



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JEFERSON YVES NUNES HOLANDA ALEXANDRE**

**UM ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO BIOQUÍMICA DE  
BIODIESEL DE BABAÇU (*Orbignya sp.*)**

**FORTALEZA**

**2022**

JEFERSON YVES NUNES HOLANDA ALEXANDRE

UM ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO BIOQUÍMICA DE  
BIODIESEL DE BABAÇU (*Orbignya sp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia química Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alexandra de Sousa Rios.

Coorientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A369e Alexandre, Jeferson Yves Nunes Holanda.  
Um estudo teórico e experimental da produção bioquímica de biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) / Jeferson Yves Nunes Holanda Alexandre. – 2022.  
83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Maria Alexsandra de Sousa Rios..

Coorientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos..

1. Biodiesel. 2. Hidroesterificação. 3. Método taguchi. 4. Docking molecular. 5. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 660

---

JEFERSON YVES NUNES HOLANDA ALEXANDRE

UM ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO BIOQUÍMICA DE  
BIODIESEL DE BABAÇU (*Orbignya sp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia química Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos

Aprovada em: 27 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Alexsandra De Sousa Rios (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Cleiton Sousa Dos Santos (Coorientador)  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof. Dra. Rita Karolinny Chaves de Lima  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus avós, Dona Iva e Seu Jorge, minha mãe, Socorro, e minha companheira, Lara Freitas, pelo apoio incondicional com a minha formação humana e profissional.

Ao Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos e Profa. Maria Alexandra de Sousa Rios pela orientação do trabalho. Pela confiança, paciência, dedicação e atenção.

Ao Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca e aos colegas Thállysson Taváres e Juliana Serpa pelo auxílio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos Prof. Me. Wallyson Gomes, Prof. Dr. Davi Coelho e a Profa. Ma. Thays Nogueira pelos conselhos e apoio no início dessa caminhada.

Aos colegas pertencentes ao Grupo de Engenharia Enzimática (GENEZ) e Grupo de Inovações Tecnológicas e Especialidades Químicas (GRINTEQUI), pela dedicação e compartilhamento de conhecimentos.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca, Profa. Dra. Rita Karolinny Chaves de Lima, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao programa de pós-graduação em engenharia química (PPGEQ) e Universidade Federal do Ceará (UFC) pela oferta de ensino público de qualidade. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo e financiamento a pesquisa em tempos tenebrosos.

E a todas as pessoas que contribuíram de maneira direta ou indireta, meu muito obrigado.

## RESUMO

Foi realizado um estudo teórico e experimental da produção biocatalítica do biodiesel de babaçu por meio da hidroesterificação enzimática. A hidroesterificação é uma rota sintética que se baseia na hidrólise seguida da esterificação. A hidrólise completa do óleo de babaçu foi conduzida utilizando uma solução com solução mássica de 1:1, a 40 °C por 4 horas empregando 0,4% da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em relação a massa de óleo. Em seguida, utilizando a lipase Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 na etapa de esterificação, foi realizado um planejamento estatístico variando os parâmetros: temperatura (25-55 °C), razão molar ácidos graxos livres (AGLs) e álcool (1:1 a 1:9), porcentagem de biocatalisador (0,1% a 0,9%) e tempo de reação (1-5 horas) através do método Taguchi. A porcentagem de biocatalisador foi o fator mais influente sob o processo com percentual de contribuição igual a 67,80%. Os níveis de reação ideal obtidos após o tratamento estatístico foram: L3 (5 horas) para o tempo, L2 (40 °C) para a temperatura, L2 (1:5 AGL/álcool) para a razão molar e L3 (0,9% de massa em relação a massa de AGL) para a porcentagem de biocatalisador, nessas condições, a conversão teórica foi de 98,64%. Após a realização da reação proposta, notou-se uma conversão de 95,15% ± 0,1. O resultado da reação otimizada foi menor que o valor teórico de conversão proposto, pois, biocatalisadores podem perder a sua atividade catalítica facilmente, visto que esses materiais são suscetíveis a diversas interferências. Os resultados de viscosidade cinemática e densidade indicam que o biodiesel produzido tem potencial para aplicações futuras. Por fim, realizou-se um estudo de *docking* e dinâmica molecular com o intuito de avaliar a estabilidade dos complexos formados entre os ácidos octanóico, decanóico, dodecanoico, tetradecanóico, hexadecanóico e cis-9-octadecenóico e a Eversa lipase. A proteína foi modelada por homologia, através do dígrama de Ramachandran foi possível identificar as regiões que mantiveram a estrutura conservada e os locais variáveis com alinhamento. Além disso, o modelo obtido apresentou pontuação média 3D-1D  $\geq 0,2$  de 93,71% na função *Verify 3D* comprovando a compatibilidade do modelo atômico com a sequência de aminoácidos. Foi observado nos resultados de *docking* molecular que os ligantes interagiram diretamente com o sítio catalítico (Ser153, Asp206 e His268) e a cavidade oxianion (Leu154 e Ser91), esses resultados sugerem que as combinações entre os ligantes com a enzima foram estáveis. Nas simulações de dinâmica molecular, constatou-se por meio do *Root Mean Square Deviation (RMSD)* que não houve grandes mudanças conformacionais dos complexos estudados durante os períodos de simulação, com *RMSD* abaixo de 2,0Å. Ademais, os resultados teóricos e experimentais expostos neste trabalho, indicam que os ácidos graxos advindos do óleo de babaçu formam complexos estáveis

com o sítio catalítico da Eversa, o que valida a sua aplicação na produção de ésteres metílicos de babaçu.

**Palavras-chave:** biodiesel; hidroesterificação; método taguchi; *docking* molecular; dinâmica molecular.

## ABSTRACT

A theoretical and experimental study of the biocatalytic production of babassu biodiesel through enzymatic hydroesterification was carried out. Hydroesterification is a synthetic route based on hydrolysis followed by esterification. Complete hydrolysis of babassu oil was conducted using a 1:1 solution by weight at 40 °C for 4 hours using 0.4% lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) in relation to oil weight. Then, using Eversa® Transform 2.0 lipase in the esterification step, a statistical planning was carried out varying the parameters: temperature (25-55 °C), molar ratio free fatty acids (FFAs) and alcohol (1:1 to 1: 9), percentage of biocatalyst (0.1% to 0.9%) and reaction time (1-5 hours) using the Taguchi method. The percentage of biocatalyst was the most influential factor in the process with a contribution percentage equal to 67.80%. The ideal reaction levels obtained after statistical treatment were: L3 (5 hours) for time, L2 (40 °C) for temperature, L2 (1:5 AGL/alcohol) for molar ratio and L3 (0.9 % of mass in relation to the mass of FFA) for the percentage of biocatalyst, under these conditions, the theoretical conversion was 98.64%. After carrying out the proposed reaction, a conversion of 95.15% ± 0.1 was noted. The result of the optimized reaction was lower than the proposed theoretical conversion value, since biocatalysts can easily lose their catalytic activity, since these materials are susceptible to various interferences. The kinematic viscosity and density results indicate that the biodiesel produced has potential for future applications. Finally, a study of docking and molecular dynamics was carried out to evaluate the stability of the complexes formed between octanoic, decanoic, dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic, and cis-9-octadecenoic acids and Eversa lipase. The protein was modeled by homology, through the Ramachandran diagram it was possible to identify the regions that maintained the conserved structure and the variable sites with alignment. In addition, the obtained model presented an average 3D-1D score  $\geq 0.2$  of 93.71% in the Verify 3D function, proving the compatibility of the atomic model with the amino acid sequence. It was observed in the molecular docking results that the ligands interacted directly with the catalytic site (Ser153, Asp206, and His268) and the oxyanion cavity (Leu154 and Ser91), these results suggest that the combinations between the ligands and the enzyme were stable. In the molecular dynamics simulations, it was verified through the Root Mean Square Deviation (RMSD) that there were no major conformational changes in the complexes studied during the simulation periods, with RMSD below 2.0 Å. Furthermore, the theoretical and experimental results presented in this work indicate that the fatty acids from babassu oil form stable complexes with the catalytic site of Eversa, which validates its application in the production of babassu methyl esters.



