



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

IÊSA MATOS LIMA

**UMA ABORDAGEM DE DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR POR
ETAPAS PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL
UTILIZANDO COMBOLIPASES DE *Candida antarctica* COMO
BIOCATALISADORES**

REDENÇÃO - CE

2025

IÊSA MATOS LIMA

**UMA ABORDAGEM DE DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR POR
ETAPAS PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL
UTILIZANDO COMBOLIPASES DE *Candida antarctica* COMO
BIOCATALISADORES**

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

Orientador: Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

REDENÇÃO - CE

2025

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

Lima, Iêsa Matos.

L732a

Uma abordagem de docking e dinâmica molecular por etapas para a produção enzimática de biodiesel utilizando combolipases de candida antarctica como biocatalisadores / Iêsa Matos Lima. - Redenção, 2025.

66f: 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, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Biodiesel. 2. Lipases. 3. CALA-CALB. 4. Docking molecular. 5. Biocatalise. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 665.5383

IÊSA MATOS LIMA

**UMA ABORDAGEM DE DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR POR
ETAPAS PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL
UTILIZANDO COMBOLIPASES DE *Candida antarctica* COMO
BIOCATALISADORES**

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)

PROFA. DRA. MARIA CRISTIANE MARTINS DE SOUZA

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

PROF. DR. DIERIC DOS SANTOS DE ABREU

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

PROF. DR. EMMANUEL SILVA MARINHO

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico este trabalho ao meu Pai/Avó, “In Memorian”, cuja força e coragem me ensinaram a enfrentar a vida com determinação e esperança. Sua sabedoria e teimosia seguem vivos em mim, guiando meus passos e me encorajando. Com eterna saudade e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que me conduziu durante essa jornada, iluminou a minha mente nos momentos difíceis, dando-me força, coragem e determinação para seguir, sempre em frente com persistência.

Agradeço à minha família: minha mãe, Erbenia; meu tio, Eliomar; minha tia, Esmenia; e minha irmã, Isa. Um agradecimento especial à minha avó, Marlucia Matos, por suas palavras de motivação, seu carinho, amor incondicional e por sempre acreditar no meu potencial. Sou imensamente grata por toda a sua ajuda e apoio.

Ao meu Pai/Avô, Eneazio Rocha (In Memoriam), cuja força e coragem me ensinaram a enfrentar a vida com determinação e esperança. Sua sabedoria e teimosia permanecem vivos em mim, guiando meus passos e me encorajando a seguir em frente.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram nessa jornada, Adriana, Elizângela, Felipe, Gustavo, Ícaro, Lennon, Mateus e Sandro José (Meu Bem), tenho um carinho imenso por todos vocês meus amigos, família! Agradeço por compartilharem comigo essa jornada maluca, que foi cheia de risos, conversas, brigas, estresses, amizade, apoio, tristezas e imensas alegrias, os altos e baixos que nos motivam a crescer. Saibam que acredito no potencial e capacidade de cada um de vocês. Todas as pessoas chegam às nossas vidas por qualquer razão, seja apenas durante um certo tempo, ou seja, para toda vida. Brilhem!

Aos professores, com destaque especial ao meu orientador, Prof. Aluísio Marques da Fonseca, cuja orientação e apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e a concretização desta ideia, sempre com grande compreensão. Agradeço também a todos os integrantes do PGEA (Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente), por proporcionarem um ambiente de aprendizado e colaboração ao longo dos anos de pesquisa e desenvolvimento.

Gratidão à UNILAB por ter sido fundamental em minha formação acadêmica e profissional, culminando no título de Mestra, e por contribuir significativamente para minha trajetória pessoal. Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro e, por fim, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa jornada ao longo dos anos do curso.

“As conquistas dependem 50% de inspiração, criatividade e sonhos, e 50% de disciplina, trabalho árduo e determinação. São duas pernas que devem caminhar juntas”.

Augusto Cury

RESUMO

O biodiesel destaca-se por suas vantagens ambientais, como a redução nas emissões de monóxido de carbono e material particulado em comparação ao diesel convencional. A produção de biodiesel, no entanto, ainda enfrenta desafios relacionados à eficiência e custo dos processos, especialmente no uso de biocatalisadores. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar o potencial das combolipases derivadas de *Candida antarctica*, CALA e CALB, como biocatalisadores para otimizar a produção enzimática de biodiesel. A pesquisa utilizou uma abordagem integrativa, combinando técnicas de docking molecular e dinâmica molecular para estudar as interações entre as proteínas e o ácido oleico, o principal substrato na produção de biodiesel. A metodologia envolveu a modelagem molecular das enzimas CALA e CALB, utilizando programas de simulação para realizar o docking molecular e as simulações de dinâmica molecular. Durante as simulações, foram analisadas as melhores poses de acoplamento entre as lipases e o ácido oleico, com base na energia livre de ligação e nas interações entre os resíduos catalíticos. Os resultados revelaram que a pose de melhor estabilidade apresentou uma energia livre de $-8,5$ kcal/mol e um RMSD de $1,54$ Å, demonstrando fortes interações com o ácido oleico. A análise indicou a participação de resíduos específicos nas interações: Ser 184, His 366 e Asp 334 para a lipase CALA, e Asp 187, His 224 e Ser 105 para a lipase CALB. A análise do gráfico de Ramachandran revelou que 92,7% dos resíduos estavam em regiões favoráveis, o que sugere o melhoramento e a estabilidade das duas cadeias proteicas. As simulações de dinâmica molecular confirmaram a estabilidade dessas conformações ao longo do tempo de simulação, destacando a lipase CALA como a mais eficiente para interação com o ácido oleico. Conclui-se que as enzimas CALA e CALB possuem potencial para serem utilizadas na biocatálise de biodiesel, com a CALA se destacando pelo melhor desempenho em termos de afinidade ao substrato. A análise também demonstrou que a interação das enzimas com o tipo de ácido carboxílico é crucial para a eficiência da biocatálise. Estes achados podem contribuir para o desenvolvimento de processos mais eficientes e econômicos na produção de biocombustíveis sustentáveis.

Palavra-Chave: Biodiesel; Lipases; CALA-CALB; Docking Molecular; Biocatálise.

ABSTRACT

Biodiesel stands out for its environmental advantages, such as the reduction in carbon monoxide and particulate matter emissions compared to conventional diesel. Biodiesel production, however, still faces challenges related to process efficiency and cost, especially in the use of biocatalysts. In this context, this study aimed to analyze the potential of combolipases derived from *Candida antarctica*, CALA and CALB, as biocatalysts to optimize the enzymatic production of biodiesel. The research used an integrative approach, combining molecular docking and molecular dynamics techniques to study the interactions between the proteins and oleic acid, the main substrate in biodiesel production. The methodology involved molecular modeling of the CALA and CALB enzymes, using simulation programs to perform molecular docking and molecular dynamics simulations. During the simulations, the best docking poses between the lipases and oleic acid were analyzed, based on the free energy of binding and the interactions between the catalytic residues. The results showed that the pose with the best stability had a free energy of -8.5 kcal/mol and an RMSD of 1.54 Å, demonstrating strong interactions with oleic acid. The analysis indicated the participation of specific residues in the interactions: Ser 184, His 366 and Asp 334 for CALA lipase, and Asp 187, His 224 and Ser 105 for CALB lipase. Analysis of the Ramachandran plot revealed that 92.7% of the residues were in favorable regions, which suggests the enhancement and stability of the two protein chains. Molecular dynamics simulations confirmed the stability of these conformations over the simulation time, highlighting the CALA lipase as the most efficient for interaction with oleic acid. It is concluded that the CALA and CALB enzymes have the potential to be used in biodiesel biocatalysis, with CALA standing out for its better performance in terms of affinity to the substrate. The analysis also showed that the interaction of the enzymes with the type of carboxylic acid is crucial for the efficiency of the biocatalysis. These findings could contribute to the development of more efficient and economical processes for the production of sustainable biofuels.

Keywords: Biodiesel; Lipases; CALA-CALB; Molecular Docking; Biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equação geral da reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool e ácido graxo de óleos vegetais e/ou gorduras animais.	15
Figura 2 - Estrutura cristalográfica da lipase CALB.	22
Figura 3 - Estrutura cristalográfica da lipase CALA.	23
Figura 4 - Estrutura molecular do Ácido oleico.	25
Figura 5 - Três esquemas de reação de biocatálise para a reação de esterificação.	33
Figura 6 - O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações dos resíduos com Ácido oleico.	36
Figura 7 - O sítio ativo da lipase CALB com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações dos resíduos com Ácido oleico.	37
Figura 8 - Combinação do combolipase CALA+CALB com as tríades catalíticas e as interações dos resíduos com o Ácido oleico.	38
Figura 9 - Interação proteína-proteína entre Chain A (CALA) Chain B (CALB).	40
Figura 10 - Diagrama topológico Hera da estrutura CALA e CALB.	41
Figura 11 - Diagrama topológico representante de ligação da estrutura secundária da CALA+CALB.	43
Figura 12 - O gráfico de Ramachandran do complexo enzimático CALA+CALB.	45
Figura 13 - Raiz do Desvio Quadrático Médio (RMSD).	47
Figura 14 - Flutuação da raiz quadrada média (RMSF).	49
Figura 15 - Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as etapas de simulação.	51
Figura 16 - Área superficial acessível por solvente (SASA) da lipase em função do tempo a partir das simulações MD. As curvas são médias dos dados brutos com uma janela de 100ns.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de Produção do Biodiesel.	20
Tabela 2 - Taxa de Rendimento dos diferentes métodos de produção do Biodiesel.	20
Tabela 3 - Comparação entre as lipases CALA e CALB.	24
Tabela 4 - Taxas de consumo de AGL por reações de esterificação homogénea.....	34
Tabela 5 - Resultado de acoplamento molecular com as respectivas pontuações de acoplamento.....	35
Tabela 6 - Dados de estimativa de energia livre da composição lipídica do ácido oleico contra as lipases CALA e CALB.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGs	Algoritmos Genéticos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGLc	Algoritmo Genético Lamarckiano
Ala	Alanina
ANOVA	Análise de Variância
Asp	Aspartato
$C_{18}H_{34}O_2$	Ácido Oleico
DFT	Teoria do Funcionamento da Densidade
DM	Docking Molecular
FAEE	Síntese de Ésteres Etílicos
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
His	Histidina
HSD	Diferença Honestamente Significativa
Ile	Isoleucina
KOH	Hidróxido de Potássio
Leu	Leucina
MD	Dinâmica molecular
MM	Massa Molecular
MM/GBSA	Mecânica Molecular/Área de Superfície de Born Generalizada
NACs	Nucleófilos no Sítio Catalítico
NAMD	Dinâmica Molecular em Escala Nanométrica
NaOH	Hidróxido Sódio
NPT	Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes
NVT	Número de partículas, Volume e Temperatura constantes
PDB	Protein Data Bank
Pdbqt	Banco de Dados de Proteínas com Quaternions e Torsões
Phe	Fenilalanina
pI	Ponto Isoelétrico
RMSD	Raiz do Desvio Quadrático Médio
RMSF	Flutuações Raiz Média Quadrada
SASA	Superfície Acessível ao Solvente

TG	Triglicerídeos
Thr	Treonina
Ser	Serina
Val	Valina
VMD	Dinâmica Molecular Visual

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Produção de biodiesel e aspectos ambientais	19
3.2 Proteínas enzimáticas CALA e CALB.....	21
3.3 Ácido oleico como ligante.....	24
3.4 Docking molecular e Dinâmica molecular.....	26
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Materiais e Métodos: Estudo <i>In Sílico</i>	29
4.1.1 Preparação de ligantes e proteínas	29
4.3 Análise Estatística.....	30
4.5 Cálculos MM/GBSA	31
4.6.1 Reações de esterificação	32
4.6.2 Estimativa do grau de síntese.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Reação de Esterificação Homogénea	34
5.2 Análises de Dados Molecular.....	35
5.2.1 Docking molecular.....	35
5.3 Estudo <i>In Sílico</i>	38
5.3.1 Acoplamento molecular entre as duas Lipases	38
5.3.2 Análise do complexo de enzimas CALA+CALB.....	43
5.4 Dinâmica Molecular	45
5.5 Análise de RMSD.....	46
5.6 Análise de RMSF	47
5.7 Análise de ligações de Hidrogênio	49
5.8 Cálculos de SASA	51
5.9 Cálculo de MM/GBSA	53
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	57

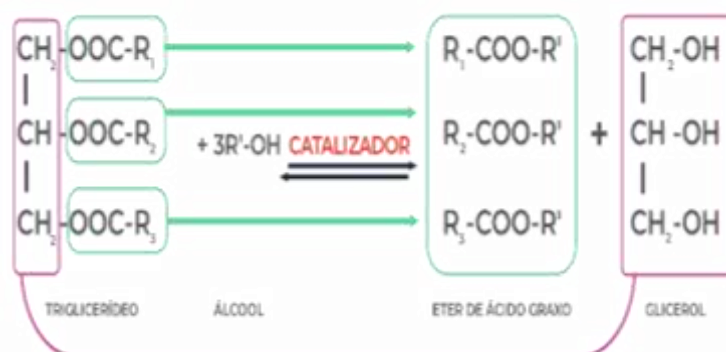
1 INTRODUÇÃO

O crescente desafio de atender à demanda energética global de maneira sustentável tem levado à busca por alternativas inovadoras. Nesse contexto, o uso em larga escala de energias provenientes da biomassa emerge como uma opção promissora, capaz de contribuir significativamente para o desenvolvimento sustentável nos âmbitos ambiental, social e econômico (CORDEIRO *et al.* 2011).

O uso de biocombustíveis derivados de matéria orgânica, como o bioetanol e biodiesel, para fins energéticos pode reduzir o crescimento do efeito estufa. Estes biocombustíveis são renováveis ao contrário dos combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão mineral (CHAVES; GOMES, 2013). Como solução, uma produção mais limpa e eficaz de biodiesel se destaca como uma resposta crucial, alinhando-se aos princípios da sustentabilidade ambiental, principalmente em países com alta emissão de gases do efeito estufa CO_2 , CH_4 , NO_x e SO_x (WALTER, 2011).

O biodiesel, uma alternativa ao diesel convencional, é descrito pela "National Biodiesel Board" (EUA) como o éster monoalquil derivado de ácidos graxos de cadeia longa (COSTA *et al.* 2000). Originado de fontes renováveis, como óleos vegetais por meio da liberação de glicerina como subproduto (Figura 1), seu emprego está vinculado à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão, conhecidos como motores de ciclo diesel (LÔBO *et al.* 2009). Em confronto com sua contraparte convencional, apresenta um perfil ambiental notavelmente superior (REIS *et al.* 2015).

Figura 1 - Equação geral da reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool e ácido graxo de óleos vegetais e/ou gorduras animais.



Fonte: Autor (2025)

Durante o processo de combustão, o biocombustível exibe baixos níveis de emissão de monóxido de carbono e material particulado, contribuindo para uma atmosfera mais limpa e saudável. Além disso, sua utilização representa uma ruptura significativa com a liberação de

compostos de enxofre na atmosfera, uma fonte comum de poluição associada aos combustíveis tradicionais (RAMOS *et al.* 2011).

Ao abraçar o biodiesel, não apenas mitigamos os impactos negativos frequentemente vinculados aos combustíveis convencionais, mas também conseguimos reduzir significativamente as emissões dos principais gases do efeito estufa (ALMEIDA *et al.* 2021). Essas características, fundamentais para a preservação ambiental, consolidam o biodiesel como uma alternativa essencial na transição para uma matriz energética mais sustentável e ecologicamente responsável (CHRISTOPHER *et al.* 2014).

Para otimizar a produção desse biocombustível, torna-se essencial conduzir estudos teóricos por meio de uma abordagem dinâmica molecular, visando reduzir custos nos experimentos e nos reagentes (MONTEIRO *et al.* 2021). O avanço tecnológico impulsionou o emprego de simulações computacionais, conhecidas como Testes *in silico*, que desempenham um papel vital no planejamento, proporcionando eficiência na redução de algumas etapas essenciais, fundamentados em técnicas computacionais, são de suma importância na pesquisa ambiental, dada a sua capacidade de análise rápida e de baixo custo (RUBA *et al.* 2014).

As simulações *in silico*, baseadas em ferramentas como o docking molecular e a mecânica molecular, emergem como metodologias estruturais fundamentais (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). Estas não apenas facilitam a previsão de interações entre ligantes e receptores, mas também desempenham um papel crucial na descoberta de novos agentes e compostos, tanto na área farmacêutica quanto na industrial (ARAÚJO *et al.* 2019).

No estudo computacional, é necessário uma proteína (receptor) e um ligante, os quais são utilizados na ancoragem (KUHN, 2023). O receptor utilizado nesse projeto são as lipases *Candida Antarctica* dos tipos A e B, pois tem alta afinidades em relação com os mecanismos reacionais e catalíticos. O ácido oleico, utilizado como ligante, desempenha um papel crucial ao favorecer o mecanismo de esterificação de ácidos graxos, por sua estrutura ácida carboxílica e uma interação com sítio ativo da proteína formando complexos (CORDEIRO *et al.* 2011).

Devido à sua composição química altamente promissora, o ácido oleico exibe miscibilidade com diversos solventes, como etanol, éter, acetona e clorofórmio (FERREIRA *et al.* 2013). Essa propriedade é atribuída à presença do grupo funcional carboxílico em sua estrutura, uma característica compartilhada pelos ácidos graxos destilados a partir de óleos vegetais (LEÃO, 2009). Essa particularidade foi determinante na seleção deste ligante para a síntese enzimática de biodiesel, utilizando a reação com combolipases.

