



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA  
AFRO-BRASILEIRA  
INSTITUTO DE ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
MESTRADO ACADÊMICO EM ENERGIA E AMBIENTE**

**MARIA DO SOCORRO PEREIRA COSTA LIMA**

**O USO DA BIOINFORMÁTICA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE  
INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS NA  
GERAÇÃO DE ENERGIAS ALTERNATIVAS**

**REDENÇÃO  
2025**

**MARIA DO SOCORRO PEREIRA COSTA LIMA**

**O USO DA BIOINFORMÁTICA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE  
INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS NA  
GERAÇÃO DE ENERGIAS ALTERNATIVAS**

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  
MAEA001: Dissertação. Área de  
concentração: Energia e Ambiente

Orientador: Dr. Aluísio Marques da  
Fonseca.

**REDENÇÃO**

**2025**

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

---

Lima, Maria do Socorro Pereira Costa.

L732u

O uso da bioinformática como ferramenta para análise de interações intermoleculares em sistemas biológicos na geração de energias alternativas / Maria do Socorro Pereira Costa Lima. - Redenção, 2025.  
55f: 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. Hidrogênio verde. 2. Sistemas biológicos. 3. Interações. 4. Enzimas. 5. Modelagem molecular. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 665.81

---

MARIA DO SOCORRO PEREIRA COSTA LIMA

**O USO DA BIOINFORMÁTICA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE  
INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS NA  
GERAÇÃO DE ENERGIAS ALTERNATIVAS**

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 MAEA001: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Aprovada em: 20/03/2025

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

PÓS-DOCTOR. PAULO GONÇALVES DE SOUSA JÚNIOR  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MÁRCIA MACHADO MARINHO  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

PROF. DR. FRANCISCO ROGENIO DA SILVA MENDES  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Minha gratidão a Deus e a toda  
minha família e em Especial ao  
meu esposo e filho que que  
contribuem com a realização de  
meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus Pai e Criador, aquele que me fortalece, que me dar forças e me ilumina para que possa concluir as etapas de minha vida com amor e dedicação, assim como toda essa trajetória acadêmica.

Aos amigos e profissionais da educação que compreenderam, apoiaram e que estava sempre demonstrando e compartilhando força, determinação e conhecimentos ao longo de todo o período em que me dediquei ao mestrado.

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

Isaias (ex-aluno e colega acadêmico) e Dayana, agradeço de coração todo o apoio que vocês me deram, das trocas de experiências, do grande conhecimento de vocês que contribuiu para que meu sonho se concretizasse. Vocês são pessoas incríveis que fizeram a diferença na minha vida e que estavam sempre resolvendo as minhas dificuldades.

Janielle, que contribuiu com sua parceria no início do curso fazendo com que eu conseguisse conciliar o mestrado com meu trabalho que estava também no início do probatório. Tenho uma gratidão imensa por estar sempre presente no meu dia a dia com sua amizade, carinho, força e brilho que ela passa com o seu contato, seu apoio foi de grande importância para não desistir.

Às Escolas onde trabalho ou trabalhei, EMEIEF Terto Venâncio, EMEIEF Boanerges Jacó e EMEIEF Dr. Edmilson Barros de Oliveira em que a gestão escolar compreendeu e contribuiu ajudando a realizar meu sonho para que pudesse adquirir mais conhecimento e usar em sala de aula.

Aos secretários de educação de Barreira e Redenção que me ouviu e aceitou que eu pudesse tirar um pouco do meu tempo de estudo para contribuir com meu sonho e com o crescimento de um grande aprendizado que será utilizado em sala de aula futuramente.

Ao meu esposo, por acreditar no meu potencial, pela segurança que me passava e por ficar acordado muitas noites comigo finalizando um trabalho ou atividade mesmo quando eu estava afadigada, desestimulada e preocupada. O que seria de mim sem o seu apoio? O seu amor é primordial para que tudo dê certo.

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

Ao meu filho que estava sempre do meu lado, cuidando, com seu amor, carinho, me passando em suas palavras fortaleza dizendo: Mãe você é capaz! Você é a melhor! .

Aos meus professores, que não medem esforços e acreditam em seus alunos, minha gratidão, pela paciência, dedicação e disponibilidade nas aulas, pelo comprometimento com as tarefas educacionais e mais pela contribuição primordial para minha formação profissional.

Em especial, meu orientador, Aluísio Marques da Fonseca, um grande profissional dedicado, compreensível que dedicou uma boa parte de seu tempo comigo desenvolvendo uma pesquisa que servira para muitos estudos e muitos aprendizados.

A banca por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições.

A todas que estiveram presentes em minha trajetória acadêmica o meu eterno agradecimento!

“O êxito da vida não se mede pela posição que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho”.

(Booker T. Washington)



## RESUMO

Este estudo utiliza como alvo, interações a protease da bactéria *Mycobacterium smegmatis* como modelo para investigar a geração de energias alternativas, focando em sua capacidade de produzir hidrogênio de maneira eficiente e sustentável. Por meio de técnicas de modelagem molecular e simulação de dinâmicas moleculares, foram identificados e caracterizados proteínas e genes que participam das vias metabólicas da bactéria. As ferramentas computacionais desempenham um papel fundamental na análise de interações intermoleculares em sistemas biológicos, particularmente na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na produção de energia. Essas ferramentas permitem prever interações intermoleculares, calcular energias de interação, e analisar as conformações e distâncias envolvidas, oferecendo uma compreensão detalhada dos pontos de controle que podem ser otimizados para maximizar a produção de hidrogênio. A bactéria *M. smegmatis* se destaca por sua habilidade de realizar fotossíntese anaeróbica, utilizando a enzima nitrogenase para converter compostos orgânicos em hidrogênio. Este processo, além de sustentável, é altamente eficiente, pois a bactéria pode utilizar uma ampla variedade de fontes de resíduos como substrato. Adicionalmente, a *M. smegmatis* apresenta alta eficiência de produção de hidrogênio em uma faixa de pH adequada, o que possibilita sua aplicação em diferentes ambientes. Dessa forma, a utilização desta espécie em sistemas de produção de energia verde emerge como uma alternativa promissora para a redução da dependência de combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação das mudanças climáticas. Este estudo se propõe a aplicar técnicas de bioinformática para analisar as interações intermoleculares associadas à produção de hidrogênio pela bactéria *M. smegmatis*, com o objetivo de potencializar a geração de energia sustentável.

**Palavras-chave:** hidrogênio verde, Sistemas biológicos, Interações, Enzimas e Modelagem Molecular.

## ABSTRACT

This study uses the protease interactions of the bacterium *Mycobacterium smegmatis* as a model to investigate alternative energy generation, focusing on its ability to produce hydrogen efficiently and sustainably. Through molecular modeling and molecular dynamics simulation techniques, proteins and genes that participate in the metabolic pathways of the bacterium were identified and characterized. Computational tools play a fundamental role in the analysis of intermolecular interactions in biological systems, particularly in understanding the molecular mechanisms involved in energy production. These tools allow the prediction of intermolecular interactions, calculation of interaction energies, and analysis of the conformations and distances involved, offering a detailed understanding of the control points that can be optimized to maximize hydrogen production. The bacterium *M. smegmatis* stands out for its ability to perform anaerobic photosynthesis, using the enzyme nitrogenase to convert organic compounds into hydrogen. This process, in addition to being sustainable, is highly efficient, since the bacterium can use a wide variety of waste sources as substrate. Additionally, *M. smegmatis* presents high hydrogen production efficiency in an adequate pH range, which allows its application in different environments. Thus, the use of this species in green energy production systems emerges as a promising alternative for reducing dependence on fossil fuels, contributing to the mitigation of climate change. This study aims to apply bioinformatics techniques to analyze the intermolecular interactions associated with hydrogen production by the bacterium *M. smegmatis*, with the aim of enhancing sustainable energy generation.

**Keywords:** Green hydrogen, Biological systems, Interactions, Enzymes and Molecular modeling.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	16
2.1	Geral	16
2.2	Específico	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	17
3.1	Modelagem Molecular	17
3.2	O Papel da Modelagem Molecular no Desenvolvimento da Bioenergia	20
3.3	Modelos usados na simulação de produção de hidrogênio	22
3.4	Estudo de Mutação e Otimização de Enzimas	23
3.5	Identificação dos Sítios Catalíticos e Previsão de Mutações	24
3.6	Estudos do Mecanismo de Ação da Bactéria e Produção de Enzima	27
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	29
4.1	Materiais Usados para o Preparo de Ligantes e Enzima <i>Mycobacterium smegmatis</i>	33
4.2	Métodos e Estratégias da Pesquisa	34
4.3	Uso da Química Computacional	34
4.4	Preparação de Ligantes e Enzima	35
4.5	Acoplamento Molecular do Ligante Proteína	35
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
5.1	Desafios no Estudo do Mecanismo de Ação da <i>Mycobacterium smegmatis</i>	37
5.2	Questionamento sobre o Mecanismo de Ação <i>Mycobacterium smegmatis</i>	38
5.3	Análise do Oxigênio na Reação	39
	<b>CONCLUSÃO</b>	42
	<b>REFERÊNCIAS</b>	43

## 1 INTRODUÇÃO

A bioinformática é uma área científica que combina conhecimentos de biologia com ferramentas e técnicas da computação para processar e interpretar informações biológicas. Segundo o dicionário *Oxford English Dictionary*, a bioinformática é definida como "o uso de computadores para armazenar, recuperar e analisar dados biológicos, especialmente sequências de DNA, RNA e proteínas". O termo surgiu na década de 1970, mas foi amplamente popularizado nos anos 1990 com o avanço do Projeto Genoma Humano. Ela utiliza métodos computacionais e estatísticos como base para abordar e resolver questões biológicas complexas. (Bastos et al., 2022a)

Diante desse contexto pode-se afirmar que a bioinformática tem um papel essencial na organização, no estudo e na interpretação desses dados volumosos, permitindo que os cientistas obtenham insights valiosos sobre a estrutura, as funções e a evolução dos organismos vivos. Ela oferece recursos e métodos indispensáveis para estudar e interpretar dados biológicos de grande complexidade.

