



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

MILLENA MARA RABELO NOBRE

**ESTUDO TEÓRICO DA LIPASE EVERSA TRANSFORM 2.0 COMO
BIOCATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DA
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO ÓLEO DA BORRA DE CAFÉ (*COFFEA
ARABICA*)**

REDENÇÃO

2024

MILLENA MARA RABELO NOBRE

**ESTUDO TEÓRICO DA LIPASE EVERSA TRANSFORM 2.0 COMO
BIOCATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DA
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO ÓLEO DA BORRA DE CAFÉ (*COFFEA
ARABICA*)**

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

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Nobre, Millena Mara Rabelo.

N754e

Estudo teórico da lipase eversa transform 2.0 como biocatalisador para produção de ésteres a partir da composição lipídica do óleo da borra de café coffea arabica / Millena Mara Rabelo Nobre. - Redenção, 2024.

56f: 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: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Biodiesel. 2. Borra do café. 3. Eversa Transform 2.0. I.
Título

CE/UF/BSCA

CDD 665.5383

MILLENA MARA RABELO NOBRE

**ESTUDO TEÓRICO DA LIPASE EVERSA TRANSFORM 2.0 COMO
BIOCATALISADOR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DA
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO ÓLEO DA BORRA DE CAFÉ (*COFFEA
ARABICA*).**

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)

Dr. EMMANUEL SILVA MARINHO

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

PROF. DRA. REGILANY PAULO COLARES

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

PROF. DR. FRANCISCO WIRLEY PAULINO RIBEIRO, UNILAB

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Dedico a minha família que é a
base de tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me sustentar durante todo o processo. Sei que sem Sua orientação e força, não teria sido possível completar essa jornada desafiadora.

A minha família, muito obrigada por entenderem os momentos de ausência e sacrifícios que fiz para me dedicar aos estudos, em especial ao meu esposo Mateus, minha mãe Auci e aos meus filhos, Levi e Lia. A compreensão e incentivo de vocês foram fundamentais para me manter motivada nos momentos mais desafiadores.

Aos meus colegas de turma, que sempre estavam me ajudado, com a sabedoria, apoio mutuo e amizade.

Aos professores, por todos os ensinamentos, em especial ao meu orientador: Aluísio Marques da Fonseca. Aqui eu gostaria de expressar minha mais profunda gratidão por sua orientação, apoio e inspiração durante todo o processo. Sua sabedoria, experiência e paciência foram inestimáveis para mim, eu estou verdadeiramente grata e realizada por ter tido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

RESUMO

Estudo teórico da lipase eversa transform 2.0 como biocatalisador para produção de ésteres a partir da composição lipídica do óleo da borra de café (*Coffea arabica*).

Millena Mara Rabelo Nobre,¹ Aluísio Marques da Fonseca^{2,*}

¹Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, Ceará – Brasil

²Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, Ceará – Brasil

*Correspondência: Instituto de Ciências Exatas e da Natureza – ICEN da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB - Campus das Auroras - Rua José Franco de Oliveira, s/n - Zona Rural, Redenção – CE, Brasil. CEP: 62790-970, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

O presente estudo investiga o comportamento do biodiesel produzido por meio da esterificação enzimática do óleo da borra de café (*Coffea arabica*), utilizando a lipase Eversa® Transform 2.0 como catalisador. Por meio de uma abordagem teórica, foram realizados estudos de docking e modelagem molecular para compreender as interações entre a lipase e os substratos lipídicos presentes no óleo da borra do café. Os resultados revelaram que o éster 6,9 octadecanoato de metila exibiu a melhor energia livre de ligação -6,1 kcal/mol., indicando uma forte afinidade pelo sítio ativo da enzima. Essas descobertas proporcionam uma compreensão detalhada dos mecanismos envolvidos na catálise da lipase Eversa® Transform 2.0 e sua capacidade de converter as sete substâncias gordurosas presentes na borra de café em ésteres.

O estudo visa avaliar o potencial dessa lipase em otimizar a produção de biodiesel a partir da borra de café, contribuindo para a expansão das fontes de matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Além disso, a compreensão dos mecanismos de interação entre a enzima e os substratos lipídicos permite uma melhor otimização das condições de reação, visando um rendimento mais eficiente na produção de ésteres desejados.

Em suma, este estudo fornece insights valiosos para o desenvolvimento de processos mais eficazes e sustentáveis na produção de biodiesel a partir da borra de café, destacando o potencial da lipase Eversa® Transform 2.0 como catalisador nesse contexto.

Palavras-chave: Biodiesel, borra do café, Eversa Transform 2.0.

ABSTRACT

Theoretical study of eversa transform 2.0 lipase as a biocatalyst for the production of esters from the lipid composition of coffee grounds oil (*Coffea arabica*).

Millena Mara Rabelo Nobre,¹ Aluísio Marques da Fonseca^{2,*}

¹Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, Ceará – Brasil

²Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, Redenção, Ceará – Brasil

*Correspondência: Instituto de Ciências Exatas e da Natureza – ICEN da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB - Campus das Auroras - Rua José Franco de Oliveira, s/n - Zona Rural, Redenção – CE, Brasil. CEP: 62790-970, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

The present study investigates the behavior of biodiesel produced through the enzymatic esterification of coffee grounds oil (*Coffea arabica*), using Eversa® Transform 2.0 lipase as a catalyst. Using a theoretical approach, docking and molecular modeling studies were carried out to understand the interactions between lipase and lipid substrates present in coffee grounds oil. The results revealed that 6,9 methyl octadecanoate ester exhibited the best binding free energy -6.1 kcal/mol., indicating a strong affinity for the active site of the enzyme. These findings provide a detailed understanding of the mechanisms involved in the catalysis of Eversa® Transform 2.0 lipase and its ability to convert the seven fatty substances present in coffee grounds into esters.

The study aims to evaluate the potential of this lipase in optimizing the production of biodiesel from coffee grounds, contributing to the expansion of raw material sources for the production of biofuels. Furthermore, understanding the mechanisms of interaction between the enzyme and lipid substrates allows for better optimization of reaction conditions, aiming for a more efficient yield in the production of desired esters.

In short, this study provides valuable insights for the development of more effective and sustainable processes in the production of biodiesel from coffee grounds, highlighting the potential of Eversa® Transform 2.0 lipase as a catalyst in this context.

Keywords: Biodiesel, coffee grounds, Eversa Transform 2.0.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção de biodiesel (2004 a 2017)

Figura 2. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (A) Equação genérica; (B) três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam grupos alquil

Figura 3. Esquema metodológico

Figura 4. Estrutura 2D da composição lipídica da espécie vegetal *Coffea arabica*

Figura 5. Detecção de sete cavidades pelo CASTp.

Figura 6. Gráfico de Ramachandran de Eversa modelado.

Figura 7. Substrato em 2D – (a) ácido hexadecanóico; (b) hexadecanoato de metila; (c) octadecanoato de metila; (d) docosanoato de metila; (e) eicosanoato de metila; (f) octadienoato de 6,9 metil; (g) octadecenoato de metila.

Figura 8. Interações entre 6,9 metil octadienoato (A) e metil octadecenoato (B) com resíduos de aminoácidos Eversa.

Figura 9. Root Mean Square Deviation (RMSD), referente à confirmação inicial do complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) na etapa de simulações de produção do MD com o complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) em a etapa de simulações de produção do MD com composição de óleo de borra de café/lipase Eversa.

Figura 10. 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 DM com composição de óleo de borra de café/lipase Eversa.

Figura 11. Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as etapas de simulação.

Figura 12. Área de superfície acessível ao solvente (SASA) da lipase Eversa em função do tempo das simulações MD. As curvas são médias dos dados brutos com uma janela de 100 ns.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do café verde.

Tabela 2. Composição lipídica do café

Tabela 3. Produção de biodiesel usando lipase como catalisador

Tabela 4. Composição do óleo e resultados de ancoragem molecular.

Tabela 5. Interações entre resíduos de aminoácidos e composição lipídica da borra de café

Tabela 6. Dados de estimativa de energia livre da composição do óleo lipídico da borra de café contra a lipase Eversa.

LISTA DE ABREVIATURAS

BC – Borra de Café

SCG – Spent Coffe Grauns

CO – Monóxido de Marbono

CO₂ – Dióxido de Carbono

EC – Emissão de Carbono

EC - Enzyme Commission Number

CAS – Configurational Analysis System

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

PDB – Protein Data Bank

MM2 – Molecular Mechanics

RMS – Desvio Quadrático Médio

TIP3P - "Transferable Intermolecular Potential with 3 Points

MMFF94 – Molecular Mechanics Force Field 94

RMSD – Root-Mean-Square Deviation

CASTP – Computed Atlas of Surface Topography of proteins

MD – Dinâmica Molecular

NVT – Número Total de Partículas

NAMD – Nanoscale Molecular Dynamics

VMD – Visual Molecular Dynamics

MM/GBSA – Molecular mechanics/Generalized Born Surface Area

CQA – Conformações Quase Ataque

NAC – Near Attack

RMSF – Root Mean Square Fluctuation

SASA – Área de superfície acessível ao solvente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Recursos naturais.....	15
2.2 Crise Energética.....	16
2.3 Sustentabilidade.....	16
2.4 Fontes alternativas de energias	17
2.5 Biocombustíveis e biodiesel	18
2.6 Biodiesel no Brasil	19
2.7 Borra de café para produção de biodiesel.....	20
2.8 Composição química do café.....	22
2.9 Estudo da composição lipídica da borra de café.....	23
2.10 Lipase	23
2.11 Estudo <i>in silico</i>	25
2.12 Docking molecular	25
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 Modelagem de Homologia	26
3.1.1 Identificação e seleção de proteínas dobradas.....	27
3.1.2 Alinhamento de Sequências de Alvo e Molde	27
3.1.3 Construção e Otimização de Modelos	27
3.1.4 Validação de Proteína	27
3.2 Preparação de Proteína	27
3.3 Obtendo o ligante	27
3.4 Docking Molecular e Visualização de Cálculos	28
3.4.1. Análise estatística	29
3.5 Dinâmica molecular.....	29

3.5.1. Cálculos MM/GBSA	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Locais de imobilização	31
4.2 Modelagem de Proteínas	31
4.3 Interação entre Substrato e Lipase.....	32
4.4 Dinâmica molecular.....	38
4.4.1 Análise RMSD	38
4.4.2 Análise RMSF	39
4.4.3 Análise de ligações Hidrogênio (H).....	41
4.4.4 Cálculos SASA.....	42
4.4.5 Cálculos MM/GBSA	44
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a preocupação mundial com as mudanças climáticas é alta, pois a cada dia as emissões de compostos poluentes estão sendo cada vez mais lançados na atmosfera. Estes podem ser minimizados com ações sustentáveis, como o uso de vários materiais residuais, incluindo resíduos industriais, como borra de café. Devido ao aumento significativo do consumo de café, os resíduos gerados a partir dele tornaram-se uma preocupação. O manejo da borra de café (BC) ou spent coffee grounds (SCG) não é feito como deveria, apesar de ser um recurso biologicamente valioso (Jeong, 2022).

O alto custo da energia e o aumento da dependência de fontes de combustíveis não renováveis têm levado muitos países a investir e buscar fontes alternativas de energia, visando reduzir a poluição causada principalmente por CO (monóxido de carbono) e CO₂ (dióxido de carbono) (Xing et al., 2021). Dentre as fontes de energia utilizadas, o petróleo é o combustível fóssil mais utilizado globalmente. Nos últimos tempos, tem-se observado um rápido aumento em seu consumo, e é previsto que essa tendência persista à medida que a população continua a crescer e se desenvolver. Esse consumo excessivo está exercendo um impacto significativo no agravamento do aquecimento global. Assim, optar por fontes de energia renováveis poderia atenuar este problema, reduzindo nossa dependência dos combustíveis não renováveis. (Mosarof et al., 2015).

O uso de combustíveis renováveis desempenhará um papel essencial na estabilização do clima do planeta até 2050. Recentemente, têm sido feitos esforços significativos para mitigar os impactos ambientais. Nesse sentido, é crucial incluir a biomassa e outros combustíveis de alta eficiência energética para alcançar esse objetivo (Wolff et al., 2022).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Para o biodiesel ter vantagem sobre os combustíveis fósseis, ele deve ter bom desempenho e rendimento energético. E para que o mundo tenha segurança energética e proteja o meio ambiente, países como a China têm buscado desenvolver mais biocombustíveis, com destaque para os biolíquidos (bioetanol e biodiesel). Estes, por sua vez, apresentam bom desempenho e menor toxicidade, causando menos danos ambientais (Lu et al., 2014).

Devido a esses e outros fatores como lubricidade, armazenamento e transporte, o governo brasileiro incluiu o biodiesel em sua matriz energética em 2005 através da Lei nº 11.097, que só foi implementada em 2008, tornando obrigatória a adição de 2% de biodiesel a todos os óleo diesel vendido, aumentando gradativamente até atingir 15% em 2023 (ANP, 2022). Existem várias fontes de biodiesel, principalmente de gordura animal, óleos residuais e óleos vegetais (Goh et al., 2019). Existem também outras fontes de obtenção de óleos, como as oleaginosas, estas são extremamente usadas para aplicações industriais e domésticas, como alimentos, produtos farmacêuticos, tintas, produtos de beleza, entre muitos outros, é fundamental. Esses óleos têm sido recentemente foco de muitos estudos devido às suas especificidades na produção de biodiesel (Adenuga et al., 2021).

A produção de biocatalisadores em escala industrial encontra muitos entraves, pois possuem altos valores e baixa estabilidade operacional. Assim, isso torna necessário considerar outras estratégias para expandir o uso de enzimas, uma das alternativas seria o uso a imobilização de enzimas e o uso de solventes verdes (Elgharbawy et al., 2018).