Este estudo se propõe a analisar o potencial das combolipases derivadas de *Candida antarctica* CALA e CALB como biocatalisadores, utilizando uma abordagem integrativa de

docking molecular e dinâmica molecular por etapas, futurando a otimização da produção enzimática de biodiesel. Com foco na transesterificação, um processo químico fundamental para a obtenção de biodiesel, a pesquisa emprega o docking molecular para analisar as interações bidimensionais e otimizar o processo (BATISTA *et al.* 2020).

As lipases provenientes da *Candida antarctica*, pertencentes à mesma família e, portanto, facilitando a adaptação para a obtenção da combolipase, desempenham um papel crucial neste estudo. Sua relevância destaca-se pela habilidade significativa de catalisar reações reversas, como esterificação e transesterificação, além de apresentarem elevada termoestabilidade, permitindo um desempenho eficiente mesmo em temperaturas elevadas (CARVALHO *et al.* 2003b, 2009).

A utilização de lipases como catalisadores em reações que envolvem triglicerídeos oferece uma variedade de vantagens. Entre estas, destacam-se a notável estabilidade dessas enzimas, a exigência de quantidades reduzidas de água e a viabilidade de reutilização em processos contínuos ou em batelada (ABDALA *et al.* 2013).

Desta forma, ao buscar graus de liberdade configuracionais e conformacionais na interação por docking molecular, o estudo visa não apenas posicionar o ligante no sítio ativo, mas também estimar a afinidade de ligação em diferentes contextos reacionais (OGBODO *et al.* 2023). Antecipamos que esse enfoque não apenas chamará a atenção para a relevância da pesquisa, mas também contribuirá para a busca de meios sustentáveis e energéticos, derivados da otimização das interações bidimensionais.

Ao fornecer uma base sólida, este estudo *in silico* visa não apenas enriquecer a compreensão das interações moleculares na produção de biodiesel, mas também servir de catalisador para futuras pesquisas na área de modelagem molecular aplicada à produção de biocombustíveis biodegradáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial das combolipases derivadas de *Candida antarctica* CALA e CALB como biocatalisadores, utilizando uma abordagem integrativa de docking molecular e dinâmica molecular por etapas, para alcançar a otimização da produção enzimática de biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o acoplamento molecular (docking) entre as combolipases de *Candida antarctica* e o substrato relevante (ácido oleico) para a produção de biodiesel, visando identificar e caracterizar as interações moleculares chave no processo biocatalítico;
- Investigar a estabilidade termodinâmica das interações das combolipase ao longo do tempo de simulação, avaliando as contribuições energéticas e identificando os determinantes da eficiência biocatalítica;
- Analisar a influência de variáveis operacionais, próximo ao NAC e RMSD, na atividade biocatalítica das combolipases, correlacionando os resultados das simulações com condições experimentais para estabelecer parâmetros otimizados;
- Averiguar a proximidade espacial do sítio catalítico das lipases CALA + CALB em resposta ao acoplamento com a estrutura otimizada do ácido oleico, e investigar a significância das interações resultantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de biodiesel empregando ácidos graxos e lipases representa uma alternativa promissora e ambientalmente mais benéfica em relação aos métodos convencionais. Através de estudos computacionais, é viável antecipar combinações mais eficazes para minimizar resíduos, empregar condições de processo mais suaves e obter um produto final de alta qualidade. Esta abordagem tem o potencial de reduzir os impactos ambientais associados à produção e ao consumo de combustíveis fósseis.

Uma base teórica sólida é essencial para explorar esse tema, compreendendo a produção de biodiesel e seus aspectos ambientais, bem como o conhecimento das proteínas enzimáticas CALA e CALB, o ácido oleico como ligante, além do estudo através de técnicas como docking molecular e dinâmica molecular. Essa fundamentação teórica é crucial para orientar os esforços na direção de uma produção mais limpa e sustentável de biodiesel, contribuindo assim para mitigar os desafios ambientais associados aos combustíveis fósseis.

3.1 Produção de biodiesel e aspectos ambientais

O biodiesel, é uma mistura derivada de reações químicas de alquilésteres de cadeia linear, resulta da transesterificação dos triglicerídeos presentes em óleos e gorduras, utilizando álcoois de cadeia curta (LÔBO *et al.* 2009). Sua aplicação representa um paradigma do aproveitamento da biomassa na produção de energia.

Como biocombustível é um substituto natural e renovável do diesel de petróleo, podendo ser obtido por meio da alcoólise de óleos vegetais e/ou gorduras animais ou pela esterificação de ácidos graxos, que podem ser catalisados por meio de métodos homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos (Tabela 1, p. 20) (KUCEK *et al.* 2007).

As reações de transesterificação de óleos ou gorduras são realizadas na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Essa abordagem resolve o problema da viscosidade dos óleos vegetais, gerando monoésteres alquílicos (biodiesel) com viscosidades cinemáticas comparáveis às do diesel, enquanto os óleos vegetais puros apresentam viscosidades significativamente superior e tem como subproduto o glicerol (RAMOS *et al.* 2011).

Tabela 1 - Meios de Produção do Biodiesel.

Métodos	Descrição
Transesterificação Alcalina	Reação catalisada por bases, geralmente NaOH ou KOH.
Transesterificação Ácida	Reação catalisada por ácidos, como H ₂ SO ₄ ou HCl.
Transesterificação Enzimática	Utilização de enzimas como catalisadores, como lipases.
Esterificação Ácida	Produção de ésteres através da reação de ácidos graxos com álcoois.
Alcoólise	Reação de óleos e gorduras com álcoois, geralmente, metanol ou etanol.
Hidroesterificação	Rota de síntese química que combina a hidroformilação e em seguida o processo de esterificação, para a obtenção de ésteres a partir de olefinas.

Fonte: Autor (2025)

A qualidade do biodiesel pode variar conforme as estruturas moleculares dos ésteres constituintes ou devido à presença de contaminantes na matéria-prima, no processo de produção ou formados durante o armazenamento (LÔBO *et al.* 2009). A absorção de umidade e os processos de degradação oxidativa durante o armazenamento contribuem para a presença de água, peróxidos e ácidos carboxílicos de baixa massa molecular.

A (Tabela 2) apresenta as diversas matérias-primas empregadas nos diferentes processos de produção de biodiesel, promovendo a avaliação dos rendimentos alcançados pesquisadores da área e disponibilizados em diferentes literaturas. Esses rendimentos podem sofrer variações consideráveis dependendo de elementos como a qualidade do insumo, a pureza dos reagentes, as condições da reação (temperatura, tempo, relação molar álcool/óleo) e o tipo de catalisador utilizado. A otimização desses parâmetros é crucial para potencializar a eficácia do procedimento (RODRIGUES; MISTURA, 2022).

Tabela 2 - Taxa de Rendimento dos diferentes métodos de produção do Biodiesel.

Métodos	Matéria-Prima	Rendimento (%)	Referencias
Transesterificação Alcalina	Óleo de soja	97,5	(DIB, 2010)
Transesterificação Ácida	Óleo de coco	90,24	(ORSI, 2021)
Transesterificação Enzimática	Óleo de abacate	76,30	(FRANCISCO <i>et al.</i> 2022)
Esterificação Ácida	Ácidos graxos livres	90,0	(SHINDE; KALIAGUINE, 2019)
Alcoólise	Etanol-óleo de soja	82,58 / 92,28	(TORQUATO, 2019)
Hidroesterificação	Biomassa oleaginosa de levedura	92,0	(NETO, 2019)

Fonte: Autor (2025)

Contudo, o biodiesel produzido a partir de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos saturados tende a apresentar problemas de solidificação em condições de baixas temperaturas, assim a transesterificação enzimática que utiliza lipases, facilitando a produção,

separação e recuperação do subproduto para outros fins e o processo de purificação dos ésteres é mais simples (REIS *et al.* 2015).

Além disso, a produção de um biodiesel mais verde, vai possibilitar uma redução maior nos impactos ambientais mais amplos, como o uso intensivo de terras para cultivo de matérias-primas, emissões de gases de efeito estufa, consumo de água na produção e seu potencial impacto em ecossistemas aquáticos e terrestres. A avaliação desses impactos, juntamente com a consideração de alternativas sustentáveis e pesquisas em desenvolvimento, proporciona uma visão holística da sustentabilidade do biodiesel (COSTA *et al.* 2000).

3.2 Proteínas enzimáticas CALA e CALB

Os biocatalisadores, também conhecidos como catalisadores biológicos, são proteínas que desempenham uma função crucial na catalisação de reações em organismos vivos. Eles são amplamente empregados na química orgânica como uma alternativa aos métodos tradicionais devido a uma série de vantagens significativas. Entre estas, destacam-se sua alta eficiência na aceleração das reações, a capacidade de operar em condições suaves, a compatibilidade com uma variedade de substratos sintéticos, em alguns casos, a habilidade de catalisar reações em ambos os sentidos e a seletividade em relação ao tipo de reação catalisada (PAQUES; MACEDO, 2006).

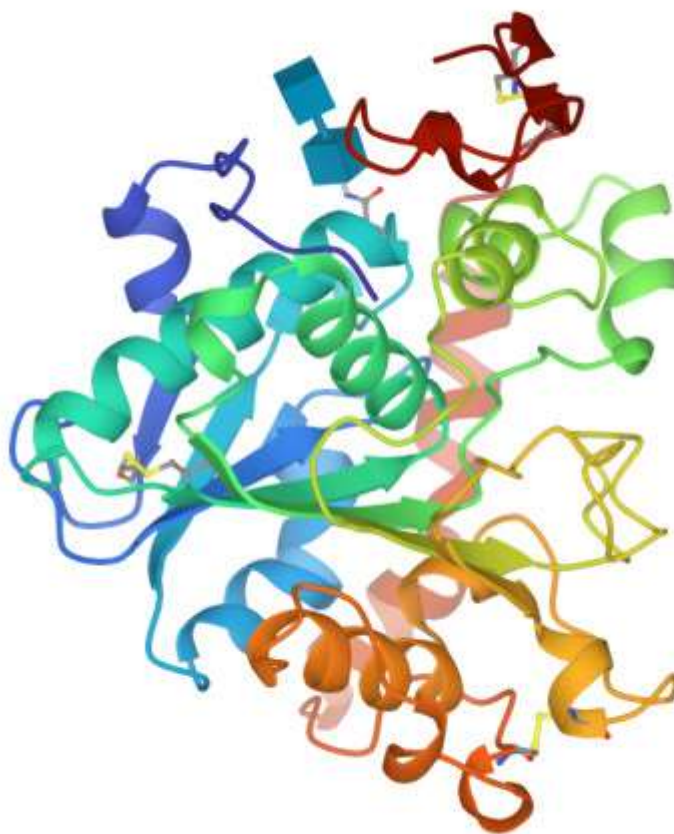
As lipases, ou enzimas lipolíticas, desempenham um papel crucial como biocatalisadores, catalisando reações de hidrólise que convertem óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (VILLENEUVE *et al.* 2000). Além da hidrólise, essas enzimas possuem a capacidade de catalisar uma variedade de reações reversas, como esterificação, transesterificação (incluindo interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (utilizada na síntese de amidas) e lactonização. A atividade de água no meio reacional emerge como um dos fatores determinantes para a eficiência de cada classe de reação (PAQUES; MACEDO, 2006).

As lipases em estudo nessa pesquisa são provenientes da *Candida antarctica*, uma espécie de levedura do gênero *Candida*, conhecido por suas propriedades enzimáticas únicas, especialmente sua capacidade de produzir lipases altamente eficazes (OLIVEIRA *et al.* 2014). As duas variantes são CALB e CALA, amplamente utilizadas na indústria biotecnológica em uma variedade de aplicações, como na produção de biodiesel, indústria alimentícia, indústria de detergentes, entre outros (CANSIAN *et al.* 2022). Sua eficiência e estabilidade tornam-na uma escolha valiosa em muitos processos industriais.

A lipase do tipo B (CALB), uma enzima globular, é composta por 317 resíduos de aminoácidos, com dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, uma massa molecular (MM) de 33 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 6.0 (FERNANDES *et al.* 2014; VILLENEUVE *et al.* 2000) Esta classe de enzimas é reconhecida por sua notável estabilidade, alta especificidade de substrato e impressionante regio-, quimio- e estereosseletividade (Figura 2) (CANSIAN *et al.* 2022; GHANEM, 2007).

Possui forte capacidade de biocatalisar as reações de transesterificação entre óleos vegetais ou gorduras animais e álcoois, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos. Além da sua capacidade de permanecer ativa em diferentes pHs e temperaturas torna-as extremamente versáteis em várias aplicações industriais (FERRAZ *et al.* 2018).

Figura 2 - Estrutura cristalográfica da lipase CALB.



Fonte: (UPPENBERG *et al.* 1994).

Já, a lipase do tipo A (CALA) é composta por 431 aminoácidos, com uma massa molecular (MM) de 45 kDa e um ponto isoelétrico (pI) (Figura 3, p. 23). A CALA exibe

diversas propriedades vantajosas para catalisar reações, incluindo notável estabilidade térmica; pode operar de forma altamente eficiente em temperaturas superiores a 90 °C, tornando-a possivelmente a lipase de tipo selvagem mais termostável (DOMÍNGUEZ *et al.* 2005). Além disso, essa lipase demonstra uma notável tolerância a uma ampla faixa de pHs, mantendo sua estabilidade em ambientes ácidos, embora seu pH ótimo seja 7.0 (MONTEIRO *et al.* 2019).

Figura 3 - Estrutura cristalográfica da lipase CALA.



Fonte: (BRANDT *et al.* 2008).

Este biocatalisador também demonstra seletividade para ácidos graxos trans e alta quimioseletividade em relação aos grupos amina (ONDUL *et al.* 2012). Além disso, a CALA é notavelmente a única lipase do tipo selvagem capaz de catalisar a resolução cinética de álcoois terciários volumosos e estereotipados (LÖFGREN *et al.* 2019). Quando se trata de substratos como triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos, a CALA exibe uma preferência significativa por ácidos graxos de cadeia longa em vez de ácidos mais curtos (DOMÍNGUEZ *et al.* 2005).

Consequentemente, observa-se que o emprego de lipases na biotransformação de óleos e gorduras apresenta diversas vantagens em relação à catálise química. Isso viabiliza a investigação da produção de biodiesel utilizando essas proteínas, uma vez que incluem benefícios como a síntese seletiva de novos triacilgliceróis com propriedades calóricas desejáveis e facilmente metabolizáveis pelo organismo, além da hidrólise de óleos para a produção de ésteres, glicerol e ácidos graxos de grande valor industrial (CANSIAN *et al.* 2022).

As lipases CALA e CALB possuem particularidades estruturais e funcionais que impactam sua utilização em processos biotecnológicos. A (Tabela 3) faz uma análise comparativa entre essas duas lipases, ressaltando suas características físico-químicas e catalíticas.

Tabela 3 - Comparação entre as lipases CALA e CALB.

Característica	CALA	CALB
Organismo de origem	<i>Candida antarctica</i>	<i>Candida antarctica</i>
Número de aminoácidos	431	317
Massa molecular (MM)	45 kDa	33 kDa
Ponto isoelétrico (pI)	~7.0	6.0
Estabilidade térmica	Alta (resistente a >90°C)	Alta, adaptável a diferentes temperaturas.
Estabilidade ao pH	Mantém-se estável em ambientes ácidos.	Ativa em diferentes pHs
Seletividade	Alta quimioseletividade para grupos amina e ácidos graxos trans.	Regio-, quimio- e estereosseletividade elevada.
Preferência por substratos	Ácidos graxos de cadeia longa	Alta especificidade de substrato.
Aplicações industriais	Resolução cinética de álcoois terciários volumosos, biotransformação de óleos.	Transesterificação de óleos e gorduras para produção de biodiesel.
Reações catalisadas	Esterificação, transesterificação, aminólise, lactonização.	Transesterificação, hidrólise, esterificação.

Fonte: Autor (2025)

3.3 Ácido oleico como ligante

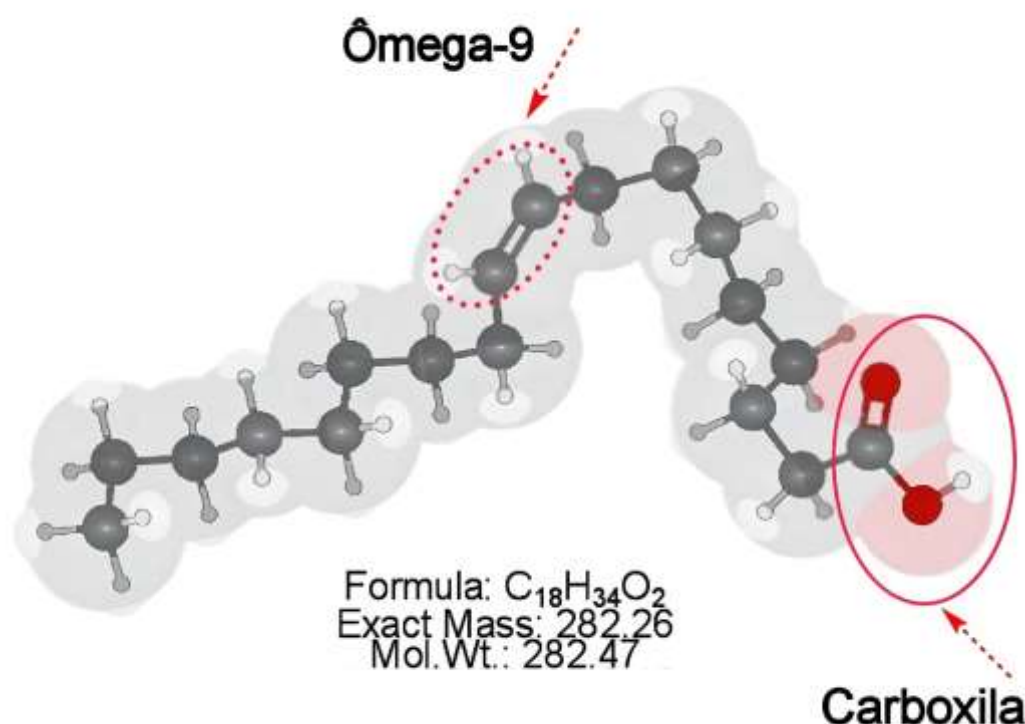
Lípidos constituem um grupo heterogêneo de compostos intimamente relacionados com os ácidos graxos, caracterizados por sua relativa insolubilidade em água e solubilidade em solventes apolares. Nesse contexto, destacam-se os ácidos graxos, os triglicerídeos (TG) e os fosfolípidios (SANTOS *et al.* 1999).