**Keywords:** biodiesel; hydroesterification; taguchi method; molecular docking; molecular dynamics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Descrição, ilustração e composição percentual dos componentes do babaçu. ....	20
Figura 2 –	Representação diagramática da síntese de biodiesel por hidroesterificação. ....	23
Figura 3 –	Representação esquemática do processo de hidrólise. ....	24
Figura 4 –	Representação esquemática da reação de esterificação. ....	24
Figura 5 –	Representação esquemática da reação de transesterificação. ....	26
Figura 6 –	Representação da estrutura 3D da Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> em conformação aberta (código PDB: 1DT3). ....	30
Figura 7 –	Representação esquemática da célula de simulação. O círculo (Raio de corte) é delimitado partindo de um átomo de interesse $i$ dentro da célula central, e sua interação com o átomo $j'$ , imagem do átomo $j$ dentro do raio. ....	34
Figura 8 –	Efeito dos fatores do processo em termos de relações S/N médias. ....	49
Figura 9 –	Gráfico Ramachandran da proteína obtida por homologia. ....	54
Figura 10 –	Os resultados da verificação estrutural da lipase Eversa® por Verify 3D	55
Figura 11 –	Representação diagramática das interações entre os ligantes e sítio ativo da enzima. ....	58
Figura 12 –	Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD), em relação à conformação inicial dos complexos versus o tempo de simulação (ns) na etapa de equilíbrio. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4. ....	60
Figura 13 –	Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD), em relação à conformação inicial do complexo versus o tempo de simulação (ns) na etapa de produção. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4. ....	61
Figura 14 –	Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as duas etapas de simulação. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4. ....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Quantidade de amêndoas de babaçu produzidas em tonelada por região.....	21
Tabela 2 –	Composição de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu segundo a literatura. ....	22
Tabela 3 –	Fatores independentes e seus respectivos níveis correspondentes para a otimização da produção de biodiesel.....	42
Tabela 4 –	Ligante utilizados no processo de docking molecular. ....	45
Tabela 5 –	Planejamento Taguchi para a reação de esterificação de AGL de babaçu. ....	48
Tabela 6 –	Resposta de relações S/N .....	49
Tabela 7 –	Análise de Variância dos parâmetros que afetam na esterificação do óleo de babaçu.....	51
Tabela 8 –	Condições ótimas de produção de ésteres metílicos de babaçu estatisticamente definidas.....	52
Tabela 9 –	Propriedades físico-químicas do biodiesel de babaçu.....	53
Tabela 10 –	Resultados obtidos no processo de docking molecular. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4.....	56
Tabela 11 –	Interações dos ligantes com a lipase após as docagens. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RSMD	<i>Root Mean Square Deviation</i> ou desvio quadrático médio
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca Registrada
- Å Angström
- Ψ Ângulo diedro impróprio Psi
- Φ Ângulo diedro impróprio Phi

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	18
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1	<b>Biodiesel</b> .....	19
3.2	<b>Matéria Prima</b> .....	19
3.2.1	<i>O babaçu</i> .....	20
3.3	<b>Processos de obtenção</b> .....	22
3.3.1	<i>Hidroesterificação</i> .....	23
3.3.2	<i>Pirólise</i> .....	25
3.3.3	<i>Esterificação</i> .....	25
3.3.4	<i>Transesterificação</i> .....	25
3.4	<b>Tipos de catalisadores</b> .....	26
3.4.1	<i>Catalisadores homogêneos</i> .....	26
3.4.2	<i>Catalisadores heterogêneos</i> .....	27
3.4.3	<i>Catalisadores enzimáticos</i> .....	27
3.5	<b>Enzimas</b> .....	28
3.5.1	<i>Lipases</i> .....	29
3.5.1.1	<i>Lipase de Thermomyces lanuginosus</i> .....	29
3.5.1.2	<i>Lipase Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0</i> .....	30
3.6	<b>Docking molecular</b> .....	31
3.7	<b>Dinâmica molecular</b> .....	33
3.7.1	<i>Condições periódicas de contorno</i> .....	33
3.7.2	<i>Campo de força</i> .....	35
3.7.3	<i>Simulação temporal do sistema</i> .....	36
3.7.4	<i>Integração numérica da equação de movimento</i> .....	37
3.7.5	<i>Controle da temperatura e pressão</i> .....	38
3.7.6	<i>Análise da trajetória gerada</i> .....	38
3.7.6.1	<i>Raiz do desvio quadrático médio (RMSD)</i> .....	38
3.7.6.2	<i>Ligação de hidrogênio</i> .....	39

3.8	<b>Método Taguchi</b> .....	39
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1	<b>Materiais</b> .....	40
4.2	<b>Métodos</b> .....	40
4.2.1	<i>Hidroesterificação</i> .....	40
4.2.2	<i>Análise de Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC/MS)</i> ....	41
4.2.3	<i>Planejamento experimental e análise estatística (Método Taguchi)</i> .....	42
4.2.4	<i>Caracterização físico-química do óleo produzido</i> .....	43
4.2.4.1	<i>Viscosidade cinemática</i> .....	43
4.2.4.2	<i>Densidade</i> .....	43
4.2.5	<i>Estudo teórico</i> .....	43
4.2.5.1	<i>Modelagem da proteína por homologia</i> .....	43
4.2.5.1.1	Reconhecimento e seleção da proteína modelo .....	43
4.2.5.1.2	Alinhamento de sequências de alvo e molde .....	44
4.2.5.1.3	Construção e otimização de modelos .....	44
4.2.5.1.4	Validação da proteína .....	44
4.2.5.2	<i>Docking molecular</i> .....	44
4.2.5.2.1	Preparação da proteína .....	44
4.2.5.2.2	Obtenção do ligante .....	46
4.2.5.2.3	Docking molecular e visualização de cálculos .....	46
4.2.5.3	<i>Simulações de dinâmica molecular</i> .....	46
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1	<b>Hidrólise enzimática</b> .....	47
5.2	<b>Planejamento Taguchi- Otimização da produção de ésteres metílicos de ácidos graxos de babaçu</b> .....	47
5.2.1	<i>Análise da razão S/R</i> .....	48
5.2.2	<i>Análise de variância (ANOVA)</i> .....	50
5.3	<b>Caracterização físico-química do óleo produzido</b> .....	52
5.4	<b>Estudo teórico</b> .....	53
5.4.1	<i>Modelagem da proteína por Homologia</i> .....	53
5.4.2	<i>Docking molecular</i> .....	55
5.4.3	<i>Simulações de dinâmica molecular</i> .....	59
5.4.3.1	<i>Root Mean Square Deviation - RMSD</i> .....	59

5.4.3.2	<i>Ligações de hidrogênio</i> .....	64
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68



## 1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis são compostos que durante a queima liberam uma determinada quantidade de energia térmica. Podem ser obtidos de origem renovável e não renovável, podendo ser classificados de acordo com a fase na qual são normalmente manuseados, quais sejam: líquidos, sólidos ou gasosos (CAVALCANTE et al., 2021). Os combustíveis de fontes não renováveis, que também são conhecidas como combustíveis fósseis, são substâncias formadas através da decomposição de resíduos orgânicos ao longo dos anos. As principais vantagens associadas ao uso desse material referem-se ao seu baixo custo de obtenção, manutenção e transporte (MOSAROF et al., 2015). No entanto, a queima dessas substâncias gera diversos gases como o monóxido e dióxido de carbono (CO e CO<sub>2</sub>, respectivamente) que são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Ademais, como os combustíveis fósseis são formados em um processo extremamente lento e consumidos em uma velocidade exacerbada, há grandes chances de haver problemas de abastecimento desses combustíveis com o passar dos anos (AGHBASHLO et al., 2021; GOH et al., 2019; MANAF et al., 2019).