Um dos atuais objetivos da bioinformática é ajudar os biólogos a recolher e a processar dados de genomas para estudar as funções de proteínas. Outro papel importante é ajudar pesquisadores a realizarem estudos detalhados das estruturas das proteínas, afim de facilitar o desenvolvimento de novas técnicas e informações.

A bioinformática ainda tem como função o desenvolvimento de novos algoritmos e estatísticas, análise e interpretação de vários tipos de dados biológicos e o desenvolvimento e implementação de ferramentas que permitem o acesso e gerenciamento eficientes de diferentes tipos de informação. (Silva, et al, 2024)

A Modelagem Molecular é uma técnica empregada para sugerir estruturas químicas e, como o próprio nome indica, criar representações de moléculas. Esse campo abrange diversas áreas de atuação, sendo uma delas o uso de métodos voltados para cálculos de otimização geométrica. (Moura, et a, 2011.)

O Brasil desempenha um papel estratégico na transição para uma economia de baixo carbono, e a bioenergia surge como uma alternativa essencial nesse processo. Entre as abordagens inovadoras, destaca-se a

produção de hidrogênio verde utilizando *Mycobacterium smegmatis*, uma bactéria com grande potencial biotecnológico para processos sustentáveis. (Silva et al, 2019)

A utilização da *M. smegmatis* em sistemas de produção de energia verde emerge como uma alternativa promissora para a redução da dependência de combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação das mudanças climáticas.

No contexto da bioenergia, *Mycobacterium smegmatis* apresenta características que o tornam um microrganismo promissor para a produção biológica de hidrogênio. Essa bactéria possui um metabolismo versátil, capaz de degradar resíduos orgânicos e converter substratos de biomassa em hidrogênio por meio de processos fermentativos.

A utilização de *M. smegmatis* na bioenergia permite o aproveitamento de resíduos agroindustriais abundantes no Brasil, reduzindo desperdícios e promovendo uma economia circular. Além disso, a manipulação genética dessa bactéria pode otimizar suas vias metabólicas para aumentar a eficiência na produção de hidrogênio, tornando o processo ainda mais viável para aplicação em larga escala.

A produção de hidrogênio verde a partir da bioenergia contribui diretamente para a mitigação das emissões de carbono, pois reduz a necessidade de combustíveis fósseis e reutiliza resíduos orgânicos. Além disso, essa abordagem fortalece a adaptação do setor energético brasileiro às novas demandas globais por fontes renováveis. (Nóbrega et al., 2022)

Em termos de desenvolvimento sustentável, a biotecnologia aplicada à produção de hidrogênio com *M. smegmatis* impulsiona a geração de empregos na bioeconomia, promove a valorização das cadeias produtivas locais e fortalece a diversificação da matriz energética nacional. (Silva et al 2019)

Para tornar a produção de hidrogênio com *M. smegmatis* mais eficiente, técnicas computacionais avançadas, como modelagem molecular, têm sido aplicadas no estudo das hidrogenases. Essa técnica permite compreender a estrutura, a funcionalidade e a estabilidade dessas enzimas, otimizando seu desempenho na conversão de biomassa em hidrogênio. (Berney et al., 2014)

A modelagem molecular permite prever a estrutura tridimensional das hidrogenases, fornecendo informações essenciais sobre sua conformação e propriedades bioquímicas. A partir dessas análises, é possível: Identificar os

sítios ativos da enzima, onde a conversão de hidrogênio ocorre, comparar variantes enzimáticas, selecionando aquelas com maior eficiência catalítica, propor mutações direcionadas, otimizando a estabilidade e a reatividade das hidrogenases.(Moura et al., 2011.)

A construção desses modelos pode ser feita utilizando softwares especializados, que empregam técnicas de bioinformática para prever a estrutura de proteínas com alta precisão.

A combinação da biotecnologia microbiana com técnicas de modelagem molecular oferece diversas vantagens para a produção sustentável de hidrogênio, incluindo: Maior Eficiência e Estabilidade Enzimática, a otimização das hidrogenases permite um aumento significativo na conversão de biomassa em hidrogênio, tornando o processo mais produtivo; Aproveitamento de Resíduos Orgânicos a utilização de substratos renováveis, como resíduos agrícolas e industriais, reduz o impacto ambiental e promove a economia circular. Redução de Emissões de Carbono a produção biológica de hidrogênio não gera CO<sub>2</sub>, contribuindo para a mitigação das mudanças climáticas. Inovação e Desenvolvimento Tecnológico o Brasil, com sua vasta disponibilidade de biomassa, tem potencial para se tornar um líder na produção de hidrogênio verde utilizando tecnologias biológicas avançadas.(Gusmão et al., 2017)

O software permite construir e refinar modelos estruturais da hidrogenase de *M. smegmatis*, usando métodos baseados em homologia, além da simulação de interação proteína-substrato que é possível simular como o hidrogênio se liga à enzima, avaliando o potencial de conversão energética outra estratégia é análise de mutações: Ferramentas para testar mutações in silico permitem prever variantes que aumentem a eficiência da enzima.

O AutoDock é amplamente usado para simular o acoplamento molecular (docking), sendo ideal para estudar como moléculas de interesse interagem com as proteínas de *M. smegmatis* apresenta como estratégias análise de afinidade, exploração de novos ligantes e avaliação energética (Durrant et al., 2011).

O PyMOL é uma ferramenta de visualização molecular que auxilia na análise tridimensional das estruturas obtidas e otimizadas com Discovery Studio e AutoDock. Suas estratégias são visualização de estrutura, apresentação de dados e identificação de locais ativos (Delano, 2002)

A integração de *M. smegmatis* em sistemas de produção de energia verde representa uma abordagem inovadora e sustentável. No entanto, é essencial continuar a pesquisa para otimizar as condições de cultivo, aprimorar a eficiência enzimática e desenvolver tecnologias que permitam a aplicação em larga escala dessa bactéria na geração de energia limpa (Berney et al., 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Utilizar a bioinformática como ferramenta para análise de interações intermoleculares em sistemas biológicos potencializando a geração de energias alternativas

### 2.2 Específicos

- ✓ Selecionar as propriedades moleculares a serem investigadas pelo software com base na literatura;
- ✓ Determinar os sistemas biológicos que serão estudados pelo presente trabalho, bem como os ligantes e macromoléculas;
- ✓ Realizar a análise teórica dos complexos ligante-proteína e as interações envolvidas com base na sua estrutura química;
- ✓ Determinar as propriedades de sistemas biológicos com base nas energias de interação obtidas potencializando a energia sustentável.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma técnica computacional utilizada para representar e simular o comportamento de moléculas em nível atômico, permitindo prever suas propriedades físicas e químicas. Ela envolve a aplicação de métodos teóricos, como a mecânica quântica e a mecânica clássica, para construir modelos tridimensionais que reproduzem as interações entre átomos e moléculas, possibilitando a análise de estruturas, dinâmicas e reações químicas em sistemas complexos. (Costa et al.,2023)

Esse método é amplamente empregado em diversas áreas, como química, biologia e ciência dos materiais, por sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre interações moleculares que são difíceis de obter experimentalmente. Dessa forma, a modelagem molecular tem se tornado uma ferramenta crucial para a compreensão e otimização de processos biológicos, catalíticos e de desenvolvimento de novos materiais e fármacos. (Bezerra et al., 2019)

A visa primordialmente a previsão do comportamento de sistemas físicos e químicos. Por meio dessa abordagem, é possível antecipar e caracterizar a dinâmica de estruturas moleculares antes da sua síntese experimental. Para alcançar esse objetivo, é fundamental desenvolver um modelo que represente de forma adequada as interações intramoleculares e intermoleculares. Isso envolve a realização de cálculos computacionais rigorosos e a análise dos dados gerados, com o intuito de validar a precisão e a relevância do modelo proposto.(Moura et at, 2011)

Com o progresso tecnológico, as ferramentas computacionais tornaram-se cada vez mais avançadas, e os softwares são amplamente utilizados no desenvolvimento de novos compostos químicos. De acordo com Souza (2024) os métodos de descoberta de fármacos destacam que “a maioria dos programas de modelagem molecular consegue criar estruturas moleculares e realizar cálculos de otimização geométrica, além de análises conformacionais”.

Ademais, os softwares de modelagem são valiosos para o planejamento teórico de novas moléculas, permitindo a definição de parâmetros estéricos e eletrônicos além disso explorar aspectos como estrutura, dinâmica e interações

moleculares de proteínas-chave, como a hidrogenase associada à *M. smegmatis*.

Na Construção de Modelos Moleculares a modelagem molecular é utilizada para construir e refinar a estrutura de proteínas quando dados experimentais não estão disponíveis ou para complementar estruturas conhecidas.

A modelagem molecular desempenha um papel crucial na bioinformática, fornecendo ferramentas para compreender e manipular sistemas biológicos em nível atômico. No caso de *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), uma bactéria amplamente estudada por sua similaridade com espécies patogênicas e seu uso em biotecnologia, a modelagem molecular permite investigar a funcionalidade de proteínas-chave, como a hidrogenase representada pela estrutura cristalográfica 7UUS (Berney et al., 2014)

No caso de bactérias como a *M. smegmatis*, essa técnica possibilita a compreensão detalhada de suas interações e mecanismos de ação na produção de hidrogênio. Através de simulações computacionais, os pesquisadores podem explorar como as enzimas presentes na bactéria catalisam reações bioquímicas que resultam na geração de hidrogênio. (Rossetti, 2006).

A estrutura da protease associada a uma hidrogenase de *Mycobacterium smegmatis*, tem sido foco de estudos voltados para o aproveitamento biotecnológico no contexto da produção sustentável de energia. Embora o termo "protease" não seja diretamente relacionado à 7UUS, que está mais comumente associada a uma hidrogenase (enzima catalisadora do metabolismo do hidrogênio), a descrição do mecanismo pode ser estendida para compreender as propriedades catalíticas dessa enzima na bioenergia (Lopes et al., 2023)

De acordo com a função catalítica da hidrolase na produção de hidrogênio, a hidrogenase *M. smegmatis* é uma enzima metaloproteica, ou seja, possui cofatores metálicos no seu sítio ativo, como o cluster Ni-Fe (níquel e ferro). Esses cofatores são fundamentais no processo de oxidação e redução do hidrogênio.