Os ácidos graxos são compostos por cadeias hidrocarbonadas com grupos carboxila (Figura 4, p. 25), podendo ser classificados como saturados ou insaturados. Exemplos de ácidos graxos saturados incluem o láurico, o palmítico, o mirístico e o esteárico, enquanto os

insaturados incluem o oleico, o linoleico e os ácidos ômega-3. Além de sua função energética, os ácidos graxos desempenham um papel essencial na síntese de lipoproteínas e prostaglandinas (SANTOS *et al.* 1999).

O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado, tradicionalmente reconhecido por suas propriedades antioxidantes, contribuindo para a redução da oxidação do LDL-colesterol, forma aterogênica (CARLOTA, 2001). Este ácido é líquido e oleoso, insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como benzeno, álcool e éter. Possui odor suave e é incolor, com propensão a mudar para tonalidades amareladas ou marrons quando exposto ao ar (CORDEIRO *et al.* 2011). Tem como formula molecular $C_{18}H_{34}O_2$, sua massa molar está em torno de 282,47g/mol, ponto de fusão aproximadamente 13-14° C, ponto de ebulição aproximadamente 360°C e Log P (coeficiente de partição octanol/água) aproximadamente 7,73 (SILVA, 2018).

Figura 4 - Estrutura molecular do Ácido oleico.



Fonte: Autor (2025)

O ácido oleico torna-se um bom modelo exploratório no docking molecular devido às suas propriedades de ligação ao receptor, facilitando a esterificação de ácidos graxos utilizando ácidos de Lewis como catalisadores. As moléculas de ácidos graxos são adsorvidas na superfície do catalisador, resultando em um aumento da densidade de carga positiva no carbono

carbonílico, devido à interação entre o par de elétrons do oxigênio carbonílico do ácido graxo e o metal presente na estrutura do catalisador. Isso favorece o ataque nucleofílico do par de elétrons da hidroxila alcoólica, levando à formação de um intermediário tetraédrico, seguido pela eliminação de uma molécula de água e a formação do monoéster graxo (FERREIRA *et al.* 2013).

É um ácido graxo amplamente utilizado na produção de biodiesel devido às suas propriedades favoráveis. Sua aplicação nesse contexto não apenas contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, mas também promove a utilização de fontes renováveis de energia. Como resultado, o biodiesel produzido a partir do ácido oleico oferece uma alternativa mais sustentável e ambientalmente amigável aos combustíveis fósseis convencionais (SANTOS; REZENDE, 2012).

Perspectivas futuras nessa área incluem a investigação de novas tecnologias e métodos para melhorar a eficiência da produção de biodiesel, bem como o desenvolvimento de processos mais limpos e sustentáveis. Esses avanços podem ajudar a impulsionar ainda mais a adoção do biodiesel como uma fonte de energia alternativa e contribuir para a transição para uma economia de baixo carbono.

3.4 Docking molecular e Dinâmica molecular

O docking molecular, originado da tradução do inglês significa "ancoramento", é uma técnica computacional utilizada nas áreas de Quimiinformática e Bioinformática como ferramenta metodológica estrutural (ALVES *et al.*, 2018). Essa abordagem é empregada na modelagem de interações entre moléculas, especialmente no contexto da química medicinal e do design de fármacos, permitindo prever a conformação e a afinidade de interação entre um ligante e um receptor biológico. O receptor pode ser uma macromolécula, proteína, receptor de membrana ou enzima, e a interação é simulada por meio de repetidas tentativas de encaixe no alvo (VERLI, 2014). Para isso, diferentes modelos são utilizados, variando em complexidade e realismo, o que possibilita análises mais precisas das interações moleculares.

O docking molecular é um método essencial no planejamento molecular, onde se busca encontrar a melhor conformação de um ligante ao se encaixar na proteína receptora, priorizando interações de baixa energia e alta afinidade (FERRO *et al.*, 2019; RUBA *et al.*, 2014). Para isso, diferentes modelos são empregados, variando o grau de flexibilidade do ligante e do receptor, o que impacta diretamente a precisão e a demanda computacional da simulação.

O modelo rígido considera tanto o ligante quanto o receptor como estruturas fixas, sem alterações estruturais durante o processo de docking. Embora essa abordagem reduza o custo

computacional, torna-se menos realista, pois ignora ajustes conformacionais naturais. Além disso, esse modelo apresenta maior complexidade devido à limitação imposta por grades predefinidas (*grid-based docking*), que restringem o espaço de busca e a localização da cavidade de interação (LOBATO *et al.* 2023; VERLI, 2014).

Já o modelo semirrígido equilibra precisão e eficiência computacional, sendo amplamente utilizado. Nele, o ligante é tratado como uma estrutura flexível, permitindo que sofra modificações conformacionais, como torções e estiramentos, enquanto o receptor permanece rígido (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018). Essa abordagem melhora a acurácia da predição ao possibilitar um melhor ajuste do ligante ao sítio de ligação.

Por fim, o modelo flexível é o mais realista, pois permite que tanto o ligante quanto o receptor sofram ajustes estruturais durante o docking. Isso possibilita uma interação mais próxima do comportamento molecular real, minimizando a energia do complexo formado. No entanto, o custo computacional elevado torna esse modelo menos viável para triagens virtuais de larga escala (VERLI, 2014).

Os Algoritmos Genéticos (AGs) são métodos inspirados na biologia evolutiva e amplamente utilizados para resolver problemas de otimização e busca (CARVALHO *et al.*, 2003). No contexto do docking molecular, esses algoritmos simulam a evolução das interações entre um ligante e um receptor, onde o genótipo é representado pela estrutura do ligante e o fenótipo corresponde às coordenadas atômicas no receptor. Durante esse processo, pares aleatórios de indivíduos passam por cruzamentos e mutações, permitindo a seleção das conformações mais estáveis enquanto as menos adequadas são eliminadas (KUMA *et al.*, 2010).

Além dos AGs, outra ferramenta fundamental no estudo computacional de interações moleculares é a Dinâmica Molecular (MD) (COSTA, 2018). Essa abordagem simula o comportamento microscópico de moléculas ao longo do tempo, utilizando equações de movimento baseadas em campos de força. Na prática, os átomos são representados como esferas, enquanto as ligações químicas são modeladas como molas conectadas a essas esferas. A trajetória da simulação é determinada pelos cálculos de movimento de Newton, enquanto as interações entre átomos seguem a lei de Hooke (JIANG *et al.* 2022). Através da MD, é possível analisar mudanças conformacionais, interações intermoleculares e propriedades cinéticas, fornecendo informações complementares às análises de docking (NAMBA *et al.*, 2008).

Os modelos empregados na Modelagem Dimensional variam de acordo com o grau de detalhamento e a complexidade do processamento computacional.

- **Modelo Clássico:** Utiliza a mecânica tradicional para explicar os movimentos atômicos. Campos de força, tais como AMBER, CHARMM e OPLS, são empregados para

calcular as interações entre átomos, o que o torna um método frequentemente usado devido ao seu custo computacional reduzido (PACHECO *et al.* 2010; SOUTO, 2006).

- **Modelo Quântico:** Emprega conceitos da mecânica quântica para detalhar as interações moleculares de maneira mais precisa. Técnicas como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e a *ab initio* possibilitam análises mais aprofundadas, porém requerem grande capacidade computacional, sendo mais recomendadas para moléculas de pequeno tamanho (JUNIOR, 2024; OLIVEIRA *et al.* 2022).
- **Modelo Híbrido (QM/MM):** Combina a mecânica quântica (QM) para regiões de interesse específicas, como o sítio ativo de uma enzima, e a mecânica molecular (MM) para o restante do sistema. Este modelo concilia exatidão e eficácia no processamento de dados, sendo frequentemente utilizado em pesquisas sobre reações enzimáticas e interações entre proteínas (SILVA *et al.* 2014).

Para a aplicação eficaz dessas técnicas, é essencial conhecer as estruturas dos compostos envolvidos, definir o modelo de simulação adequado e compreender os princípios básicos dos cálculos empregados. O método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), por exemplo, é amplamente utilizada para otimizar a estrutura do ligante, garantindo uma configuração mais estável e prevendo suas interações com proteínas, metais ou superfícies catalíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Quando combinada com docking molecular, especialmente utilizando o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGLc), essa abordagem permite obter simulações mais próximas da realidade, garantindo a estabilidade do complexo proteína-ligante e reduzindo a ocorrência de falsos positivos (RUBA *et al.*, 2014).

4 METODOLOGIA

Este estudo adotou uma abordagem qualitativa-quantitativa, focalizando a análise *in silico* das lipases CALA e CALB como biocatalisadores em meio reacional contendo ácido oleico, visando otimizar a produção enzimática de biodiesel, utilizado como biocombustível. A metodologia empregada envolveu uma abordagem integrativa, combinando técnicas de docking molecular e dinâmica molecular para estudar as interações entre as proteínas e o ligante. As etapas dessa interação foram analisadas por meio de programas de computador e interpretadas com base na literatura (CAVALCANTE *et al.* 2022; FONSECA *et al.* 2021, 2023), incluindo comparações experimentais da reação de esterificação.

4.1 Materiais e Métodos: Estudo *In Silico*

4.1.1 Preparação de ligantes e proteínas

As moléculas do ácido oleico em sua forma livre foram construídas utilizando o software Chem3D (AHMADI *et al.* 2005), em suas configurações de auto otimização foi aplicado o campo de força MMFF94S (WAHL *et al.* 2019), a fim de gerar conformações bioativas por minimização de conformadores gerados aleatoriamente, com algoritmo Steepest Descente (PETROVA; SOLOV'EV, 1997), Step per Update 4 (SUTTON *et al.* 2016), pelo software AVOGADRO (HANWELL *et al.* 2012). O ficheiro com o ligante foi convertido para o formato correspondente (pdbqt) com adição dos estados de ionização e tautomeria a pH 7,4, utilizando o software OpenBabel ver. 3.0.0 (O'BOYLE *et al.* 2011). Essa estrutura também está disponível sob o código CID: 445639 no repositório PubChem (TAN *et al.* 2020).

O receptor em estudo foi a estrutura das lipases CALA e CALB, obtida no repositório do Protein Data Bank (PDB) com o código ID CALA (3GUU) e CALB (1TCA) (BERMAN *et al.* 2000), cuja estrutura cristalina foi obtida por difração de raios X complexa. Para viabilizar a acoplagem molecular, foi eliminado os resíduos interferentes, as moléculas de água e o inibidor sintético. Utilizando o software Discovery Studio (BIOVIA, 2015), hidrogênios polares foram adicionados de forma separada aos ligantes e à proteína. Esta técnica visa explorar potenciais bases de dados de ligantes virtuais específicos para um determinado alvo proteico. O software utilizado foi o Autodock tools (MORRIS *et al.* 2009).

4.2 Docking Molecular

A acoplagem molecular foi realizada utilizando o AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010), com a implementação de multifilamento de 3 vias e a aplicação da genética Lamarkiana.

Para a ligação da lipase CALA (3GUU) à protease principal, foram definidos os seguintes parâmetros: número de pontos na grade em xyz (30, 30, 30), espaçamento (0.642), e centro da grade em xyz (9.159433 53.119167 2.118367). No caso da ligação da lipase CALB (1TCA) à protease principal, foram empregados parâmetros similares: número de pontos na grade em xyz (30, 30, 30), espaçamento (0.642), e centro da grade em xyz (-2.847793 22.862241 14.848931). Os demais parâmetros foram mantidos conforme configurações padrão. Os ligantes de entrada, contendo hidrogênios polares, foram formatados no estilo (pdbqt). Foram realizados entre 10 a 40 simulações, com mais ou menos 20 redes por vez.

Para validar a eficácia da simulação e avaliar a qualidade dos dockings, adotou-se o critério de pontuação RMSD (Desvio Quadrático Médio), que sugere que um docking realizado de acordo com os parâmetros, apresenta um valor RMSD inferior ou igual a 2.0 Å (SUTHERLAND *et al.* 2007), simultaneamente, utilizou-se a rede neural NNScore, levando em conta a medida em concentração molar da melhor pose (DURRANT; MCCAMMOM, 2010, 2011). O critério de menor energia de ligação sugere que, no complexo previsto pela docagem molecular, a menor energia de ligação é assumida como mais próxima do estado do sítio ativo da enzima, podendo ser associada a uma constante de afinidade (FU *et al.* 2018; HAVRANEK; ISLAM, 2020). As simulações com as principais interações receptor-ligante foram visualizadas utilizando o software Discovery Studio (BIOVIA, 2015) e Pymol (DELANO, 2020).

4.3 Análise Estatística

Os resultados são expressos em valores médios $\pm$ erro padrão da média. Após verificar a normalidade da distribuição e a homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à Análise de variância (ANOVA), utilizando o modelo unidirecional ou bidirecional em experiências com antagonistas (FUJIKOSHI, 1993). Para identificar quais grupos apresentam diferentes estatisticamente significativas, aplicou-se o teste de Tukey (LIN; ZHANG, 2018), um método que compara diretamente as médias dos grupos e ajusta os valores para minimizar erros de múltiplas comparações. Esse teste calcula a Diferença Honestamente Significativa (HSD), gerando uma interpretação mais confiável dos resultados (SOUSA *et al.* 2012). Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v.8.0., adotando um nível de significância estatística fixado em 5% ($P < 0,05$) (SILVA *et al.* 2022).

4.4 Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (MD) foram efetuadas com o programa NAMD (PHILLIPS *et al.* 2005). As melhores conjugações obtidas no acoplamento molecular foram

resolvidas em água no modelo TIP3P (KATO *et al.* 2021), no campo de forças CHARMM36 e adição de íons para neutralizar a carga total do sistema. Finalmente, foi submetido à minimização de energia pelo método Steepest Descent. O sistema foi então introduzido nos equilíbrios NVT e NPT nas condições descritas por Langevin (FARAGO, 2019). As simulações de produção do sistema foram realizadas com um tempo de 100 ns. A qualidade das estruturas obtidas em MDs foi avaliada usando os seguintes parâmetros com NAMD:

- Energia potencial (kcal/mol) (DIEZ *et al.* 2014);
- Energia de Interação Proteína-Ligante (kcal/mol);
- O desvio quadrático médio das posições atômicas das proteínas, dos ligantes e das distâncias entre eles (RMSD, Å), e o desvio quadrático médio das posições atômicas das proteínas, dos ligantes e das distâncias entre eles (RMSD, Å);
- As ligações de hidrogénio foram avaliadas com Dinâmica Molecular Visual (VMD) (HUMPHREY *et al.* 1996);
- A flutuação quadrática média das distâncias mínimas entre proteínas e ligantes foi observada em MD (RMSF, Å) (ARSHIA *et al.* 2021). Os gráficos foram gerados usando o programa Qtrace (LIMA *et al.* 2012).

4.5 Cálculos MM/GBSA

Utilizando o registro de dinâmica molecular (MD) gerado pelo software NAMD (PHILLIPS *et al.* 2005), o cálculo do MM/GBSA foi realizado por meio do MolAICal (BAI *et al.* 2021), sendo as estimativas obtidas através das equações de variação livre de Gibbs 1-3.

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

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

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

Onde ΔE_{MM} , ΔG_{sol} e $T\Delta S$ representam a energia MM da fase gasosa, a energia livre de solvatação (soma da contribuição polar ΔG_{GB} e da contribuição não polar ΔG_{SA}) e a entropia conformacional, respetivamente (GOHLKE; CASE, 2004; GOHLKE *et al.* 2003). A ΔE_{MM} contém a energia de Van Der Waals ΔE_{vdw} , a energia eletrostática ΔE_{ele} e a $\Delta E_{\text{internal}}$ das energias de ligação, angular e diedral. Se não houver alterações estruturais induzidas pela ligação no processo de simulações MD, o cálculo da entropia pode ser omitido (DASGUPTA *et al.* 2017).

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 ligando, a energia

de interação deve ser estimada de acordo com as equações 7, 8 e 9 (EMIRIK, 2022; ŠPONER *et al.* 1999).

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

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

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

4.6 Processo Experimental

4.6.1 Reações de esterificação

Para verificar a atividade enzimática das lipases CALA e CALB nas reações de esterificação, foram medidas as conversões de etanol em ésteres etílicos. Foram realizadas três reações variando a proporção dos biocatalisadores: (1) utilizando exclusivamente a enzima CALA, (2) utilizando exclusivamente a enzima CALB, e (3) uma mistura equimolar das enzimas de CALA + CALB. As reações foram realizadas em triplicatas, sem a adição de solventes orgânicos adicionais no meio. O etanol serviu tanto como reagente quanto como meio reacional.