Sabe-se que o petróleo é o combustível fóssil mais utilizado no mundo, uma vez que ao ser refinado gera diversos subprodutos como, diesel, gasolina, lubrificantes, dentre outros (FATIH DEMIRBAS, 2009; ZHANG et al., 2017). Por conta disso, a Agência Internacional de Energia dos Estados Unidos (IEA), estima que haverá um déficit de oferta de petróleo no mundo a partir de 2025 (ABUDU; SAI, 2020). Desse modo, os combustíveis renováveis surgem como uma alternativa para suprir essa demanda energética (GOH et al., 2019; MANAF et al., 2019).

Os combustíveis renováveis, que também são conhecidos como biocombustíveis, são advindos de produtos agrícolas como açúcares, óleos de origem animal e vegetal, biomassa florestal, dentre outras fontes energéticas (PENG et al., 2020). Dentre os combustíveis renováveis destaca-se o biodiesel, uma vez que é utilizado em mistura ao diesel fóssil, em motores de combustão interna do ciclo Diesel (LI et al., 2014; PENG et al., 2020).

Benefícios como lubricidade, fácil transporte e armazenamento, tornam o biodiesel um combustível interessante. Além disso, quando comparado ao diesel, o biodiesel apresenta menor grau de toxicidade e danos ao ambiente. Por conta desses fatores, o governo brasileiro introduziu o biodiesel em sua matriz energética no ano de 2005 através da Lei Nº 11.097. No ano de 2008, o Brasil passou a tornar obrigatória a adição de um percentual de 2% de biodiesel no diesel comercializado. Ademais, foi instituído um cronograma que estabelece o aumento percentual e progressivo, que deve chegar a 15% em 2023 (ANP, 2021).

O biodiesel pode ser obtido através do óleo vegetal, gordura animal, óleos residuais, dentre outros (GOH et al., 2019). As fontes oleaginosas são formadas pela condensação de ácidos graxos e glicerol, formando glicerídeos. Vale ressaltar que as características fisiológicas da fonte oleaginosas influenciam diretamente nas propriedades do óleo e, conseqüentemente nas características físico-químicas do biodiesel produzido (MUÑIZ et al., 2016; TEMÓTEO et al., 2018; ZIĘBA et al., 2010).

Por conta dos fatores supracitados, esse trabalho estudou a aplicação do óleo de babaçu (*Attalea speciosa*) na produção de biodiesel. O fruto do babaçu foi escolhido por estar presente em cerca de 196 mil km<sup>2</sup> do território brasileiro, sendo que a maior parte das palmeiras estão localizadas nas regiões norte e nordeste (EMMERICH et al., 1987; STAUFENBERG et al., 2018).

Conforme a resolução N° 45, de 25 de agosto de 2014, da Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é um combustível composto por alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ANP, 2014). Essas substâncias podem ser produzidas por meio da modificação química de matérias graxas (gorduras de origem animal ou vegetal) empregando rotas convencionais como a transesterificação e/ou esterificação. No entanto, a produção biocatalítica por hidrólise seguida de esterificação, denominada hidroesterificação, vem sendo amplamente estudada, uma vez que esse processo pode ser realizado com qualquer fonte graxa, independentemente do seu grau de pureza, acidez e umidade (CARVALHO et al., 2021; WANCURA et al., 2019, 2021)

Os processos supracitados, com exceção do craqueamento térmico, podem ser realizados na presença de catalisadores homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos. Os catalisadores enzimáticos demonstram ser uma alternativa viável dentre os diversos tipos de catalisadores existentes, pois esses materiais geram menos resíduos além de serem menos agressivos ao meio ambiente quando comparados aos catalisadores químicos (CACICEDO et al., 2019; SHELDON; WOODLEY, 2017)

Todavia, há problemas associados a aplicação dos biocatalisadores em escala industrial, uma vez que esses possuem um preço elevado, além de apresentarem baixa estabilidade operacional. Dessa forma, diversas estratégias são empregadas com o objetivo de ampliar a aplicação dos biocatalisadores na indústria, técnicas de imobilização enzimática, utilização de solventes verdes e manipulação genética na produção de enzimas, são algumas das técnicas que podem ser utilizadas (ELGHARBAWY et al., 2018; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; MONTEIRO et al., 2021).

As manipulações genéticas são empregadas na produção de enzimas solúveis, essa

modificação pode ampliar a atividade da enzima, além disso, enzimas geneticamente modificadas podem ser comercializadas com um valor de 30 a 50 vezes menor que as suas alternativas imobilizadas. A Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 destaca-se entre as enzimas manipuladas geneticamente. Esse material biológico é produzido através da modificação genética da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expressa em uma cepa de *Aspergillus oryzae*. Esse biocatalisador foi projetado para ser um material viável economicamente, podendo ser aplicado em reações de produção de ácidos graxos livres, glicerídeos e biolubrificantes (CARVALHO et al., 2021; CHANG; CHAN; SONG, 2021; MOLINA-GUTIÉRREZ et al., 2021).

Com isso, compreender os processos enzimáticos em nível atômico e molecular pode facilitar a aplicação desses materiais em larga escala. O desenvolvimento de computadores e softwares com alta capacidade de processamento, fez com que a química computacional e a bioinformática se expandissem e se consolidassem como áreas de fundamental importância para a compreensão de processos em nível atômico (AMARO; MULHOLLAND, 2018; GAUTHIER et al., 2019; QIN; ZHONG; WANG, 2021). Desse modo, o presente trabalho procurou avaliar o potencial da lipase Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 na síntese de ésteres metílicos do óleo de babaçu (FAME). Para produção dos FAME foi empregada a hidroesterificação enzimática visto que essa estratégia ocasiona um menor impacto ao meio ambiente, quando comparado a rotas convencionais. Além disso, foram realizados estudos teóricos da etapa de esterificação. O docking molecular, foi utilizado com o intuito de obter as melhores poses de conformação entre os ácidos graxos e o sítio catalítico da enzima, bem como compreender a natureza dessas interações. Já nos estudos de dinâmica molecular, foram avaliados a estabilidade do complexo enzima-substrato em condições reacionais de produção.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo teórico e experimental da produção biocatalítica do biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*), empregando a *Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0* como biocatalisador.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar o biodiesel metílico de babaçu empregando a *Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0* como biocatalisador;
- b) Estudar a influência da temperatura, razão molar, tempo de reação e porcentagem de biocatalisador no processo;
- c) Realizar a caracterização físico-química dos ésteres metílicos de babaçu;
- d) Modelar e validar a estrutura da *Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0* por homologia;
- e) Efetuar estudo *in silico* e avaliar teoricamente o acoplamento molecular e calcular as energias de interação enzima-substrato;
- f) Avaliar a estabilidade dos complexos lipase-ligante utilizando dinâmica molecular.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biodiesel

Os biocombustíveis são substâncias renováveis advindos da biomassa que possuem a capacidade de substituir de maneira parcial ou total os combustíveis fósseis em motores de combustão interna (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011; SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016). Quando comparado ao diesel, o biodiesel apresenta vantagens como a redução dos impactos ao meio ambiente, ótima da lubricidade, facilidade de transporte e armazenamento pois apresenta um menor risco de explosão (LI et al., 2014).

