fibers and Polymers*, *15*(10), 2139–2145. https://doi.org/10.1007/S12221-014-2139-Y/METRICS

Monisha, B., Sridharan, R., Kumar, P. S., Rangasamy, G., Krishnaswamy, V. G., & Subhashree, S. (2023). Sensing of azo toxic dyes using nanomaterials and its health effects - A review. *Chemosphere*, *313*, 137614. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137614

Morris, G. M., Huey R Fau - Lindstrom, W., Lindstrom W Fau - Sanner, M. F., Sanner Mf Fau - Belew, R. K., Belew Rk Fau - Goodsell, D. S., Goodsell Ds Fau - Olson, A. J., Olson, A. J., & Chem, J. C. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791.

Mustafa, G., Tariq Zahid, M., Ali, S., Zaghum Abbas, S., & Rafatullah, M. (2021). Biodegradation and discoloration of disperse blue-284 textile dye by Klebsiella pneumoniae GM-04 bacterial isolate. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(4), 101442. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101442

Nascimento de Castro, T., Dantas Mota, M., & Laignier, E. C. (2022). Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *51*(2). https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.97604

Nobre, M. M. R., Silva, A. F. da, Menezes, A. M., Silva, F. L. B. da, Lima, I. M., Colares, R. P., Souza, M. C. M. de, Marinho, E. S., Melo, R. L. F., Santos, J. C. S. dos, & Fonseca, A.

M. da. (2023). Ester Production Using the Lipid Composition of Coffee Ground Oil (Coffea arabica): A Theoretical Study of Eversa® Transform 2.0 Lipase as an Enzymatic Biocatalyst. *Compounds 2023, Vol. 3, Pages 411-429*, *3*(3), 411–429. https://doi.org/10.3390/COMPOUNDS3030031

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, *3*(1), 33. https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33

Pande, V., Joshi, T., Pandey, S. C., Sati, D., Mathpal, S., Pande, V., Chandra, S., & Samant, M. (2022). Molecular docking and molecular dynamics simulation approaches for evaluation of laccase-mediated biodegradation of various industrial dyes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(23), 12461–12471. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1971564

Pardo, I., & Camarero, S. (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(5), 897–910. https://doi.org/10.1007/S00018-014-1824-8/FIGURES/5

Pasini, S. M., Valério, A., Yin, G., Wang, J., de Souza, S. M. A. G. U., Hotza, D., & de Souza, A. A. U. (2021). An overview on nanostructured TiO2–containing fibers for photocatalytic degradation of organic pollutants in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, *40*, 101827. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101827

Patel, H., & Kukol, A. (2021). Integrating molecular modelling methods to advance influenza A virus drug discovery. *Drug Discovery Today*, *26*(2), 503–510. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.014

Petrova, S. S., & Solov'ev, A. D. (1997). The Origin of the Method of Steepest Descent. *Historia Mathematica*, *24*(4), 361–375. https://doi.org/10.1006/hmat.1996.2146

Pinto, É. S. M., Dorn, M., & Feltes, B. C. (2020). The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. *Chemosphere*, *250*, 126202. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126202

Polak, J., & Jarosz-Wilkolazka, A. (2012). Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, *47*(9), 1295–1307. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.006

Porto, V. A., & Porto, R. S. (2022). In silico studies of novel synthetic compounds as potential drugs to inhibit coronavirus (SARS-CoV-2): a systematic review. *Biointerface Res Appl Chem*, *12*, 4293–4306.

Qin, X., Zhong, J., & Wang, Y. (2021). A mutant T1 lipase homology modeling, and its molecular docking and molecular dynamics simulation with fatty acids. *Journal of Biotechnology*, *337*, 24–34. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.024

Ragunathan, A., Malathi, K., & Anbarasu, A. (2018). MurB as a target in an alternative approach to tackle the Vibrio cholerae resistance using molecular docking and simulation study. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(2), 1726–1732. https://doi.org/10.1002/jcb.26333

Ripoll, V., Godino-Ojer, M., & Calzada, J. (2023). Development of engineering skills in students of biotechnology: Innovation project "From laboratory to industry." *Education for Chemical Engineers*, *43*, 37–49. https://doi.org/10.1016/j.ece.2023.01.006

Rodrigues, A. F. S., da Silva, A. F., da Silva, F. L. B., dos Santos, K. M., de Oliveira, M. P., Nobre, M. M. R., Catumba, B. D., Sales, M. B., Silva, A. R. M., Braz, A. K. S., Cavalcante, A. L. G., Alexandre, J. Y. N. H., Junior, P. G. S., Valério, R. B. R., de Castro Bizerra, V., & dos Santos, J. C. S. (2023). A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolorization of synthetic dyes. *Process Biochemistry*, *126*, 272–291. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2023.01.014

Roe, D. R., & Brooks, B. R. (2020). A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, *153*(5). https://doi.org/10.1063/5.0013849

Schlosser, C., & Korda, M. (2020). Sparse moment-sum-of-squares relaxations for nonlinear dynamical systems with guaranteed convergence. *ArXiv:2012.05572*, *hal-030594*. https://doi.org/https://doi.org/10.48550/arXiv.2012.05572

Sharma, J., Sharma, S., & Soni, V. (2021). Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Regional Studies in Marine Science*, *45*, 101802. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101802

Sharma, K. K., & Kuhad, R. C. (2008). Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Indian Journal of Microbiology*, *48*, 309–316.