Foi utilizada uma relação ácido-álcool de 1:4, de ácido oleico e etanol com a enzima, como mostra o esquema 1 (Figura 5, p. 33). Cada reação foi realizada em um Erlenmeyer de 5 mL, ao qual foram adicionados 3 mL da mistura reacional. Para minimizar a evaporação do etanol, os frascos foram hermeticamente vedados com parafilme antes de serem submetidos às condições experimentais. A adição das enzimas foi realizada da seguinte forma:

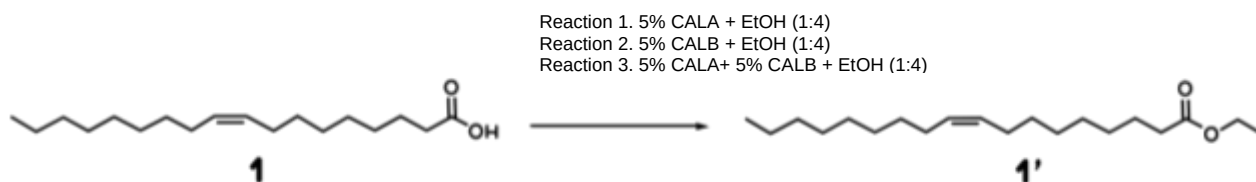
- Sistema reacional 1: 150 µL de CALA (5% v/v em relação ao volume total da reação);
- Sistema reacional 2: 150 µL de CALB (5% v/v em relação ao volume total da reação);
- Sistema reacional 3: 150 µL de CALA + 150 µL de CALB (5% v/v de cada enzima).

Para cada sistema, foi preparado um controle negativo, onde a reação foi conduzida nas mesmas condições, porém sem a adição de enzima, a fim de verificar a conversão espontânea do ácido oleico. Os sistemas foram mantidos sob agitação orbital a 250 rpm e temperatura de 45 °C por 300 minutos, conforme parâmetros descritos por Brandão *et al.* (2021).

A (Figura 5, p. 33) ilustra a configuração experimental dos processos de reação empregados na produção de ésteres etílicos a partir do ácido oleico e etanol, catalisados por

lipases comerciais. Contendo o controle negativo, reação realizada nas mesmas condições, mas sem a presença de enzima, utilizada para avaliar a conversão espontânea do substrato.

Figura 5 - Três esquemas de reação de biocatálise para a reação de esterificação.



Fonte: Autor (2025)

4.6.2 Estimativa do grau de síntese

Para quantificar a conversão dos ácidos graxos livres (AGL) em ésteres etílicos, foram retiradas alíquotas de 100 µL do meio reacional e o padrão de reação sem a enzima, em tempos específicos. Cada alíquota foi diluída em 5 mL de etanol previamente neutralizado e, em seguida, os AGL residuais foram titulados com NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador da reação (SANTOS, 2015).

O índice de acidez (IA) foi determinado antes (IA_i) e após a reação (IA_f) e a conversão foi calculada conforme a Equação 4:

$$Conversion (\%) = \frac{IA_i - IA_f}{IA_i} \times 100 \quad \text{Equação 4.}$$

IA_i representa o índice de acidez inicial, indicando a quantidade inicial de Ácidos Graxos Livres (AGL) introduzida na reação. Enquanto isso, IA_f refere-se ao índice de acidez final, representando a quantidade remanescente de AGL em solução, que não foi utilizado pela enzima (ALEXANDRE, 2022). Para garantir a precisão dos resultados, todas as titulações foram realizadas em triplicata e corrigidas utilizando um branco, composto por uma solução de etanol neutralizado titulado nas mesmas condições, sem amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reação de Esterificação Homogênea

As reações de síntese dos ésteres metílicos do ácido oleico, utilizando a enzima comercial CALA e CALB livre como catalisador homogêneo, foram baseadas nos valores ótimos da pesquisa de Sousa (2013), em que a razão molar foi de 1:4 (ácido e álcool), a temperatura foi de 37 °C e a velocidade de agitação foi de 150 rpm. O tempo de reação foi de 5h e, para cada reação, foram adicionados 3,0 µL da enzima livre ao meio para um total de 80 UpNPB/g. No final do dia e para cada reação, foi efetuada a suavização. O teor restante de ácidos gordos livres foi utilizado para determinar a taxa de consumo de Ácidos Graxos Livres (AGL) e para selecionar os melhores resultados para efetuar a análise do teor de ésteres formados por cromatografia gasosa. Os resultados das taxas de consumo de AGL obtidas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Taxas de consumo de AGL por reações de esterificação homogênea.

Reação	Volume 1 (mL)	Volume 2 (mL)	Volume 3 (mL)	Branco volume (mL)	Conversão (%)
5% CALA	4.6	4.2	4.2	9.5	53.12
5% CALB	3.0	3.2	3.0	9.3	67.75
5% CALA + 5% CALB	2.6	2.8	2.7	9.2	70.67

Fonte: Autor (2025)

A utilização da enzima comercial CALA na forma livre como catalisador na reação de esterificação dos AGL do ácido oleico promoveu conversões ótimas em ésteres etílicos com apenas 53,12% de conversão. O valor do AGL para a CALB aumentou em quase 15% na sua conversão. Por fim, a que melhor apresentou a conversão em massa foi com a mistura, com um ligeiro aumento e passou a registrar 70,67%, sob as mesmas condições de reação.

Em suma, os resultados das reações foram moderados e relativamente próximos entre si. Observou-se que as enzimas comerciais, CALA e CALB na forma livre, apresentam boa atividade na presença de etanol. No entanto, o desempenho catalítico é significativamente influenciado pela natureza do ácido carboxílico utilizado, uma vez que sua acidez afeta a polarização do carbono carbonílico, interferindo na eficiência do ataque nucleofílico da hidroxila alcoólica e, conseqüentemente, na formação do monoéster graxo.

Os processos de síntese de biodiesel têm-se revelado eficientes quando se utilizam álcoois de cadeia curta (metanol, etanol, isômeros de butanol), sendo o metanol o mais adequado na rota química por ter boa reatividade e não formar uma mistura azeotrópica com a

água (GRUNWALD, 2014). O processo enzimático não requer condições de álcool anidro, uma vez que a maioria das enzimas necessita de alguma água para ser mais ativa. Porém, essa quantidade de água é tão limitada que não facilita o processo reversível de esterificação ou transesterificação, que é a hidrólise (GRUNWALD, 2014; REMONATTO *et al.* 2018).

Estudos realizados por Remonatto (2017), mostraram que as enzimas livres obtiveram bons rendimentos na síntese de ésteres etílicos (FAEE), sendo que as melhores taxas apresentadas pelos pesquisadores foram as obtidas com etanol, porém com uma razão molar etanol/ácido de 4:1.

5.2 Análises de Dados Molecular

5.2.1 Docking molecular

Com base na literatura de (ALMEIDA *et al.* 2020) e com algumas adaptações de (FONSECA *et al.* 2020a), este estudo de simulação de acoplamento molecular foi utilizado para elucidar a reação de interação de hidrólise entre o ácido oleico e as lipases CALA/CALB.

Mediante a análise do docking molecular pelo Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010), conseguimos compilar a afinidade e as energias do desvio quadrático médio (RMSD) dos ligantes, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado de acoplamento molecular com as respectivas pontuações de acoplamento.

Compostos	Energia de Afinidade (kcal/mol)	RMSD	Lipase
Ácido Oleico	-4.9	<2.0 Å	CALA
Ácido Oleico	-6.0	<2.0 Å	CALB
Ácido Oleico	-8.5	1.54 Å	CALA/CALB misturada

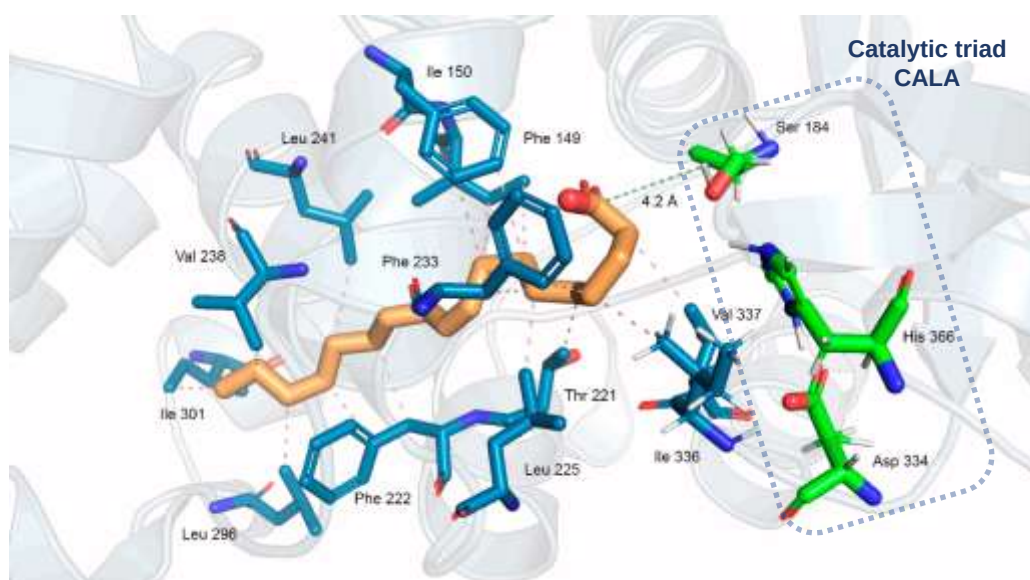
Fonte: Autor (2025)

Apesar de todos se alocarem na mesma região do sítio ativo da proteína, que normalmente é constituído pela tríade catalítica (Ser-His-Asp), no caso da lipase CALA, a simulação sugere uma composição de resíduos Ser 184, His 366 e Asp 334 (SANDSTRÖM *et al.* 2009), e para a CALB, os resíduos Asp 187, His 224 e Ser 105 (CEN *et al.* 2019).

Os NACs (Nucleófilos no Sítio Catalítico) são caracterizados pela sua compatibilidade com as conformações que envolvem o ataque do sítio catalítico ao carbono eletrofílico do grupo acila (BRUICE; LIGHTSTONE *et al.* 1999). Em um NAC típico, a distância entre o oxigênio do resíduo Ser 184 (CALA)/Ser 105 (CALB) e o carbono carbonílico geralmente se observa próxima a 3 Å, enquanto os mesmos átomos, juntamente com a molécula de oxigênio carbonila, formam um ângulo de aproximadamente 60°, alcançando um máximo de 90° (CORICI *et al.* 2015).

Nesta simulação, para a lipase CALA, não foram observadas características que configurariam uma NAC em todas as 10 poses estudadas para cada substrato. Entretanto, apresentam-se as interações mais destacadas da pose considerada mais próxima ao sítio ativo da enzima. No complexo entre a CALA e o ácido oleico, conforme ilustrado na (Figura 6), evidencia-se uma ligação de hidrogênio com a Ser 184 (3.063Å) da tríade catalítica, configurando assim uma NAC, dada a aproximação entre a carbonila do ácido e o referido resíduo. Além disso, foram identificadas interações hidrofóbicas do tipo alquila com os resíduos Phe 149, Ile 150, Thr 221, Phe 222, Leu 225, Val 238, Leu 241, Leu 296, Ile 301, Ile 336 e, por fim, Val 337 (LEVANDOSKI *et al.* 2015).

Figura 6 - O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações dos resíduos com Ácido oleico.



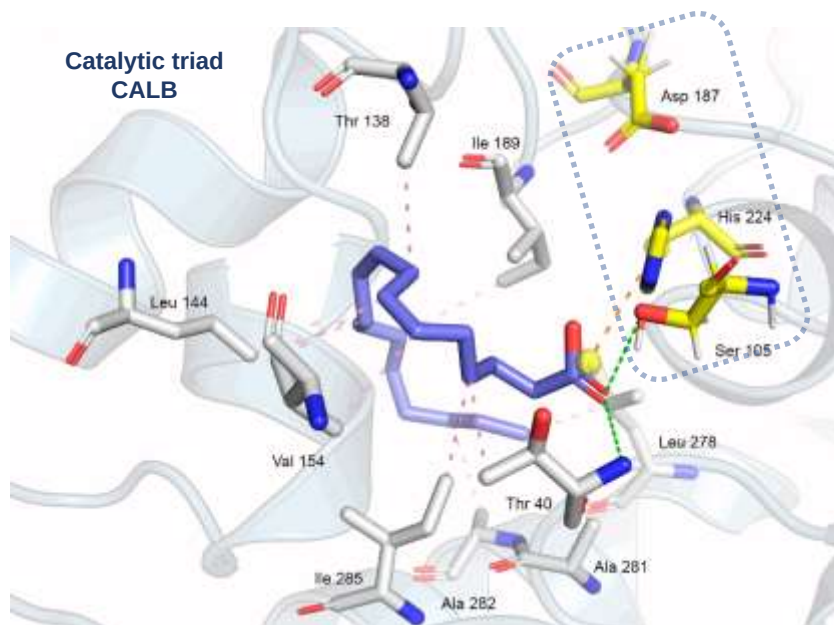
Fonte: Autor (2025)

Ao investigar a lipase CALB em interação com o ácido oleico, na simulação os resultados indicaram uma proximidade notável do sítio catalítico da lipase com a região onde ocorreria a hidrólise. As 10 poses de acoplamento foram, portanto, categorizadas como NACs fortes, uma vez que a distância entre a Ser-O (105) e a carbonila-C do substrato ficou abaixo de 3 Å Figura 8, acompanhada de um ângulo inferior a 60°, como documentado por (FONSECA *et al.* 2020).

Portanto, em relação ao ácido oleico, é evidente uma aproximação hidrofílica com o Ser 105 (2.063Å) (Figura 7, p. 37), estabelecendo uma ligação de hidrogênio na tríade catalítica, e o Thr 40 (2.64Å), e uma ligação de hidrogênio envolvendo o oxigênio do grupo carbonila. Além disso, observa-se uma aproximação hidrofóbica nos resíduos Thr 40, Thr 138, Leu 144, Val 154, Ala 281, Ala 282, Ile 285 e Ile 189, do tipo alquila. Finalmente, para o ácido oleico,

destaca-se outra interação intrigante nos resíduos da tríade catalítica, em particular com His 224, formando um p-ânion na região da carboxila (FONSECA *et al.* 2020).

Figura 7 - O sitio ativo da lipase CALB com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações dos resíduos com Ácido oleico.

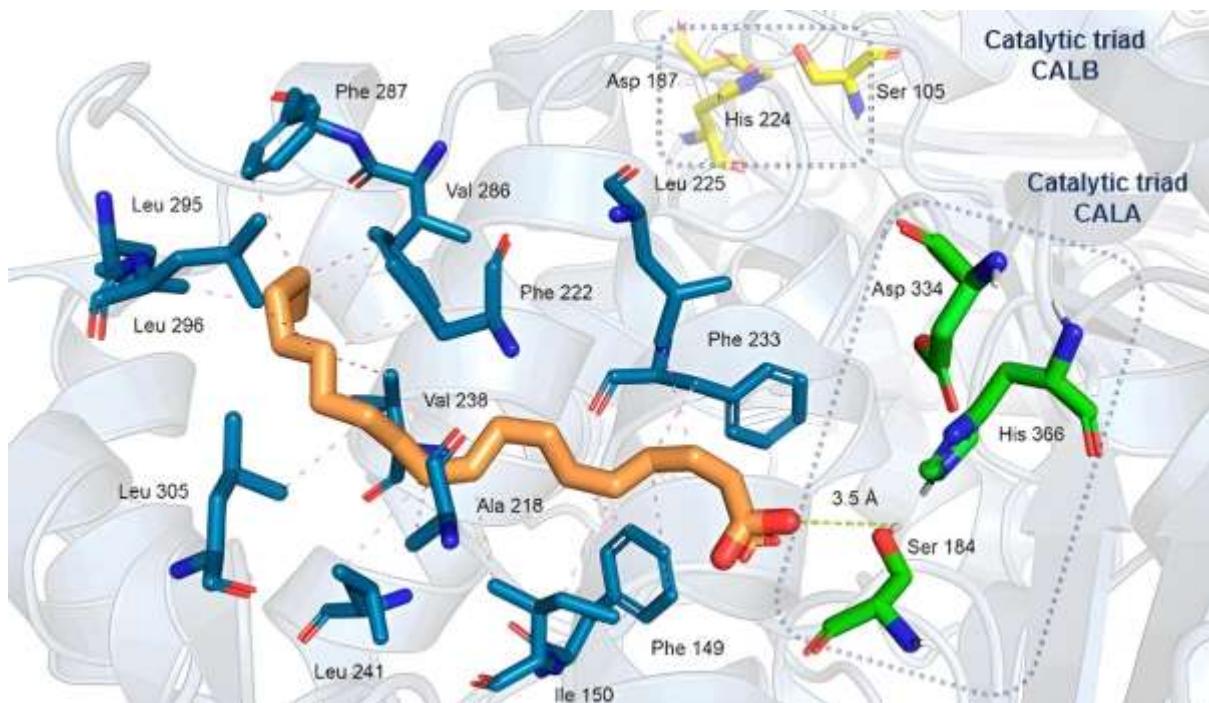


Fonte: Autor (2025)

Na (Figura 7), o ácido oleico interage com resíduos hidrofóbicos do tipo alquila. Na simulação subsequente com a combolipase (Figura 8, p. 37), observamos uma modificação na combinação e agrupamento de outros resíduos livres, resultando em uma maior proximidade com Leu 295, Val 239 e Ala 218. Além disso, foram identificados outros resíduos relevantes, como Leu 296, Leu 305, Leu 241, Ile 150, Phe 149, Phe 233, Leu 225, Phe 222, Val 286 e Phe 287, caracterizados por suas tendências apolares e hidrofóbicas (LEVANDOSKI *et al.* 2015).