Considerando os benefícios citados acima, a mistura do biodiesel ao diesel de origem não renovável vem aumentando consideravelmente com o passar do tempo. Essa política de inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, teve início no ano de 2003 de maneira voluntária com um percentual de 2% até o ano de 2007. No ano de 2008, a adição de 2% de biodiesel ao diesel (B2) tornou-se obrigatória. Com o passar dos anos esse percentual foi progredindo, sendo que a meta estabelecida pelo governo é elevar esse percentual para 15% até 2023 (ANP, 2021).

#### 3.2 Matéria Prima

O biodiesel pode ser obtido de matérias-primas distintas como oleaginosas (soja, girassol, babaçu, mamona, etc.), gorduras de origem animal, óleos residuais, algas e cianobactérias (FATIH DEMIRBAS, 2009; FERREIRA MOTA et al., 2022; PENG et al., 2020; SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016). Grande parte dos óleos e gorduras são formados por ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol formando mono, di ou triacilglicerídeos, podendo conter também ácidos graxos em sua forma livre.

A origem do óleo ou da gordura influencia diretamente na estrutura das cadeias graxas e, por conseguinte, nas propriedades físico-químicas do biodiesel (MANAF et al., 2019). As cadeias graxas se diferem em tamanho, número de saturação e nas suas proporções. Vale ressaltar, que alguns ácidos graxos podem conter em sua estrutura grupos funcionais, tais como álcoois, epóxidos, cetonas, etc. (GOH et al., 2019).

O uso de óleo, gorduras e seus derivados no processo de combustão interna teve início no ano de 1900 na Exposição de Paris. Na época, Rudolph Diesel (criador do motor de combustão interna que leva o seu nome) realizou testes com uma mistura contendo petróleo bruto com óleo de amendoim (SHAY, 1993). Contudo, a necessidade eminente de aumentar a eficiência do motor aliado a redução de custos ocasionou mudanças nos motores e combustíveis,

essas modificações inviabilizaram o uso direto de óleos vegetais *in natura*. Desse modo, para a utilização de óleos e gorduras como combustíveis, é necessário realizar uma modificação química com o intuito de aproximar as suas propriedades ao do óleo diesel (MA; HANNA, 1999).

Sabe-se que uma única fonte oleaginosa pode conter 10 tipos diferentes de ácidos graxos conectados ao glicerol, sendo que a composição química desses óleos está diretamente relacionada com funções fisiológicas da planta (SHAY, 1993). Com isso, a diversidade natural das matérias graxas amplia a necessidade de pesquisar e desenvolver processos com ênfase na produção de óleos com diferentes propriedades (AGHBASHLO et al., 2021; ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011; PENG et al., 2020; SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016).

### 3.2.1 O babaçu

O babaçu é um fruto obtido da palmeira da espécie *Attalea speciosa*, nativas da região norte e áreas de cerrado brasileiro (JACKSON; LONGENECKER, 1944). Essas palmeiras recobrem cerca de 196 mil km<sup>2</sup> do território brasileiro e são encontradas de maneira maciça nos estados do Maranhão e Piauí, na Mata dos Cocais (região de transição entre a Caatinga, Cerrado e Amazonia) (DOS SANTOS et al., 2017). Além disso, podem ser encontradas também nos estados do Ceará, Pará, Mato Grosso e Tocantins (TEIXEIRA, 2008)

O babaçu contém de 8 a 15 centímetros de comprimento e pode ser dividido em três partes: externa (epicarpo), intermediária (mesocarpo) e interna (endocarpo) (TEIXEIRA, 2008). Na parte interna desse fruto estão contidas várias sementes (ou amêndoas) que são utilizadas na extração de óleo de coco de babaçu (DA SILVA et al., 2019). A descrição e ilustração dos componentes do fruto está exposta na figura 1.

Figura 1- Descrição, ilustração e composição percentual dos componentes do babaçu



Fonte: Adaptado de Da Silva et a., 2019.

O epicarpo contém fibras resistentes que podem ser empregadas na produção de escovas e tapetes (REUL et al., 2019). Do mesocarpo pode ser extraído uma farinha de alto valor nutricional com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (MANIGLIA; TAPIA-BLÁCIDO, 2016; SARAIVA RODRIGUES et al., 2020). O endocarpo é rico em lignina e pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de isolantes, fabricação de álcool metílico, ácido acético, alcatrão e carvão. Já as amêndoas são empregadas na produção cosméticos, lubrificantes e biodiesel. Além disso, o material fibroso remanescente das sementes pode ser utilizado na alimentação animal (EMMERICH et al., 1987; STAUFENBERG et al., 2018).

Estima-se que uma palmeira de babaçu tenha a capacidade de produzir anualmente aproximadamente 2 mil frutos (JACKSON; LONGENECKER, 1944; REUL et al., 2019; TEIXEIRA, 2008). Cada fruto contém de 3 a 5 amêndoas, sendo composto por, aproximadamente, 68% de óleo (TEIXEIRA, 2008). Destaca-se que em condições favoráveis ao crescimento das palmeiras, esse valor pode chegar a 72% (JACKSON; LONGENECKER, 1944). Outro aspecto positivo, refere-se ao processo de secagem das amêndoas que pode ser realizado ao ar livre. Após o processo, as amêndoas podem absorver até 4% de umidade sendo que esse aumento de umidade não interfere na qualidade do óleo (EMMERICH et al., 1987).

Somente em 2020, cerca de 47.640 toneladas de amêndoas de babaçu foram coletadas. Conforme está exposto na tabela 1, a região nordeste é responsável diretamente por cerca de 99% da extração do país. Vale destacar que o estado do Maranhão concentra cerca de 98,73 % da extração total (IBGE, 2020).

Tabela 1 - Quantidade de amêndoas de babaçu produzidas em tonelada por região

<b>Região</b>	<b>Quantidade produzida (t)</b>	<b>Porcentagem relativa (%)</b>
<b>Nordeste</b>	47.164	99.00
<b>Norte</b>	402	0.84
<b>Sudeste</b>	71	0.15
<b>Centro-Oeste</b>	3	0,01
<b>Sul</b>	-	-
<b>Total</b>	47.640	100

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020)

O óleo de babaçu, assim como todo óleo vegetal, é formado majoritariamente por triacilglicerídeos contendo em sua composição ácidos graxos livres (JACKSON; LONGENECKER, 1944). A tabela 2 expõe os principais ácidos graxos presentes no óleo

babaçu, bem como a sua composição percentual.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu segundo a literatura

Ácidos graxos	Composição percentual (%)	Composição percentual (%)	Composição percentual (%)
	(JACKSON; LONGENECKER, 1944)	(FIGUEREDO et al., 2020)	(MOREIRA et al., 2020b)
Ácido Capróico	0,15	0,33	0,80
Ácido Caprílico	4,8	5,35	9,64
Ácido Cáprico	6,61	5,49	6,85
Ácido Láurico	44,1	50,99	41,55
Ácido Mirísítico	15,4	17,43	14,01
Ácido Palmítico	8,5	8,23	6,96
Ácido Esteárico	2,65	1,61	2,66
Ácido Oléico	16,1	7,81	11,04
Ácido Linoléico	1,4	2,76	1,76
Outros	0,29	-	4,73

Fonte: Adaptado de Jackson e Longenecker, 1944; Figueredo et al., 2020 e Moreira et al., 2020.