O mecanismo de ação geral dessa hidrogenase envolve a oxidação do  $H_2$  em que a enzima catalisa a dissociação do gás hidrogênio ( $H_2$ ) em dois prótons ( $H^+$ ) e dois elétrons ( $e^-$ ) assim como também transfere elétrons gerados no processo de oxidação para outros componentes da cadeia de transporte

eletrônico da célula, enquanto os prótons podem ser utilizados em processos energéticos (Gaete et al., 2020)

Esse processo é essencial para o metabolismo energético bacteriano e pode ser explorado em sistemas biotecnológicos para produção de hidrogênio como fonte de energia limpa. No entanto a modelagem molecular é uma ferramenta essencial para compreender o mecanismo de ação da hidrogenase, permitindo a análise de suas propriedades estruturais e funcionais em nível atômico.

As principais contribuições incluem a estrutura e sítio ativo em que a modelagem molecular permite uma visualização detalhada da organização tridimensional do sítio ativo. No caso da hidrogenase, o cluster Ni-Fe está envolvido diretamente na catálise do  $H_2$  e os ligantes específicos, como cisteínas, coordenam os metais, estabilizando a estrutura do sítio ativo. (Fan et al., 2022)

Esses modelos utilizam dados experimentais, como estruturas cristalográficas e dinâmicas moleculares, para criar representações tridimensionais da bactéria e de suas vias metabólicas, auxiliando na otimização de condições que favoreçam a produção eficiente de hidrogênio (Moura et al., 2011).

As vantagens dessa abordagem são várias. Em primeiro lugar, as simulações computacionais oferecem uma maneira não invasiva de estudar esses sistemas biológicos, permitindo a previsão de comportamentos moleculares antes de testes experimentais. Isso reduz o custo e o tempo associados a experimentos em laboratório. Em segundo lugar, ao identificar os mecanismos moleculares responsáveis pela produção de hidrogênio, a modelagem pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de engenharia biológica para otimizar a produção desse gás, que tem sido considerado uma fonte promissora de energia renovável (Lima, 2016).

Portanto, a aplicação de técnicas de modelagem molecular na análise de bactérias como a 7UUS oferece uma ferramenta poderosa para desvendar os detalhes complexos das reações bioquímicas que resultam na geração de hidrogênio. Ao compreender melhor esses processos, os pesquisadores podem não apenas otimizar a produção de hidrogênio, mas também contribuir para o

avanço de tecnologias sustentáveis e de baixo impacto ambiental (Moura et al., 2011.)

### 3.2 O Papel da Modelagem Molecular no Desenvolvimento de Bioenergia

A modelagem molecular tem sido uma ferramenta essencial para entender as interações enzimáticas e otimizar o rendimento desse processo bioquímico, contribuindo para o desenvolvimento de biotecnologias voltadas para a produção de energia limpa (Alves, 2013).

No campo da bioenergia, *Mycobacterium smegmatis*, especialmente com sua estrutura enzimática representada pela 7UUS, oferece grande potencial para avanços na produção de energia sustentável. Essa bactéria possui enzimas como hidrogenases, que catalisam reações fundamentais para o metabolismo do hidrogênio, um combustível limpo e renovável (Silva et al., 2019).

A estrutura 7UUS representa uma hidrogenase de *M. smegmatis*, uma enzima que desempenha um papel crítico no metabolismo de hidrogênio, catalisando a oxidação ou a produção de  $H_2$ . Essa proteína contém um sítio ativo com cofatores metálicos, como níquel e ferro, que facilitam a transferência de elétrons e prótons.

As hidrogenases são estudadas como biocatalisadores em sistemas de energia verde, como células a combustível microbianas e dispositivos biohíbridos. A enzima de *M. smegmatis* é particularmente promissora devido à sua estabilidade e capacidade de operar em condições diversas, tornando-a uma candidata ideal para tecnologias sustentáveis.

Então a modelagem molecular desempenha um papel fundamental na investigação e otimização da hidrogenase 7UUS, permitindo compreender sua estrutura, simular e analisar o comportamento de moléculas biológicas em ambientes computacionais, fornecendo informações detalhadas sobre interações biomoleculares, cinética enzimática e propriedades estruturais. No caso da *Mycobacterium smegmatis*, essa abordagem tem sido utilizada para o Estudo de Enzimas e Análise de Interações Moleculares (Rodrigues, 2001).

E quando envolve bioenergia e, o hidrogênio produzido por hidrogenases é uma fonte de energia limpa, gerando apenas água como subproduto. A utilização de *M. smegmatis* e sua hidrogenase em sistemas de produção de hidrogênio oferece várias vantagens e uma delas é a sustentabilidade, o uso de

recursos biológicos reduz a dependência de combustíveis fósseis, outra é a eficiência Energética quando as hidrogenases operam com alta eficiência catalítica, tornando os processos bioenergéticos mais viáveis e por fim as aplicações tecnológicas onde as enzimas podem ser integradas a dispositivos biohíbridos, como biocélulas de combustível, para gerar eletricidade a partir de hidrogênio.

A modelagem molecular é uma ferramenta indispensável no desenvolvimento de bioenergia com base em *M. smegmatis* e sua hidrogenase 7UUS. Ao permitir a compreensão detalhada de mecanismos catalíticos e possibilitar a engenharia de proteínas, essas técnicas avançam o potencial de tecnologias sustentáveis para atender às demandas energéticas globais. Essa abordagem não apenas auxilia na compreensão fundamental da enzima, mas também viabiliza sua aplicação em tecnologias inovadoras e sustentáveis, contribuindo para a transição energética global (Silva, 2012).

Com o crescimento da demanda por fontes de energia sustentáveis e renováveis, a bioenergia, derivada de biomassa, biocombustíveis e gases como o hidrogênio, tem se destacado como uma alternativa promissora. Nesse contexto, a modelagem molecular surge como uma ferramenta crucial para investigar e otimizar as reações bioquímicas que ocorrem durante a conversão de matéria orgânica em energia (Silva et al., 2019).

A modelagem molecular permite a simulação de interações atômicas e moleculares em diversos sistemas biológicos, desde enzimas envolvidas na degradação de biomassa até proteínas responsáveis pela produção de biocombustíveis. Ao fornecer informações detalhadas sobre a estrutura e função de biomoléculas, essas técnicas ajudam a prever o comportamento molecular sob diferentes condições, o que é essencial para a concepção de sistemas mais eficientes e de menor impacto ambiental.

Além disso, essas simulações desempenham um papel crucial na identificação de modificações estruturais ou funcionais que podem otimizar o desempenho de enzimas ou proteínas em processos biotecnológicos.

Essa abordagem não apenas acelera o desenvolvimento de soluções inovadoras, mas também reduz a necessidade de experimentação extensiva em laboratório, economizando tempo, recursos e minimizando os resíduos gerados durante a pesquisa. Dessa forma, contribui para avanços significativos na

sustentabilidade e na eficiência energética de processos industriais baseados em biomassa.

### 3.3. Modelos Usados na Simulação de Produção de Hidrogênio

O Discovery Studio é uma plataforma integrada de bioinformática e modelagem molecular desenvolvida pela BIOVIA (Dassault Systèmes). Ele fornece ferramentas avançadas para modelar, visualizar e analisar moléculas biológicas e químicas, sendo amplamente utilizado em pesquisas de biotecnologia, química computacional e desenvolvimento de fármacos. O software permite realizar simulações moleculares, docking, dinâmicas moleculares e análises de interações proteína-ligante (Moura et al., 2011).

O AutoDock é um software amplamente utilizado para estudos de *docking* molecular. Ele foi desenvolvido pelo Scripps Research Institute para prever como pequenas moléculas, como ligantes ou fármacos, se ligam a um receptor com uma estrutura conhecida, geralmente uma proteína. O programa utiliza algoritmos baseados em busca estocástica e calcula a energia livre de ligação entre os compostos analisados, fornecendo informações sobre a afinidade e a posição preferida do ligante no sítio ativo do receptor (Morris et al., 2009).

O PyMOL é um software de visualização molecular usado para analisar e manipular estruturas biológicas em 3D. Ele é popular por sua interface intuitiva e capacidades avançadas de renderização de gráficos moleculares. Além de visualização, o PyMOL permite a edição de estruturas moleculares, como adição de hidrogênios, visualização de interações e preparação de moléculas para simulações (Delano, 2002).

Assim, utilizando estruturas cristalográficas e modelos de mecânica molecular, esses softwares conseguem simular o comportamento da bactéria em condições próximas às reais, oferecendo uma visão detalhada dos processos bioquímicos envolvidos (Rossetti, 2006).

Além disso, são capazes de prever como variações ambientais, como pH e temperatura, podem impactar a eficiência da produção de hidrogênio.

Assim, o mecanismo de ação da *M. smegmatis* na produção de hidrogênio envolve complexas interações entre proteínas, cofatores metálicos e prótons, que podem ser exploradas por meio da Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Esse método quântico é essencial para entender os estados eletrônicos das hidrogenases e suas transições de energia durante a catálise.

Utilizando DFT, os cientistas conseguem simular os passos fundamentais do processo catalítico, como a transferência de elétrons e a ligação dos prótons, que resultam na formação de hidrogênio molecular.

Ao estudar esses detalhes em nível atômico, é possível otimizar o desempenho das hidrogenases, identificando mutações ou modificações nos cofatores que aumentem a eficiência do processo bioenergético.

Além das simulações de dinâmica molecular e DFT, os modelos computacionais também permitem explorar as condições ambientais que podem influenciar a atividade catalítica da *M. smegmatis*. Esses modelos são cruciais não apenas para compreender o mecanismo de ação da 7UUS, mas também para desenvolver estratégias de engenharia biológica para aumentar a eficiência da produção de hidrogênio em larga escala(Lima, 2016).

Em suas aplicações tecnológicas a hidrogenase *M. smegmatis*, quando combinada com técnicas avançadas de modelagem molecular, pode ser integrada em sistemas bioenergéticos, como: Células a Combustível Biológicas utilizada para conversão direta de hidrogênio em energia elétrica, a produção biológica de Hidrogênio: Reversão do ciclo catalítico da hidrogenase para gerar hidrogênio molecular e dispositivos biohíbridos: Uso da enzima em conjunto com materiais sintéticos para aumentar a eficiência energética(Silva *et al.*, 2019).