Silva, L. A., Garrot, T. G., Pereira, A. M., & Correia, J. C. G. (2021). Historical perspective and bibliometric analysis of molecular modeling applied in mineral flotation systems. *Minerals Engineering*, *170*, 107062. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107062

Silva Neto, A. C. (2017). TRIAGEM VIRTUAL PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE SUBTILISINA 1 (SUB1) DO Plasmodium falciparum. *Anais Dos Seminários de Iniciação Científica*, *21*. https://doi.org/10.13102/semic.v0i21.2282

Šponer, J., Hobza, P., & Leszczynski, J. (1999). *Computational Approaches to the Studies of the Interactions of Nucleic Acid Bases* (pp. 85–117). https://doi.org/10.1016/S1380-7323(99)80078-8

Struchtrup, H. (2020). Entropy and the Second Law of Thermodynamics—The Nonequilibrium Perspective. *Entropy*, *22*(7), 793. https://doi.org/10.3390/e22070793

Sutherland, J. J., Nandigam, R. K., Erickson, J. A., & Vieth, M. (2007). Lessons in Molecular Recognition. 2. Assessing and Improving Cross-Docking Accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *47*(6), 2293–2302. https://doi.org/10.1021/ci700253h

Sutton, R. S., Mahmood, A. R., & White, M. (2016). An emphatic approach to the problem of off-policy temporal-difference learning. *Journal of Machine Learning Research*, *17*, 1–29.

Tadesse, M. A., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., & Sergi, F. (2008). An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *6*(5), 868. https://doi.org/10.1039/b716002j

Tan, W., Ai, J., Fan, Y., Liu, X., Xu, Y., Zhang, H., & Huang, Y.-H. (2020). Enhanced mineralization of Reactive Black 5 by waste iron oxide via photo-Fenton process. *Research on Chemical Intermediates*, *46*, 4423–4431.

Tanabe, A., & Tsumoto, K. (2023). *Analytical Method for Experimental Validation of*

Computer-Designed Antibody (pp. 409–433). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2609-2_23

Temml, V., & Kutil, Z. (2021). Structure-based molecular modeling in SAR analysis and lead optimization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1431–1444. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.018

Thirumalai, D., Lorimer, G. H., & Hyeon, C. (2020). Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones. *Protein Science*, *29*(2), 360–377. https://doi.org/10.1002/pro.3795

Tian, W., Chen, C., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: Computed Atlas of Surface Topography of Proteins and Beyond. *Biophysical Journal*, *114*(3), 50a. https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2017.11.325

Tkaczyk, A., Mitrowska, K., & Posyniak, A. (2020). Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of The Total Environment*, *717*, 137222. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137222

Toker, S. K., Evlat, H., & Koçyiğit, A. (2021). Screening of newly isolated marine-derived fungi for their laccase production and decolorization of different dye types. *Regional Studies in Marine Science*, *45*, 101837. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101837

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Vamathevan, J., Clark, D., Czodrowski, P., Dunham, I., Ferran, E., Lee, G., Li, B., Madabhushi, A., Shah, P., Spitzer, M., & Zhao, S. (2019). Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(6), 463–477. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0024-5

Vorobjev, Y. N. (2001). Free energies of protein decoys provide insight into determinants of protein stability. *Protein Science*, *10*(12), 2498–2506. https://doi.org/10.1110/ps.ps.15501

Wahl, J., Freyss, J., von Korff, M., & Sander, T. (2019). Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. *Journal of Cheminformatics*, *11*(1), 53. https://doi.org/10.1186/s13321-019-0371-6

Wright, D. W., Hall, B. A., Kenway, O. A., Jha, S., & Coveney, P. V. (2014). Computing Clinically Relevant Binding Free Energies of HIV-1 Protease Inhibitors. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *10*(3), 1228–1241. https://doi.org/10.1021/ct4007037

Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S., & Ang, H. M. (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *209*, 172–184. https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.002

Yin, Q., Zhou, G., Peng, C., Zhang, Y., Kües, U., Liu, J., Xiao, Y., & Fang, Z. (2019). The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. *AMB Express*, *9*(1), 151. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0878-2

Zaheer, M., Ali, N., Javed, H., Munir, R., & Jamil, N. (2023). Uncovering the impact of SARS-CoV2 spike protein variants on human receptors: A molecular dynamics docking and simulation approach. *Journal of Infection and Public Health*, *16*(10), 1544–1555. https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2023.07.011

Zhang, W., Lu, Z., Liu, R., Ji, L., Nian, B., & Hu, Y. (2023). Ionic liquid modulation of metal-organic framework immobilized laccase and boosted its catalytic performance for organic pollutants removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *11*(5), 110880. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110880

Zhou, W., Zhang, W., & Cai, Y. (2021). Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, *403*, 126272. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.126272

Zosenko, O. O., Kushch, O. V., Kompanets, M. O., Anishchenko, V. M., & Shendrik, A. N. (2022). Aliphatic oxime 3-(hydroxyimino)pentan-2,4-dione as new potential mediator for laccase-catalyzed decolorization of dyes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*(4), 108149. https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.108149