### 3.3 Processos de obtenção

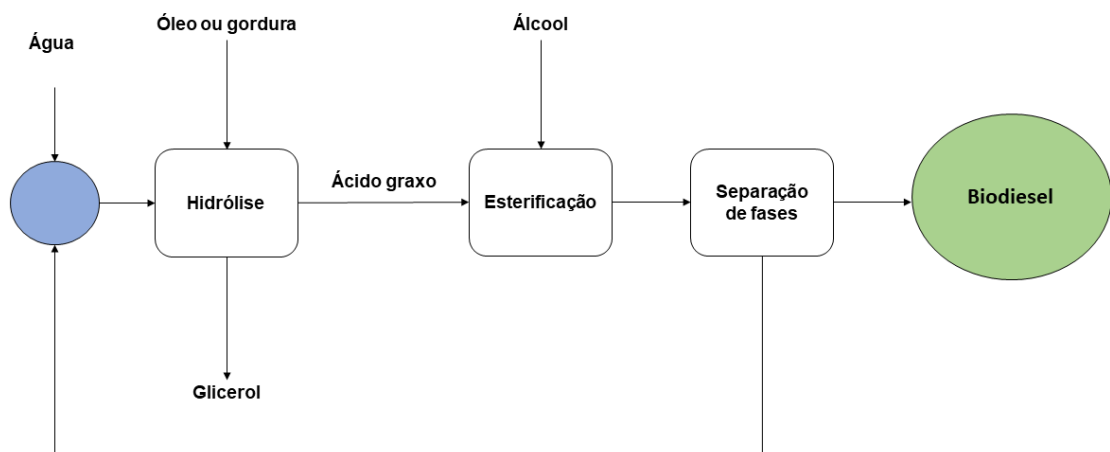
O biodiesel pode ser produzido através de processos já conhecidos como: pirólise ou craqueamento, esterificação, transesterificação e hidroesterificação. Nos últimos anos o processo de hidroesterificação vem sendo amplamente estudado, pois permite a aplicação de qualquer matéria-prima (óleos vegetais, gorduras animais e óleo residuais) independente do seu nível de umidade e acidez (HOANG et al., 2021; MOFIJUR et al., 2021; MOSTAFA MARZOUK et al., 2021; SINGH et al., 2020).



### 3.3.1 Hidroesterificação

A hidroesterificação é uma rota sintética onde ocorre a hidrólise seguida de uma esterificação (Figura 2).

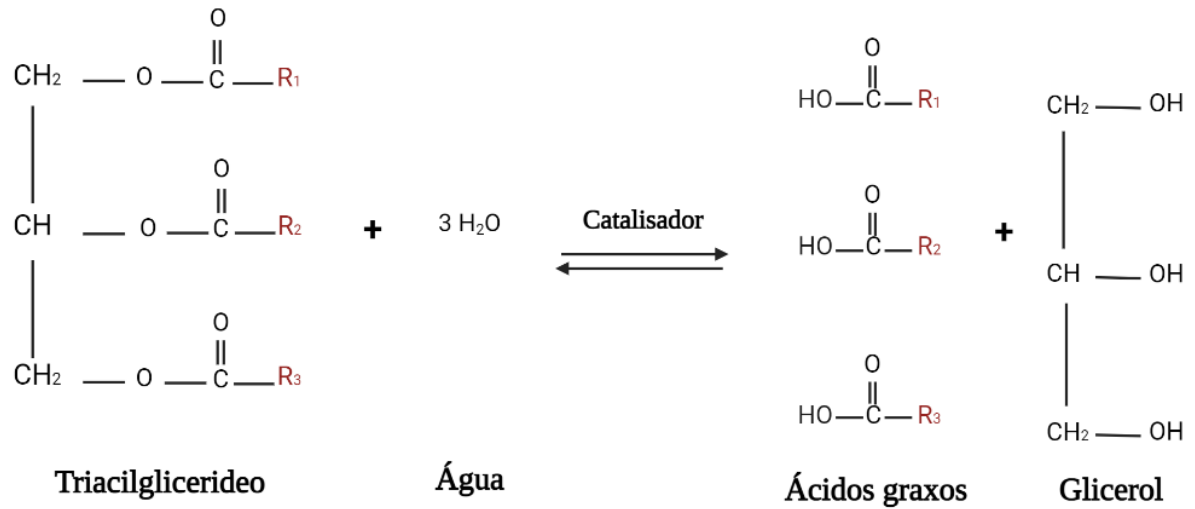
Figura 2 - Representação diagramática da síntese de biodiesel por hidroesterificação



Fonte: elaborado pelo autor.

A hidrólise é baseada na reação química entre um óleo ou gordura com água, no final do processo ocorre a formação de glicerina e ácidos graxos (Figura 3). Essa etapa é empregada para aumentar propositalmente a acidez do óleo, ou seja, mesmo que a gordura utilizada seja de baixa qualidade, baixa acidez ou tenha umidade elevada, o produto final da hidrólise terá uma alta acidez (WANCURA et al., 2019, 2021). Outra vantagem dessa metodologia, é que a glicerina formada contém uma maior pureza que a glicerina obtida através da transesterificação (COSTA et al., 2020; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

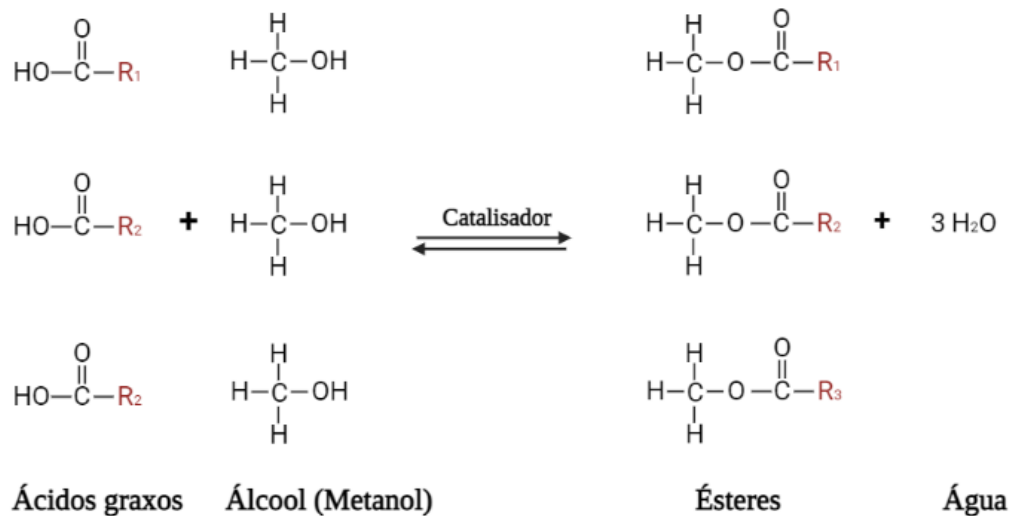
Figura 3 - Representação esquemática do processo de hidrólise



Fonte: elaborado pelo autor.

Logo após a etapa de hidrólise e remoção da glicerina, ocorre a esterificação dos ácidos graxos formados (Figura 4). Esse processo gera um biodiesel de alta pureza, ou seja, não há a necessidade de etapas de lavagem. Vale ressaltar que a água que é formada ao final do processo pode ser reutilizada na etapa de hidrólise (POURZOLFAGHAR et al., 2016; WANCURA et al., 2021).