### **3.4. Estudos de Mutação e Otimização de Enzimas**

Os estudos de mutação e otimização de enzimas são fundamentais para aprimorar suas funções catalíticas e adaptar sua eficiência a condições específicas. Por meio de técnicas de engenharia de proteínas, é possível modificar seletivamente a sequência de aminoácidos de uma enzima para melhorar sua atividade, estabilidade térmica ou resistência a inibidores. Isso é particularmente relevante em processos industriais, como a produção de biocombustíveis e a geração de hidrogênio, onde enzimas como as hidrogenases têm sido alvo de mutações que buscam aumentar a sua eficiência catalítica(Souza *et al.*, 2010).

Ao introduzir mutações em pontos críticos, como no sítio ativo ou nas interações com cofatores, os cientistas podem otimizar o desempenho das enzimas em ambientes mais exigentes, como os encontrados em processos industriais de larga escala.

Além disso, a otimização de enzimas via mutação geralmente envolve o uso de abordagens como a evolução dirigida. Esse método consiste em induzir mutações aleatórias na sequência genética da enzima e, posteriormente, selecionar as variantes com as melhores características catalíticas. Com essa abordagem, é possível identificar enzimas que apresentam maior resistência a fatores ambientais, como variações de pH e presença de oxigênio, que podem inibir a atividade catalítica. Por exemplo, no caso das hidrogenases, mutações são projetadas para reforçar a estabilidade do complexo enzimático e melhorar a transferência de elétrões, promovendo uma produção mais eficiente de hidrogênio(Rodrigues, 2001).

Finalmente, a combinação de experimentos de mutagênese com simulações computacionais tem acelerado significativamente o processo de otimização enzimática. As simulações permitem prever o impacto das mutações sobre a estrutura e função da enzima, reduzindo o número de testes experimentais necessários. Com isso, é possível não apenas otimizar enzimas para condições específicas, mas também personalizar sua atividade para novas aplicações industriais. Esses avanços mostram que a combinação de técnicas experimentais e computacionais é crucial para a engenharia de enzimas mais eficientes e estáveis, com implicações diretas no desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis(Goldemberg, 2009).

### **3.5. Identificação de Sítios Catalíticos e Previsão de Mutações**

Os sítios catalíticos são regiões específicas de uma enzima responsáveis pela interação com substratos e pela catalisação das reações químicas. Na *M. smegmatis*, identificar essas regiões é essencial para compreender como a enzima contribui para a produção de hidrogênio.

Em outras palavras, são regiões organizadas tridimensionalmente para permitir o reconhecimento molecular, a ativação do substrato e a conversão eficiente em produto. No contexto de enzimas envolvidas na bioprodução de hidrogênio, a identificação e caracterização desses sítios são etapas-chave para compreender os mecanismos moleculares que sustentam essa atividade biocatalítica.

No caso específico da bactéria *Mycobacterium smegmatis*, tem-se identificado enzimas hidrolíticas, como as hidrolases, que participam de vias



metabólicas associadas à geração de hidrogênio molecular ( $H_2$ ). Embora tradicionalmente não sejam classificadas como hidrogenases, certas hidrolases presentes nesse organismo exibem atividade relacionada à liberação de hidrogênio a partir de precursores orgânicos ou intermediários metabólicos. Nessa perspectiva, a localização dos sítios catalíticos nessas hidrolases é crucial para entender como essas enzimas contribuem para o fluxo de elétrons e a redução de prótons — etapas determinantes na produção de  $H_2$ .

Compreender os detalhes estruturais e funcionais desses sítios catalíticos permite a modelagem precisa da interação entre a enzima e seus cofatores metálicos, como centros Fe-S ou grupos prostéticos que participam do transporte de elétrons. A partir dessa análise, torna-se possível propor modificações por mutagênese em resíduos específicos do sítio ativo com o objetivo de aumentar a eficiência catalítica ou ampliar a estabilidade da enzima em ambientes industriais.

Além disso, a análise dos sítios catalíticos em *M. smegmatis* pode fornecer pistas evolutivas sobre o funcionamento de sistemas biológicos mais complexos de produção de hidrogênio, uma vez que essa espécie é frequentemente utilizada como modelo não patogênico em estudos de metabolismo energético de micobactérias. Dessa forma, o mapeamento funcional desses domínios enzimáticos contribui não apenas para a biotecnologia aplicada à produção de hidrogênio verde, mas também para a compreensão fundamental de processos bioquímicos com potencial energético.

As hidrolases, em especial as hidrogenases, desempenham um papel central na conversão biológica de prótons em hidrogênio molecular ( $H_2$ ), sendo consideradas catalisadores naturais promissores na produção de hidrogênio verde. Esses biocatalisadores possuem a capacidade de operar sob condições brandas de temperatura e pH, utilizando água como fonte primária de elétrons, o que os torna atrativos para aplicações sustentáveis em bioenergia.

A atividade catalítica das hidrogenases está diretamente associada à presença de centros metálicos ativos, geralmente compostos por ferro (Fe) ou níquel (Ni), localizados em sítios catalíticos específicos. Esses sítios apresentam arquitetura tridimensional altamente conservada, permitindo a coordenação de cofatores essenciais, como clusters Fe-S, fundamentais para o transporte eficiente de elétrons até o centro ativo. A caracterização estrutural desses

domínios, por meio de técnicas como cristalografia de raios X e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), tem sido crucial para compreender os mecanismos de ativação do hidrogênio e para orientar estratégias de modificação enzimática.

A identificação precisa dos sítios catalíticos é um passo essencial para a engenharia racional dessas enzimas. Ferramentas computacionais de modelagem molecular, como a docagem molecular e a dinâmica molecular, permitem prever interações entre resíduos-chave e substratos, favorecendo a seleção de alvos para mutagenese dirigida. Além disso, algoritmos baseados em aprendizado de máquina têm sido aplicados com sucesso para antecipar os efeitos funcionais de mutações pontuais, contribuindo para a criação de variantes enzimáticas com maior estabilidade, atividade catalítica ou resistência a inibidores.

A previsão de mutações benéficas, aliada à compreensão da organização dos sítios catalíticos, representa uma abordagem promissora para a otimização de hidrolases no contexto da bioprodução de hidrogênio. Essa linha de investigação se mostra estratégica frente à crescente demanda por fontes renováveis de energia, e posiciona as hidrogenases como elementos-chave no desenvolvimento de biotecnologias voltadas à economia do hidrogênio.

Para isso é necessário usar alguns procedimentos como análise estrutural é importante trabalhar com a ferramental que visualiza a estrutura tridimensional da *M. smegmatis* como o PyMOL ou Discovery Studio, outro procedimento importante é a predição de Funções Catalíticas que tem como objetivo examinar a presença de cofatores ou íons metálicos que possam estar envolvidos no mecanismo catalítico, utilizando bases de dados como o PDB finalizando com a Simulações utilizando a ferramenta: Docking Molecular que realize simulações com substratos conhecidos da *M. smegmatis* para validar os resíduos que participam diretamente na ligação e transformação química do substrato(Pimentel et al., 2016).

A integração de ferramentas computacionais e experimentais permite explorar o mecanismo de ação da 7UUS e potencializar sua aplicação em sistemas de produção de hidrogênio. Essa abordagem oferece insights sobre como mutações direcionadas podem melhorar a eficiência enzimática, viabilizando sistemas bioenergéticos mais sustentáveis. Assim, a modelagem

molecular auxilia na compreensão das interações moleculares entre as hidrogenases e os cofatores metálicos, componentes essenciais para a catalisação da reação de produção de hidrogénio.

Estudos focados nesse tipo de modelagem têm se concentrado na identificação de mutações específicas que poderiam melhorar a resistência das enzimas da *M. smegmatis* a condições desfavoráveis, como a presença de oxigénio, que inibe a produção de hidrogénio. A previsão dessas mutações tem possibilitado a engenharia de microrganismos geneticamente modificados para aumentar a eficiência da produção de bioenergia. Assim, esses avanços no campo da modelagem molecular não apenas promovem o desenvolvimento de enzimas otimizadas, como também aceleram a bioprospecção de novas cepas microbianas que podem ser aplicadas na produção industrial de hidrogénio, contribuindo para a transição para fontes de energia mais sustentáveis. (Pitassi et al., 2014).

### **3.6. Estudo do mecanismo de ação da bactéria e produção de enzimas**

O estudo do mecanismo de ação das bactérias no processo de produção de enzimas foca-se em entender como esses microrganismos utilizam suas estruturas internas para sintetizar e ativar enzimas que desempenham papéis cruciais em processos bioquímicos (Fan et al., 2022).

No caso específico de bactérias envolvidas na produção de bioenergia, como a *M. smegmatis*, o objetivo é investigar como essas enzimas, como as hidrogenases, são formadas e como atuam no metabolismo da bactéria, facilitando a conversão de prótons em hidrogénio molecular. A produção de enzimas bacterianas é regulada por uma série de fatores genéticos e ambientais, o que torna esse processo extremamente complexo e dinâmico. Compreender como esses fatores influenciam a síntese e a função das enzimas é fundamental para otimizar a eficiência biológica desses organismos (Peters et al., 2015).

Além disso, o estudo do mecanismo de ação das bactérias na formação de enzimas envolve a análise das etapas de maturação e incorporação de cofatores, que são essenciais para a atividade catalítica das hidrogenases, por exemplo. Esses cofatores, como níquel e ferro, desempenham um papel central

no funcionamento do sítio ativo das enzimas, permitindo a realização de reações de oxirredução (Stripp et al., 2015).

Durante o processo de formação da enzima, as bactérias precisam garantir a correta inserção desses cofatores e a conformação adequada da proteína para que a catálise ocorra de maneira eficiente. Alterações no ambiente externo, como variações de pH e temperatura, podem impactar significativamente essas etapas, o que justifica a necessidade de estudos aprofundados sobre a regulação do processo de produção enzimática em diferentes condições (Winkler et al., 2013).

Por fim, esses estudos também consideram os desafios práticos e técnicos envolvidos na utilização dessas enzimas para aplicações industriais. Um dos problemas frequentemente encontrados é a sensibilidade das enzimas, como as hidrogenases, ao oxigênio, que pode inibir sua atividade catalítica, limitando sua aplicação em processos de bioenergia.