Portanto, é necessário entender as enzimas em sua forma atômica e molecular, o que facilitará sua aplicação em escala industrial. Isso só é possível devido à evolução de softwares e computadores com alta capacidade de processamento de dados, permitindo que a bioinformática e a química computacional evoluam para visualizar níveis atômicos e moleculares (Ramanathan, 2017).

2.1 Recursos naturais

Embora as fontes de energia não renováveis conduzam a um crescimento econômico mais significativo, também aumentam as emissões de poluentes como o CO₂. Em contraste, as fontes de energia renováveis reduzem as emissões de carbono (Kuo et al., 2022).

Para muitos países, adotar estratégias que promovam o crescimento econômico com a preservação do meio ambiente tornou-se recentemente uma questão de honra. Como resultado, muitos formuladores de políticas buscam fontes de energia mais limpas sem interferir no crescimento econômico, com o objetivo de reduzir os recursos não renováveis e garantir a segurança energética. (Aftab et al., 2021).

Muitos recursos vêm da natureza e podem ser derivados de fontes minerais, biológicas, ambientais e incidentes. Estes podem ser usados para satisfazer as

necessidades da humanidade e possuem a capacidade de se renovar com facilidade na velocidade com que a natureza pode reabastecê-los. Por outro lado, também existem recursos naturais não renováveis, como petróleo e minerais, que podem ter a mesma função energética que os renováveis. No entanto, estes causam impactos ambientais significativos (Barbosa, 2015).

Portanto, no futuro, as tecnologias verdes que usam fontes de energia renováveis serão responsáveis pela redução das emissões de carbono (EC), e o uso de fontes de energia não renováveis diminuirá gradualmente (Habiba et al., 2022).

2.2 Crise Energética

Nas últimas décadas, o setor de energia vem crescendo constantemente, e a proporcionalidade dos impactos ambientais também vem aumentando. Isso se deve ao crescimento exponencial da população mundial, que consome e consumirá cada vez mais energia. Como resultado, muitos países, como China e Índia, estão passando por crises energéticas, fazendo com que a demanda por eletricidade e as tarifas aumentem (Pretorius et al., 2015), impactando significativamente o setor de energia.

Uma redução nas reservas de eletricidade caracteriza uma crise energética. Afinal, os consumidores são atendidos o tempo todo, e a energia restante é considerada energia de reserva. Em países que enfrentam escassez de energia, as emissões de gases de efeito estufa aumentam significativamente porque as pessoas muitas vezes precisam queimar combustíveis sólidos para atender às suas necessidades domésticas, causando poluição. Torna-se necessário o uso de fontes de energia limpas e renováveis para mitigar o problema. Além da transição para fontes de energia limpas e renováveis, a sustentabilidade abrange uma ampla gama de práticas e políticas que visam preservar os recursos naturais e minimizar o impacto ambiental das atividades humanas. Isso inclui não apenas a produção de energia, mas também a conservação da água, a gestão eficiente dos resíduos, a promoção da mobilidade sustentável e a adoção de práticas agrícolas e industriais ambientalmente responsáveis. (Pretorius et al., 2015).

2.3 Sustentabilidade

Segundo Cavalcante (2021), as pessoas hoje estão em busca de uma sociedade mais sustentável que reduza o uso de combustíveis fósseis e seus derivados e, com isso,

esteja aproveitando mais outras fontes para a produção de combustíveis e biocombustíveis produzidos a partir de óleos vegetais. Sendo a principal fonte de matéria-prima, esses óleos, além de apresentarem vários benefícios a mais que os derivados de petróleo, ainda podem ser fonte de renda para pequenos produtores. Outra característica marcante dos biocombustíveis é que podem ser produzidos por catálise enzimática, o que gera um produto que não agride o meio ambiente, preservando os recursos naturais.

Tais recursos vêm da natureza e podem ser derivados de fontes minerais, biológicas, ambientais e incidentes. Estes podem ser usados para satisfazer as necessidades da humanidade e possuem a capacidade de se renovar com facilidade na velocidade com que a natureza pode reabastecê-los. Por outro lado, também existem recursos naturais não renováveis, como petróleo e minerais, que podem ter a mesma função energética que os renováveis. No entanto, estes causam impactos ambientais significativos (Barbosa, 2015). Torna-se necessário o uso de fontes alternativas de geração de energia. Uma das amplamente utilizadas é a energia da biomassa; é frequentemente citada como uma alternativa de geração de energia por ser viável e mais limpa, tornando a sociedade mais sustentável e capaz de suprir suas demandas energéticas.

2.4 Fontes alternativas de energias

Torna-se necessário o uso de fontes alternativas de geração de energia. Uma das amplamente utilizadas é a energia da biomassa; é frequentemente citada como uma alternativa de geração de energia por ser viável e mais limpa, tornando a sociedade mais sustentável e capaz de suprir suas demandas energéticas. A idade da energia desses materiais reduz significativamente as emissões de gases causadores do efeito estufa e reduz consideravelmente o uso e geração de combustíveis como carvão, gás natural e petróleo. O aproveitamento da energia proveniente desses materiais não só reduz de maneira substancial as emissões de gases do efeito estufa, como também diminui consideravelmente a dependência e a produção de combustíveis como carvão, gás natural e petróleo (Stougie et al., 2018).

Os combustíveis fósseis derivados do petróleo sempre tiveram sua produção em larga escala, porém hoje, a busca por um planeta limpo vem tentando diminuir essa produção pois os motivos são muitos: o esgotamento dos recursos para a produção de petróleo, o aumento do preço do petróleo e o mais relevante de todos são os problemas

ambientais, com destaque para o aumento das emissões de poluentes nocivos, aumento do aquecimento global e dos gases de efeito estufa. Com isso, o uso de energias limpas, principalmente de combustíveis de fontes alternativas, como o biodiesel, ganhou força por apresentar diversas vantagens em relação aos combustíveis derivados do petróleo. Porque são biodegradáveis, não tóxicos, têm menos poluentes, têm baixo teor de enxofre e são seguros (Zahan & Kano, 2018).

2.5 Biocombustíveis e biodiesel

Nos últimos anos a crise do petróleo veio à tona, pois o combustível aumentou significativamente devido ao desenvolvimento exponencial da população. Por outro lado, a literatura cita que muitos tipos de pesquisas estão em desenvolvimento para novas formas de produção de biocombustíveis no Brasil e no mundo e que são desvinculadas do petróleo, onde a biomassa pode ser uma dessas principais alternativas por ter excelente disponibilidade, é biodegradável e de baixo custo (Suarez et al., 2009).

Segundo Salaheldeen et al., (2021), a conversão de fontes de energia renováveis a partir de combustíveis alternativos tem estado em evidência a cada dia. E um dos combustíveis mais promissores é o biodiesel, que pode ser produzido a partir de diversas fontes naturais, como óleos vegetais, gorduras animais e resíduos domésticos de óleos. Esse uso expressivo se deve à sua capacidade de se renovar, de se biodegradar, de emitir menos gases poluentes, de não ser tóxico, de ter alto ponto de fulgor, de aumentar a vida útil e operacional dos motores e menor desgaste das peças, devido a sua alta capacidade de lubrificação. É um combustível com capacidade de competir com o petróleo, do ponto de vista econômico e principalmente do ponto de vista ambiental.

A utilização de óleos vegetais foi inicialmente utilizada por Adolf Diesel, que utilizava óleo de amendoim como combustível em um motor. No entanto, o problema com o uso de óleos vegetais como fontes de combustível é sua alta viscosidade e baixa volatilidade. Porém, podem ser melhorados com outras técnicas, como pirólise, blending, microemulsificação e o processo de transesterificação, que é mais viável e utilizado ultimamente. O biodiesel é produzido por transesterificação pela reação de lipídios de óleos e gorduras com álcool. É possível ser uma fonte de extração de óleo usando borra de café (Sokač et al., 2020).

Ainda é um grande desafio produzir biocombustíveis a partir de matérias-primas que atendam às exigências impostas pelos programas energéticos e que não impactem a produção mundial de alimentos (Suarez et al., 2009).

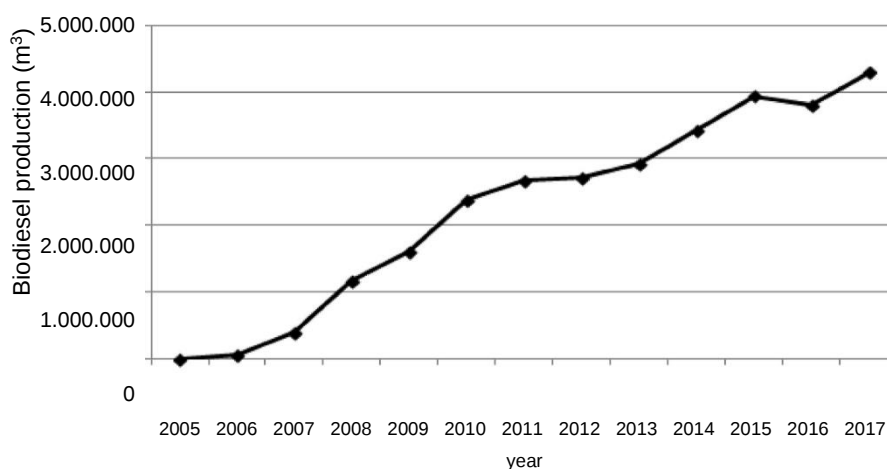
2.6 Biodiesel no Brasil

O Brasil foi pioneiro na produção de biodiesel e estimulou a aplicação de políticas públicas que aliem a equidade social à produção desse biocombustível. Mas com todas as expectativas criadas, há preocupações com a produção de matérias-primas que possam impactar a Sociedade (Costa & Oliveira, 2022).

Somente em 2004 surgiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) do governo federal, onde foram definidos os parâmetros para a produção e uso do biocombustível. O Brasil foi o país precursor no desenvolvimento e produção de biodiesel por volta de 1980 (Camargos, 2005).

O biodiesel brasileiro tem como principal matéria-prima o óleo de soja; também há uso para girassol, amendoim, mamona e dendê, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. O óleo residual é mais comumente usado no sul do Brasil. O biodiesel teve aumento em sua produção graças ao aumento das ampliações de suas unidades, onde a capacidade média aumentou dez vezes mais em relação ao ano de 2005 (Rodrigues, 2021). O teor de biocombustível na mistura de diesel foi designado inicialmente como 2%; esse percentual vem crescendo gradativamente até chegar a 13% e pode chegar a 15% em 2023.

Figura 1. Produção de biodiesel (2004 a 2017)



Fonte: Rodrigues (2021).

A utilização da energia proveniente de biomassa pode ter um impacto positivo na redução das emissões de gases causadores do efeito estufa e na diminuição da dependência de combustíveis fósseis como carvão, gás natural e petróleo. Aqui estão algumas razões pelas quais isso ocorre:

Menor emissão de CO₂: Embora a queima de biomassa libere dióxido de carbono (CO₂), a quantidade liberada é compensada pela absorção de CO₂ pelas plantas durante o crescimento. Portanto, o ciclo de carbono é relativamente neutro em carbono, contribuindo para menores emissões líquidas de CO₂ quando comparado aos combustíveis fósseis.

Redução do desmatamento: O uso de biomassa como fonte de energia pode reduzir a pressão sobre as florestas, pois muitas vezes é derivada de resíduos agrícolas, florestais e industriais, em vez de serem colhidas diretamente de áreas florestais primárias.

Menor poluição atmosférica: A queima de biomassa pode produzir menos poluentes atmosféricos em comparação com a queima de combustíveis fósseis, como enxofre e partículas. Isso pode levar a uma melhor qualidade do ar em áreas onde a biomassa é utilizada como fonte de energia.

Diversificação energética: O uso de biomassa diversifica a matriz energética, reduzindo a dependência de fontes de energia não renováveis e contribuindo para a segurança energética.

No entanto, é importante observar que a eficácia da biomassa como alternativa sustentável depende de vários fatores, como práticas de manejo florestal adequadas, tecnologias de combustão limpa e considerações socioeconômicas. Além disso, o uso de biomassa não está isento de impactos ambientais, e é crucial garantir que sua produção e uso sejam realizados de forma sustentável, levando em conta preocupações ambientais, sociais e econômicas.