Figura 4 - Representação esquemática da reação de esterificação



Fonte: elaborado pelo autor.

### **3.3.2 Pirólise**

A pirolise que também conhecida é como craqueamento térmico, consiste na quebra das moléculas de óleo (ou gordura) a altas temperatura. Durante esse processo, ocorre a ruptura das ligações químicas gerando moléculas menores. A principal vantagem dessa técnica é que o produto formado apresenta propriedades similares ao do diesel, entretanto, esse processo contém um alto custo associado. Ademais, ao final do processo são geradas também moléculas oxigenadas com alta acidez demandando a aplicação de um processo de purificação (HOANG et al., 2021; PATEL; AGRAWAL; RAWAL, 2019; POURKARIMI et al., 2019).

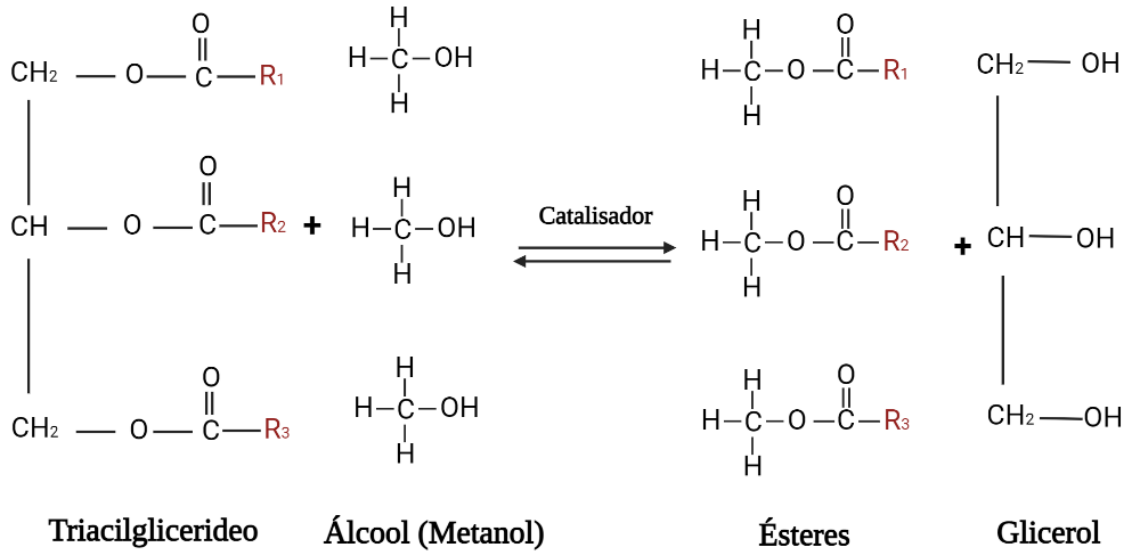
### **3.3.3 Esterificação**

A reação de esterificação refere-se à formação de ésteres a partir da reação de um ácido graxo com um álcool, como subproduto têm-se a formação de água (Figura 4). Esse método apresenta vantagens em relação ao método de transesterificação, uma vez que diferem no percussor utilizado (ácido graxo ao invés de triaglicerídeos) tornando-o mais vantajoso por conta da possibilidade de utiliza matérias primas de baixo valor agregado (como óleos residuais e borras ácidas), outro aspecto positivo é a não formação de glicerol. A maior desvantagem desse método é que o rendimento está associado ao nível de acidez da matéria-prima, além disso, há pouca disponibilidade de resíduos ácidos o que inviabiliza a sua aplicação em larga escala (CAO et al., 2021; MANDARI; DEVARAI, 2021; MUANRUKSA; KAEWKANNETRA, 2020).

### **3.3.4 Transesterificação**

A transesterificação é a rota mais utilizada industrialmente para produção de biodiesel. A reação consiste na transformação de um éster em um novo éster através da troca do grupo alquil (Figura 5). Deste modo, a formação do biodiesel ocorre através da reação entre 1 mol triacilglicerídeo com 3 mols de álcool (metanol ou etanol), ao final do processo verifica-se a formação de uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (metílicos ou etílicos) e glicerol como subproduto (DING et al., 2018; MANDARI; DEVARAI, 2021; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019).

Figura 5 - Representação esquemática da reação de transesterificação



Fonte: elaborado pelo autor.

As principais vantagens relacionadas a esse processo referem-se à simplicidade do processo e produção de biocombustíveis com características similares ao diesel (ANAND KUMAR et al., 2019). Contudo, a necessidade de utilização de reagentes com alto grau de pureza e a necessidade de um pré-tratamento podem ser grandes empecilhos na utilização dessa estratégia (MANDARI; DEVARAI, 2021).

### 3.4 Tipos de catalisadores

Com exceção do craqueamento térmico, as reações citadas anteriormente são conduzidas na presença de catalisadores. Deste modo, é de suma importância conhecer os tipos de catálises e seus respectivos catalisadores.

#### 3.4.1 Catalisadores homogêneos

A catalise homogênea, é caracterizada pela utilização dos catalisadores e reagentes na mesma fase, ou seja, um sistema monofásico (KUMAR; DAW; MILSTEIN, 2022). Esse processo pode ser empregue em reação na fase gasosa e, principalmente, em fases líquidas (DOS PASSOS GOMES; POLLICE; ASPURU-GUZI, 2021).

A produção de biodiesel pode ser conduzida empregando catalisadores ácidos ou básicos. Os catalisadores alcalinos (hidróxidos alcalinos ou alcóxidos metálicos) são utilizados

comercialmente no processo de transesterificação para a produção de biodiesel (SUNDARAMAHALINGAM et al., 2021). Vale destacar, que esses catalisadores demonstram ser altamente eficazes, alcançando altíssimos rendimentos. Contudo, esse tipo de catálise contém algumas desvantagens, como a necessidade de neutralização, problemas de envenenamento e a necessidade da adição de etapas de separação e purificação (KASIRAJAN, 2021; MOHADESI et al., 2019; VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2004).

### ***3.4.2 Catalisadores heterogêneos***

A catalise heterogênea, é caracterizada pela utilização de catalisadores e reagentes em fases distintas (LEE et al., 2014). Vale destacar, que a velocidade de reação está diretamente relacionada com a área superficial disponível para o contato do catalisador com os reagentes, ou seja, a reação ocorre na superfície através de fenômenos de adsorção, podendo ocorrer quebra e/ou, formação de ligações (AWOGBEMI; KALLON; AIGBODION, 2021; TANG et al., 2018).

As principais vantagens relacionadas ao uso desses catalisadores, referem-se a sua facilidade de remoção do meio reacional e regeneração, além de sua reutilização (MUKHTAR et al., 2022). A principal desvantagem do uso dos catalisadores heterogêneos refere-se a sua baixa seletividade, quando comparados aos catalisadores enzimáticos (ALEMAN-RAMIREZ et al., 2021; MAHMOOD KHAN et al., 2020).