A engenharia genética, incluindo mutagênese e evolução dirigida, tem sido explorada como uma abordagem para contornar esses problemas, aumentando a estabilidade das enzimas e sua eficiência em ambientes industriais. Dessa forma, o estudo do mecanismo de ação das bactérias no processo de formação de enzimas visa não apenas a compreensão teórica dos processos biológicos, mas também o desenvolvimento de soluções práticas para otimizar a produção e utilização dessas enzimas em larga escala (Fan et al., 2022).

#### 4 METODOLOGIA

A estrutura 7UUS no Banco de Dados de Proteínas (PDB) refere-se a uma protease da bactéria *Mycobacterium smegmatis*. Essa enzima desempenha um papel crucial no metabolismo *bacteriano*, participando da degradação de proteínas e na regulação de processos celulares essenciais(Souza et al., 2010).

Estudos indicam que a *M. smegmatis* possui a capacidade de realizar fotossíntese anaeróbica, utilizando a enzima nitrogenase para converter compostos orgânicos em hidrogênio. Esse processo é eficiente e sustentável, permitindo que a bactéria utilize diversas fontes de resíduos como substrato. Além disso, a *M. smegmatis* apresenta alta eficiência na produção de hidrogênio em uma faixa de pH adequada, o que possibilita sua aplicação em diferentes ambientes(Rodrigues et al., 2011).

A compreensão detalhada das interações intermoleculares e dos mecanismos moleculares envolvidos na produção de energia por essa bactéria é fundamental para potencializar a geração de energia sustentável. Ferramentas de bioinformática, como modelagem molecular e simulação de dinâmicas moleculares, têm sido utilizadas para identificar e caracterizar proteínas e genes que participam das vias metabólicas da *M. smegmatis*. Essas técnicas permitem prever interações intermoleculares, calcular energias de interação e analisar conformações e distâncias envolvidas, oferecendo uma compreensão detalhada dos pontos de controle que podem ser otimizados para maximizar a produção de hidrogênio(Moura et al.,2011).

Inicialmente utilizou-se um programa para modelar e analisar o mecanismo de ação da bactéria 7UUS na produção de hidrogênio é tipicamente baseado em softwares de simulação molecular, como o DOC: DISCOVERY STUDYO, AUTO DOC E PYMOL Esses programas permitem realizar simulações de dinâmica molecular que ajudam a entender como as enzimas da bactéria, particularmente as hidrogenases, interagem com substratos e catalisam a produção de hidrogênio((Moura et a, 2011.).

Discovery Studio, AutoDock e PyMOL são ferramentas utilizadas para proporcionar uma abordagem detalhada e eficiente para explorar os mecanismos moleculares envolvidos e otimizar processos biotecnológicos(Biovia, 2015).

O Discovery Studio é um software poderoso para modelagem molecular que pode ser usado para prever e analisar estruturas de proteínas essenciais, como a enzima Huc, responsável pela conversão de hidrogênio em energia e tem como estratégia a modelagem de proteínas (Biovia, 2015).

Para compreender detalhadamente os mecanismos estruturais que regem essa atividade catalítica, abordagens de modelagem molecular têm sido amplamente utilizadas. Estudos recentes têm empregado modelagem por homologia para construir modelos tridimensionais das hidrogenases de *M. smegmatis*, a partir de estruturas-resolução de enzimas homólogas depositadas em bancos como o Protein Data Bank (PDB). Esses modelos permitem a visualização e análise da conformação espacial dos cofatores metálicos — como o centro [NiFe] e os clusters Fe-S — que constituem o núcleo catalítico da enzima.

A etapa seguinte ao refinamento estrutural dos modelos é frequentemente conduzida por meio de simulações de docking molecular, que possibilitam investigar como substratos, cofatores ou moléculas reguladoras se ligam ao sítio ativo da enzima. Essa técnica tem sido aplicada para avaliar a interação entre a hidrogenase e potenciais doadores de elétrons ou inibidores naturais, com o objetivo de mapear as regiões de contato molecular e identificar resíduos críticos para a estabilidade do complexo enzimático. Por exemplo, estudos utilizando a ferramenta AutoDock Vina revelaram padrões de interação estável entre a hidrogenase de *M. smegmatis* e modelos de NADH, sugerindo trajetórias possíveis de transferência eletrônica (Halder et al 2021).

Complementando as análises de docking, simulações de dinâmica molecular fornecem uma descrição temporal da flexibilidade conformacional da enzima e das flutuações nos resíduos que compõem o sítio catalítico. Essas simulações, geralmente conduzidas com pacotes como GROMACS ou AMBER, permitem observar a estabilidade do centro ativo ao longo do tempo e sob diferentes condições simuladas de temperatura, pH ou presença de substratos. Tais estudos já demonstraram que o ambiente proteico ao redor do centro [NiFe] de *M. smegmatis* apresenta alta estabilidade conformacional, mantendo as distâncias críticas para a catálise ao longo de centenas de nanossegundos de simulação (Sparks et al., 2023).

O software permite construir e refinar modelos estruturais da hidrogenase de *M. smegmatis*, usando métodos baseados em homologia, além da simulação de interação proteína-substrato que é possível simular como o hidrogênio se liga à enzima, avaliando o potencial de conversão energética outra estratégia é análise de mutações: Ferramentas para testar mutações in silico permitem prever variantes que aumentem a eficiência da enzima(Rodrigues, 2001).

O AutoDock é amplamente usado para simular o acoplamento molecular (docking), sendo ideal para estudar como moléculas de interesse interagem com as proteínas de *M. smegmatis* apresenta como estratégias análise de afinidade, exploração de novos ligantes e avaliação energética(Durrant et al 2011).

O PyMOL é uma ferramenta de visualização molecular que auxilia na análise tridimensional das estruturas obtidas e otimizadas com Discovery Studio e AutoDock. Suas estratégias são visualização de estrutura, apresentação de dados e identificação de locais ativos.

Na estrutura inicial e Dados Experimentais, a estrutura 7UUS foi resolvida por cristalografia de raios X e está disponível no Protein Data Bank (PDB), ela representa uma hidrogenase de *M. smegmatis*, uma enzima envolvida na oxidação de hidrogênio. Para iniciar, o arquivo PDB contendo as coordenadas atômicas é importado para softwares de modelagem molecular, como o Discovery Studio e PyMO(Schrödinger, 2020).

Pode-se então, observar que o software Biovia Discovery Studio tem como realizar um carregamento de estrutura de compostos apresentados em vários formatos um dos mais conhecido é o Protein Data Bank (PDB). Este software abriu a molécula e permitiu o usuário alterar a estrutura usando os comandos que estão presentes na barra lateral tendo a possibilidade de remover resíduos de aminoácidos e retirar o que é indesejável.

Quanto ao PyMOL é um software que tem como finalidade visualizar as moléculas, é necessário a permissão acadêmica para utilizar de forma gratuita. Este software é considerado bastante seguro e com boa qualidade. Sua principal função é visualizar com profundidade as ligações das estruturas através dos arquivos apresentados no formato pdb, no protein data bank. Além disso é capaz de remover as moléculas de água, facilitar a realização do docking e possibilitar o usuário a salvar imagens, vídeo das estruturas trabalhadas e analisada(ferreira et al., 2022).

Os dois softwares possibilitam tanto a visualização quanto a edição de estruturas de moléculas importantes para o estudo do *in silico* do composto.

A integração dessas ferramentas computacionais tem sido fundamental não apenas para a compreensão estrutural da hidrogenase de *M. smegmatis*, mas também para a previsão racional de mutações. Ao identificar resíduos conservados e funcionalmente relevantes no sítio catalítico, é possível propor substituições por mutagênese dirigida visando otimizar a atividade enzimática ou conferir maior resistência a condições ambientais adversas. Essa abordagem tem implicações diretas na engenharia de cepas microbianas para aplicações em biorreatores ou sistemas híbridos bioinorgânicos voltados à produção de hidrogênio verde (Silva et al., 2023).

Assim, o uso combinado de modelagem por homologia, docking molecular e dinâmica molecular tem se consolidado como um conjunto robusto de estratégias para elucidar os mecanismos catalíticos e projetar novas variantes enzimáticas com potencial biotecnológico. No contexto de *M. smegmatis*, essa abordagem representa um caminho promissor para o desenvolvimento de plataformas sustentáveis e eficientes de bioprodução de hidrogênio.

No mecanismo de ação da 7UUS, a modelagem molecular auxilia na identificação de sítios catalíticos das enzimas envolvidas no processo de geração de hidrogênio e na análise das interações entre essas enzimas e seus substratos.

Além disso, possibilita a análise de como diferentes mutações afetam a eficiência enzimática, permitindo a identificação de variantes mais estáveis e ativas em condições industriais, como altas temperaturas ou ambientes oxidativos.

Portanto a proteína 7UUS, esta frequentemente associada à produção de hidrogênio em organismos biológicos, desempenha um papel crucial como biocatalisador em sistemas enzimáticos. A identificação de sítios catalíticos e a previsão de mutações são etapas fundamentais para otimizar seu desempenho na produção de energias renováveis. Esses procedimentos envolvem o uso de ferramentas de bioinformática e técnicas de modelagem molecular, possibilitando uma compreensão detalhada do funcionamento enzimático e estratégias de engenharia (Pimentel et al., 2016).



#### 4.1 Materiais Usados para o Preparo de Ligantes e Enzima na *Mycobacterium smegmatis*

No processo de preparo de ligantes e enzimas na *Mycobacterium smegmatis* é necessário alguns materiais e softwares para Preparo da Enzima. Em sua estrutura a enzima da *Mycobacterium smegmatis* pode ser obtida de bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB), por exemplo a enzima como a hidrogenase ou outro relevante pode ser utilizada para o metabolismo (Berney et al., 2014).

Os principais softwares utilizados para o processamento da enzima são: o pymol que visualiza e remove moléculas desnecessárias, como os íons ou moléculas de água não essenciais. O Discovery Studio, utilizado nas correções possíveis de lacunas ou erros na estrutura, como átomos ausentes.

Portanto para a realização dos procedimentos é necessário baixar a estrutura da enzima em formato pdb. Em seguida inspecionar a estrutura para identificar lacunas ou resíduos não resolvidos, aproveitar todos os procedimentos e otimizar a geometria e minimizar a energia da estrutura utilizando o CHARMM-GUI(Silva, 2020).