Na simulação da combinação das lipases CALA+CALB, em interações com os resíduos do ácido oleico (Figura 8, p. 38), observou-se uma notável aproximação hidrofílica do sítio catalítico da lipase CALA, especialmente com Ser 184, mantendo-se estável, coerente com os resultados obtidos nas simulações individuais. Por outro lado, a estrutura do sítio catalítico da CALB demonstrou uma proximidade mais evidente com os resíduos Leu 225 e Phe 233, sem, contudo, reproduzir a ligação de hidrogênio anteriormente estabelecida na tríade catalítica com a Ser 105 e a His 224. Essa diferenciação sugere possíveis variações na interação entre as lipases em conjunto, enriquecendo nossa compreensão das dinâmicas moleculares envolvidas (FONSECA *et al.* 2020).

Figura 8 - Combinação do combolipase CALA+CALB com as tríades catalíticas e as interações dos resíduos com o Ácido oleico.



Fonte: Autor (2025)

5.3 Estudo *In Silico*

5.3.1 Acoplamento molecular entre as duas Lipases

As tríades identificadas nas interfaces consistem em Ser 184, His 366 e Asp 334 provenientes da Cadeia A (CALA), e Asp 187, His 224 e Ser 105 da Cadeia B (CALB). Apesar de termos incluído esses resíduos como locais de interação nas interações proteína-proteína, não detectamos um envolvimento direto de ambos os resíduos. Não há evidências de participação direta na estabilização do complexo, seja por meio de ligações hidrogênicas ou interações hidrofóbicas.

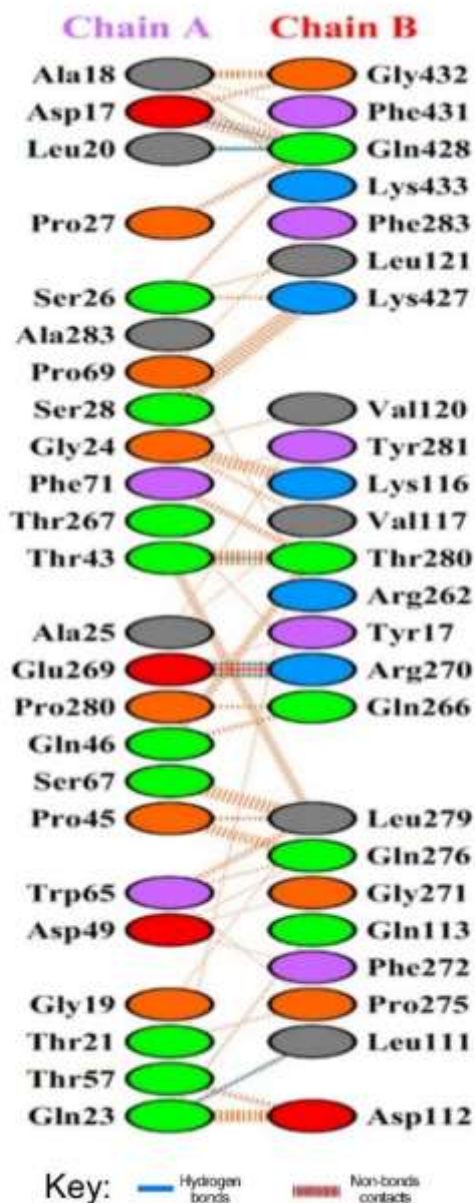
A análise dos resultados da interação proteína-proteína, obtidos com base nos mínimos de energia, revela a interação entre aminoácidos livres, dispostos nas estruturas das lipases. As interações mediadas por ligações de hidrogênio entre as proteínas destacam a participação específica de Asp 17 e Leu 20 com Gln 428, Thr 267 com Thr 248, Glu 46 com Arg 270 e Gln 23 com Leu 111 (Figura 9, p. 40). É importante notar que todos os resíduos presentes na interface são conservados em termos de sequência, conforme evidenciado por alinhamentos e

pesquisa de domínios conservados no NCBI (RAYCHAUDHURI *et al.* 2006; VANCE *et al.* 2003).

Ao analisar a representação da superfície do complexo nas Cadeias A e B na figura abaixo, destacamos uma notável complementaridade de formas, indicando uma possível interação estável entre as duas proteínas. Cada oval colorido representa um resíduo de aminoácido indicados nas cadeias, e as conexões entre eles indicam diferentes tipos de interações, sendo as linhas azuis referentes as ligações de hidrogênio, que são interações polares importantes para a estabilidade da proteína. As linhas vermelhas indicam contatos não polares, que envolvem interações hidrofóbicas ou de Van der Waals (VANCE *et al.* 2003).

As estruturas polares ácidas são identificadas em vermelho (negativamente carregados, tendem a formar ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com resíduos ácidos), as polares neutras em verde (participam de ligações de hidrogênio e estabilizam interações proteína-proteína), as alifáticas em tons de cinza (esses resíduos normalmente participam de interações hidrofóbicas), as aromáticas em púrpura (envolvem-se em empilhamento aromático e interações hidrofóbicas), glicina e prolina em laranja (referente a resíduos especiais, a prolina pode ser encontrada em regiões estruturais rígidas) e resíduos básicos em azul (são comuns em ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com resíduos ácidos) (SARKER *et al.* 2024). Esses resultados fortalecem a robustez e a viabilidade da interação proteica, proporcionando uma visão mais abrangente da natureza específica dessa interação. Sugestivamente, a coloração revela padrões que podem ser fundamentais para compreender aspectos específicos dessa interação molecular (FAZIL *et al.* 2012).

Figura 9 - Interação proteína-proteína entre Chain A (CALA) Chain B (CALB).

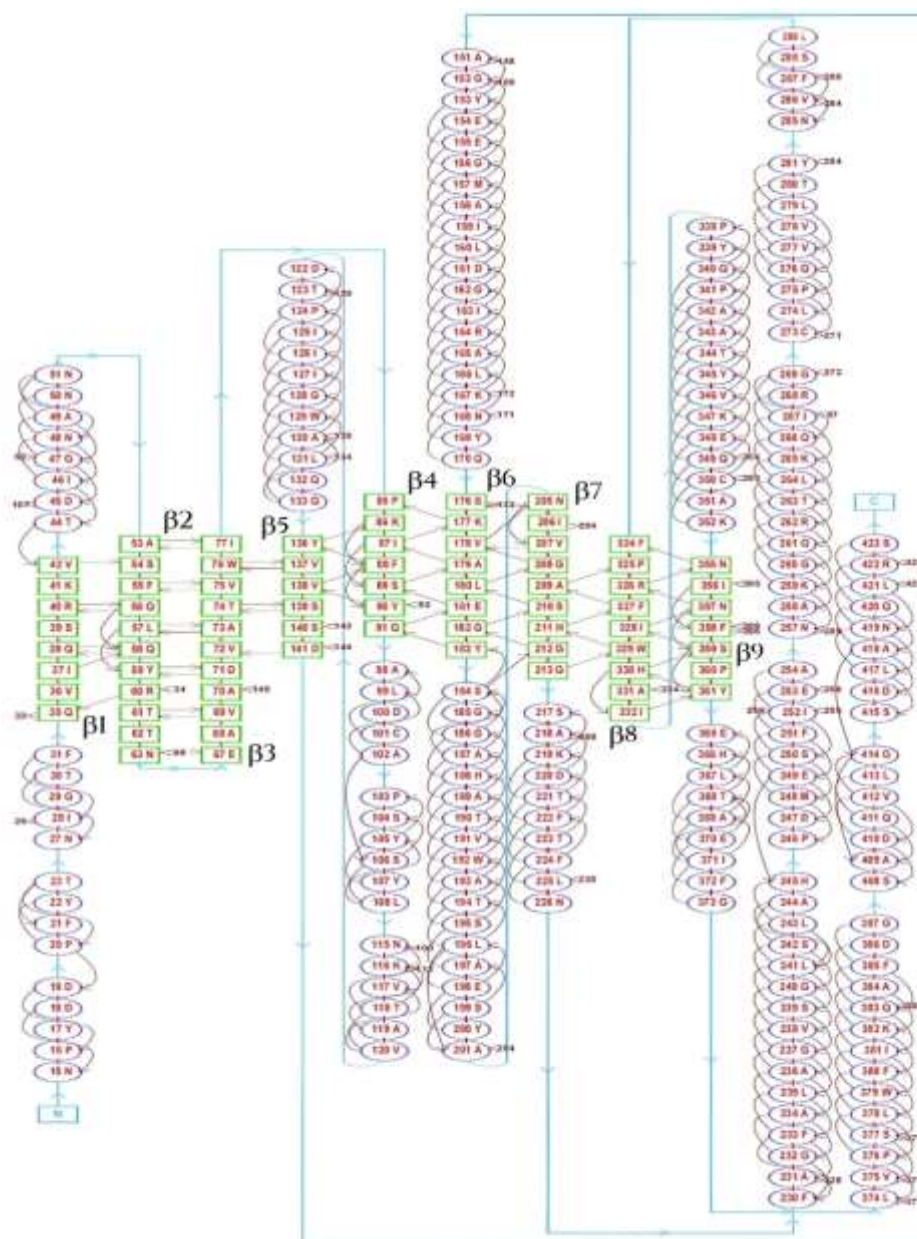


Fonte: Autor (2025)

O diagrama Topológico de Hera, analisa a estrutura de proteínas e a distribuição integral de todos os resíduos, livres das estruturas secundárias como hélice de α e folhas de β , de maneira simplificada (Figura 10, p. 41), por meio de agrupamentos de aminoácidos em cadeias e suas rupturas, além da organização espacial e topológica (VAZQUEZ, 2018). O número de cisalhamento/ruptura do cano, uma medida do escalonamento dos fios na folha fechada, é 13. Pois dois laços dispostos na cadeia β_9 podem ser considerados como uma dupla de laços simétricos, sugerindo uma simetria na estrutura da proteína (HUET *et al.* 2013).

A primeira alça é formada por um eixo 4, que está topologicamente relacionado a $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$, respectivamente, sendo conectado a $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$ e $\beta 9$. As cadeias $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ são paralelas entre si, porém são separadas da cadeia $\beta 4$ pela cadeia $\beta 5$. Essa interferência sugere que $\beta 4$ esteja em uma orientação antiparalela em relação ao seu conjunto primário de alças. As cadeias $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$ e $\beta 9$ permanecem paralelas à estrutura, apesar de sofrerem interferência de outras cadeias. Essa conformação dobrada é denominada "double-barrel" e foi observada em várias outras estruturas proteicas, conforme mencionado por (CASTILLO *et al.* 1999).

Figura 10 - Diagrama topológico Hera da estrutura CALA e CALB.



Fonte: Autor (2025)

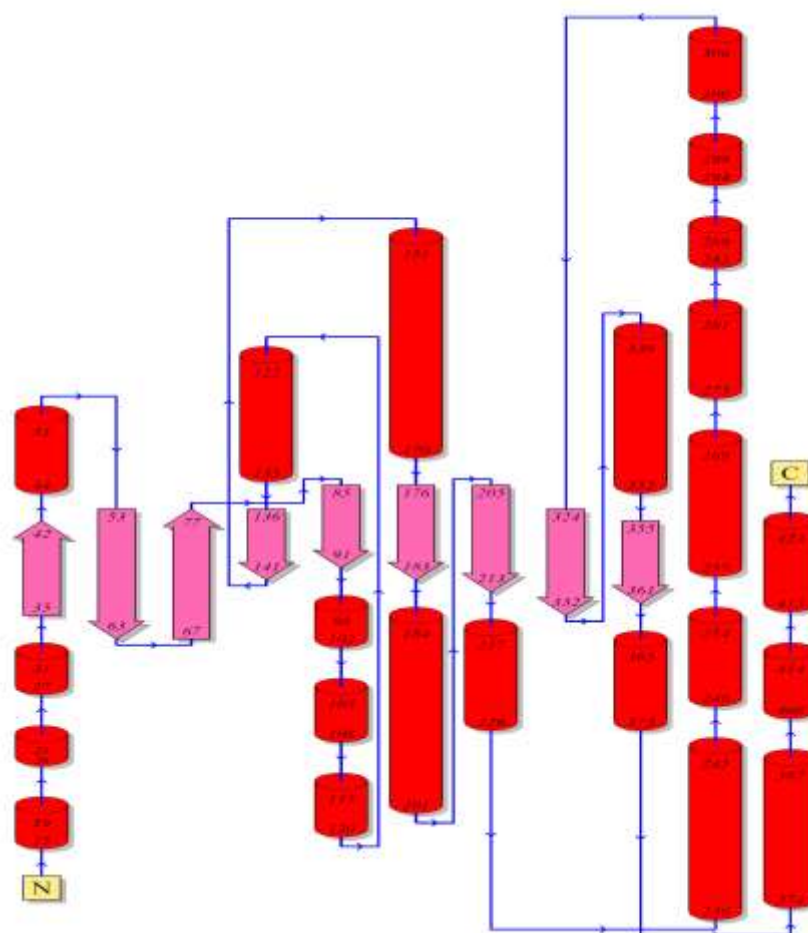
A estrutura secundária das proteínas CALA+CALB foi analisada utilizando o método PSIREN, revelou uma distribuição diversificada de elementos estruturais. Esses elementos incluem bobinas, hélices alfa e folhas beta. O diagrama topológico resultante representa graficamente a disposição desses elementos na subunidade da proteína (GHAZI *et al.* 2023).

A disposição dos elementos da estrutura secundária na subunidade são caracterizados por, setas grandes cor-de-rosa representam as cadeias beta, enquanto cilindros vermelhos indicam alfa-hélices, as setas azuis menores indicam de ligação a direcionalidade da cadeia proteica e os números dentro dos elementos estruturais secundários correspondem aos números do primeiro e do último resíduo (Figura 11, p. 43) (LISNYAK, 2017).

Neste diagrama, as setas grandes cor-de-rosa são usadas para representar as cadeias beta, que são segmentos de cadeias polipeptídicas estendidas e organizadas em folhas planas. Os cilindros vermelhos indicam as alfa-hélices, que são estruturas secundárias enroladas, conferindo estabilidade à proteína. As setas azuis menores indicam a direcionalidade da cadeia proteica, fornecendo informações sobre a orientação dos resíduos ao longo da cadeia polipeptídica (GHAZI *et al.* 2023).

Além disso, os números dentro dos elementos estruturais secundários correspondem aos números do primeiro e do último resíduo de cada elemento, ajudando a identificar sua extensão ao longo da sequência proteica (HAGHROOSTA *et al.* 2020). Foi observado 9 segmentos de cadeias polipeptídicas que formam as folhas betas, 48 são as regiões em que a cadeia polipeptídica muda de direção, conectando segmentos de estruturas beta, possuindo assim um total de 425 aminoácidos (aa) ligantes e não ligantes.

Figura 11 - Diagrama topológico representante de ligação da estrutura secundária da CALA+CALB.



Fonte: Autor (2025)

5.3.2 Análise do complexo de enzimas CALA+CALB

A validação estrutural das lipases é realizada através da elaboração e análise do Gráfico de Ramachandran. Este gráfico possibilita a visualização das áreas conformacionalmente favoráveis e desfavoráveis, baseadas nos ângulos de torção phi (ϕ) e psi (ψ) dos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica (RODWELL *et al.* 2021). Cada ângulo foi calculado com base nas coordenadas atômicas da proteína, o que permitiu a elaboração do diagrama. Os valores de (ϕ, ψ) foram plotados em um gráfico bidimensional (FERREIRA, 2016), onde:

- O eixo X representa o ângulo φ , que varia entre -180° a $+180^\circ$.
- O eixo Y representa o ângulo ψ , que varia entre -180° a $+180^\circ$.

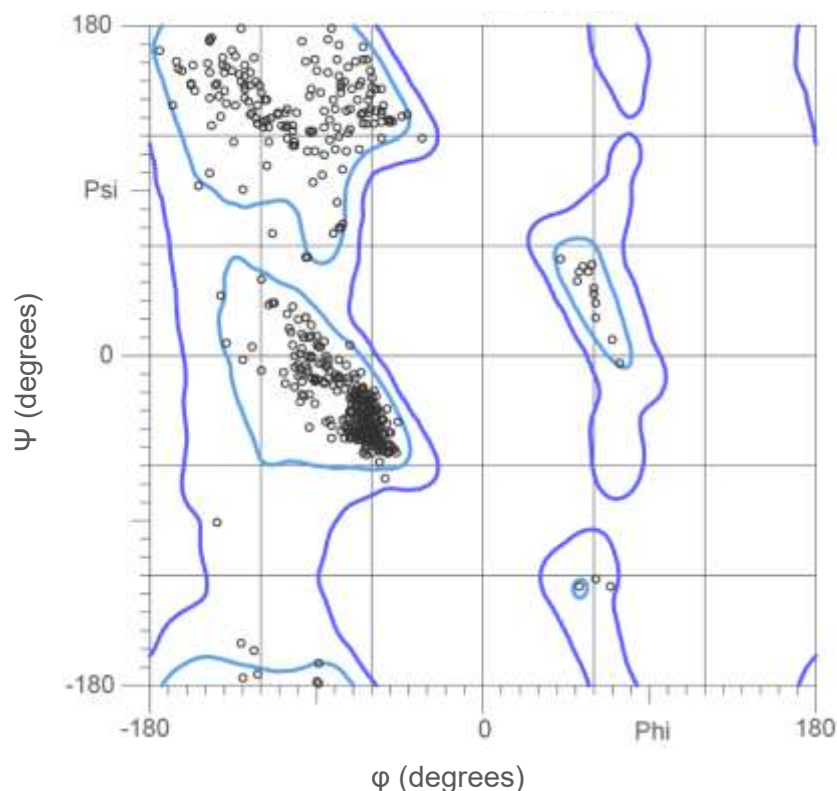
As regiões do gráfico foram coloridas conforme a probabilidade de ocorrência das conformações estruturais, sendo classificadas da seguinte forma (KZIOZEK *et al.* 2021):

- Regiões Favoráveis (azul escuro): Representa conformações de alta estabilidade e frequentemente encontradas.
- Regiões Adicionalmente Permitidas (azul médio): Representam conformações possíveis, porém menos frequentes.
- Regiões Generosamente Permitidas (azul claro): Representa conformações raras, porém aceitáveis.
- Regiões Desfavoráveis (branco ou vazio): Representam conformações estereoquimicamente desfavoráveis, geralmente ligadas a limitações estruturais severas.