### ***3.4.3 Catalisadores enzimáticos***

A biocatálise é caracterizada pela aplicação de catalisadores enzimáticos (lipases) no processo (CHANG; CHAN; SONG, 2021). Os biocatalisadores demonstram ser uma alternativa viável dentre os diversos tipos de catalisadores existentes, pois geram menos resíduos e são menos agressivos ao meio ambiente quando comparados aos catalisadores químicos (KHOOBBAKHT et al., 2020). Além disso, o uso de catalisadores enzimáticos gera produtos com alto grau de pureza, outro aspecto positivo é que durante o processo não ocorre saponificação, ademais, o procedimento é realizado sob condições brandas o que reduz os custos de produção (MOREIRA et al., 2020b; SANTOS; PUNA; GOMES, 2020)

Todavia, o custo das enzimas associada à sua estabilidade acabam atrapalhando o seu uso em escala industrial (WU et al., 2021). Além disso, a reutilização dessas enzimas pode ser um procedimento complicado. Desse modo, uma alternativa viável para contornar esses problemas, é o processo de imobilização de enzimas em suportes sólidos (BONAZZA et al.,

2018; DA S. MOREIRA et al., 2022).

### 3.5 Enzimas

As enzimas são macromoléculas orgânicas de origem geralmente proteicas (exceto as Riboenzimas) desenvolvidas por organismos vivos, essas moléculas agem como catalisadores biológicos em reações bioquímicas específicas, sendo essenciais para regulação e desenvolvimento da vida (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017). O uso das enzimas como catalisadores em processos bioquímicos é denominado como biocatálise (ASHKAN et al., 2021; SARAVANAN et al., 2021). Essa biomolécula tem a capacidade de aumentar a velocidade de reação por meio da redução da energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação, além de serem conservadas ao final do processo (GHOSH; SOMASUNDAR; SEN, 2021; PLANAS-IGLESIAS et al., 2021).

Os biocatalisadores podem operar em condições brandas de temperatura e pressão sem que haja perda de atividade, além disso, possuem alta seletividade e especificidade, são biocompatíveis e biodegradáveis (BELL et al., 2021; WU et al., 2021; YI et al., 2021). Devida as propriedades citadas, os catalisadores biológicos podem apresentar algumas vantagens em relação aos catalisadores químicos, visto que seu uso pode impactar diretamente na redução dos custos de processo, em virtude da diminuição do consumo de energia relacionado a reação e da geração de coprodutos e resíduos (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Desse modo, as enzimas estão cada vez mais requeridas em processos industriais devida à necessidade de realizar processos mais sustentáveis (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; WU et al., 2021). Todavia, ainda que os biocatalisadores possam apresentar maiores benefícios ao meio ambiente que os catalisadores químicos, é preciso que suas aplicações sejam mais rentáveis para que possa competir com os catalisadores químicos em uma perspectiva econômica (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017; SARAVANAN et al., 2021).

No geral, as enzimas utilizadas em processos industriais pertencem a classe das hidrolases, dentre essas, as lipases são as enzimas que contém maior destaque por conta da série de reações que estão aptas a catalisar, podendo ser empregadas nas áreas de modificação de alimentos, farmacêutica, química fina, produção de biocombustíveis, dentre outras (BASSO; SERBAN, 2019). Esses catalisadores biológicos contêm uma elevada enantiosseletividade e estabilidade na presença de solventes orgânicos, além disso, apresentam uma grande especificidade ao substrato (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; WU et al., 2021; YI et al., 2021).

### 3.5.1 Lipases

As lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol hidrolases) (PADJADJARAN, 2020; SALGADO; DOS SANTOS; VANETTI, 2022). Essas macromoléculas biológicas têm a função natural de catalisar a reação de hidrólise de triacilglicerídeos em ácidos graxos e glicerídeos em superfícies água-óleo (BONAZZA et al., 2018; SALGADO; DOS SANTOS; VANETTI, 2022). Em meios reacionais com água em excesso, as lipases agem na superfície orgânico-aquosa catalisando o processo de hidrólise de ligações éster carboxilato, desta reação são liberados ácidos graxos e glicerol (PELLIS et al., 2018). No entanto, ao entrarem em contato com meios orgânicos pode ocorrer reações adversas, por conta de mudanças no comportamento enzimático as lipases podem estar aptas a catalisar as reações de alcóolise, acidólise, interesterificação, esterificação, aminólise e diversas outras reações para originar novos tipos de lipídios (CACICEDO et al., 2019; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; MONTEIRO et al., 2021a)

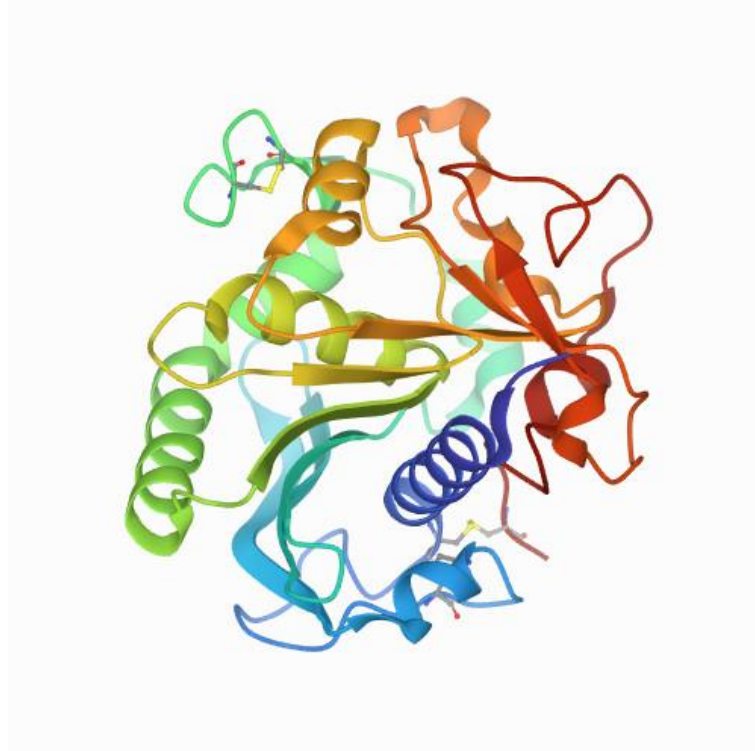
Além dos atributos supracitados, as lipases são enzimas que possuem a habilidade de hidrolisar substratos insolúveis (SARMAH et al., 2018). Durante esse processo as lipases são adsorvidas a superfície do substrato por meio do mecanismo de ativação interfacial (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; SARMAH et al., 2018). Em sistemas aquosos, o centro ativo dessas enzimas é mantido isoladas do meio reacional através de uma cadeia polipeptídica denominada tampa (MONTEIRO et al., 2021a). As lipases podem assumir duas estruturas: fechada ou aberta. A estrutura fechada, ocorre quando a tampa segrega o centro ativo deixando-o inalcançável aos substratos e solventes, durante esse fenômeno a parte interna da tampa que tem natureza hidrofóbica interage com a área hidrofóbica do sítio ativo (SHELDON; WOODLEY, 2017). Já na forma aberta, ocorre a interação entre a enzima e uma superfície hidrofóbica proporcionando a abertura da tampa, essa desobstrução viabiliza a entrada ao centro ativo (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; WU et al., 2021; YI et al., 2021). O sítio ativo das lipases é composto por três resíduos de aminoácidos, um resíduo nucleofílico que pode ser composto por cisteína, serina, ou aspartato, um resíduo ácido catalítico que pode ser constituído por glutamato ou aspartato, e um resíduo de histidina, já a tampa pode ser formada por uma ou duas hélices, ou uma região em loop (DOS SANTOS et al., 2015).