Para a preparação dos ligantes utilizados geralmente incluem substratos naturais da enzima, inibidores ou moléculas que tem interação com os sítios catalíticos. Nesse momento foi utilizado para identificar a base de dados o Pubchem que através desse programa é fornecido informações sobre as estruturas moleculares dos ligantes. Quanto aos Softwares para Preparo de Ligantes: o ChemDraw serve para desenhar e editar a estrutura do ligante. Já o Open Babel: Para converter arquivos entre diferentes formatos moleculares (ex.: .mol2, .pdb, .sdf).

Então foram desenvolvidos os seguintes procedimentos, com a imagem da estrutura molecular do ligante foi realizado a otimização geométrica para garantir que o ligante esteja na conformação de menor energia , em seguida foi calculado as cargas parciais (por exemplo, com o método AM1-BCC), logo após aconteceu a conversão do ligante para o formato apropriado para docking molecular (geralmente .pdbqt para o AutoDock).

Na modelagem molecular e estudo do mecanismo de ação de enzimas da *Mycobacterium smegmatis*, é crucial preparar adequadamente tanto os ligantes quanto a estrutura enzimática. O preparo envolve o uso de ferramentas

computacionais e protocolos experimentais para garantir a acurácia e a confiabilidade dos dados obtidos.

## **4.2 Métodos e Estratégias da Pesquisa**

Os métodos utilizados terão um foco mais preciso diante dos problemas encontrado ao realizar a pesquisa e para solucionar serão apresentados alguns objetivos mais preciso como selecionar as propriedades moleculares a serem investigadas pelo software com base na literatura; determinar os sistemas biológicos que serão estudados pelo presente trabalho, bem como os ligantes e macromoléculas; Realizar a análise teórica dos complexos ligante-proteína e as interações envolvidas com base na sua estrutura química; Estudar in silico de ligantes ou pró-fármacos com o sítio ativo de enzimas com interesse farmacêutico; determinar as propriedades de sistemas biológicos com base nas energias de interação obtidas(Pitassi et al., 2014).

As estratégias desenvolvidas na pesquisa basearam-se fortemente no uso da bioinformática para análise e interpretação de dados genômicos. As ferramentas computacionais forma empregadas para mapear, prever funções e identificar possíveis alvos

## **4.3 O Uso da Química Computacional**

Desse modo esta pesquisa justifica-se que o mecanismo utilizado para entender será por meio de software ou seja através da química computacional em que é uma ótima ferramenta para otimizar reações experimentais e levam à formação de resíduos e subprodutos estas ferramentas computacionais podem ser usadas para otimizar as reações apresentar uma boa reprodutibilidade e aplicabilidade, reduzir a geração de poluentes químicos, reduzir os custos energéticos além de ser um processo rápido em preparação (Bastos et al., 2022b).

A pesquisa tem como objetivo utilizar a bioinformática como ferramenta para análise de interações intermoleculares em sistemas biológicos de geração de energias alternativas. afim de mostrar através da modelagem molecular a construção de novos modelos teóricos apresentando de forma simplificada os

principais fenômenos e objetos em que em sua estrutura e propriedades possa visualizar as conformações e poses, racionalização molecular, cálculos de energia e propriedades eletrônicas. Os estudos realizados terão como foco mais preciso diante dos problemas encontrados a otimização das reações, a boa reprodutibilidade, a redução de geração de poluentes, a redução de custos e por fim o resultado imediato na preparação e análise (Alves, 2013).

#### 4.4 Preparação de ligantes e enzima

A molécula de dissiliano (CID6341) utilizada foi criada pelo software Chem3D (Ahmadi et al., 2005), composto **1** (Figura 5), nas 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), Passo por Atualização 4 (Sutton; Mahmood; White, 2016) pelo software AVOGADRO (Hanwell et al., 2012). Todos os arquivos com ligantes foram convertidos para formatos correspondentes (.pdbqt) com adição de ionização e estados tautométicos em pH 7,4 usando o software OpenBabel ver. 3.0.0 (O'Boyle et al., 2011).

O receptor em estudo foi a estrutura das [NiFe]-hidrogenase Huc da *Mycobacterium smegmatis*, obtida no código de repositório do Protein Data Bank ID 7UUS (Berman et al., 2000), cuja estrutura cristalina foi obtida por difração de raios X complexos. Para possibilitar o acoplamento molecular, os resíduos interferentes, as moléculas de água e o inibidor sintético foram removidos. Hidrogênios polares foram adicionados aos ligantes, separadamente, e à proteína. Essa técnica visa pesquisar dentro de potenciais bancos de dados de ligantes virtuais para um determinado alvo de proteína. O software utilizado foi o Autodock tools (Morris et al., 2009b).

#### 4.5 Acoplamento molecular do ligante e da proteína

O docking molecular foi realizado pelo AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010) empregando multithreading de 3 vias, foi realizada a Genética Lamarkiana. Para o acoplamento da hidrogenase (7UUS) foram utilizados os seguintes parâmetros: pontos da grade numérica em xyz (126 126 126), espaçamento

(0,642), centro da grade em xyz (143,284 143,229 120,367). Outros parâmetros foram definidos como padrão. Ligantes de entrada com hidrogênios polares foram usados no formato .pdbqt. Foram realizadas entre dez e quarenta execuções de docking molecular, e número de simulações que foram repetidas na mesma região do receptor biológico. Assim, para validar o desempenho da simulação e quantificar a qualidade dos encaixes, adotou-se o critério de pontuação RMSD (root mean square deviation), que sugere que um encaixe bem-sucedido exibe um valor  $\text{RMSD}_{\text{rmsd}} \leq 2,0 \text{ \AA}$  (Sutherland et al., 2007) e, paralelamente, o uso da rede neural NNScore com a medição em concentração molar da melhor pose (Durrant et al., 2010) e o critério de menor energia de ligação sugere que no complexo previsto pelo docking molecular, a menor energia de ligação é assumida como mais próxima do estado do sítio ativo da enzima, onde pode ser associada a uma constante de afinidade (Fu et al., 2018; Havranek et al., 2020)

Os dados de simulação com as principais interações receptor-ligante foram visualizados pelos softwares Discovery Studio (Biovia, 2015c) e ChimeraX (Pettersen et al., 2021).

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. Desafios no Estudo do Mecanismo de Ação da *Mycobacterium smegmatis*

De acordo com as análises realizadas durante a pesquisa observa-se que são apresentados poucos resultados do mecanismo de ação da bactéria 7UUS na produção de Hidrogênio, pois estudos experimentais buscam realizar atividades experimentais usando produtos energéticos e custos.(Goldemberg, 2009).

O mecanismo de ação da bactéria 7UUS na produção de hidrogênio envolve processos bioquímicos complexos, especialmente mediados por enzimas específicas, como as hidrogenases, que catalisam a oxidação de substratos e a subsequente liberação de hidrogênio.

Pesquisas indicam que a 7UUS utiliza uma via metabólica que inclui a fermentação anaeróbica de substratos orgânicos, durante a qual elétrons são transferidos para as hidrogenases, possibilitando a produção de hidrogênio molecular(Silva et al., 2019).

Esse processo é favorecido em condições de baixa oxigenação, o que torna a 7UUS uma candidata promissora para a bioenergia, já que é capaz de gerar hidrogênio de forma eficiente em ambientes controlados e sustentáveis (Membro; Membros, 2012).

No entanto ação da bactéria 7UUS na produção de hidrogênio enfrenta diversos desafios, particularmente devido à complexidade estrutural e funcional das enzimas hidrogenases envolvidas no processo. As hidrogenases, responsáveis pela catalisação da conversão de prótons em hidrogênio molecular, são compostas por cofatores metálicos sensíveis a alterações ambientais e estruturais.

A modelagem precisa dessas interações requer não apenas a identificação exata dos estados eletrônicos dos cofatores, mas também a simulação detalhada das condições celulares que influenciam a atividade enzimática. A limitação no acesso a dados experimentais de alta resolução sobre as conformações intermediárias dessas enzimas durante o processo catalítico é um obstáculo significativo. Além disso, as técnicas computacionais, embora avançadas, ainda podem apresentar limitações em simular, com precisão, todos

os efeitos dinâmicos e eletrônicos que ocorrem durante a catálise, especialmente em sistemas tão complexos e de grande escala como a 7UUS(Alves, 2013).

Outro desafio relevante é a integração dos dados computacionais com resultados experimentais, visto que as condições simuladas nem sempre replicam com exatidão o ambiente intracelular da bactéria. As simulações precisam considerar variações de pH, temperatura, concentração de substrato e interações com outras biomoléculas, o que aumenta a complexidade do estudo.

Além disso, as hidrogenases apresentam uma sensibilidade elevada à presença de oxigênio, o que pode inibir sua atividade. Isso dificulta a manutenção das condições ideais tanto em simulações quanto em experimentos laboratoriais. Portanto, os desafios não se limitam apenas à modelagem molecular, mas também à necessidade de desenvolver métodos mais eficazes para estudar os mecanismos de inibição e otimização da atividade enzimática em ambientes controlados. Superar esses desafios é crucial para avançar no desenvolvimento de biotecnologias eficientes de produção de hidrogênio(Silva et al., 2019).

## **5.2. Questionamentos Sobre o Mecanismo de Ação da *Mycobacterium smegmatis***

Preocupado com todos os déficits apresentados no conhecimento da bioinformática levantou-se o seguinte questionamento: Como entender o mecanismo de ação da bactéria 7UUS na produção de Hidrogênio?

Diante disso, o mecanismo de ação da bactéria 7UUS na produção de hidrogênio surge devido à complexidade bioquímica envolvida e às limitações experimentais e computacionais na análise detalhada do processo catalítico.

Embora se saiba que as hidrogenases presentes na 7UUS são responsáveis pela catalisação da produção de hidrogênio, os detalhes exatos de como essas enzimas facilitam a transferência de elétrons e prótons ainda não estão completamente elucidados. A estrutura tridimensional dessas hidrogenases, bem como as interações com cofatores metálicos, como o níquel e o ferro, são fatores determinantes no processo catalítico.