2.7 Borra de café para produção de biodiesel

O café é um dos produtos agrícolas mais importantes do mundo. Possui três características principais (acidez, aroma e sabor), dela derivam mais de 1500 substâncias químicas, das quais 850 são voláteis e 700 solúveis. Depois de extraídos em água, alguns compostos hidrofóbicos (óleos, lipídios, triglicerídeos e ácidos graxos) e carboidratos insolúveis (celulose e vários açúcares indigeríveis) permanecem no pó, assim como

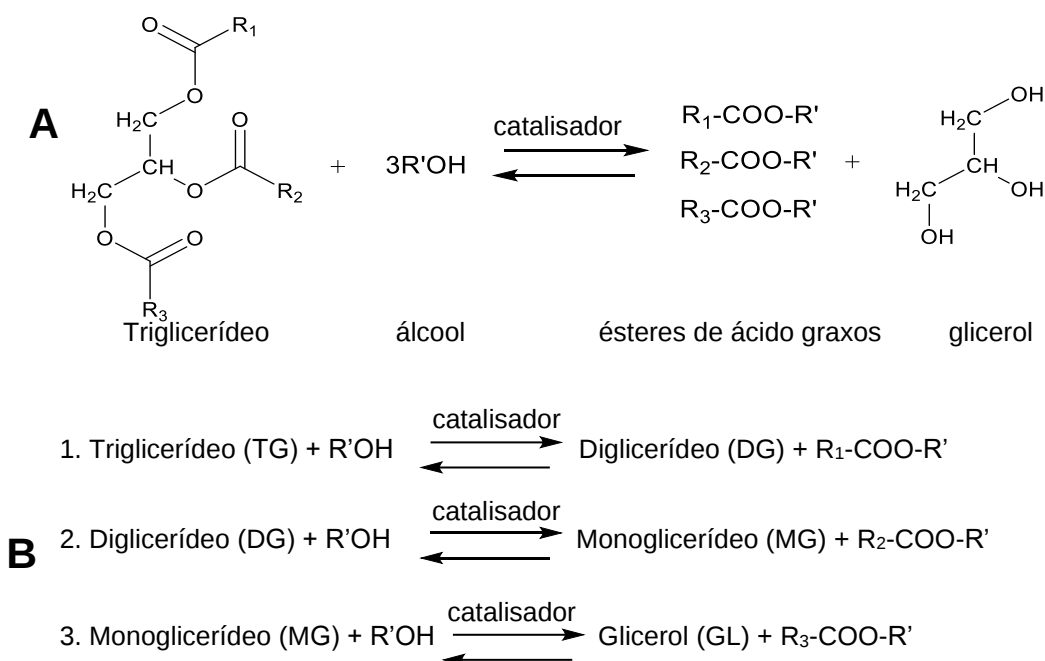
lignina, fenólicos e óleos essenciais também estão presentes em sua composição. grãos (Blinová et al., 2017).

De acordo com Jin; Zhang (2018) o café é uma das bebidas mais consumidas no mundo em média, 8 milhões de toneladas, com crescimento de cerca de 1,5% ao ano. Assim, sua jazida é uma alternativa viável para a geração de energia por meio da extração do óleo nela contido. Pode ser uma fonte promissora para a geração de biocombustíveis, com destaque para o biodiesel.

Com a crescente tecnologia no estudo do biodiesel, um dos motivos que restringe sua produção é o preço de algumas matérias-primas. Após a extração do óleo, esse lodo ainda pode ser reaproveitado para a produção de combustíveis sólidos. Assim, ao utilizar o óleo extraído da borra do café, torna-se benéfico financeiramente e ambientalmente (Zhang H, 2018).

A Transesterificação de triglicerídeos com álcool é um processo fundamental na produção de biodiesel e outros produtos químicos derivados de óleos vegetais e gorduras animais. Na sua forma genérica, a equação representa a transformação dos triglicerídeos em ésteres metílicos ou etílicos, essenciais para a fabricação de biodiesel.

Figura 2. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (A) Equação genérica; (B) três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' representam grupos alquil



Fonte: Camargos (2005).

Durante esse processo, ocorrem três reações consecutivas e reversíveis, onde os grupos alquil (representados por R1, R2, R3 e R') são transferidos dos triglicerídeos para o álcool. Essas reações resultam na formação de ésteres e glicerol como produtos finais. Essa representação visual oferece uma compreensão clara do mecanismo da transesterificação e sua importância na produção de biocombustíveis e outros compostos químicos.

2.8 Composição química do café

Desde 2010, o café aumentou de 140 para 152 milhões de sacas. É uma das maiores commodities, gerando uma grande quantidade de resíduos, tornando-se um desafio quando se trata de seu descarte. Ainda assim, também pode se tornar uma oportunidade de aproveitamento de sua biomassa (Janissen & Huynh, 2018).

Fatores ambientais podem afetar e alterar a composição do café. Dentre eles podem ser citados o armazenamento, métodos de colheita, beneficiamento, secagem, tipo de café, entre outros (Camargos, 2005). Como visto na Tabela 1, os dados adaptados de MOURA et al., 2019.

Tabela 1. Composição química do café verde.

Componentes	Café arábica (%)		Café canéfora (%)
Carboidratos solúveis	9-12.5	0.2-0.5	6-11.5
Monossacarídeos			
Oligossacarídeos	6-9	3-4	3-7
Polissacarídeos			
Polissacarídeos insolúveis	46-53	0.1	34-44
Hemicelulose	5-10		3-4
Celulose, b (104) manano	41-43		32-40
Ácidos voláteis		1-3	
Ácidos alifáticos não voláteis	2-2.9		1.33-2.2
Ácido clorogênico	6.7-9.2	7.7-17.7	7.1-12.1
Lignina			
Lipídios	15-18	11.0-15.0	8-12
Óleo			
Compostos nitrogenados		0.2-0.8	
Aminoácidos livres			
Proteínas		8.5-12	
Cafeína	0.8-1.4		1.7-4.0
Trigonelina	0.6-1.2	3.0-5.4	0.3-0.9
Minerais			

Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

2.9 Estudo da composição lipídica da borra de café

Segundo Camargos (2005), o óleo de café apresenta sua composição de glicerídeos e não glicerídeos; os óleos vegetais, principalmente o café, são compostos por mais de 90% de glicerídeos e um dos mais formados por triglicerídeos, monoglicerídeos e diglicerídeos, respectivamente.

A esse respeito, Moura et al. (2019), apontam que a fração lipídica do café possui de 10 a 15% de ácidos graxos saturados e insaturados e pode ser uma fonte alternativa de triglicerídeos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Composição lipídica do café

Tipos de tratamentos com café	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico
Café Cru	34%	9%	10%	41%	1%
Café Torrado	35%	9%	10%	40%	1%

Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

A produção de biodiesel pode envolver o uso de enzimas em certos processos. As enzimas são frequentemente utilizadas em etapas específicas da produção de biodiesel, como a transesterificação, que é o processo de conversão de óleos vegetais ou gorduras animais em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que são os componentes principais do biodiesel. As enzimas podem atuar como catalisadores nesse processo, acelerando a reação química e aumentando a eficiência da produção de biodiesel.

2.10 Lipase

Essa classe de enzimas está amplamente disponível na natureza e é obtida de várias fontes: vegetal, animal e microbiana. Devido à sua versatilidade, as lipases são alvo de muitos estudos. Suas propriedades específicas de substrato os tornaram amplamente utilizados em escala industrial, especialmente os microbianos, porque são mais facilmente produzidos em massa (Roveda et al., 2010).

A lipase é uma enzima que atua nos lipídios; estes são da classe hidrolases de éster de triacilglicerol (EC 3.1.1.3) (Okoro et al., 2019). Essas enzimas têm sido foco de estudos como catalisadores na obtenção de biolubrificantes. Em qualquer aplicação na indústria, as enzimas imobilizadas ganham destaque, pois quando a imobilização é feita

corretamente, há melhorias significativas em sua estabilidade, atividade e seletividade, entre outros benefícios. A imobilização de enzima é uma importante ferramenta capaz de processar a aplicação de biocatalisadores, permitindo a reutilização e redução de sua inativação por meio de temperatura e solventes orgânicos, melhorando a estabilidade operacional da enzima. (Fernandes et al., 2021).

Em 1990, foi relatado por Mittelbach, a utilização de lipases no processo de reações de transesterificação para a produção de biodiesel a partir do óleo de girassol. Ao longo dos anos, muitos trabalhos foram escritos sobre lipases onde se pode concluir que elas poderiam produzir biodiesel a partir de diferentes fontes de óleo, como pode ser visto na Tabela 3 dos dados adaptados da literatura (Amini et al., 2017; Bueso et al., 2015; Chen et al., 2009; Dizge et al., 2009; Huang et al., 2012; Lee et al., 2010; Naranjo et al., 2010; Okoro et al., 2019; Shah et al., 2004; Yagiz et al., 2007).

Tabela 3. Produção de biodiesel usando lipase como catalisador

Substrato	Lipase	Álcool	Forma	Referências
Óleo de semente de Ocimum basilicum (manjerição doce)	Candida antártica B	CH ₃ OH	Imobilizado em resina acrílica	(Amini et al., 2017)
		CH ₃ OH	Imobilização em uma matriz anfílica	(Lee et al., 2010)
Azeite		Isobutanol	Imobilizado em carvão ativado granular	(Naranjo et al., 2010)
Óleo de Jatrofa	Thermomyces lanuginosus (TL) 1,3, lipase específica	CH ₃ OH	livre	(Bueso et al., 2015)
Canola		CH ₃ OH	Imobilizado em copolímero de estireno-divinilbenzeno microporioso hidrofóbico	(Dizge et al., 2009)
Resíduos de cozinha		CH ₃ OH	Imobilizado em hidrotalcita e zeólitas	(Yagiz et al., 2007)
Óleo de Jatropha	Chromobacterium viscosum	CH ₃ CH ₂ OH	Imobilizado em Celite-545	(Shah et al., 2004)
Resíduos de óleo de cozinha	Rhizomucor miehei exibindo Pichia pastoris	CH ₃ OH	Imobilizado em tecido têxtil	(Chen et al., 2009)
Soja		CH ₃ OH	Usado como biocatalisador de células inteiras (Pichia pastoris)	(Huang et al., 2012)
Óleo de colza	Saccharomyces cerevisiae	CH ₃ OH	Imobilizado em hidrocalcita Mg-Al	(Zeng et al., 2009)
Sebo e graxa	Burkholderia cepacia	CH ₃ CH ₂ OH	Imobilizado em sol-gel de filosilicato	(Hsu et al., 2001)
Óleo de babaçu		CH ₃ CH ₂ OH	Imobilizado em SiO ₂ -PVA	(Da Rós et al., 2010)
Azeite de dendê	Apergillus niger	CH ₃ OH	Usado como uma célula inteira biocatalisador	(XIAO et al., 2010)
Óleo de soja	Rhizopus oryzae ATCC 24563	CH ₃ OH	Usado como uma célula inteira biocatalisador	(Y. H. Lin et al., 2011)
Óleo de soja	Pseudomonas fluorescens	CH ₃ OH	Livre	(Kaieda et al., 2001)

Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

2.11 Estudo *in silico*

Atualmente, existem diversas formas de estudar compostos sem a necessidade de utilizá-los fisicamente. Assim, isso é possível graças aos avanços da ciência que podem prever os efeitos colaterais de drogas e substâncias em nosso corpo e compostos que podem se ligar a outros. Diante de diversas ferramentas científicas que temos para estudos, fica mais barato, e uma das principais são os recursos computacionais. O que pode ser feito a partir de experimentos *in silico*, simulando o material biológico, onde são escolhidos os melhores ligantes para serem sintetizados e depois os ensaios *in vitro* e *in vivo* se necessário (SOUZA, 2015).

Esse tipo de estudo tornou-se uma ferramenta essencial para químicos e físicos, pois facilitam o entendimento molecular e atômico como um dos primeiros passos para sintetizar muitos compostos e se tornam ferramentas cada vez mais poderosas para o desenvolvimento de novos compostos (Serrano & Neto, 2011).

2.12 Docking molecular

Barros (2015), também descreve que é possível fazer uso de simulações computacionais para a previsão de moléculas, melhorando uma estrutura com outras, sem que seja necessário estar em um laboratório e analisá-las fisicamente, podendo prever as orientações, estabelecer qual ou quais moléculas são melhor acomodadas no sítio ativo de outras através do docking molecular. A molécula escolhida é aquela que apresenta menor quantidade de energia para fazer a ligação com o sítio ativo, ou seja, aquela que dá o melhor resultado da atividade biológica. Portanto, na seleção de uma molécula para interagir com um sítio ativo biológico, é crucial considerar não apenas sua capacidade de se ligar ao sítio ativo, mas também a eficiência energética dessa interação. A molécula escolhida é aquela que demonstra a menor quantidade de energia necessária para estabelecer uma ligação estável com o sítio ativo. Essa escolha é fundamental para otimizar a atividade biológica desejada, uma vez que a interação molecular mais favorável tende a resultar em uma resposta biológica mais eficaz.

Com o avanço da tecnologia surgiram os computadores, que possibilitaram desenvolver mais e melhores técnicas de análise e armazenamento de dados, tornando viável o estudo e desenvolvimento de diversos compostos e fármacos através da bioinformática. A partir de então, as indústrias, principalmente as farmacêuticas, estão

utilizando a modelagem molecular para aprimorar seus produtos por meio da tecnologia e reduzir o custo de aquisição de reagentes (Barnea & Dori, 1996).

Ainda segundo Sousa (2015), a técnica de modelagem molecular é feita a partir dos elementos que se deseja estudar; são representações de suas estruturas aproximando-se muito do modelo real; a modelagem é feita por meio de uma série de cálculos, que envolvem química teórica por meio de computação gráfica e modelos matemáticos, facilitando a relação entre a estrutura e a atividade biológica do composto estudado, como a composição lipídica da borra de café.

3. METODOLOGIA

Figura 3. Esquema metodológico



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

3.1 Modelagem de Homologia

Primeiro, foi realizada uma modelagem comparativa de quatro etapas da proteína Eversa lipase transform 2.0® (Bresolin et al., 2020).

3.1.1 Identificação e seleção de proteínas dobradas

A sequência de aminoácidos da proteína lipase Eversa (número CAS 9001-62-1 da empresa Sigma-Aldrich) foi submetida a uma análise comparativa usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) e seu banco de dados PDB. Assim, foi identificada no organismo *Aspergillus oryzae* uma proteína relacionada à sequência de aminoácidos (a enzima lipase, classificada como hidrolase), expressa através da lançadeira *Escherichia coli*-*Pichia pastoris*, obtida no Banco de Dados de Proteínas com o código 5XK2 como proteína alvo.

3.1.2 Alinhamento de Sequências de Alvo e Molde

O alinhamento entre as sequências foi realizado com o uso do software Modeller (Webb & Sali, 2016).