O gráfico de Ramachandran (Figura 12, p. 45) revelou que 92,7% dos resíduos estão situados nas regiões favoráveis (representadas em azul). Nas áreas adicionalmente permitidas (em azul escuro), a porcentagem foi de 6,4%; enquanto nas regiões generosamente permitidas (indicadas em azul claro), alcançou 1,5%. A presença de resíduos nas regiões desfavoráveis (vazias) foi de 0,45%. Vale ressaltar que os resíduos localizados nas regiões desfavoráveis refletem as estruturas utilizadas como modelos, alguns dos quais estão localizados nas extremidades da proteína (MUHL; VITÓRIA, 2017).

Esses dados do gráfico corroboram o modelo obtido. Dessa forma, por meio do alinhamento, foi possível identificar as regiões estruturalmente conservadas e variáveis, impedimento examinando os resíduos estruturalmente equivalentes na sequência primária durante o processo de identificação da lipase (PAL *et al.* 2014). Essa abordagem contribui significativamente para a compreensão das características estruturais e funcionais da lipase em questão.

Figura 12 - O gráfico de Ramachandran do complexo enzimático CALA+CALB.



Fonte: Autor (2025)

5.4 Dinâmica Molecular

Um sistema termodinâmico que consiste num soluto e num solvente pode ser modelado utilizando um complexo proteína-ligante. Este complexo é caracterizado por vários tipos de forças intermoleculares, bem como por trocas térmicas entre as moléculas e os íons presentes. As leis da termodinâmica ditam que a relação entre estas moléculas e a forma como a transferência de calor ocorre está relacionada com várias mudanças de energia, como evidenciado por estudos realizados anteriormente na literatura (ARCON *et al.* 2017; BERETTA, 2020; CHINAKA, 2021; STRUCHTRUP, 2020).

Para compreender melhor o comportamento destes complexos proteína-ligando, foram efectuadas simulações de dinâmica molecular utilizando NAMD (PHILLIPS *et al.* 2005). Estas simulações visavam avaliar possíveis alterações conformacionais globais e a estabilidade da proteína após cada conformação, bem como obter informações sobre o mecanismo de interação dos complexos a nível molecular. Estudos recentes realizados por Byléhn *et al.* (2021) e Du *et al.* (2016), utilizaram esta técnica para obter informações valiosas sobre a estrutura e a função dos complexos proteína-ligando.

Os resultados obtidos com estas simulações podem ser valiosos para o desenvolvimento de um processo mais dinâmico e eficiente na produção otimizada do biodiesel, bem como para

a otimização de processos químicos com vista a melhorar a eficiência das reações. Assim, as implicações destas simulações são significativas para um vasto espectro de domínios científicos e industriais, a biotecnologia e a ciência dos materiais (VAMATHEVAN *et al.* 2019).

5.5 Análise de RMSD

Logo após a docagem molecular, a melhor pose do ácido oleico foi selecionada por apresentar as melhores energias de ligação para realizar o estudo da dinâmica molecular, de acordo com o sítio catalítico de CALA, CALB e CALAB.

O gráfico apresenta a Raiz do Desvio Quadrático Médio (RMSD) (Figura 13, p. 47), para as lipases, tanto o complexo CALA como CALB e ácido oleico, onde é possível visualizar as simulações 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) na etapa de simulação de produção do MD com os complexos CALA/ácido oleico (vermelho); CALB/ácido oleico (verde); CALA-CALB/ácido oleico (preto).

A estabilidade relativa do sistema CALB/ácido oleico (verde), apresenta os maiores valores de RMSD e maior flutuação ao longo do tempo, sugerindo maior flexibilidade/dinamicidade estrutural em torno de 3.0 Å (salto brusco) – 4.5 Å, ocorrendo a variação ao longo do tempo, com um aumento acentuado no RMSD após 20ns da trajetória estabilizando-se em 100ns, sugerindo uma mudança conformacional significativa. A estabilidade relativa dos sistemas CALA/ácido oleico (vermelho) e CALA-CALB/ácido oleico (preto), apresentam RMSD menores e relativamente estáveis, indicando que essas configurações mantêm conformações mais consistentes em regiões mais rígidas da estrutura.

No entanto, os sistemas CALA/ácido oleico (vermelho) e CALA-CALB/ácido oleico (preto) apresentam valores mais baixos de RMSD e com menor variação ao longo da simulação, sendo de 1.7 Å - 2.5 Å (início em 20ns) entrando em estabilidade em 2.3 Å a 100ns e CALA-CALB/ácido oleico (preto) 1.5 Å - 2.5 Å (salto de 50ns a 80ns) estabilidade também em 2.3 Å a 100ns.

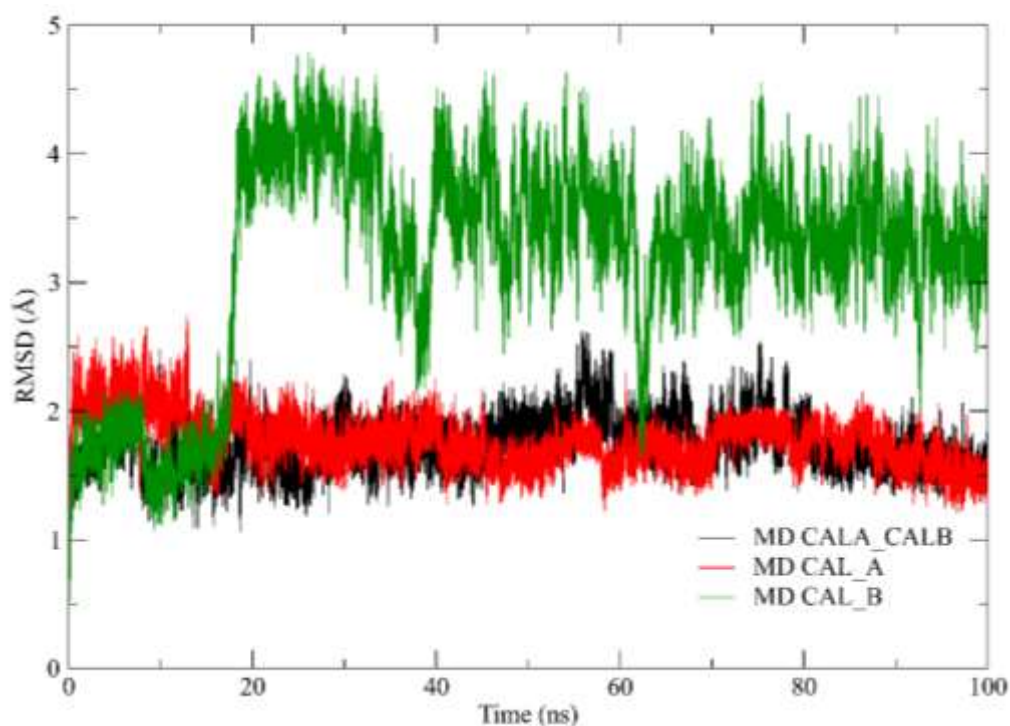
A estabilização estrutural pode estar relacionada à afinidade de ácido oleico pelos diferentes complexos enzimáticos, já a alta flutuação do sistema CALB/ácido oleico (verde) pode indicar menor estabilidade dessa interação, enquanto os sistemas que envolvem CALA parecem mais estáveis. O que é consistente nos estudos anteriores como Cavallari *et al.* (2006), que utilizaram simulações MD para avaliar a estabilidade de uma enzima protease viral em uma solução aquosa com diferentes ligantes contendo diferentes níveis de hélice de α e folhas de β ,

onde, os picos indicam regiões móveis (*loops* em peotéinas) e vales indicam regiões estáveis (hélice de α e folhas de β). As interações de longo alcance foram calculadas usando o procedimento SPME e um banho termal Langevin a 310K (MIYAMOTO *et al.* 2014). Os desvios quadráticos médios (RMSD) foram usados para descrever as mudanças conformacionais da proteína observadas durante as simulações de DM.

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.

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

Figura 13 - Raiz do Desvio Quadrático Médio (RMSD).



Fonte: Autor (2025)

5.6 Análise de RMSF

Com base na análise RMSD, a estabilidade dos complexos foi confirmada. No entanto, a fim de obter informações mais detalhadas sobre as mudanças conformacionais observadas na proteína durante simulações de dinâmica molecular (DM), as flutuações na estrutura média da proteína foram calculadas em termos de Flutuações Raiz Média Quadrada (RMSF) das posições

atômicas, as quais 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, em seguida, calculando-se os desvios quadráticos (KARPLUS; GELIN, 1997).

O tempo total de simulação I foi expresso como o número total de passos de tempo coletados. Este cálculo forneceu informações mais detalhadas sobre a dinâmica da proteína durante as simulações, possibilitando a avaliação do impacto das interações com os complexos formados (KARPLUS; GELIN, 1997; VOROBJEV 2001).

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

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

A (Figura 14, p. 49), exibe o gráfico de RMSF ao longo dos resíduos da proteína para três sistemas diferentes: MD CALA_CALB (preto), MD CAL_A (vermelho) e MD CAL_B (verde), logo o eixo X representa os resíduos das proteínas, enquanto o eixo Y indica a variação do RMSF em Å. O sistema MD CAL_A (vermelho) apresenta picos mais pronunciados, especialmente nos resíduos Leu 57 (A) e Phe 380 (A), sugerindo maior mobilidade nesses pontos estruturais. Além disso, foi a flutuação observada no sistema, podendo indicar variação de maior flexibilidade estrutural, o que pode afetar sua estabilidade funcional (LIRA et al. 2021). Ou seja, valores maiores em algumas regiões, podem sugerir que o ligante causa maior movimento ou desestabilidade estrutural.

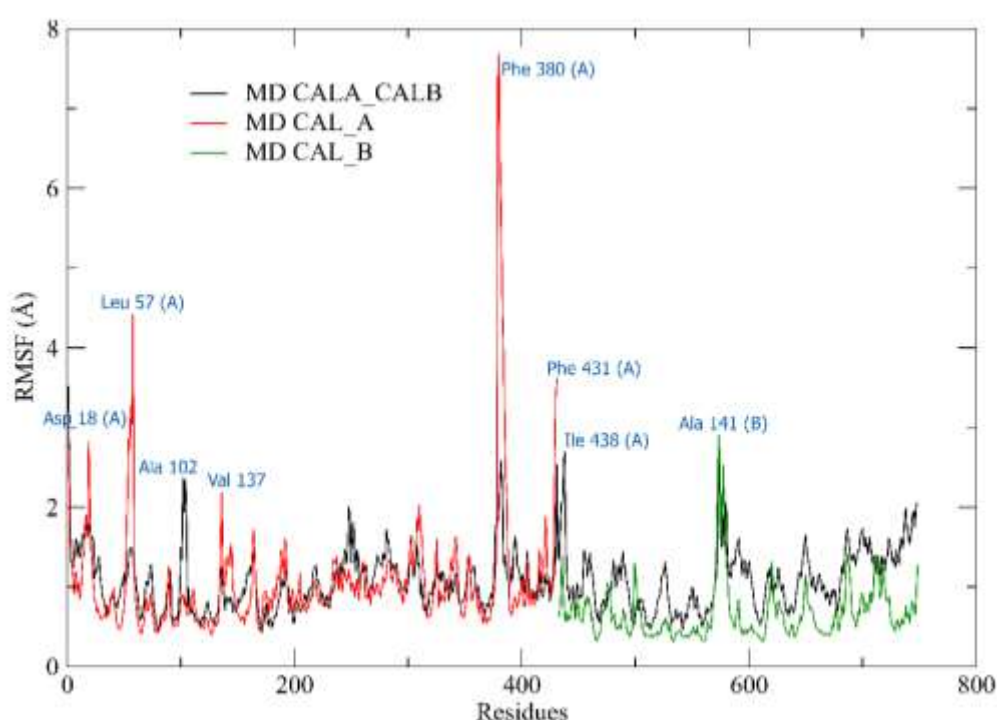
O sistema MD CALA_CALB (preto) exibe uma flutuação intermediária, sugerindo que a interação entre as duas proteínas pode modular a estabilidade global. E o sistema CAL_B (verde) é o mais estável, com menores oscilações na maioria dos resíduos, parece ser mais rígido, o que pode estar relacionado a uma maior estabilidade conformacional. 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. 2020). Dessa forma, valores menores de RMSF em muitos casos indicam que o ligante estabiliza essas regiões, reduzindo sua flexibilidade.

Os resíduos Asp 18 (A), Ala 102, Val 137 e Ala 141 (B), apresentam flutuações moderadas, em comparação aos resíduos Phe 380 (A) e Phe 431 (A) que possuem os maiores picos, indicando que essas regiões da proteína podem ser mais flexíveis ou expostas ao solvente, esses picos mais altos de RMSF geralmente correspondem a regiões que podem estar

envolvidas na interação com ligantes ou sofrer mudanças conformacionais importantes. No entanto, a maior parte dos resíduos exibem RMSF abaixo de 2 Å, indicando uma estrutura relativamente rígida, apenas algumas regiões apresentam flutuação acima de 5 Å, o que pode estar associado a regiões de loops ou domínios flexíveis (SILVA et al. 2022).

As conformações obtidas a partir de simulações de MD para ambas as enzimas foram complexadas com o mesmo ligante através de técnicas de acoplamento, gerando informações importantes sobre os modos de ligação de pequenas moléculas em diferentes estados de enovelamento enzimático (THIRUMALAI et al. 2020).

Figura 14 - Flutuação da raiz quadrada média (RMSF).



Fonte: Autor (2025)

5.7 Análise de ligações de Hidrogênio

O número de ligações de hidrogênio é essencial para verificar se um complexo atingiu a estabilidade em um sistema dinâmico (MASCOLI et al. 2021; RAGUNATHAN et al. 2018). O gráfico apresentado na (Figura 15, p. 51), mostra a evolução das ligações de hidrogênio entre as proteínas e um ligante ao longo do tempo de simulação molecular, para três condições distintas: MD CAL_B (verde), MD CALA_CALB (preto) e MD CAL_A (vermelho).

O complexo MD CAL_B (verde) apresenta uma variabilidade maior nas ligações de hidrogênio ao longo do tempo, com flutuações frequentes entre 0 e 4 ligações, com um pico oscilante entre 50ns a 60ns. Esse comportamento sugere interações mais dinâmicas, podendo

indicar ligações menos estáveis ou intermitentes. O sistema MD CAL_A (vermelho) exibe uma região contínua de pelo menos uma ligação de hidrogênio em quase toda a simulação, indicando maior estabilidade na interação proteína-ligante, essa condição favorece uma interação mais estável com o ligante, mostra oscilações ao longo do tempo entre 60ns a 100ns. Já o sistema MD CALA_CALB (preto) demonstra manter um número reduzido de ligações de hidrogênio, com oscilações variantes de 1-2 ligações com interações esporádicas ao longo do tempo, precisamente de 10ns a 60ns. Pode indicar que essa condição não seja nada favorável em interações fortes entre proteínas e ligante.

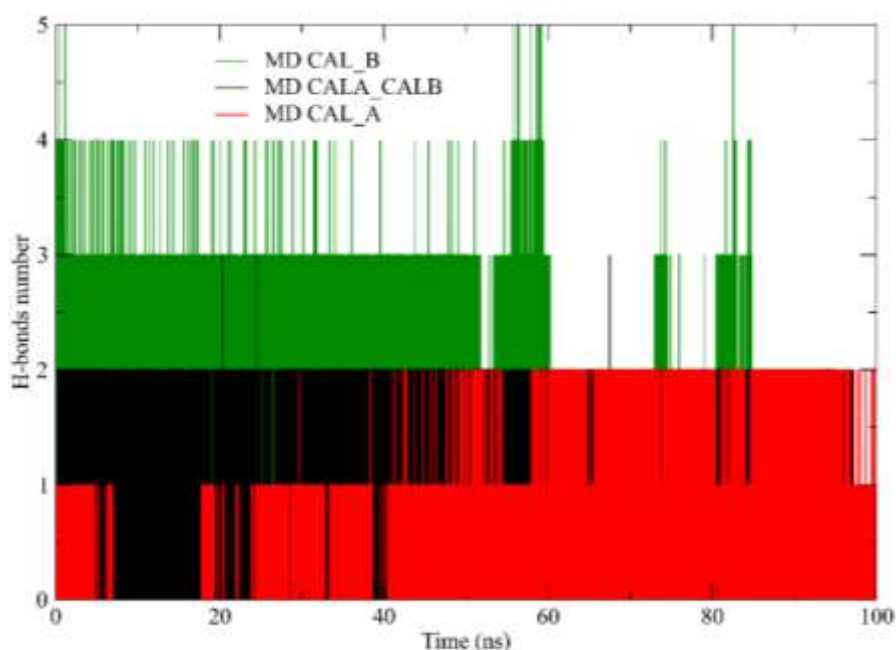
A simulação sugeri que as redes de ligação de hidrogênio relativamente adequadas e medianas, agrega a condição que mantém o ligante mais firmemente associado à proteína do sistema MD CAL_A (vermelho), seria a condição mais favorável, dada sua estabilidade nas ligações de hidrogênio. O momento em que essas conexões estavam muito presentes sugere que essa interação manteve a estabilidade do complexo além do tamanho dos compostos e suas funcionalidades (QIN *et al.* 2021).

Por outro lado, a flutuação do sistema MD CAL_B (verde) pode advertir possíveis mudanças conformacionais na proteína ou no ligante, que impactam a formação das ligações. 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 de sistema contínuo (SOARES; CALIRI, 2009).