No entanto, a caracterização experimental dessas enzimas é dificultada pela sua instabilidade em condições ambientais adversas, como a exposição ao

oxigénio, o que gera incertezas sobre a sua funcionalidade em cenários industriais

Além disso, questiona-se como as condições fisiológicas e ambientais, como o pH e a temperatura, influenciam diretamente o desempenho das hidrogenases da 7UUS.

Estudos indicam que pequenas variações nesses fatores podem afetar drasticamente a eficiência da produção de hidrogénio, o que levanta dúvidas sobre a robustez do mecanismo de ação dessa bactéria em condições variáveis.

Outro ponto de discussão é a capacidade da 7UUS de manter altos níveis de atividade catalítica em longos períodos, especialmente quando inserida em sistemas biotecnológicos para produção em larga escala. A presença de inibidores naturais ou industriais, como o oxigénio, representa um obstáculo significativo para a aplicação eficiente dessas hidrogenases, aumentando os questionamentos sobre a viabilidade de sua utilização contínua na produção de bioenergia(Souza et al.,2010b).

Por fim, outro aspecto que gera questionamentos é a possibilidade de engenharia genética dessas enzimas para otimizar sua função e resistência a ambientes hostis. A modelagem molecular e os estudos de mutação têm sido utilizados para prever e testar melhorias no desempenho das hidrogenases da 7UUS.

Contudo, há dúvidas sobre até que ponto essas modificações podem realmente aumentar a eficiência da produção de hidrogénio sem comprometer a estabilidade estrutural da enzima ou introduzir novas vulnerabilidades, como uma maior sensibilidade a variações ambientais. Embora esses questionamentos sejam legítimos, eles também abrem novas linhas de pesquisa para melhorar a compreensão dos mecanismos bioquímicos da 7UUS e explorar seu potencial na produção sustentável de hidrogénio.

### **5.3 Análise do Oxigênio na reação**

A disponibilidade de oxigênio é um fator crucial e uma força evolutiva que molda as estratégias metabólicas das bactérias em diferentes nichos ambientais (Khademian et al., 2021). No solo, as condições oscilam frequentemente entre oxigênese (oxia) e ausência de oxigênio (anóxia), exigindo que as bactérias adaptem constantemente seus metabolismos energéticos (Berney et al., 2014).

A bactéria *Mycobacterium smegmatis*, é um actinomiceto do solo aeróbio obrigatório, e tem capacidade de adotar uma estratégia típica de anaeróbios ao ativar a produção fermentativa de hidrogênio em resposta à hipóxia (Benoit et al., 2020).

Em estudos anteriores foi observado que o mecanismo da obtenção de hidrogênio é feito por meio de um sensor de oxigênio e redox altamente conservado nessas micobactérias (Bhat et al., 2012). O fator regulador DosR controla rigidamente as duas [NiFe]-hidrogenases, Hyd3 e Hyd2 (Berney et al., 2014d). Portanto, a hidrogenase Hyd3 facilita a produção de  $H_2$  quando o oxigênio é esgotado. A atividade combinada de Hyd2 e Hyd3 é fundamental para manter uma relação ideal entre  $NAD^+$  e NADH, favorecendo a adaptação e sobrevivência durante períodos de hipóxia (Lauterbach et al., 2011).

Neste estudo, foi realizada uma simulação envolvendo a molécula doadora de hidrogênio etilamina, que interagiu diretamente com os principais resíduos localizados nas proximidades do co-fator  $NAD^+$  ou NADH, desempenhando um papel fundamental nas reações de oxidação e redução. A energia de afinidade obtida por meio da docking molecular foi de aproximadamente -2,5 kcal/mol, um valor relativamente baixo quando comparado com outras interações em sistemas reacionais semelhantes, cujos valores energéticos variam tipicamente entre -4,0 e -6,5 kcal/mol (Ferreira et al., 2010; Mohamed et al., 2023).

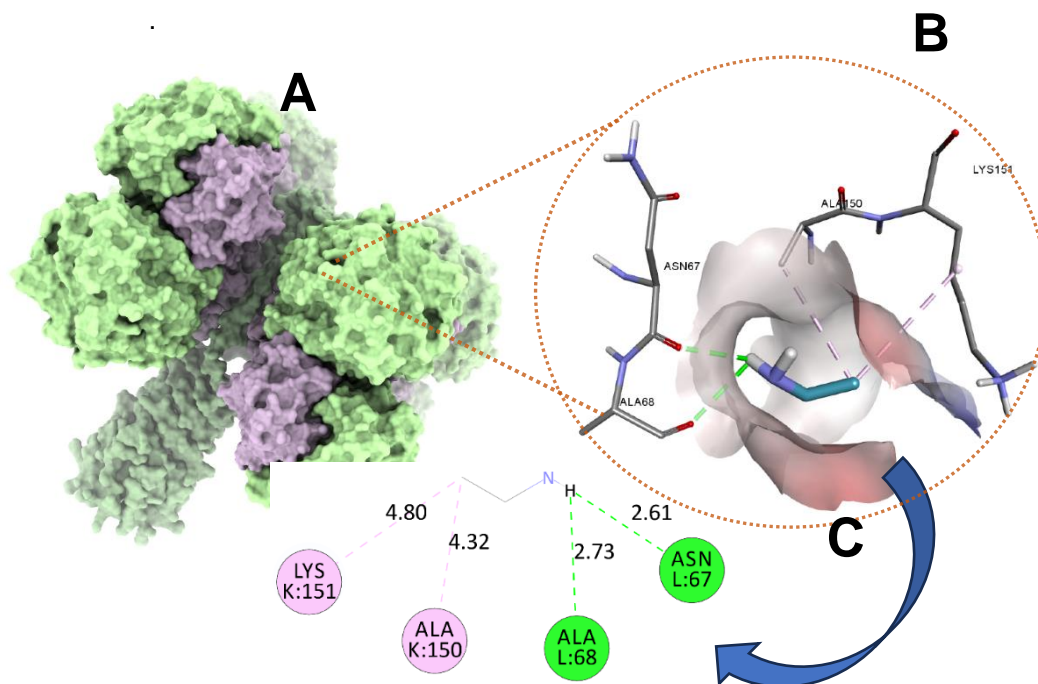
Na Figura 2 (A), é possível observar a enzima completa. Na subfigura (B), destacam-se as principais interações em três dimensões, onde os átomos de hidrogênio da amina formaram duas ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 67 e Ala 68. Essas interações exibiram distâncias intermoleculares variando entre 2,73 Å e 2,61 Å, sugerindo uma força de ligação moderada a forte (Kim et al., 2024). Essa afinidade energética, em conjunto com a força das ligações de hidrogênio observadas, pode influenciar significativamente a estabilidade do complexo enzima-substrato (Guo et al., 2012).

Além das ligações de hidrogênio, também foram identificadas interações hidrofóbicas relevantes entre o grupo metil da etilamina e os resíduos Lys 151 e Ala 150, conforme mostrado na subfigura (C). Tais interações hidrofóbicas podem desempenhar um papel importante na orientação da molécula no sítio ativo da enzima e na estabilidade global do complexo (Lomize et al., 2007).



Esses achados sugerem que, apesar da afinidade relativamente baixa da etilamina, a combinação de ligações de hidrogênio moderadas e interações hidrofóbicas pode contribuir para a eficiência do processo de oxidação/redução, impactando a funcionalidade do sistema enzimático estudado

**Figura 1:** Enzima *Mycobacterium smegmatis*



Fonte: Autoria própria(2024)

Na figura a descrição ocorre da seguinte forma: **(A)** Enzima vista por completo com preenchimento superficial. **(B)** Interações entre o agente doador de hidrogênio etilamina e os principais resíduos e aminoácidos na simulação e **(C)** Interações em 2D dos principais resíduos de aminoácidos e etilamina juntamente com suas distâncias em angström (Å).

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, utilizamos a bioinformática como uma ferramenta poderosa para a análise de interações intermoleculares em sistemas biológicos voltados para a geração de energias alternativas. Por meio de uma abordagem teórica, foi possível selecionar propriedades moleculares relevantes, determinadas com base na literatura científica, para investigar a eficiência desses sistemas. As análises realizadas nos complexos ligante-proteína permitiram a identificação de interações-chave, tanto hidrofóbicas quanto por ligações de hidrogênio, fornecendo insights fundamentais sobre a estabilidade e funcionalidade das moléculas envolvidas.

A determinação das energias de interação auxiliou na compreensão das propriedades estruturais e dinâmicas dos sistemas estudados, destacando a importância dessas interações para a adaptação e sobrevivência em condições ambientais específicas, como baixa disponibilidade de oxigênio. A aplicação dessas análises em sistemas biológicos específicos demonstra o potencial da bioinformática não apenas para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes, mas também para otimizar o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para a geração de energia sustentável.

Portanto, os resultados deste estudo reforçam o papel essencial da bioinformática na predição e análise de interações intermoleculares, contribuindo significativamente para o avanço de sistemas energéticos inovadores.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, M. et al. Chem3D 15.0 User Guide. **Macromolecules**, v. 24, n. 2, p. 1–61, 2005. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Macromolecules&title=Chem3D%2015.0%20user%20guide&author=M%20Ahmadi&author=M%20Jahed%20Motlagh&author=AT%20Rahmani&author=MM%20Zolfagharzadeh&author=P%20Shariatpanahi&volume=24&issue=2&publication\\_year=2005&pages=1-61](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Macromolecules&title=Chem3D%2015.0%20user%20guide&author=M%20Ahmadi&author=M%20Jahed%20Motlagh&author=AT%20Rahmani&author=MM%20Zolfagharzadeh&author=P%20Shariatpanahi&volume=24&issue=2&publication_year=2005&pages=1-61) . Acesso em: 12 mar 2024
- ALVES, S. M. A bioinformática e sua importância para a biologia molecular. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 3, n. 4, p. 18–25, 2013. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/2498/1941> . Acesso em: 13 abr 2024
- BASTOS, L. L. et al. A bioinformática e sua inserção no ensino superior brasileiro atual. **BIOINFO- Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, v.2 , n. 6, p. 15 – 27, 2022a. Disponível em: [https://bioinfo.com.br/wp-content/uploads/2022/08/BIOINFO\\_ed\\_02.pdf](https://bioinfo.com.br/wp-content/uploads/2022/08/BIOINFO_ed_02.pdf) . Acesso em: 24 abr 2024.
- BASTOS, L. L. et al. A importância da preparação de estruturas na metodologia de docking molecular. **BIOINFO- Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, v.2, n. 6, p. 72 – 81, 2022b. Disponível em: [https://bioinfo.com.br/wp-content/uploads/2022/08/BIOINFO\\_ed\\_02.pdf](https://bioinfo.com.br/wp-content/uploads/2022/08/BIOINFO_ed_02.pdf) . Acesso em: 24 abr 2024.
- BENOIT, S. L. et al. Molecular Hydrogen Metabolism: a Widespread Trait of Pathogenic Bacteria and Protists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00092-19>. Acesso em: 10 mai 2024.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>. Acesso em: 10 mai 2024.
- BERNEY, M. et al. Three different [NiFe] hydrogenases confer metabolic flexibility in the obligate aerobe Mycobacterium smegmatis. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 1, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12320>. Acesso em :23 jun 2024
- BERNEY, M. et al. An obligately aerobic soil bacterium activates fermentative hydrogen production to survive reductive stress during hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 31, 2014b. Disponível em: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* DOI link: <https://doi.org/10.1073/pnas.1407034111>. Acesso em: 23 jun de 2024.
- BEZERRA, A. A. da S. et al. Workshop de bioinformática. **Saúde.com**, 13 ago. 2019.