3.1.3 Construção e Otimização de Modelos

A construção do modelo foi realizada pelo programa Modeller 10.4 (Webb & Sali, 2016), resultando em uma nova proteína denominada Eversa, que foi avaliada quanto à função, alvo e parâmetros estereoquímicos (Bedoya & Tischer, 2015).

3.1.4 Validação de Proteína

A validação do modelo foi realizada nos níveis estereoquímico, conformacional e energético. A qualidade do modelo gerado foi validada pela plotagem de Ramachandran (Ramachandran & Sasisekharan, 1963) com o software PROCHECK, que avaliou sua estrutura tridimensional e indicou a possível qualidade estereoquímica (Laskowski et al., 1993).

3.2 Preparação de Proteína

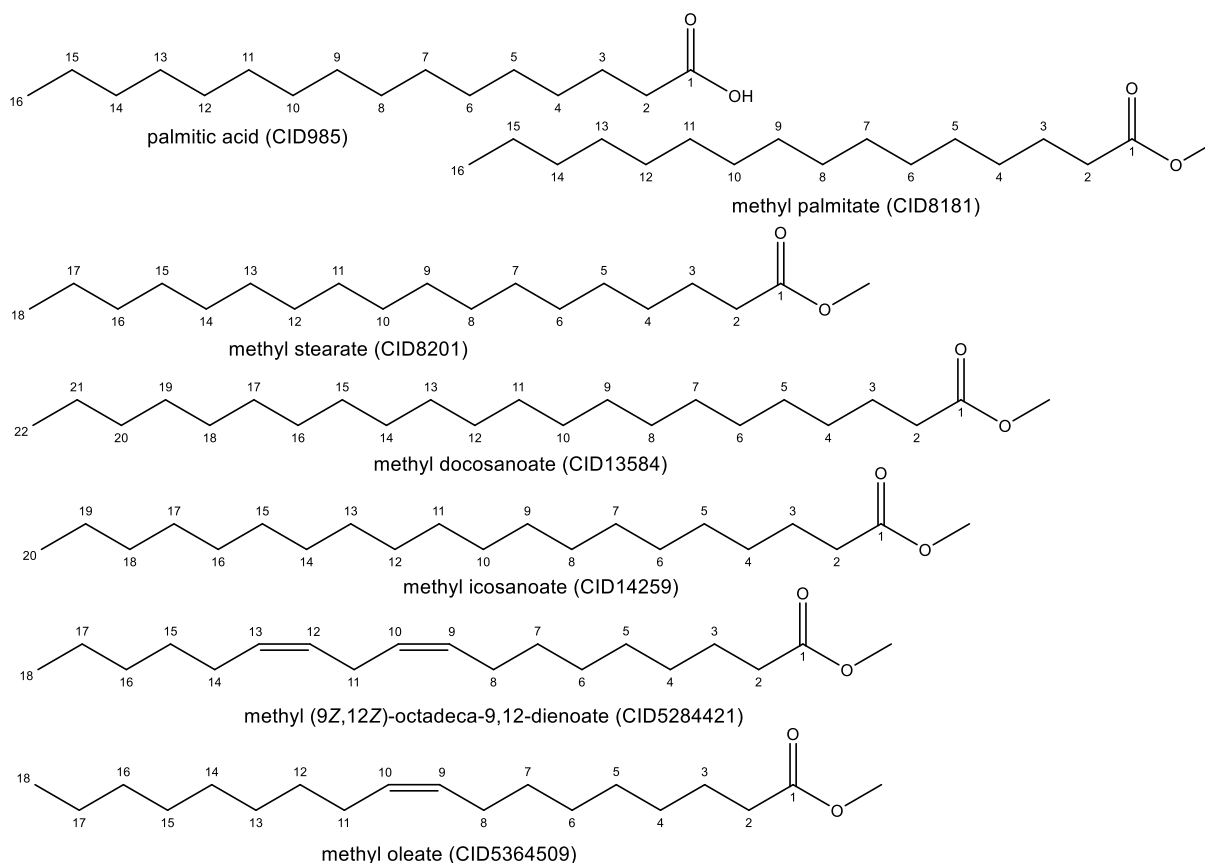
A proteína criada pela homologia Eversa foi submetida a um processo de correção de cargas e adição de átomos de hidrogênio através do software AutoDock Tools (Morris et al., 2009).

3.3 Obtendo o ligante

As estruturas da composição lipídica dos óleos de *Coffea arabica* (Figura 6) foram criadas no software ChemDraw 3D e depois minimizadas usando um campo de força MM2 com gradiente RMS de 0,0001 (Ahmadi et al., 2005). Para otimização

estrutural, o setup foi realizado no software Avogadro® (Hanwell et al., 2012), configurado com o campo de força molecular Merk (MMFF94), com ciclos de 500 interações e um algoritmo mais íngreme com limite de convergência de $10e^{-7}$ (Halgren, 1996) e depois convertido para o formato PDBQT.

Figura 4. Estrutura 2D da composição lipídica da espécie vegetal *Coffea arabica*



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

3.4 Docking Molecular e Visualização de Cálculos

Simulações de acoplamento molecular foram realizadas com o código AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009), considerando tanto proteínas rígidas quanto ligantes flexíveis. Para ambos os cálculos, foi realizada uma configuração de rede com os parâmetros do sítio ativo da enzima (Ben Hlima et al., 2021; Cen et al., 2019). Os perfis de energia das interações ligante-receptor também foram avaliados pelo software, e a visualização das posições ancoradas foi realizada pelo PyMol (DeLano, 2020).

O parâmetro estatístico RMSD (Root Mean Square Deviation) com valores até 2,0 Å (Yusuf et al., 2008) e energia de afinidade, com valores inferiores a -6,0 kcal/mol, (o que é esperado) (Shityakov & Förster, 2014; Silva et al., 2021), e a energia de afinidade

também foi utilizada para avaliar a estabilidade dos complexos formados. Utilizando os valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, avaliou-se a intensidade das ligações de Hidrogênio (H-Bond) classificadas como ligações fortes quando apresentam distâncias entre 2,5-3,1 Å, ligações médias entre 3,1-3,55 Å e fracas ligações quando apresentam comprimento maior que 3,55 Å (Rose et al., 2018).

Para encontrar locais de conexão de imobilização, o CASTp 3.0 foi usado para identificar e medir bolsões de superfície alcançáveis (Tian et al., 2018). Alguns critérios deveriam ser atendidos para que a imobilização selecionada fosse aceita: o sítio deveria estar distante do centro catalítico ativo da enzima para não afetar a atividade catalítica; o tamanho do site/pocket deve ser grande o suficiente para acomodar o link de afinidade selecionado; e, finalmente, as propriedades de superfície da região do sítio precisam ser significativamente diferentes daquelas do sítio ativo.

3.4.1. Análise estatística

Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média para cada grupo de estudo. Após confirmação da distribuição normal e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (one-way ANOVA) e two-way ANOVA em experimentos com antagonistas (Fujikoshi, 1993), seguido do teste de Tukey (Lin & Zhang, 2018). Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism v.8.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

3.5 Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas com o programa NAMD (Phillips et al., 2005). As melhores conformações obtidas no acoplamento molecular foram resolvidas em água no modelo TIP3P (Kato et al., 2021), no campo de força CHARMM36 e adição de íons para neutralizar a carga total do sistema. Por fim, foi submetido à minimização de energia pelo método Steepest Descent. O sistema foi então introduzido nas balanças NVT e NPT nas condições descritas por Langevin (Fargo, 2019). As simulações de produção do sistema foram realizadas com um tempo de 100 ns. O BLA foi utilizado como ligante de referência para analisar as interações do complexo formado. A qualidade das estruturas obtidas em MDs foi avaliada usando os seguintes parâmetros com NAMD:

- Energia Potencial (kcal/mol) (Diez et al., 2014);
- Energia de Interação Ligante-Proteína (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 pontes de hidrogênio foram avaliadas com Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996).
- A flutuação quadrática média das distâncias mínimas entre proteínas e ligantes foi observada em DM (RMSF, Å) (Arshia et al., 2021). Os gráficos foram gerados utilizando o programa Qtrace (Lima et al., 2012).

3.5.1. Cálculos MM/GBSA

Com base no arquivo de log MD do software NAMD (Phillips et al., 2005), o MM/GBSA foi calculado por MolAICal (Bai et al., 2021) e foi estimado pelas equações 1-3.

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

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

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

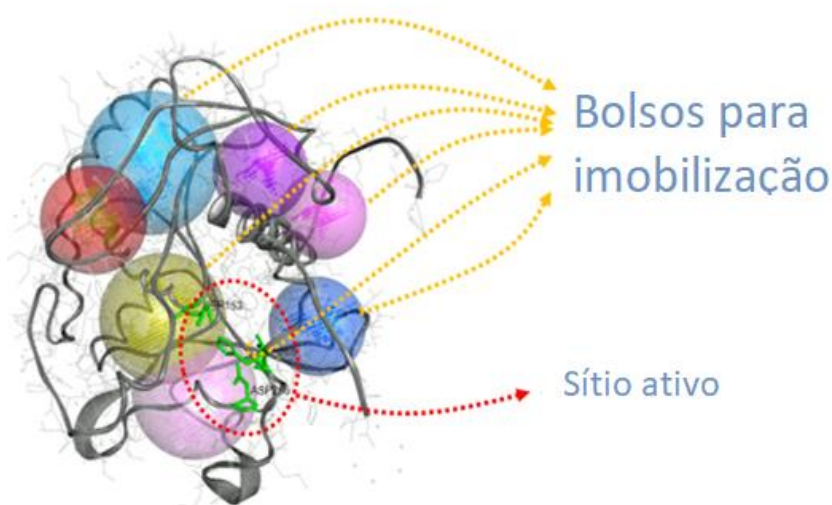
Onde ΔE_{MM} , ΔG_{sol} e $T\Delta S$ representam a energia MM da fase gasosa, energia livre de solvatação (soma da contribuição polar ΔG_{GB} e contribuição apolar ΔG_{SA}) e entropia conformacional, respectivamente (Gohlke et al., 2003; Gohlke & Case, 2004). Verificando a equação é possível observar que na eq. da Energia Livre de Gibbs tem-se as contribuições de duas formas de energias bem importantes, que são A entalpia e a entropia, percebe-se que quanto maior a entropia, mais negativa será a energia de Gibbs, contudo, a energia utilizada para o aumento de entropia não está disponível para a realização de trabalho, logo a eficiência do processo diminui. ΔE_{MM} contém energia de Van Der Waals ΔE_{vdw} , eletrostática ΔE_{ele} e $\Delta E_{\text{interna}}$ de ligação, ângulo e energia diedro. Se não houver mudanças estruturais induzidas por ligação no processo de simulações MD, o cálculo da entropia pode ser omitido (DasGupta et al., 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Locais de imobilização

Para descobrir locais de imobilização, o CASTp foi empregado para selecionar bolsas de superfície acessíveis para ligação (Tian et al., 2018). Com base no princípio da seleção do sítio de imobilização, foram identificadas sete cavidades distantes da tríade catalítica – equivalente ao sítio ativo da enzima - conforme ilustrado na Figura 4. Essa abordagem ajuda a evitar a competição durante o processo de biocatálise. Vale ressaltar que essa estratégia oferece vantagens em relação a outros métodos de imobilização, pois minimiza a interferência na atividade catalítica da enzima. Além disso, imobilizar a enzima em locais distantes da área ativa pode aumentar sua estabilidade, prolongando sua vida útil e reduzindo os custos de manutenção associados à substituição do biocatalisador.

Figura 5. Detecção de sete cavidades pelo CASTp.



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

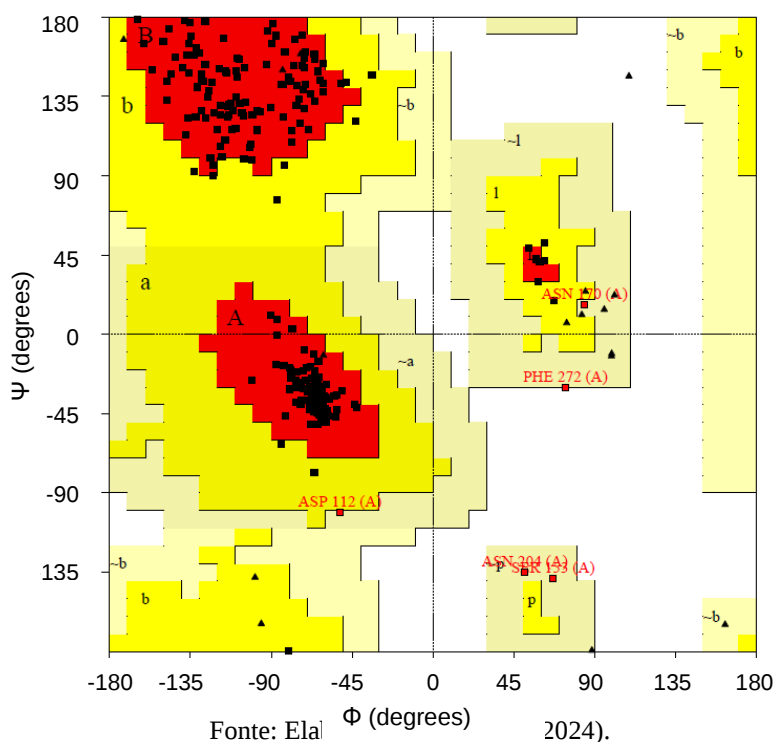
4.2 Modelagem de Proteínas

O gráfico de Ramachandran (Figura 5) foi usado para avaliar a qualidade da estrutura da proteína. Este gráfico mostra a distribuição de resíduos de aminoácidos em diferentes regiões da estrutura da proteína com base em seus ângulos de torção de espinha dorsal. A maioria dos resíduos (91,5%) foi encontrada nas regiões favoráveis (região vermelha), indicando a boa qualidade da estrutura da proteína. Uma pequena porcentagem de resíduos (6,5%) foi encontrada em regiões adicionalmente permitidas (regiões a, b, l, p, amarelo), enquanto uma porcentagem ainda menor (1,6%) estava nas

partes generosamente permitidas ($\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$ regiões, amarelo claro). Apenas 0,4% dos resíduos estavam nas regiões desfavoráveis (região vazia), o que pode ser atribuído ao uso de templates para predição da estrutura da proteína e alguns resíduos localizados nas extremidades da proteína. Estes resultados confirmam a confiabilidade do modelo de proteína obtido.