Um maior número corresponde de ligações de hidrogênio podem indicar uma estrutura mais estável, no entanto a perda de ligações ao longo do tempo pode sugerir desdobramento ou instabilidade. Já, o número de persistência das ligações entre uma proteína e um ligante indicam a força da interação, ou seja, ligações mais duradouras ao longo de uma simulação molecular sugerem uma afinidade maior entre as moléculas (NAMBA *et al.* 2008)

Nas interações proteína-proteína as ligações de hidrogênio indicam áreas de interação importantes, pois alterações no padrão de ligações de hidrogênio o longo de uma simulação de dinâmica molecular pode sugerir transições entre diferentes estados conformacionais. Além disso, mudanças no ambiente molecular podem afetar a formação de ligações alterando a função e estabilidade da proteína (HASSUNUMA; YONEZAWA, 2023).

Figura 15 - Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as etapas de simulação.



Fonte: Autor (2025)

5.8 Cálculos de 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 com o ácido oleico foi monitorado durante simulações de 100ns de dinâmica molecular (DM), que é uma poderosa técnica computacional que pode fornecer informações detalhadas sobre a dinâmica e estabilidade de biomoléculas (MAZOLA et al. 2015).

O gráfico mostra a evolução SASA para três condições ao longo de 100ns, sendo elas MD CALA_CALB (preto), MD CAL_A (vermelho) e MD CAL_B (verde) (Figura 16, p. 53).

A curva MD CALA_CALB (preto) apresenta os maiores valores de SASA (~ 28.000 - $30.000 \text{ \AA}^2$), indicando que essa estrutura tem maior exposição ao solvente, sugerindo uma estrutura mais aberta ou expandida, em questão molecular CALA/CALB contém íons monovalentes estabilizadores e altos. A curva MD CAL_A (vermelho) mantém valores intermediários/oscilantes entre (~ 18.000 - $20.000 \text{ \AA}^2$), enquanto a curva MD CAL_B (verde) apresenta os menores valores entre (~ 12.000 - $14.000 \text{ \AA}^2$), sugerindo ao longo da simulação uma conformação mais compacta, onde menos superfície da lipase está exposta ao solvente, ou possui regiões mais flexíveis.

Resíduos com alto SASA estão expostos ao meio aquoso, hidrofílicos ou em regiões de superfície. Já os resíduos com baixos índices de SASA estão enterrados no interior da proteína, hidrofóbicos ou envolvidos em interações intramoleculares (FIDELIS, 2017). No entanto, a diminuição do SASA de um resíduo pode sugerir que ele está envolvido na interação com um ligante ou outra proteína, dessa forma proteínas estáveis tendem a manter uma distribuição consistente de SASA ao longo da simulação e o aumento do mesmo pode fornecer indicação de desdobramento parcial ou instabilidade da estrutura (AUSAF ALI *et al.* 2014).

A SASA está diretamente relacionada ao grau de compactação da estrutura da lipase. Uma estrutura mais aberta permite maior interação com o solvente, enquanto uma estrutura mais fechada reduz essa interação (OLIVEIRA, 2020). Para lipases, a acessibilidade ao solvente pode afetar a interação com substrato e a eficiência ao solvente (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004).

A diferença nos valores observados sugere que a interação entre as subunidades ou diferentes conformações impactam diretamente na acessibilidade ao solvente (CHITOLINA *et al.* 2021). Logo, A diferença nos valores de SASA entre as três condições pode estar associada a variações conformacionais da lipase, onde a estrutura MD CAL_B pode apresentar maior exposição de resíduos hidrofílicos, ao mesmo tempo que parece estar mais compacta e menos acessível ao solvente.

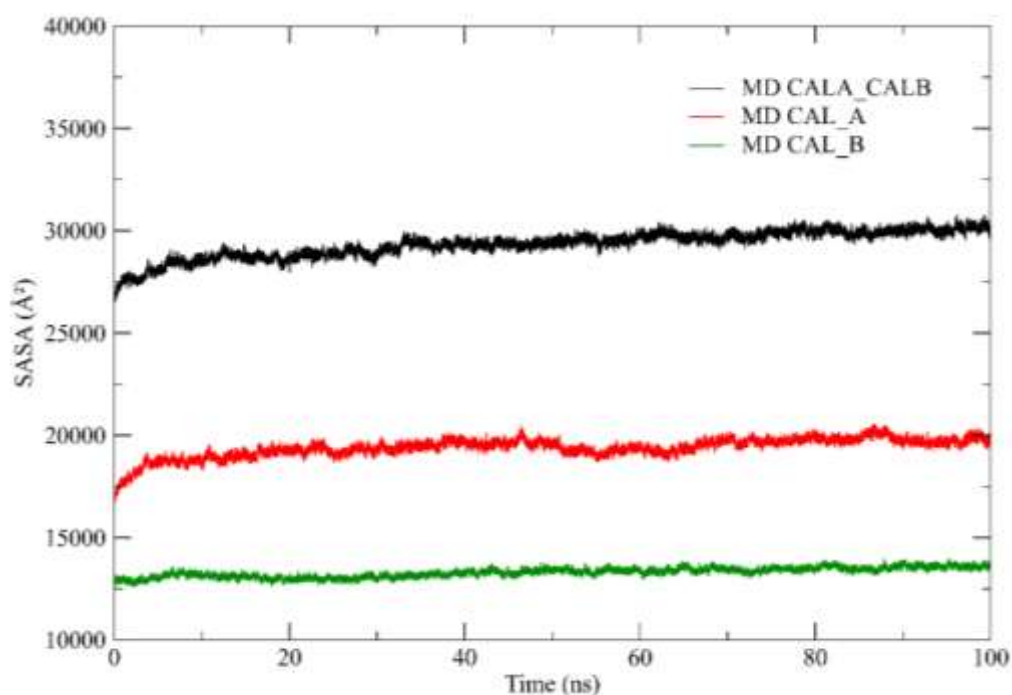
As três curvas mostram uma tendência de estabilidade ao longo do tempo, indicando que as estruturas alcançam um equilíbrio na acessibilidade ao solvente após um período inicial de adaptação. Isso sugere que a ligação dos ligantes à proteína não alterou significativamente a acessibilidade das moléculas do solvente à superfície da proteína (MARSH; TEICHMANN, 2011).

Os sistemas com maiores concentrações de íons apresentaram menores áreas e podem ter encolhido sob a influência da carga superficial, resultando em estruturas proteicas mais compactas. Tornando possível observar um aumento acentuado durante a simulação, indicando relaxamento estrutural, os valores de SASA flutuaram em torno de um valor constante, indicando que as simulações tiveram sistemas equilibrados amostrados. Uma inspeção mais aprofundada dos dados revelou que a flutuação ou "respiração" da superfície relaxada foi principalmente devido a uma flutuação da SASA da área C-terminal flexível. Isso indica que a flexibilidade da região C-terminal desempenha um papel importante na determinação dos valores globais de SASA da proteína (NOVOTNY *et al.* 2007).

Logo, a análise dos valores de SASA durante as simulações MD forneceu informações importantes sobre a dinâmica e estabilidade dos complexos de composição do ácido oleico. Os

resultados deste estudo poderiam potencialmente ser usados para informar o planejamento de novos compostos que interagem mais efetivamente com a superfície da proteína, ou para otimizar as condições sob as quais os complexos proteicos são formados.

Figura 16 - Área superficial acessível por solvente (SASA) da lipase em função do tempo a partir das simulações MD. As curvas são médias dos dados brutos com uma janela de 100ns.



Fonte: Autor (2025)

5.9 Cálculo de MM/GBSA

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

O complexo formado pelo ácido oleico com CALA e CALB simultaneamente demonstrou a melhor estabilidade energética, com uma energia livre de -26,86 kcal/mol, em comparação com as interações individuais entre o ácido oleico e cada uma das lipases em estudo. Os complexos ácido oleico/CALB e ácido oleico/CALA apresentaram energias livres de -16,26 kcal/mol e -13,27 kcal/mol, respectivamente. Em outra simulação, os complexos formados separadamente com CALB e CALA exibiram uma interação com o ligante de -37,19

kcal/mol e -29,14 kcal/mol, respectivamente. Esses resultados são resumidos na (Tabela 3, p. 32). Esses achados sugerem que a formação simultânea do complexo com ambas as lipases resulta em uma estabilidade termodinâmica mais favorável em comparação com as interações individuais (Tabela 6).

O termo variação de entropia diz respeito à perda de graus de liberdade resultante da formação de uma ou mais interações, uma vez que, anteriormente, existiam apenas duas moléculas (ligando e proteína), que podiam aceder a quaisquer graus de liberdade rotacional, translacional ou vibracional, agora existe um complexo onde o movimento das moléculas é muito mais limitado (BEN-TAL *et al.* 2000; Wright *et al.* 2014).

Tabela 6 - Dados de estimativa de energia livre da composição lipídica do ácido oleico contra as lipases CALA e CALB.

Complexos	$\Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{sol}}$ (kcal/mol)	ΔE_{vdw} (kcal/mol)	ΔG_{bind} (kcal/mol)	Desvio padrão
Ácido Oleico/CALA	18.43	-29.14	-13.27	+/- 0.052
Ácido Oleico/CALB	17.67	-33.93	-16.26	+/- 0.023
Ácido Oleico/CALA+CALB	10.33	-37.19	-26.86	+/- 0.027

Fonte: Autor (2025)

6 CONCLUSÃO

O estudo detalha com sucesso a modelagem das interações entre as combolipases CALA e CALB em conjunto com o ácido oleico. Os resultados revelam uma conversão significativa de ácidos graxos livres em ésteres etílicos, atingindo 70,67% ao utilizar a combinação de CALA e CALB, em comparação com 53,12% para CALA e 67,75% para CALB individualmente. Essa complementaridade entre as enzimas sugere que a sinergia de suas propriedades catalíticas pode aprimorar substancialmente a eficiência do processo de esterificação homogênea.

Além disso, os resultados indicam que a síntese de ésteres metílicos do ácido oleico utilizando CALA e CALB como catalisadores homogêneos pode ser uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de transesterificação alcalina. Enquanto os processos convencionais frequentemente exigem condições rigorosas, como altas temperaturas e pressões, além da geração de subprodutos indesejados, a abordagem enzimática se mostra uma rota mais seletiva e ambientalmente sustentável para a produção de biodiesel.

A análise computacional demonstrou que o docking molecular do ácido oleico apresentou pontuações de afinidade de -4.9 kcal/mol para CALA, -6.0 kcal/mol para CALB e -8.5 kcal/mol para a combinação CALA/CALB, evidenciando uma forte interação entre o substrato e os biocatalisadores. A análise da estrutura secundária das proteínas CALA e CALB revelou uma distribuição diversificada de elementos estruturais, incluindo bobinas, hélices alfa e folhas beta, reforçando a estabilidade conformacional do sistema. O gráfico de Ramachandran indicou que 92,7% dos resíduos estavam situados em regiões favoráveis, sugerindo uma conformação estrutural adequada e estável do complexo enzimático CALA/CALB. Além disso, os cálculos MM/GBSA demonstraram que o complexo formado pelo ácido oleico com a combinação CALA/CALB apresentou uma energia livre de ligação de -26,86 kcal/mol, comparado com -13,27 kcal/mol para CALA e -16,26 kcal/mol para CALB individualmente. Esses achados reforçam que a formação simultânea do complexo com ambas as lipases resulta em uma estabilidade termodinâmica mais favorável.

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo, é fundamental considerar algumas limitações e perspectivas futuras. Embora as análises *in silico* forneçam insights valiosos sobre as interações entre as enzimas e o ácido oleico, a validação experimental se faz necessária para confirmar a eficiência catalítica observada e avaliar possíveis discrepâncias entre os modelos teóricos e a realidade laboratorial. Além disso, aspectos físico-químicos do sistema, como a influência do ambiente catalítico, a dinâmica da “tampa” das lipases e a imobilização enzimática em suportes sólidos, são fatores críticos que podem impactar a

estabilidade e o desempenho dos biocatalisadores em aplicações industriais. A exploração desses parâmetros poderia ampliar a aplicabilidade dos resultados e contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais robustas para a produção enzimática de biodiesel.

Em suma, os resultados indicam que a formação simultânea do complexo CALA/CALB com o ácido oleico é termodinamicamente mais favorável e pode representar uma abordagem mais eficiente e ambientalmente sustentável para a síntese de ésteres metílicos. Dessa forma, a utilização de lipases como catalisadores homogêneos pode viabilizar uma rota mais suave e seletiva para a produção de biodiesel, contribuindo para a substituição de métodos convencionais menos sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, A. C. A. et al. Síntese contínua e não catalítica de ésteres etílicos: esterificação e transesterificação. 2013.
- AHMADI, M. et al. Chem3D 15.0 user guide. *Macromolecules*, v. 24, n. 2, p. 1–61, 2005.
- ALEXANDRE, J. Y. N. H. Um estudo teórico e experimental da produção bioquímica de biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*). 2022.
- ALMEIDA, F. L. C. et al. Biodiesel production by lipase-catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 4, p. 1141–1159, 23 jul. 2021.
- ALMEIDA, L. C. et al. Enzymatic transesterification of coconut oil by using immobilized lipase on biochar: An experimental and molecular docking study. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1–8, 2020.
- ALVES, V. M. et al. Cheminformatics: An introduction. **Química Nova Sociedade Brasileira de Química**. 1 fev. 2018.
- ARAÚJO, J. L. et al. Estudo in silico da atividade biológica por docagem molecular da desloratadina contra esquistossomose. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 28, p. e993, 18 jul. 2019.
- ARCON, J. P. et al. Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein-Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 4, p. 846–863, 2017.
- ARSHIA, A. H. et al. 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**, v. 139, 2021.
- AUSAF ALI, Syed et al. A review of methods available to estimate solvent-accessible surface areas of soluble proteins in the folded and unfolded states. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 456–476, 2014.
- BAI, Q. et al. MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm. **Briefings in bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 1–12, 2021.
- BATISTA, V. DE S. et al. Post-processing of docking results through docking-based comparative intermolecular contacts analysis (dbCICA) of the $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Anais do VIII Simpósio de Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular. Anais...Universidade de Brasília, 23 nov. 2020.
- BEN-TAL, N. et al. Association entropy in adsorption processes. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 3, p. 1180–1187, 2000.
- BERETTA, G. P. The fourth law of thermodynamics: Steepest entropy ascent. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 378, n. 2170, p. 1–17, 2020.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BIOVIA. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5. **Accelrys Software Inc. San Diego**, 2015.

BRANDÃO JUNIOR, J. et al. Immobilization of CalB Lipase by adsorption on magnetic nanoparticles: A heterogeneous biocatalysis/ Imobilização da lipase CalB por adsorção em nanopartículas magnéticas: um biocatalisador heterogêneo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 76015–76024, 3 ago. 2021.

BRANDT, A.-M. et al. The crystal structure of lipase A from *Candida antarctica*. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, v. 64, n. a1, p. C245–C245, 23 ago. 2008.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 32, n. February 2003, p. 335–373, 2003.

BRUICE, T. C.; LIGHTSTONE, F. C. Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. **Accounts of Chemical Research**, 1999.

BYLÉHN, F. et al. Modeling the Binding Mechanism of Remdesivir, Favilavir, and Ribavirin to SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. **ACS Central Science**, v. 7, n. 1, p. 164–174, 2021.

CANSIAN, A. et al. Modeling and simulation of the biosurfactant production by enzymatic route using xylose and oleic acid as reagents. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 28, n. 4, p. 265–276, 2022.

CARLOTA DE ANGELIS, R. NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arq Gastroenterol.* [s.l: s.n.].

CARVALHO, I. et al. INTRODUÇÃO A MODELAGEM MOLECULAR DE FÁRMACOS NO CURSO EXPERIMENTAL DE QUÍMICA FARMACÊUTICA. **Quim. Nova.** [s.l: s.n.].

CARVALHO, P. DE O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, jan. 2003b.

CARVALHO, P. DE O. et al. Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: optimization of process parameters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 117–124, 2009.

CASTILLO, R. M. et al. A six-stranded double-psi β barrel is shared by several protein superfamilies. **Structure**, v. 7, n. 2, p. 227–236, fev. 1999.

CAVALCANTE, F. T. T. et al. A stepwise docking and molecular dynamics approach for enzymatic biolubricant production using Lipase Eversa® Transform as a biocatalyst. *Industrial Crops and Products*, v. 187, p. 115450, nov. 2022.

CAVALLARI, M. et al. Partially folded states of HIV-1 protease: Molecular dynamics simulations and ligand binding. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 769, n. 1–3, p. 111–121, 2006.

CEN, Y. et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019.

CHAVES, M. C. DE C.; GOMES, C. F. S. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. *Production*, v. 24, n. 3, p. 495–507, 2 jul. 2013.

CHINAKA, T. W. Introducing the second law of thermodynamics using Legitimation Code Theory among first year chemistry students. **Cypriot Journal of Educational Sciences**, 2021.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, abr. 2014.

CHITOLINA, L. S. et al. Estudo in silico, por dinâmica molecular clássica, da estrutura terciária da enzima MtInhA (EC 1.3. 1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* sob restrições da estrutura quaternária. 2021.

CORICI, L. et al. Understanding Potentials and Restrictions of Solvent-Free Enzymatic Polycondensation of Itaconic Acid: An Experimental and Computational Analysis. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 357, n. 8, p. 1763–1774, 2015.

COSTA, Mírian F. da. Docking, dinâmica molecular e redes neurais artificiais na busca por flavonoides anti-RSV. 2018.