BHAT, S. A. et al. The mechanism of redox sensing in Mycobacterium tuberculosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 8, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.008>. Acesso em: 24 jul 2024

BIOVIA. **Discovery Studio Modeling Environment**, Release 2017. San Diego, CA: Dassault Systèmes, 2016. Disponível em: <https://docslib.org/doc/389370/biovia-discovery-studio%C2%AE-2016-comprehensive-modeling-and-simulations-for-life-sciences-datasheet>. Acesso em :23 jun 2024

COSTA, H. M.da; RAMOS, V. D. Vulcanização da borracha natural com óleos vegetais – análise teórica do processo através da modelagem molecular. **Revista Foco**, p. e2445, 14 jul. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n7-063>. Acesso em: 14 set 2024

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, San Carlos, CA, USA, 2002. Disponível em: <https://pymol.org/2/>. Acesso em: 15 out 2024

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci100244v>. Acesso em: 13 de agos 2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci2003889> . Acesso em: 13 de agos 2024.

FAN, X. et al. Aerobic hydrogen-oxidizing bacteria in soil: from cells to ecosystems. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 877–904, 26 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09633-0>. Acesso em: 20 set 2024

FERREIRA, R. S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm100488w>. Acesso em: 12 out 2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>. Acesso em: 22 nov 2024

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. DE S.; MARTINAZZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 17 jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5785>. Acesso em: 22 nov 2024

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300004> . Acesso em: 13 fev 2024

GUO, X. et al. Strain energy in enzyme-substrate binding: An energetic insight into the flexibility versus rigidity of enzyme active site. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 995, p. 17–23, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2012.06.017>. Acesso em: 11 nov 2024

GUSMÃO, A. O. de M.; SILVA, A. R. da; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v. 17, n. 1, p. 135–154, 2017. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/4979>. Acesso em: 22 out 2024

HALDER, S. K.; ELMA, F. In silico identification of novel chemical compounds with antituberculosis activity for the inhibition of InhA and EthR proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 24, p. 100246, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100246>. Acesso em: 12 agos 2024

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>. Acesso em: 04 set 2024

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1776158>. Acesso em: 05 dez 2024.

KHADEMIAN, M.; IMLAY, J. A. How Microbes Evolved to Tolerate Oxygen. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.001>. Acesso em: 05 dez 2024.

KIM, T. et al. Molecular Design Leveraging Non-Covalent Interactions for Efficient Light-Emitting Organic Small Molecules. **Advanced Functional Materials**, v. 2412267, p. 1–57, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afm.2020.10.001>. Acesso em: 12 dez 2024

LAUTERBACH, L. et al. Catalytic properties of the isolated diaphorase fragment of the NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025939>. Acesso em: 05 jan 2025

LIMA, E. **Investimento em energia renovável: fontes biomassa , eólica e solar**. 40f, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção) – Universidade Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2016. Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/235/11503/1/51402325.pdf>. Acesso em: 12 dez 2024

LOMIZE, A. L. et al. The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes. **BMC Structural Biology**, v. 7, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-44>. Acesso em: 24 jan 2025.

LOPES, I. R. et al. Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes. **Revista da Biologia**, p. 32–46, 29 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1984-5154.v22p32-46> . Acesso em: 23 mar 2024.

MEMBRO, E.; MEMBROS, E. Biomassa e produção de energia. **Terra**, p. 23–30, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300004>. Acesso em: 23 jun 2024

MOHAMED IBRAHIM, H. F. et al. Understanding the binding interaction mechanism of i-motif with fluorophores: A biophysical approach. **Chemical Physics Impact**, v. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2023.100370>. Acesso em: 13 abr 2024.

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, 2009a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>. Acesso em: 28 jun 2024.

MOURA, D.; RODRIGUES, J. F.; SEIDL, P. R. Modelagem Molecular Simulação de Interações entre Modelos de Asfaltenos. **BEPA - Bol. Epidemiol. Paul. (Online)**, v. 8, p. 33–42, 2011a. Disponível em: <https://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/846/1/Daniel.pdf>. Acesso em: 22 dez 2024.

NÓBREGA, M.F.R. et al. Natural Resources Green Hydrogen: a review of hydrogen production processes from renewable energy sources. **Natural Resources**, v. 12, n. 2, p. 75–85, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/nr.2022.122005>. Acesso em: 24 jul 2024.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–14, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33> . Acesso em: 13 set 2024.

PETERS, J. W. et al. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 1 jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.016>. Acesso em: 22 ago. 2024.

PETROVA, S. S.; SOLOV'EV, A. D. The Origin of the Method of Steepest Descent. **Historia Mathematica**, v. 24, n. 4, p. 361–375, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/hmat.1996.2146>. Acesso em: 02 set 2024.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82,

2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3943>. Acesso em: 30 ago 2024.

PIMENTEL, A. L.; BUENO, P. S. A. B. **Ferramentas de bioinformática na caracterização de alvos de medicamentos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2016. (Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular do PBC, 6). Disponível em: <https://pbc.uem.br/arquivos/mc7-2016.pdf>. Acesso em: 30 ago 2024.

PITASSI, C.; GONÇALVES, A. A.; MORENO JÚNIOR, V. de A. Fatores que influenciam a adoção de ferramentas de TIC nos experimentos de bioinformática de organizações biofarmacêuticas: um estudo de caso no Instituto Nacional do Câncer. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 19, n. 1, p. 257–268, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232014191.2007> . Acesso em: 03 jan 2025.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, 2001. Disponível em: <https://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/modelag.pdf>. Acesso em: 04 mar 2024.

ROSSETTI, H. L. Utilização de métodos de modelagem molecular para caracterização do sistema (NBUCP) 2 zr(CH 3 ) 2 imobilizado em sílica e ativado com mao. p. 1–106, 2006. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13348/000638230.pdf>. Acesso em: 24 jun 2024.

SANTANA, E.F.; SOARES, A.C. Avaliação da utilidade dos softwares Bovia discovery studio e pymol para visualização e edição de estruturas moleculares in silico. FÓRUM ACADÊMICO DA FACULDADE VÉRTICE. **Resumos...** Matipó, MG, 2023.. Disponível em: <https://fave.univertix.edu.br/resumo/avaliacao-da-utilidade-dos-softwares-bovia-discovery-studio-e-pymol-para-visualizacao-e-edicao-de-estruturas-moleculares-in-silico/>. Acesso em: 05 mai 2024.

SCHRÖDINGER, LLC. **PyMOL Support**. Versão 3.0+. Disponível em: <https://www.pymol.org/support.html>. Acesso em: 05 mai 2024.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA, P. A. **Energias renováveis no Brasil: perspectivas e desafios**. In: Desafios e Oportunidades das Energias Renováveis. Editora Senac, 2019. p. 45–67. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/7bde/974086b502c13e84ba4515df5538b7a5d4e4.pdf>. Acesso em: 13 de nov 2024.

SILVA, J. P. Utilização de interfaces gráficas na dinâmica molecular: O exemplo do CHARMM-GUI. **Revista Brasileira de Bioinformática**, v. 5, n.2, p. 45–52, 2020. Disponível em: <https://bioinfo.com.br/revista/volume-5-numero-2/> Acesso em: 13 de nov 2024.

SILVA, M. V. D. **Modelagem molecular aplicada a reações de produção do biodiesel**. p. 79, 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15201>. Acesso em: 12 dez 2024.

SILVA, R. C. C. da; ALVES, M. C. S. Os avanços e desafios da bioinformática aplicada à saúde: uma revisão. **Diversitas Journal**, v. 9, n. 3, 9 ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.48017/dj.v9i3.2910>. Acesso em: 26 jul 2024.

SOUZA, V. C. A.; JUSTI, R. Estudo da utilização de modelagem como estratégia para fundamentar uma proposta de ensino relacionada à energia envolvida nas transformações químicas (Study the use of the modelling approach to base the teaching of the energy involved in chemical reaction. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, v. 10, n. 2, p. 1–26, 2010. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/rbpec/article/view/3978/2542>. Acesso em: 18 mai 2024.

SPARKS, I. L. et al. Mycobacterium smegmatis: The Vanguard of Mycobacterial Research. **Journal of Bacteriology**, v. 205, n. 1, 26 jan. 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00337-22>. Acesso em: 02 jun 2024.

STRIPP, S. T. et al. Identification of an isothiocyanate on the hypEF complex suggests a route for efficient cyanide-channeling during [NiFe]-Hydrogenase cofactor generation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 17 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133118>. Acesso em: 02 jun 2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci700253h>. Acesso em: 14 set 2024.

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. Disponível em: <https://jmlr.org/papers/volume17/14-488/14-488.pdf>. Acesso em: 18 mai 2024.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. Acesso em: 18 mai 2024.

WAHL, J. et al. Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13321-019-0371-6>. Acesso em: 18 mai 2024.



WINKLER, M.; ESSELBORN, J.; HAPPE, T. Molecular basis of [FeFe]-hydrogenase function An insight into the complex interplay between protein and catalytic cofactor. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.03.004>. Acesso em: 11 mar 2024.