Além disso, o alinhamento da estrutura protéica prevista com outras estruturas protéicas conhecidas permitiu a identificação de regiões conservadas e variáveis na sequência primária da proteína. Comparando os resíduos estruturalmente equivalentes em diferentes proteínas, é possível determinar quais áreas da proteína são essenciais para sua estrutura e função. Este processo foi usado para identificar resíduos críticos na proteína lipase estudada (Pal et al., 2014).

Figura 6. Gráfico de Ramachandran de Eversa modelado.



4.3 Interação entre Substrato e Lipase

Estudos de pareamento molecular foram realizados para validar as abordagens usadas para explicar os resultados observados para Eversa. Consistente com as forças de van der Waals relatadas na literatura, as ligações de hidrogênio foram favoráveis com afinidades de ligação indicadas por estudos de acoplamento molecular (Barbany et al., 2015). Portanto, para fins de imobilização, a lipase Eversa foi estudada estruturalmente por modelagem molecular com uma pesquisa de ligação de lipase usando o software

AutoDock Vina e DS para prever sua afinidade, orientação e superfícies ambientais (Chaturvedi et al., 2015).

O sítio catalítico Eversa é uma tríade representada pelos resíduos Ser 153, His 268 e Asp 206 (Ben Hlima et al., 2021; Cen et al., 2019; Silvestrini & Cianci, 2020), dos quais o resíduo serina atua como um nucleófilo no grupo carbonila do substrato para biorreações de esterificação apenas dentro do bolso do substrato (Hari Krishna & Karanth, 2002; Stergiou et al., 2013). Somente substratos de formas moleculares adequadas podem ocupar esses subsítios e sofrer catálise, como os ácidos carboxílicos e ésteres presentes na composição do óleo da borra de café.

A afinidade de ligação para o óleo da composição ancorada com a enzima foi estimada entre -5,1 kcal/mol a -6,1 kcal/mol (Tabela 4). A menor energia de ligação sugere que a combinação de substrato e lipase foi mais estável e adequada para esterificação. Os resultados da simulação são mostrados em 2D na Figura 6.

Tabela 4. Composição do óleo e resultados de ancoragem molecular.

Amostra	Energia de afinidade de ligação (kcal/mol)	RMSD (Å)
CID985 Ácido hexadecanóico	-5.6	1.679
CID8181 Hexadecanoato de metila	-5.4	1.321
CID8201 Octadecanoato de metila	-5.6	1.579
CID13584 docosanoato de metila	-5.4	1.132
CID14259 eicosanoato de metila	-5.7	1.613
CID5284421 6_9 octadienoato de metila	-6.1	1.649
CID5364509 octadecenoato de metila	-5.7	1.952

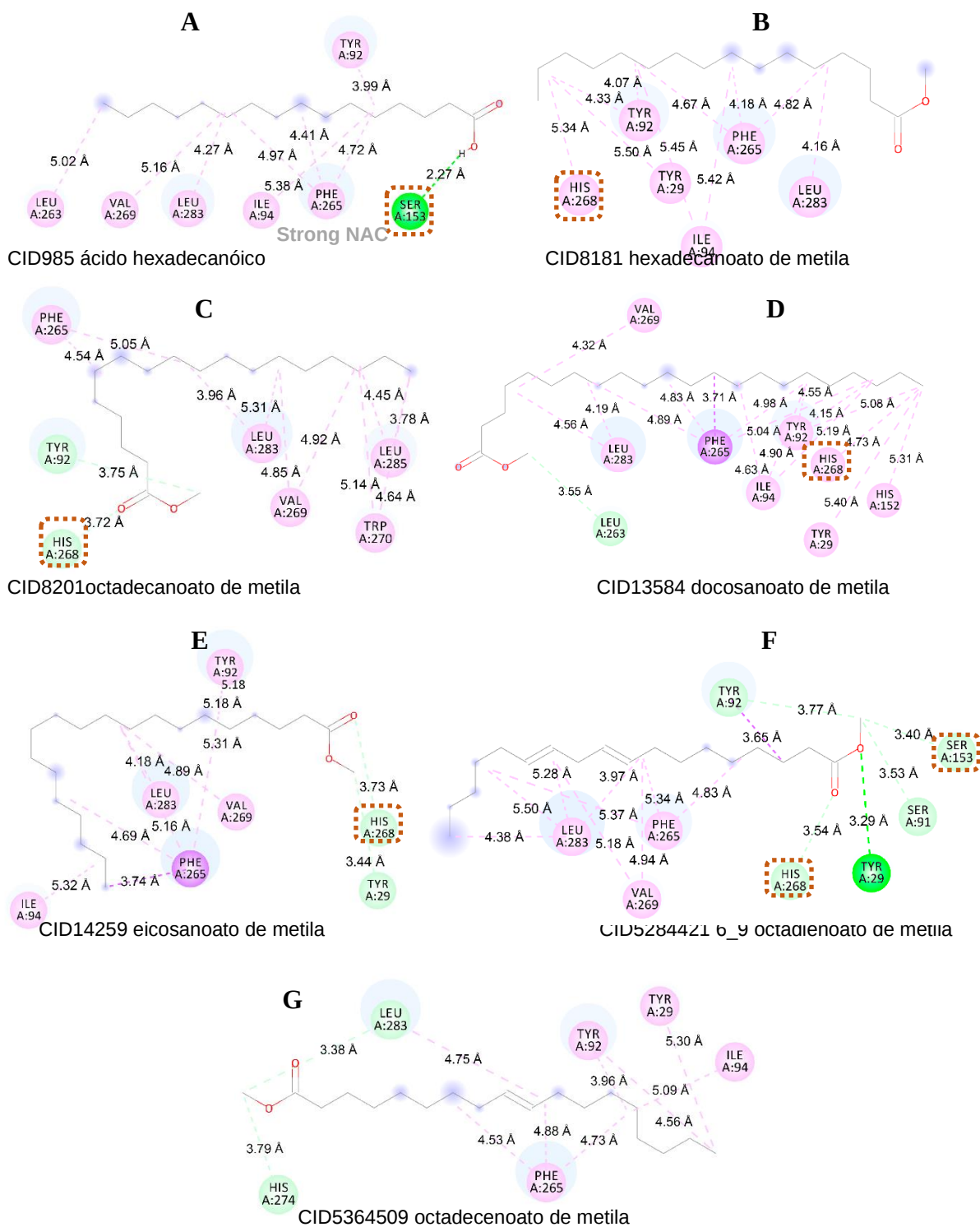
Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

Observou-se que, de acordo com o estudo de docking molecular, com exceção do composto metílico octadecenoato, os demais derivados interagiram com pelo menos um dos resíduos da tríade catalítica, mais precisamente com a aproximação da região do ácido carboxílico a Ser 153 e também da His 268, que, segundo a literatura, favorece ligeiramente a formação de um éster na reação de esterificação (Cen et al., 2019).

As conformações quase ataque (CQA) são definidas como compatíveis com conformações com ataque do sítio catalítico ao carbono eletrofílico do grupo acila (Bruice & Lightstone, 1999). Em um NAC (Near Attack) típico, a distância entre o oxigênio do resíduo Ser 153 (Eversa) e o carbono carbonílico é geralmente observada como próxima a 3 Å de comprimento. Os mesmos átomos e a molécula de oxigênio da carbonila tendem

a formar um ângulo de aproximadamente 60°, com máximo de 90° (Corici et al., 2015), o que demonstrou um NAC forte para o composto ácido hexanóico.

Figura 7. Substrato em 2D – (a) ácido hexadecanóico; (b) hexadecanoato de metila; (c) octadecanoato de metila; (d) docosanoato de metila; (e) eicosanoato de metila; (f) octadienoato de 6,9 metil; (g) octadecenoato de metila.

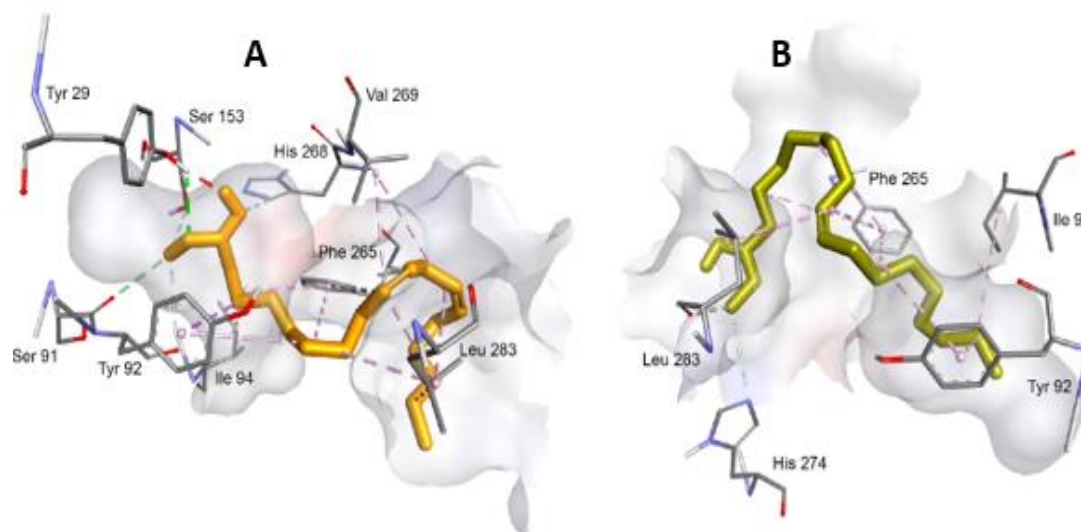


Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

Assim, para aprofundar, este texto descreve uma investigação sobre as interações entre diferentes compostos químicos e uma enzima específica. A imobilização da enzima é um processo crítico para torná-la mais estável e eficiente em aplicações específicas. A tríade catalítica é uma parte fundamental da enzima que facilita sua função bioquímica.

Isso sugere que a tríade permanecerá ativa para a resposta Eversa após a imobilização. A composição do óleo que melhor interagiu com os resíduos enzimáticos foram 6,9 metil octadienoato e metil octadecenoato com afinidades de ligação de -6,1 kcal/mol e -5,7 kcal/mol, respectivamente. O octadecanoato de metila 6,9 apresentou uma ponte de hidrogênio na Tyr 29. Além disso, foram observadas interações hidrogênio-carbono convencionais na Tyr 92 e Ser 91, e resíduos que compõem a tríade catalítica: Ser 153 e His 268, onde ocorreu uma reação de esterificação. Além disso, interações hidrofóbicas foram observadas em Phe 265, Val 269 e Leu 283, todas do tipo alquil e π -alquil. Já para o octadecenoato de metila, foram observadas duas interações polares com os resíduos Leu 283 e His 274 do tipo hidrogênio-carbono, e interações apolares nos resíduos Tyr 29, Ile 94, Tyr 92 e Phe 265. Porém, nenhuma interação foram observados diretamente com os aminoácidos que compõem a tríade catalítica. Essas interações incluíram ligações de hidrogênio, interações hidrogênio-carbono e interações hidrofóbicas, que ajudam a estabilizar a enzima e permitem que ela funcione e são apresentadas na Figura 6 e na Tabela 5.

Figura 8. Interações entre 6,9 metil octadienoato (A) e metil octadecenoato (B) com resíduos de aminoácidos Eversa



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

Tabela 5. Interações entre resíduos de aminoácidos e composição lipídica da borra de café.

Amostra	Resíduos												
	Tyr 29	Tyr 92	Ile 94	His 152	Ser 153	Leu 263	Phe 265	His 268	Val 269	Trp 270	His 274	Leu 283	Leu 285
CID985 ácido hexadecanóico		3.99(HI)	5.38(HI)		2.27 (HB)	5.02(HI)	4.41(HI) 4.72(HI) 4.97(HI)		5.16(HI)			4.27(HI)	
CID8181hexadecanoato de metila	5.50(HI)	4.33(HI) 4.07(HI)	5.42(HI) 5.45(HI)				4.82(HI) 4.18(HI) 4.67(HI)	5.34(HI)				4.16(HI)	
CID8201octadecanoato de metila		3.75(CH)					4.54(HI) 5.05(HI)	3.72(CH)	4.85(HI) 4.92(HI)	4.64(HI) 5.14(HI)		3.96(HI) 5.31(HI)	3.78 4.45
CID13584 docosanoato de metila	5.40(HI)	4.15(HI) 4.55(HI) 5.08(HI)	4.63(HI) 4.55(HI) 5.19(HI)	5.31(HI)		3.55(CH)	3.71(PA) 4.83(HI) 4.89(HI) 4.98(HI) 5.04(HI)	4.73(HI)	4.32(HI)			4.19(HI) 4.56(HI)	
CID14259 eicosanoato de metila	3.44		5.32				3.74 4.96 5.16 5.31	3.73	4.89				
CID5284421 6_9 octadienoato de metila	3.29	3.65					4.83 5.34 5.18	3.54	4.94 5.18			3.97 4.38 5.28 5.50	
CID5364509 octadecenoato de metila	5.30	3.96	5.09				4.53 4.73 4.88				3.79	4.75	

Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

4.4 Dinâmica molecular

Um sistema termodinâmico que consiste em um soluto e um solvente pode ser modelado usando um complexo proteína-ligante-solvente-íon. Este complexo é caracterizado por vários tipos de forças intermoleculares, bem como trocas térmicas entre as moléculas e os íons presentes. As leis da termodinâmica ditam que a relação entre essas moléculas e como ocorre a transferência de calor está relacionada a diversas mudanças de energia, conforme evidenciado por estudos realizados anteriormente na literatura (Arcon et al., 2017; Beretta, 2020; Chinaka, 2021; Struchtrup, 2020).