COSTA, P. R. N. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, ago. 2000.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DASGUPTA, D.; MANDALAPARTHY, V.; JAYARAM, B. 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**, v. 38, n. 32, p. 2791–2801, 2017.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3. Schrödinger LLC, 2020.

DE SOUZA, M. C. M. Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. **Vasa**, p. 88, 2013.

DIB, F. H. Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador. 2010.

DIEZ, M. et al. Insights into mechanism kinematics for protein motion simulation. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, 2014.

DOMÍNGUEZ DE M., P. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 1 dez. 2005.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore: A neural-network-based scoring function for the characterization of protein-ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 10, p. 1865–1871, 2010.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore 2.0: A neural-network receptor-ligand scoring function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 11, p. 2897–2903, 2011.

DU, X. et al. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–34, 2016.

EMIRIK, M. 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**, v. 40, n. 5, p. 2024–2037, 2022.

FARAGO, O. Langevin thermostat for robust configurational and kinetic sampling. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, v. 534, n. 122210, 2019.

FAZIL, M. H. U. T. et al. Comparative structural analysis of two proteins belonging to quorum sensing system in *Vibrio cholerae*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 30, n. 5, p. 574–584, set. 2012.

FERNANDES, I. A. et al. Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-valerato como suporte para a imobilização da lipase de candida antarctica fração B. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 331–336, 2014.

FERRAZ, J. L. DE A. A. et al. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciencias Exatas e Naturais**, v. 20, n. 1, 2018.

FERREIRA, Carolina T. A. Desenvolvimento de ferramentas computacionais para o estudo de macromoléculas. 2016.

FERREIRA, S. P.; DE SOUZA-SOARES, L.; VIEIRA COSTA, J. A. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais Review: microalgae: an alternative source to obtain essential fatty acids **Revista de Ciências Agrárias**. [s.l: s.n.].

FERRO, E. D. S.; GUIMARÃES, A. P.; GONÇALVES, A. S. L. Estudo De Ancoramento Molecular (Docking) De Potenciais Inibidores Da Butirilcolinesterase Humana (Hssbche). p. 2639–2645, 2019.

FIDELIS, Priscila Cardoso. Emulsões simples e multicamadas estabilizadas por lisozima e β -lactoglobulina. 2017.

FONSECA, A. M. DA et al. Isolation, characterization and in silico study of propenamide alkaloids from *Hymenocallis bicolor* poison against active μ -opioid receptor. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–17, 23 fev. 2023.

FONSECA, A. M. DA et al. Study of the Inhibition Potential of Remdesivir Derivatives on Mpro of SARS-COV-2. **International Journal of Research -GRANTHAALAYAH**, v. 8, n. 11, p. 164–174, 3 dez. 2020a.

FONSECA, A. M. DA et al. Synthesis, Biological Activity, and In silico Study of Bioesters Derived from Bixin by the CALB Enzyme. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 5901–5917, 24 out. 2021.

FONSECA, T. DE S. et al. Lipase mediated enzymatic kinetic resolution of phenylethyl halohydrins acetates: A case of study and rationalization. *Molecular Catalysis*, v. 485, 2020b.

FUJIKOSHI, Y. Two-way ANOVA models with unbalanced data. *Discrete Mathematics*, v. 116, n. 1–3, p. 315–334, 1993.

FU, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2018, p. 1–12, dez. 2018.

FRANCISCO, S. et al. PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO A PARTIR DE ÓLEO VEGETAL EXTRAÍDO DA POLPA DO ABACATE. **Revista Vincci-Periódico Científico do UniSATC**, v. 7, n. 2, p. 248-272, 2022.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 19 fev. 2007.

GHAZI, B. K. et al. In Silico Structural and Functional Analyses of NLRP3 Inflammasomes to Provide Insights for Treating Neurodegenerative Diseases. **BioMed Research International**, v. 2023, p. 1–16, 23 jan. 2023.

GOHLKE, H.; CASE, D. A. Converging Free Energy Estimates: MM-PB(GB)SA Studies on the Protein-Protein Complex Ras-Raf. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 238–250, 2004.

GOHLKE, H.; KIEL, C.; CASE, D. A. 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**, v. 330, n. 4, p. 891–913, 2003.

GRUNWALD, P. Industrial Biocatalysis. 1a edition ed. New York, USA: **Jenny Stanford Publishing**, 2014.

HAGHROOSTA, A. et al. In silico analysis of a chimeric fusion protein as a new vaccine candidate against *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium septicum* alpha toxins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 29, n. 5, p. 981–989, 14 out. 2020.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HASSUNUMA, Renato M.; YONEZAWA, Wilson M. COMPREENDENDO A IMPORTÂNCIA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DNA-PROTEÍNA USANDO UM JOGO DE BIOINFORMÁTICA. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 4, n. 3, p. 33-43, 2023.

HAVRANEK, B.; ISLAM, S. M. An in silico approach for identification of novel inhibitors as potential therapeutics targeting COVID-19 main protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020.

HUET, J. et al. High-resolution structure of a papaya plant-defence barwin-like protein solved by in-house sulfur-SAD phasing. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, v. 69, n. 10, p. 2017–2026, 1 out. 2013.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JIANG, W. et al. Molecular simulation -based research on antifreeze peptides: advances and perspectives. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 3, p. 203–212, set. 2022.

JUNIOR, F. S. M. O ácido perfluoropropiônico e suas interações com moléculas atmosféricas: implicações para a formação de aglomerados pré-nucleação. 2024.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, n. June, p. 585–590, 1977.

KATO, K. et al. Molecular dynamics simulations for the protein–ligand complex structures obtained by computational docking studies using implicit or explicit solvents. **Chemical Physics Letters**, v. 781, n. 139022, 2021.

KUCEK, K. T. et al. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 4, p. 385–392, abr. 2007.

KUHN, Eduardo Ramires. Estudo computacional de docagem e dinâmica molecular sobre o mecanismo de ação do Molnupiravir sobre o Coronavírus SARS-CoV-2. 2023.

KUMAR, M. et al. GENETIC ALGORITHM: REVIEW AND APPLICATION. *International Journal of Information Technology and Knowledge Management*, v. 2, p. 451–454, 2010.

KZIOZEK, Luana; LORSCHIEDER, Carla A.; ROMANELLO, Larissa. Modelagem molecular comparativa da enzima Adenosina Kinase isoforma 1 (AK1) de *Schistosoma mansoni*. *Luminária*, v. 23, n. 02, 2021.

LEÃO, L. S. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Dissertação (Mestrado), p. 97, 2009.

LEVANDOSKI, K. L. D. et al. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE COMERCIAL EM XEROGEL OBTIDO PELA TÉCNICA SOL-GEL UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO COMO ADITIVO. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq IC 2015. Anais...São Paulo: **Editora Edgard Blücher**, jun. 2015.

LIMA, A. H. et al. Molecular Modeling of T. rangeli, T. brucei gambiense, and T. evansi Sialidases in Complex with the DANA Inhibitor. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 80, n. 1, p. 114–120, 2012.

LIN, C. K.; ZHANG, J. Detecting Nonadditivity in Single-Facet Generalizability Theory Applications: Tukey's Test. *Journal of Educational Measurement*, v. 55, n. 1, p. 78–89, 2018.

LIRA, M. A. C. de et al. Estudo da toxicidade de extratos de Parmeliaceae, do ácido salazínico e avaliação do seu potencial antitumoral. 2021.

LISNYAK, Y. V., & M. A. V. Homology modeling and molecular dynamics study of Mycobacterium tuberculosis urease. *Annals of Mechnikov's Institute*, n. No. 3 (2017), p. 23–40, 2017.

LÔBO, I. P. et al. BIODIESEL: PARÂMETROS DE QUALIDADE E MÉTODOS ANALÍTICOS. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.

LOBATO, J. C. M. et al. Interações com nanotubos de carbono e pontos quânticos de óxido de grafeno com estruturas externas do Sars-cov-2 via simulações de dinâmica e docagem molecular. 2023.

LÖFGREN, J. et al. Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered Candida antarctica Lipase A. *ChemBioChem*, v. 20, n. 11, p. 1438–1443, 3 jun. 2019.

MARSH, J. A.; TEICHMANN, S. A. Relative solvent accessible surface area predicts protein conformational changes upon binding. *Structure*, v. 19, n. 6, p. 859–867, 2011.

MASCOLI, V. et al. Uncovering the interactions driving carotenoid binding in light-harvesting complexes. *Chemical Science*, v. 12, n. 14, p. 5113–5122, 2021.

MAZOLA, Y. et al. A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic β -fructosidase enzymes. *Journal of Molecular Modeling*, v. 21, n. 228, p. 1–11, 2015.

MIYAMOTO, Y. et al. Langevin description of gauged scalar fields in a thermal bath. Physical Review D - Particles, Fields, *Gravitation and Cosmology*, v. 89, n. 8, 2014.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto Chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2 ago. 2019.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renewable Energy*, v. 164, p. 1566–1587, fev. 2021.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MUHL, E. L.; VITÓRIA, E. S. Padrão de variação intra e intergenérica na estrutura proteica do Citocromo b em oito gêneros de *Oryzomyini* (Rodentia). 2017.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13-24, 2008.

NETO, C. J. D. DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA OLEAGINOSA EM CULTURA SUBMERSA DE *Rhodospiridium toruloides* EM MEIO DE CULTIVO DE BAIXO CUSTO: PRODUÇÃO DE BIODIESEL E TESTES EM MOTORES DO TIPO DIESEL. Tese-Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. - Curitiba, 2019.

NOVOTNY, M.; SEIBERT, M.; KLEYWEGT, G. J. On the precision of calculated solvent-accessible surface areas. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 63, n. 2, p. 270–274, 2007.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 7 dez. 2011.

OGBODO, U. C. et al. Computational identification of potential inhibitors targeting cdk1 in colorectal cancer. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, 30 nov. 2023.

OLIVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1503–1511, dez. 2014.

OLIVEIRA, H. A. et al. Estudo das propriedades físico-químicas e terapêuticas do óleo de canabidiol extraído da planta *Cannabis sativa*. 2022.

OLIVEIRA, T. E. M. de et al. Combinação de Cálculos DFT e algoritmos de Machine Learning para o estudo da reatividade de complexos quadráticos plano de Platina (II). 2022.

OLIVEIRA, T. V. Estudos in silico e in vitro sobre bases estruturais de propriedades tecnológicas de proteínas e peptídeos do leite bovino. 2020.

ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 109–114, 15 jun. 2012.

ORSI, H. M. Tecnologias de produção de biodiesel: uma revisão. 2021.

PACHECO, Alessandra Gomes Marques et al. Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. 2010.

- PAL, G. et al. Modelagem molecular de proteínas: o caso de uma glucoronosiltransferase (GumK) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 3, p. 1–6, 2014.
- PETROVA, S. S.; SOLOV'EV, A. D. The Origin of the Method of Steepest Descent. *História Mathematica*, v. 24, n. 4, p. 361–375, nov. 1997.
- PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.
- PICCIRILLO, E.; DO AMARAL, A. T. Virtual screening of bioactive compounds: Concepts and applications. **Química Nova Sociedade Brasileira de Química**, 1 jun. 2018.
- QIN, X.; ZHONG, J.; WANG, Y. A mutant T1 lipase homology modeling, and its molecular docking and molecular dynamics simulation with fatty acids. **Journal of Biotechnology**, v. 337, n. February, p. 24–34, ago. 2021.
- RAGUNATHAN, A.; MALATHI, K.; ANBARASU, A. MurB as a target in an alternative approach to tackle the *Vibrio cholerae* resistance using molecular docking and simulation study. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 1726–1732, fev. 2018.
- RAMOS, L. P. et al. Biodiesel production technologies. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, 2011.
- RAYCHAUDHURI, S.; JAIN, V.; DONGRE, M. Identification of a constitutively active variant of LuxO that affects production of HA/protease and biofilm development in a non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* O110. **Gene**, v. 369, p. 126–133, mar. 2006.
- REIS, M. C. et al. BIODIESEL PRODUCTION FROM FATTY ACIDS OF REFINED VEGETABLE OILS BY HETEROGENEOUS ACID CATALYSIS AND MICROWAVE IRRADIATION. **Química Nova**, 2015.
- REMONATTO, D. Síntese Enzimática De Ésteres De Ácidos Graxos a Partir De Diferentes Matérias Graxas Utilizando As Lipases Eversa Transform E Eversa Transform 2.0. Florianópolis - SC: [s.n.].
- REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.
- ROE, D. R.; BROOKS, B. R. A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 5, p. 1–9, 2020.
- RODRIGUES, W. G.; MISTURA, C. M. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE DIFERENTES MATÉRIAS PRIMAS: UMA REVISÃO. **Revista CIATEC-UPF**, v. 14, n. 1, 2022.
- RUBA, S.; AROOJ, M.; NAZ, G. In Silico Molecular Docking Studies and Design of Dengue Virus Inhibitors. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)**, v. 9, n. 2, p. 15–23, 2014.
- SANDSTRÖM, A. G. et al. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 22, n. 7, p. 413–420, 2009.

SANTOS J. E.; GUIMARÃES, A. C.; DIAMENT, J. Consenso brasileiro sobre dislipidemias detecção, avaliação e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, p. 287-305, 1999.

SANTOS, J. S. ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO OLEICO E ÁLCOOIS (C2-C8): ESTUDOS DE PARTIÇÃO DE COMPOSTOS E INFLUÊNCIA DE CATALISADORES. 2015.

SANTOS, N. B. L. DOS; REZENDE, M. J. C. Monoacylglycerols Production: Routes and Catalysts. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, 2012.

SARKER, Arnob et al. In Silico design of a multi-epitope vaccine for Human Parechovirus: Integrating immunoinformatics and computational techniques. **PLoS One**, v. 19, n. 12, p. e0302120, 2024.

SHINDE, K.; KALIAGUINE, S. A comparative study of ultrasound biodiesel production using different homogeneous catalysts. **chemengineering**, v. 3, n. 1, p. 18, 2019.

SILVA, J. C. A. da et al. Simulação molecular de proteínas com nós geométricos. 2022.

SILVA, J. P.; SANTOS, Y. R. P.; BELLO, M. I. M. C. Aplicação da ANOVA e dos testes de Fisher e Tukey em dados de recalque de edifícios de múltiplos pavimentos. **Revista Principia-Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 59, n. 3, p. 829-845, 2022.

SILVA, L. R. Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. **Nativa**, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2018.

SILVA, Thaís B. B. da et al. Estudo teórico do complexo cefoxitina-proteína 5 de ligação à penicilina da Escherichia Coli por dinâmica molecular com método híbrido de mecânica quântica/mecânica molecular. 2014.

SOARES CORDEIRO, C.; ROSA DA SILVA, F.; WYPYCH LUIZ PEREIRA RAMOS, F. CATALISADORES HETEROGÊNEOS PARA A PRODUÇÃO DE MONOÉSTERES GRAXOS (BIODIESEL) **Quim. Nova**. [s.l: s.n.].

SOARES, Ricardo O. S.; CALIRI, Antonio. Dinâmica molecular de proteínas: estabilidade e renaturação térmica. 2009.

SOUSA, CLAYTON A.; LIRA J., MARIO A.; FERREIRA, Rinaldo L. C. Avaliação de testes estatísticos de comparações múltiplas de médias. **Revista Ceres**, v. 59, p. 350-354, 2012.

SOUTO, Antonio Carlos Stumpf. Uso de redes neurais artificiais na simulação Monte Carlo aplicado ao problema de dobramento de proteínas. 2006.

ŠPONER, J.; HOBZA, P.; LESZCZYNSKI, J. Chapter 3 Computational approaches to the studies of the interactions of nucleic acid bases. In: **Theoretical and Computational Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 8p. 85–117.

STRUCHTRUP, H. Entropy and the second law of thermodynamics-The nonequilibrium perspective. **Entropy**, v. 22, n. 7, p. 1–61, 2020.

SUTHERLAND, J. J. et al. Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 6, p. 2293–2302, nov. 2007.

SUTTON, R. S.; MAHMOOD, A. R.; WHITE, M. An emphatic approach to the problem of off-policy temporal-difference learning. **Journal of Machine Learning Research**, v. 17, p. 1–29, 2016.

TAN, W. et al. Enhanced mineralization of Reactive Black 5 by waste iron oxide via photo-Fenton process. **Research on Chemical Intermediates**, v. 46, p. 4423–4431, 2020.

THIRUMALAI, D.; LORIMER, G. H.; HYEON, C. Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones. **Protein Science**, v. 29, n. 2, p. 1–18, 2020.

TORQUATO, Davi Braga. Análise da produção de biodiesel a partir da etanólise de óleo refinado e residual. 2019.

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

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293–308, abr. 1994.

VAMATHEVAN, J. et al. Applications of machine learning in drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 6, p. 463–477, 2019.

VANCE, R. E.; ZHU, J.; MEKALANOS, J. J. A Constitutively Active Variant of the Quorum-Sensing Regulator LuxO Affects Protease Production and Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2571–2576, maio 2003.

VAZQUEZ, Diego Sebastian. Un vistazo biofísico-funcional de los sistemas redox tiorredoxina y glutarredoxina. **Revista Citecsa**, v. 10, n. 16, p. 31, 2018.

VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/molcatb>.

VOROBJEV, Y. N. Free energies of protein decoys provide insight into determinants of protein stability. **Protein Science**, v. 10, n. 12, p. 2498–2506, 2001.

WAHL, J. et al. Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 53, 7 dez. 2019.

WALTER, A. Emissões de gases de efeito estufa no setor de energia, no Brasil. **Revista Brasileira de Energia**, v. 27, n. 3, 17 ago. 2021.

WIERMANN PAQUES, F.; ALVES MACEDO, G. LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS **Quim. Nova**. [s.l: s.n.].

WRIGHT, D. W. et al. Computing clinically relevant binding free energies of HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 3, p. 1228–1241, 2014.