Para entender melhor o comportamento desses complexos proteína-ligante, foram realizadas simulações de dinâmica molecular usando NAMD (Phillips et al., 2005). Estas simulações visaram avaliar possíveis alterações conformacionais globais e estabilidade da proteína após cada conformação, bem como obter informações sobre o mecanismo de interação dos complexos em nível molecular. Estudos recentes conduzidos por Bylehn et al. (2021) e Du et al. (2016) utilizaram essa técnica para obter informações valiosas sobre a estrutura e a função dos complexos proteína-ligante (Byléhn et al., 2021; Du et al., 2016).

4.4.1 Análise RMSD

Logo após a realização do docking molecular, a composição do óleo de borra de café foi selecionada por apresentar as melhores energias de ligação para realizar o estudo de dinâmica molecular, de acordo com o sítio catalítico da lipase Eversa transform 2.0 ® (Figura 7).

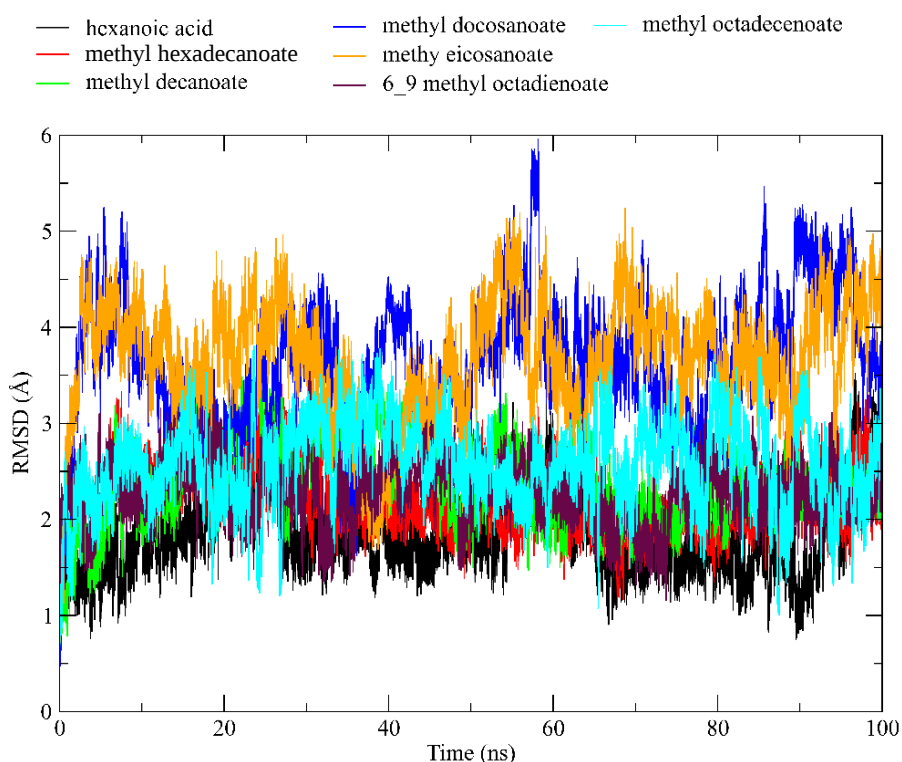
As simulações revelaram que os valores médios de RMSD para Eversa lipase permaneceram em torno de 3,1 Å ao longo dos estágios de produção de 100 ns. O 6,9 metil octadienoato apresentou valores estáveis com um RMSD médio de 2,0 Å ao longo de sua rota. A dinâmica molecular observada para o ácido hexanóico e hexadecanoato de metila com lipase apresentou maior estabilidade e consistência, com valor médio de RMSD abaixo de 2,0 Å na simulação. No entanto, outros ácidos apresentaram valores estáveis com RMSD acima de 2,0 Å, o que está de acordo com estudos anteriores como Cavallari et al. (2006) que usaram simulações MD para avaliar a estabilidade de uma enzima protease viral em uma solução aquosa com diferentes ligantes contendo níveis variados de hélice α e folhas β . As interações de longo alcance foram calculadas usando o procedimento SPME e um banho termal de Langevin a 310 K (Miyamoto et al., 2014).

Os desvios quadráticos médios (RMSD) foram usados para descrever as mudanças conformacionais da proteína observadas durante as simulações de MD.

As alterações conformacionais da proteína observadas durante as simulações de DM foram descritas por meio de desvios quadráticos médios (RMSD) na equação 5. $r_i(t)$ e $r_i(0)$ são as coordenadas do i -ésimo átomo no tempo t e 0, respectivamente, e N é o número de átomos no domínio de interesse.

$$RMSD = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 5.}$$

Figura 9. Root Mean Square Deviation (RMSD), referente à confirmação inicial do complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) na etapa de simulações de produção do MD com o complexo ligante-enzima versus o tempo de simulação (ns) em a etapa de simulações de produção do MD com composição de óleo de borra de café/lipase Eversa.



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

4.4.2 Análise RMSF

Com base na análise RMSD, a estabilidade dos complexos foi confirmada. No entanto, para obter informações mais detalhadas sobre as mudanças conformacionais observadas na proteína durante as simulações de dinâmica molecular (MD), as flutuações

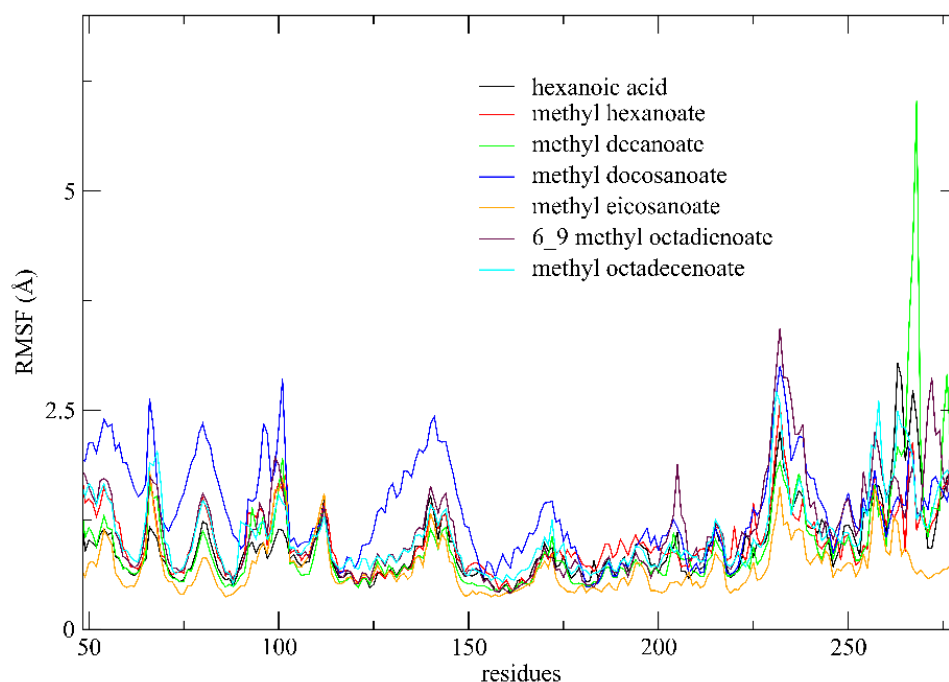
na estrutura média da proteína foram calculadas em termos de flutuações quadráticas médias (RMSF) das posições atômicas, que foram determinadas usando a equação 6. Os valores de RMSF foram calculados subtraindo-se a posição média de cada átomo $\bar{r}_i$ de sua posição em cada passo de tempo j , e então calculando os desvios quadráticos. O tempo total de simulação I foi expresso como o número total de etapas de tempo coletadas. Este cálculo forneceu informações mais detalhadas sobre a dinâmica da proteína durante as simulações, permitindo avaliar o impacto das interações com os complexos formados (Karplus et al., 1977; Vorobjev, 2001).

$$RMSF_i = \left[\frac{1}{3} \sum_{j=0}^3 [\bar{r}_i(j) - \bar{r}_i]^2 \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 6.}$$

O RMSF do sistema foi realizado para entender o deslocamento e a estabilidade de cada resíduo de proteína na trajetória da simulação de 100ns.

A Figura 8 ilustra as principais interações dos complexos líderes (composição do óleo da borra de café) estudados, sugerindo mudanças conformacionais significativas dos complexos composto-Eversa lipase durante a simulação. Os resultados indicam que as trajetórias de simulação de dinâmica molecular para todos os complexos apresentaram oscilações médias com correlações significativas com resíduos críticos na replicação (Qin et al., 2021; Roe & Brooks, 2020). Apenas os complexos formados entre metil decanoato com Eversa apresentaram valores superiores a 2,0 Å para os resíduos His 268. Além disso, observou-se que os complexos de lipase com metil docosanoato e 6,9 metil octadienoato apresentaram valores de RMSF acima de 2,5 Å, nos resíduos Phe 63, Thr 102 e Asn 232. Apesar das flutuações observadas, os resultados indicaram boa estabilidade das estruturas em solução aquosa. As conformações obtidas a partir de simulações de MD para ambas as proteínas foram complexadas com vários ligantes por meio de técnicas de docking, gerando informações importantes sobre os modos de ligação de pequenas moléculas em diferentes estados de enovelamento enzimático (Thirumalai et al., 2020).

Figura 10. 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 DM com composição de óleo de borra de café/lipase Eversa.



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

4.4.3 Análise de ligações Hidrogênio (H)

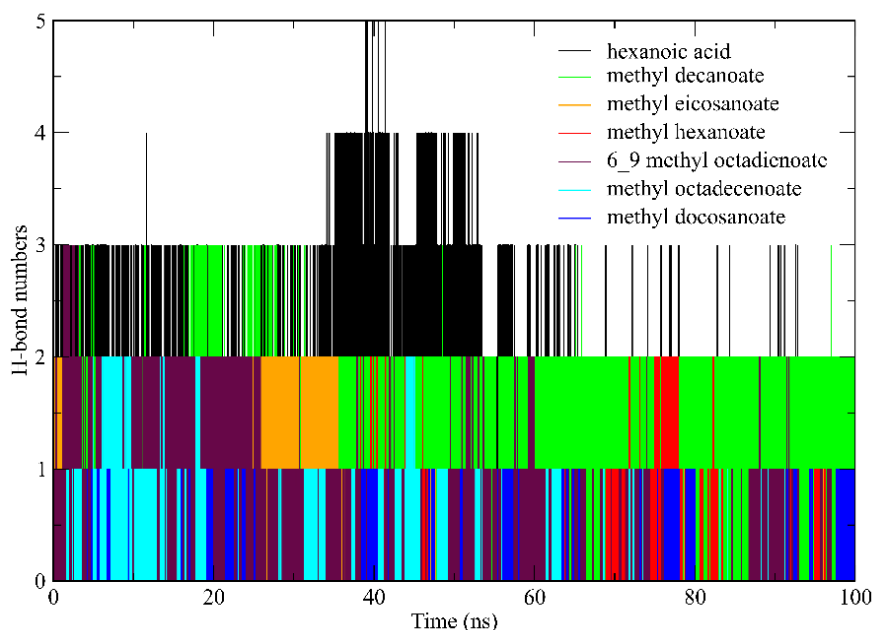
O número de ligações de hidrogênio, que de acordo com a literatura, no mínimo cinco é essencial para verificar se um complexo atingiu a estabilidade em um sistema dinâmico (Mascoli et al., 2021; Ragunathan et al., 2018).

Após os 100ns, foi possível verificar as pontes de hidrogênio formadas entre a Eversa lipase com seus respectivos ligantes simulados em longas etapas de produção em dinâmica molecular, na Figura 10. Durante a simulação, houve mudanças nas redes de ligações de hidrogênio, e o número das interações variaram entre 3 ou 5 para a lipase. No complexo Eversa com ácido hexanóico, as ligações de hidrogênio isoladas e o número médio moderado de ligações de hidrogênio por período (até 5 ligações) sugerem que as redes de ligações de hidrogênio eram relativamente adequadas e medianas. Foi formando conexões razoáveis durante sua trajetória. Metil decanoato e 6,9 metil octadecenoato MD mostraram ter mais interações ao longo do curso (3 links), sugerindo outra rede de ligação de hidrogênio, moderadamente mais significativa que a anterior.

Para a simulação dos demais ácidos com a enzima Eversa, foram formadas no máximo 2 pontes de hidrogênio, caracterizando uma rede de interações relativamente mais fraca. O momento em que essas conexões estiveram muito presentes sugere que essa interação manteve a estabilidade do complexo além do tamanho dos compostos e suas funcionalidades (Qin et al., 2021).

Portanto, correlações complementares podem ser observadas na comparação de ligações de hidrogênio formadas em dinâmica molecular com aquelas previamente obtidas pelo processo de acoplamento, indicando a convergência de um método estático para um processo sistêmico contínuo.

Figura 11. Pontes de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as etapas de simulação



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

4.4.4 Cálculos SASA

A Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) é uma medida da área de superfície de uma proteína que é acessível às moléculas do solvente e desempenha um papel fundamental na compreensão do comportamento das proteínas em solução. O SASA dos complexos de composição do óleo da borra de café foi monitorado durante 100 ns de simulações de dinâmica molecular (MD), que é uma técnica computacional poderosa que pode fornecer informações detalhadas sobre a dinâmica e a estabilidade das biomoléculas (Mazola et al., 2015).

Os resultados da análise SASA revelaram algumas tendências interessantes. Em particular, os valores SASA para alguns dos compostos, incluindo ácido hexadecanóico, metil octadecanoato, metil docosanoato, 6,9 metil octadienoato e metil octadecenoato, mostraram um aumento acentuado durante a simulação, indicando relaxamento estrutural. Por outro lado, os valores SASA para outros compostos, como metil eicosanoato e metil

hexadecanoato, mostraram uma diminuição e tensão da enzima quando o complexo se formou (Durham et al., 2009; Street & Mayo, 1998) (Figura 11).

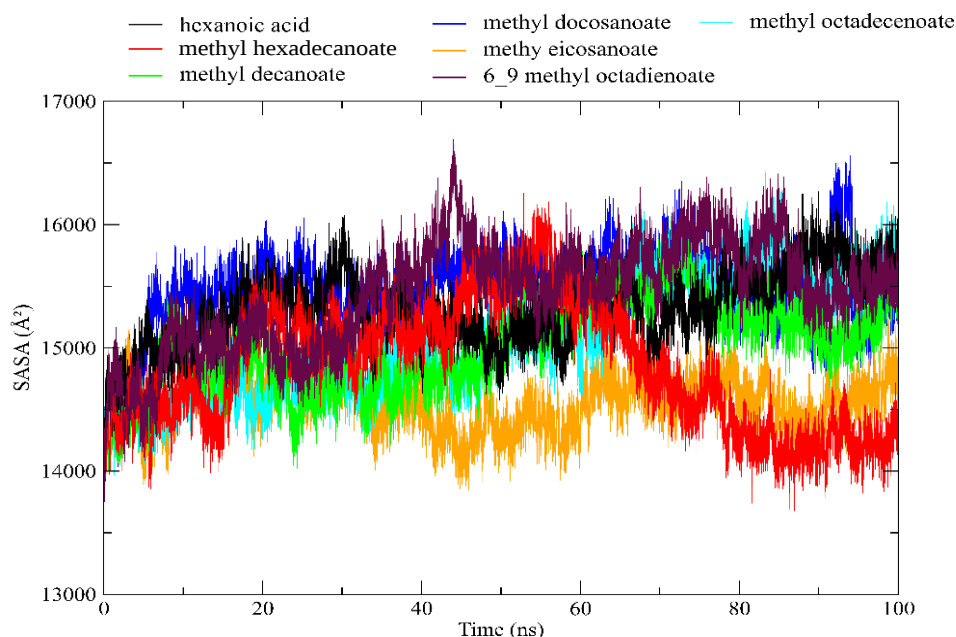
Curiosamente, a ligação dos ligantes não levou a nenhuma mudança importante nos valores de SASA. Isso sugere que a ligação dos ligantes à proteína não alterou significativamente a acessibilidade das moléculas do solvente à superfície da proteína (Marsh & Teichmann, 2011).

Após 100 ns de simulação, os valores SASA flutuaram em torno de um valor constante, indicando que as simulações amostraram sistemas equilibrados. No entanto, vale a pena notar que os valores SASA das moléculas Eversa com íons monovalentes estabilizantes foram os mais altos. Os sistemas com maiores concentrações de íons tiveram áreas menores e podem ter encolhido sob a influência da carga de superfície, resultando em estruturas proteicas mais compactas.

Uma inspeção mais aprofundada dos dados revelou que a flutuação ou "respiração" da superfície relaxada foi principalmente devido a uma flutuação do SASA da área C-terminal flexível. Isso indica que a flexibilidade da região C-terminal desempenha um papel importante na determinação dos valores SASA globais da proteína (Novotny et al., 2007).

Em resumo, a análise dos valores SASA durante as simulações MD forneceu informações importantes sobre a dinâmica e estabilidade dos complexos de composição do óleo da borra de café. Os resultados deste estudo poderiam ser usados para informar o projeto de novos compostos que interagem de forma mais eficaz com a superfície da proteína, ou para otimizar as condições sob as quais os complexos de proteínas são formados.

Figura 12. Área de superfície acessível ao solvente (SASA) da lipase Eversa em função do tempo das simulações MD. As curvas são médias dos dados brutos com uma janela de 100 ns.



Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

4.4.5 Cálculos MM/GBSA

O cálculo das energias livres de um complexo receptor pode ser feito calculando as energias da mecânica molecular combinadas com a solvatação contínua generalizada de Born e da área de superfície (MM/GBSA) (Genheden & Ryde, 2015). MolAICal, portanto, é uma ferramenta computacional que estima rapidamente a energia livre de um sistema, sem entropia do ligante, com base na aproximação de três trajetórias obtidas por dinâmica molecular.

O complexo octadecanoato de metila/Eversa foi o que obteve o melhor resultado, com base em sua energia livre, com -26,86 kcal/mol, em relação aos outros ligantes em estudo, eicosanoato de metila/Eversa e octadienoato de metila 6,9/Eversa, que apresentaram uma energia livre de -23,62 kcal/mol e -23,41 kcal/mol respectivamente. Na outra simulação atual, os demais compostos com o complexo Eversa deram energia livre, variando de -16,26 a -13,27 kcal/mol. Esses resultados são mostrados na Tabela 6.

O termo variação de entropia diz respeito à perda de graus de liberdade resultante da formação de uma ou mais interações, pois antes havia apenas duas moléculas (ligante e proteína), que podiam acessar quaisquer graus de liberdade rotacional,

translacional ou vibracional, agora não há é 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).

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

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

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

Tabela 6. Dados de estimativa de energia livre da composição do óleo lipídico da borra de café contra a lipase Eversa.

Complexo	$\Delta E_{ele} + \Delta G_{sol}$ (kcal/mol)	ΔE_{vdw} (kcal/mol)	ΔG_{bind} (kcal/mol)	Desvio Padrão
ácido hexadecanóico/Eversa	18.43	-29.14	-13.27	+/- 0.052
hexadecanoato de metila/Eversa	17.67	-33.93	-16.26	+/- 0.023
octadecanoato de metila/Eversa	10.33	-37.19	-26.86	+/- 0.027
docosanoato de metila/Eversa	20.76	-39.79	-19.03	+/- 0.024
eicosanoato de metila/Eversa	13.75	-37.37	-23.62	+/- 0.027
6_9 octadienoato de metila/Eversa	11.97	-35.38	-23.41	+/- 0.026
octadecenoato de metila/Eversa	19.56	-35.03	-15.47	+/- 0.026

Fonte: Elaborado pela Autora (2024).

Uma maneira de determinar as energias livres de um complexo receptor é usar o método MM/GBSA, que envolve o cálculo das energias da mecânica molecular juntamente com a solvatação contínua de Born e de áreas de superfícies generalizada. Com base nos cálculos, o complexo octadecanoato de metila/Eversa foi o que obteve o melhor resultado, com base em sua energia livre, com -26,86 kcal/mol, em relação aos outros ligantes em estudo.

Os resultados obtidos dessas simulações podem ser valiosos no desenvolvimento de fármacos e terapêuticas, bem como na otimização de processos químicos para melhorar a eficiência das reações. Portanto, as implicações dessas

simulações são significativas para um amplo espectro de domínios científicos e industriais, como descoberta de medicamentos, biotecnologia e ciência de materiais (Vamathevan et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

Esse estudo tem como objetivo avaliar o potencial da lipase Eversa® Transform 2.0 em catalisar as sete substâncias gordurosas extraídas da borra de café. Foi modelado com sucesso as interações entre a lipase Eversa Transform® 2.0 e substratos potenciais para uso na produção de biodiesel ou biolubrificantes, incluindo fontes renováveis e ecológicas, como a composição lipídica do óleo de borra de café. A análise *in silico* revelou que o 6,9 octadienoato de metil se liga próximo ao sítio ativo da enzima com energia livre favorável e ligações H específicas, alquila e interações π -alquila. Simulações de dinâmica molecular demonstraram boa estabilidade e baixos valores de RMSD, indicando que as posturas de acoplamento escolhidas foram adequadas para que a reação ocorresse sem impedimentos.

O estudo MM/GBSA sugeriu que o octadecenoato de metila teve a melhor estimativa de energia livre para o complexo enzima-substrato. A análise CASTp identificou os principais bolsões ativos para potencial imobilização da enzima em estudos experimentais, exceto para a região nativa do ligante. No entanto, deve-se notar que, embora as simulações de computador forneçam uma ferramenta de triagem inicial útil, aplicações *in vitro* e expandidas podem enfrentar variáveis e desafios adicionais, incluindo condições de transporte, atividade catalítica, inibição enzimática, condições de equilíbrio e características físico-químicas do biodiesel produzido, que requerem mais estudo e consideração.

Contribuições dos Autores: Conceituação, Millena Mara Rabelo Nobre; metodologia, Ananias Freire da Silva, Amanda Maria Menezes e Francisco Lennon Barbosa da Silva; software, Aluísio Marques da Fonseca, Emmanuel Silva Marinho; validação, Regilany Paulo Colares, Aluísio Marques da Fonseca, Iesa Matos Lima, Emmanuel Silva Marinho; análise formal, Maria Valderez Ponte Rocha, Maria Cristiane Martins de Souza; investigação, José Cleiton Sousa dos Santos; recursos, Millena Mara Rabelo Nobre; curadoria de dados, José C. S. dos Santos; redação—preparação do rascunho original, Millena Mara Rabelo Nobre; redação—revisão e edição, Millena Mara Rabelo Nobre; visualização, José C. S. dos Santos, Aluísio Marques da Fonseca e Maria Cristiane Martins de Souza; supervisão, Aluísio Marques da Fonseca; administração do projeto, Aluísio Marques da Fonseca. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Favor acrescentar: Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP.

Declaração de Disponibilidade de Dados: Não aplicável.

Agradecimentos: Os autores reconhecem e agradecem o apoio financeiro da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com o apoio do Instituto de Engenharia e Desenvolvimento Sustentável (IEDS) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), e Grupo de Química Teórica (GQT) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. REFERÊNCIAS

- Adenuga, A. A., Oyekunle, J. A. O., & Idowu, O. O. (2021). Pathway to reduce free fatty acid formation in *Calophyllum inophyllum* kernel oil: A renewable feedstock for biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, 316, 128222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128222>
- Aftab, S., Ahmed, A., Chandio, A. A., Korankye, B. A., Ali, A., & Fang, W. (2021). Modeling the nexus between carbon emissions, energy consumption, and economic progress in Pakistan: Evidence from cointegration and causality analysis. *Energy Reports*, 7, 4642–4658. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2021.07.020>
- 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., Derbyshire, J., Dolan, T. E., Fuller, T., Kishita, Y., McLellan, B. C., Giurco, D., Aoki, K., Yoshizawa, G., Handoh, I. C., ... Bose, S. (2005). Chem3D 15.0 User Guide. *Macromolecules*, 24(2), 1–61.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amini, Z., Ong, H. C., Harrison, M. D., Kusumo, F., Mazaheri, H., & Ilham, Z. (2017). Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. *Energy Conversion and Management*, 132, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.11.017>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.compbio.2021.104967>
- 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), 1–12. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa161>
- Barbany, M., Meyer, T., Hospital, A., Faustino, I., D'Abramo, M., Morata, J., Orozco, M., & De La Cruz, X. (2015). Molecular dynamics study of naturally existing cavity couplings in proteins. *PLoS ONE*, 10(3), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119978>
- Barbosa, G. G. (2015). Recursos Naturais Renováveis e Produção de Energia. *Revista Política Hoje*, 23(1), 193–215.
- Barnea, N., & Dori, Y. J. (1996). Computerized molecular modeling as a tool to improve chemistry teaching. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36(4), 629–636. <https://doi.org/10.1021/ci950122o>
- Barreiro, E. J., Rodrigues, C. R., Albuquerque, M. G., Sant'Anna, C. M. R. de, & Alencastro, R. B. de. (1997). Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Química Nova*, 20(3), 300–310. <https://doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011>
- Barros, M. E. de S. B. (2015). Estudo de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4. In *Tese de*

Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

- Bedoya, O. F., & Tischer, I. (2015). Detección de homología remota de proteínas usando modelos 3D enriquecidos con propiedades fisicoquímicas. *INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD*, 17(1). <https://doi.org/10.25100/iyc.v17i1.2202>
- 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](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76372-7)
- Ben Hlima, H., Dammak, M., Karray, A., Drira, M., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. *Marine Drugs*, 19(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md19020070>
- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0168>
- Blinová, L., Sirotiak, M., Bartošová, A., & Soldán, M. (2017). Faculty of Materials Science and Technology in Trnava Review: Utilization of Waste From Coffee Production. *Research Papers*, 25(40), 91–102.
- Bresolin, D., Hawerth, B., de Oliveira Romera, C., Sayer, C., de Araújo, P. H. H., & de Oliveira, D. (2020). Immobilization of lipase Eversa Transform 2.0 on poly(urea-urethane) nanoparticles obtained using a biopolyol from enzymatic glycerolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(7). <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02324-6>
- Bruice, T. C., & Lightstone, F. C. (1999). Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. In *Accounts of Chemical Research* (Vol. 32, Issue 2, pp. 127–136). <https://doi.org/10.1021/ar960131y>
- Bueso, F., Moreno, L., Cedeño, M., & Manzanarez, K. (2015). Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with *Jatropha curcas* oil: Exploring its potential for Central America. *Journal of Biological Engineering*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0009-9>
- 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>
- Camargos, R. R. D. S. (2005). *Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cavalcante, F. T. T. (2021). *Aplicação da Liapse reversa transform 2.0 na síntese de biolubrificantes por meio de simulações computacionais*. UNIVERSIDADE DE INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DE LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA.
- 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>
- Cen, Y., Singh, W., Arkin, M., Moody, T. S., Huang, M., Zhou, J., Wu, Q., & Reetz, M. T. (2019). Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11155-3>
- Chaturvedi, S. K., Zaidi, N., Alam, P., Khan, J. M., Qadeer, A., Siddique, I. A., Asmat, S., Zaidi, Y., & Khan, R. H. (2015). Unraveling comparative anti-amyloidogenic

- behavior of pyrazinamide and D-Cycloserine: A mechanistic biophysical insight. *PLoS ONE*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136528>
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., & Wang, X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, 50(3), 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.10.011>
- Chinaka, T. W. (2021). Introducing the second law of thermodynamics using Legitimation Code Theory among first year chemistry students. In *Cypriot Journal of Educational Sciences* (Vol. 16, Issue 3, pp. 981–994). <https://doi.org/10.18844/CJES.V16I3.5772>
- Corici, L., Pellis, A., Ferrario, V., Ebert, C., Cantone, S., & Gardossi, L. (2015). Understanding Potentials and Restrictions of Solvent-Free Enzymatic Polycondensation of Itaconic Acid: An Experimental and Computational Analysis. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 357(8), 1763–1774. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500182>
- Costa, M. W., & Oliveira, A. A. M. (2022, May). Social life cycle assessment of feedstocks for biodiesel production in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112166. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112166>
- Da Rós, P. C. M., Silva, G. A. M., Mendes, A. A., Santos, J. C., & de Castro, H. F. (2010). Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 101(14), 5508–5516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.061>
- DasGupta, D., Mandalaparth, 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>
- DeLano, W. L. (2020). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3. In *Schrödinger LLC*. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.17>
- Diez, M., Petuya, V., Martínez-Cruz, L. A., & Hernández, A. (2014). Insights into mechanism kinematics for protein motion simulation. *BMC Bioinformatics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-184>
- Dizge, N., Keskinler, B., & Tanriseven, A. (2009). Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.12.008>
- 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), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Durham, E., Dorr, B., Woetzel, N., Staritzbichler, R., & Meiler, J. (2009). Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. *Journal of Molecular Modeling*, 15(9), 1093–1108. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0454-9>
- Elgharbawy, A. A., Riyadi, F. A., Alam, M. Z., & Moniruzzaman, M. (2018). Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 251, 150–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.050>
- 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>
- Fernandes, K. V., Cavalcanti, E. D. C., Cipolatti, E. P., Aguiéiras, E. C. G., Pinto, M. C. C., Tavares, F. A., da Silva, P. R., Fernandez-Lafuente, R., Arana-Peña, S., Pinto, J. C., Assunção, C. L. B., da Silva, J. A. C., & Freire, D. M. G. (2021). Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. *Catalysis Today*, 362(November 2019), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.060>
- Fujikoshi, Y. (1993). Two-way ANOVA models with unbalanced data. *Discrete Mathematics*, 116(1–3), 315–334. [https://doi.org/10.1016/0012-365X\(93\)90410-U](https://doi.org/10.1016/0012-365X(93)90410-U)
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 10, Issue 5, pp. 449–461). <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gielen, D., Boshell, F., Saygin, D., Bazilian, M. D., Wagner, N., & Gorini, R. (2019, January). The role of renewable energy in the global energy transformation. *Energy Strategy Reviews*, 24(June 2018), 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.01.006>
- Goh, B. H. H., Ong, H. C., Cheah, M. Y., Chen, W.-H., Yu, K. L., & Mahlia, T. M. I. (2019). Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 59–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>
- 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](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00610-7)
- Habiba, U., Xinbang, C., & Anwar, A. (2022). Do green technology innovations, financial development, and renewable energy use help to curb carbon emissions? *Renewable Energy*, 193, 1082–1093. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.05.084>
- Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5–6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
- 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>
- Hari Krishna, S., & Karanth, N. G. (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, 44(4), 499–591. <https://doi.org/10.1081/CR-120015481>
- Hsu, A. F., Jones, K., Marmer, W. N., & Foglia, T. A. (2001). Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 585–588. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0308-x>
- Huang, D., Han, S., Han, Z., & Lin, Y. (2012). Biodiesel production catalyzed by

- Rhizomucor miehei lipase-displaying Pichia pastoris whole cells in an isooctane system. *Biochemical Engineering Journal*, 63, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.009>
- 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](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001>
- Jeong, G.-T. (2022). Valorization of lipid-extracted spent coffee grounds: The synthesis of levulinic acid by thermochemical process. *Industrial Crops and Products*, 187, 115410. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115410>
- Jin L, Zhang H, M. Z. (2018). Study on capacity of coffee grounds to be extracted oil, produce biodiesel and combust. *Energy Procedia*, 152, 1296–1301. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.09.185>
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2001). Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 12–15. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80103-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80103-1)
- 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>
- Kuo, Y., Maneengam, A., Phan The, C., Binh An, N., Nassani, A. A., Haffar, M., & Qadus, A. (2022). Fresh evidence on environmental quality measures using natural resources, renewable energy, non-renewable energy and economic growth for 10 Asian nations from CS-ARDL technique. *Fuel*, 320, 123914. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123914>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2). <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Lee, K. W., Min, K., Park, K., & Yoo, Y. J. (2010). Development of an Amphiphilic Matrix for Immobilization of Lipase B for Biodiesel Production. 607, 603–607. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3085-1>
- 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 and Drug Design*, 80(1), 114–120. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01380.x>
- Lin, C. K., & Zhang, J. (2018). Detecting Nonadditivity in Single-Facet Generalizability Theory Applications: Tukey's Test. *Journal of Educational Measurement*, 55(1), 78–89. <https://doi.org/10.1111/jedm.12164>
- Lin, Y. H., Luo, J. J., John Hwang, S. C., Liao, P. R., Lu, W. J., & Lee, H. T. (2011). The influence of free fatty acid intermediate on biodiesel production from soybean oil by whole cell biocatalyst. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 2217–2223. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.039>
- Lu, L., Jiang, D., Fu, J., Zhuang, D., Huang, Y., & Hao, M. (2014). Evaluating energy

- benefit of *Pistacia chinensis* based biodiesel in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 258–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.019>
- Marsh, J. A., & Teichmann, S. A. (2011). Relative solvent accessible surface area predicts protein conformational changes upon binding. *Structure*, 19(6), 859–867. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.010>
- 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>
- Mazola, Y., Guirola, O., Palomares, S., Chinae, G., Menéndez, C., Hernández, L., & Musacchio, A. (2015). A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic β -fructosidase enzymes. *Journal of Molecular Modeling*, 21(228), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2772-4>
- Miyamoto, Y., Motohashi, H., Suyama, T., & Yokoyama, J. (2014). Langevin description of gauged scalar fields in a thermal bath. *Physical Review D - Particles, Fields, Gravitation and Cosmology*, 89(8). <https://doi.org/10.1103/PhysRevD.89.085037>
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mosarof, M. H., Kalam, M. A., Masjuki, H. H., Ashraful, A. M., Rashed, M. M., Imdadul, H. K., & Monirul, I. M. (2015). Implementation of palm biodiesel based on economic aspects, performance, emission, and wear characteristics. *Energy Conversion and Management*, 105, 617–629. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.08.020>
- Moura, C. L. de, Andrei, I. C. M., Lima, L. F. de, & Sakanaka, L. S. (2019, October). Extração e caracterização da composição lipídica da borra de café robusta e arábica. *Ciência e Tecnologia Dos Alimentos–Volume 4*, 12(43), 6. <https://doi.org/10.36229/978-85-7042-160-9.cap.08>
- Naranjo, J. C., Córdoba, A., Giraldo, L., García, V. S., & Moreno-Piraján, J. C. (2010). Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1–2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.002>
- Novotny, M., Seibert, M., & Kleywegt, G. J. (2007). On the precision of calculated solvent-accessible surface areas. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(2), 270–274. <https://doi.org/10.1107/S09074444906044118>
- Okoro, O. V., Sun, Z., & Birch, J. (2019). Lipases for Biofuel Production. In L. Melton, F. Shahidi, & P. B. T.-E. of F. C. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 150–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21650-8>
- Pal, G., Araújo, L. S., Vidal, M. S., Baldani, J. I., Henrique, C., & Gadelha, S. (2014). Modelagem molecular de proteínas: o caso de uma glucoronosiltransferase (GumK) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 10(3), 1–6.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Pretorius, I., Piketh, S. J., & Burger, R. P. (2015). The impact of the south african energy crisis on emissions. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 198, 255–

264. <https://doi.org/10.2495/AIR150211>
- 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(February), 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>
- Ramachandran, G. N. R. C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. *Journal of Molecular Biology*, 7, 95–99.
- Ramanathan, V. (2017). Ultra-microporous MOFs for selective CO₂ capture from industrial gas mixtures. *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, 73(a2), C106–C106. <https://doi.org/10.1107/s2053273317094657>
- Rodrigues, A. C. C. (2021, October). Policy, regulation, development and future of biodiesel industry in Brazil. *Cleaner Engineering and Technology*, 4, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100197>
- Roe, D. R., & Brooks, B. R. (2020). A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 153(5), 1–9. <https://doi.org/10.1063/5.0013849>
- Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlic, A., & Rose, P. W. (2018). NGL viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21), 3755–3758. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419>
- Roveda, M., Hemkemeier, M., & Colla, L. M. (2010). Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 126–131. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000100019>
- Salaheldeen, M., Mariod, A. A., Aroua, M. K., Rahman, S. M. A., Soudagar, M. E. M., & Fattah, I. M. R. (2021). Current State and Perspectives on Transesterification of Triglycerides for Biodiesel Production. *Catalysts*, 11(9), 1121. <https://doi.org/10.3390/catal11091121>
- Serrano, A., & Neto, D. A. (2011). *MOLECULAR A Literature Review About Molecular Modeling. January 2011.*
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2004). Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy and Fuels*, 18(1), 154–159. <https://doi.org/10.1021/ef030075z>
- Shityakov, S., & Förster, C. (2014). In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*. <https://doi.org/10.2147/AABC.S63749>
- Silva, J., Rocha, M. N. da, Marinho, E. M., Marinho, M. M., Marinho, E. S., & Santos, H. S. dos. (2021). Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 10(5), 177–194. <https://doi.org/10.15406/japlr.2021.10.00384>
- Silvestrini, L., & Cianci, M. (2020). Principles of lipid–enzyme interactions in the limbus region of the catalytic site of *Candida antarctica* Lipase B. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.061>
- Sokač, T., Gojun, M., Tušek, A. J., Šalić, A., & Zelić, B. (2020). Purification of biodiesel produced by lipase catalysed transesterification by ultrafiltration: Selection of

- membranes and analysis of membrane blocking mechanisms. *Renewable Energy*, 159, 642–651. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.132>
- SOUZA, R. L. DE. (2015). *Aplicação Da Técnica De Ancoragem Molecular Na Otimização Do Fármaco Hipoglicemiante Metformina*. 41.
- Šponer, J., Hobza, P., & Leszczynski, J. (1999). Chapter 3 Computational approaches to the studies of the interactions of nucleic acid bases. In *Theoretical and Computational Chemistry* (Vol. 8, Issue C, pp. 85–117). [https://doi.org/10.1016/S1380-7323\(99\)80078-8](https://doi.org/10.1016/S1380-7323(99)80078-8)
- Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., & Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1846–1859. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.006>
- Stougie, L., Tsalidis, G. A., Kooi, H. J. Van Der, & Korevaar, G. (2018, December). Environmental and exergetic sustainability assessment of power generation from biomass. *Renewable Energy*, 128, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.046>
- Street, A. G., & Mayo, S. L. (1998). Pairwise calculation of protein solvent-accessible surface areas. *Folding and Design*, 3(4), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00036-4)
- Struchtrup, H. (2020). Entropy and the second law of thermodynamics-The nonequilibrium perspective. *Entropy*, 22(7), 1–61. <https://doi.org/10.3390/e22070793>
- Suarez, P. A. Z., Santos, A. L. F., Rodrigues, J. P., & Alves, M. B. (2009). Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, 32(3), 768–775. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300020>
- Thirumalai, D., Lorimer, G. H., & Hyeon, C. (2020). Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones. *Protein Science*, 29(2), 1–18. <https://doi.org/10.1002/pro.3795>
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W363–W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- 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*. <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>
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(6), 1–37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
- Wolff, M., Becker, T., & Walther, G. (2022). Long-term design and analysis of renewable fuel supply chains – An integrated approach considering seasonal resource availability. *European Journal of Operational Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ejor.2022.04.001>
- 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>
- XIAO, M., MATHEW, S., & OBBARD, J. P. (2010). A newly isolated fungal strain used as whole-cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. *GCB Bioenergy*, 2(2), 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01038.x>
- Xing, Y., Zheng, Z., Sun, Y., & Alikhani, M. A. (2021). *A Review on Machine Learning Application in Biodiesel Production Studies*. 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/2154258>
- Yagiz, F., Kazan, D., & Akin, A. N. (2007). Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Engineering Journal*, 134(1–3), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.03.041>
- Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>
- Zahan, K., & Kano, M. (2018). Biodiesel Production from Palm Oil, Its By-Products, and Mill Effluent: A Review. *Energies*, 11(8), 2132. <https://doi.org/10.3390/en11082132>
- Zeng, H. yan, Liao, K. bo, Deng, X., Jiang, H., & Zhang, F. (2009). Characterization of the lipase immobilized on Mg-Al hydrotalcite for biodiesel. *Process Biochemistry*, 44(8), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.005>