#### 3.5.1.1 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma proteína de cadeia simples formada por 269 aminoácidos pertencente a classe das hidrolases com (E.C 3.1.1.3)(FERNANDEZ-

LAFUENTE, 2010). O peso molecular dessa macromolécula é 31,700 g/mol e seu ponto isoelétrico é 4,4 (JHA et al., 1999). Essa lipase contém uma forma aproximadamente esférica, com uma dimensão em  $35 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ , seu núcleo central é composto de oito fita, com pré estrutura de folha beta predominantemente com cinco alfa-hélices. A tampa dessa enzima é um loop de interface móvel alfa-helicoidal formada dos aminoácidos 86-93 que recobre o sítio ativo dessa enzima(FERNANDES et al., 2004). O seu sito é formado pela tríade Ser-His-Asp (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A figura 6 expõe a estrutura aberta dessa enzima.

Figura 6 - Representação da estrutura 3D da Lipase de *Thermomyces lanuginosus* em conformação aberta (código PDB: 1DT3)



Fonte: Adaptada de Protein Data Bank (2022).

### 3.5.1.2 Lipase Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0

Com o objetivo de baratear a utilização de enzimas na produção de biodiesel, a empresa Novozymes elaborou uma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, na qual nomeou de Callera<sup>™</sup> Trans, posteriormente, passou a ser chamada de Eversa<sup>®</sup> Transform, essa enzima foi desenvolvida especificamente para a síntese de biodiesel (MONTEIRO et al., 2021). No ano de 2014, foi divulgada a sua primeira versão, conhecida por Eversa<sup>®</sup> Transform, em 2016, foi lançada a segunda versão denominada Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 (MIRANDA et al., 2020). Essas enzimas, são comercializadas em fase aquosa, apresentando uma elevada atividade na esterificação de ácidos graxos e transesterificação de glicerídeos (REMONATTO et al., 2022).



A Eversa lipase, foi produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae*, sendo ela uma enzima monomérica composta por 269 resíduos de aminoácidos. A sua tríade catalítica é composta por Asp206, His268 e Ser153. Já a cavidade oxianion contém resíduos de Leu154 e Ser91 (LAN et al., 2021). A sua fabricante afirma que a enzima é estabilizada em água, além disso apresenta um alta estabilidade e vida útil (no mínimo dois meses a temperatura inferiores a 25 °C). A Eversa apresenta maior atividade catalítica em 40 °C, contudo, pode apresentar estabilidade a temperaturas maiores que 45 °C (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; MOLINA-GUTIÉRREZ et al., 2021).

### 3.6 Docking molecular

O docking molecular é uma estratégia de simulação empregada na análise das interações moleculares entre uma proteína de conformação tridimensional conhecida e um ligante. Através dessa metodologia, é possível obter informações sobre as conformações energeticamente estáveis do complexo proteína-ligante (BÖHM, 1998; PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017). Para os métodos de amostragem de simulação de docagem molecular, pode-se considerar modelos na qual tanto a proteína quanto o ligante são inflexíveis, modelos em que tanto a proteína quanto o ligante são flexíveis, ou modelos onde a proteína é fixa e o ligante é flexível (GAUTHIER et al., 2019; HANWELL et al., 2012).

Os modelos em que a tanto a proteína quanto o ligante são fixos, é conhecida como metodologia de docagem rígida. Nessa metodologia, considera-se três graus de liberdade rotacional e três de liberdade translacionais, de modo que que essa estratégia é mais adequada para utilização em sistemas onde ocorre interação entre proteínas, uma vez que o número de graus de liberdade conformacionais a serem estudados são altos (FAN; FU; ZHANG, 2019; VAKSER, 1995).

No método de docagem flexível, considera-se o ligante flexível e a proteína é considerada parcial ou totalmente flexível. Vale destacar que o grau de liberdade do sistema está diretamente relacionado a flexibilidade da proteína. Com isso, a execução de docagens que utilizem essa estratégia demandam não só um maior tempo, mas como também computadores com maior capacidade de processamento (ABDELSATTAR; DAWOUD; HELAL, 2020; KROVAT; STEINDL; LANGER, 2006; VAKSER, 1995).

Já a docagem semiflexível, a proteína é considerada rígida, com seis graus de liberdade similar ao método de docagem rígida, e o ligante é considerado flexível, de maneira que são considerados todos os seus graus de liberdade. Nesse método leva-se em consideração

que a proteína fixa tem a capacidade de identificar os ligantes a serem docados, vale ressaltar que essa simplificação nem sempre condiz com a realidade (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; JAKHAR et al., 2019; SHOICHET et al., 2002).

Os algoritmos de docagem molecular podem ser divididos em: métodos estocásticos, técnicas de busca sistêmica e métodos simulacionais. Os algoritmos de procura estocásticos baseiam-se na modificação randômica dos graus de liberdade, através dessa metodologia a resolução do sistema é obtida rapidamente. No entanto, essa estratégia não assegura a execução de uma varredura completa pelo espaço conformacional, ou seja, a melhor solução nem sempre é obtida pelo algoritmo. As técnicas de busca sistêmica baseiam-se na associação de valores discretos a cada grau de liberdade, de maneira que as coordenadas são obtidas através de combinações. Por fim, as metodologias simulacionais expõem mudanças do sistema com o decorrer do tempo é descrita, uma dessas metodologias que é bastante estudada é dinâmica molecular (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; DIAS; DE AZEVEDO JR., 2008; FAN; FU; ZHANG, 2019).

As funções de pontuação (*scoring*), são empregadas na definição do posicionamento dentro dos grupos de posição obtidos através do sistema de amostragem. Essas funções podem fundamentar-se em campos de força, funções empíricas ou funções baseadas no conhecimento (DIAS; DE AZEVEDO JR., 2008; GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

As funções de pontuação que se baseiam em campo de força são fundamentadas na mecânica molecular, de maneira que ocorre a aproximação da energia potencial do sistema através do somatório das forças inter e intramoleculares e demais contribuições. As funções empíricas baseiam-se na soma dos termos de energia empírica, como em interações eletrostáticas, forças de Van de Waals, ligações de hidrogênio, modelos de dessolvatação, interações hidrofóbicas, etc. Esses termos de energia são moderados por coeficientes, que são desenvolvidos para descreverem dados de afinidade de ligação de um conjunto de treinamento, por meio da regulação de mínimos quadrados (DIAS; DE AZEVEDO JR., 2008; FAN; FU; ZHANG, 2019; KROVAT; STEINDL; LANGER, 2006).

Por fim, as funções fundamentadas em conhecimento reconhecem que as interações entre ligante e proteína estatisticamente mais estudadas referem-se a contatos mais favoráveis. Desse modo, através de um banco de dados de estruturas, a periodicidade das interações de todos os átomos do complexo ligante-proteína é estimada e convertidas em componentes de energia (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014; KROVAT; STEINDL; LANGER, 2006; SHOICHET et al., 2002).

### 3.7 Dinâmica molecular

A ampliação do poder de processamento de computadores possibilitou cálculos de sistema com milhares de átomos. Essas simulações que são conhecidas como dinâmica molecular (DM), são empregadas no estudo da dinâmica e estruturas de macromoléculas, dentre elas, destaca-se as proteínas (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Por meio dessa metodologia, é possível avaliar, preliminarmente, experimentos complexos (HILDEBRAND; ROSE; TIEMANN, 2019). Vale ressaltar, que essa estratégia pode ser utilizada após o processo de docking molecular, de maneira que, partindo da melhor pose, é possível compreender não só a interação ligante-proteína no transcorrer do tempo, mas como também, o papel do solvente e as forças atuantes no sistema (SEYYEDATTAR; ZENDEHBOUDI; BUTT, 2019).

Para que simulação de sistemas com um número de átomos elevados (centenas ou milhares) sejam realizados é necessário seguir alguns passos (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Abaixo, está exposto as etapas essenciais para realização da dinâmica molecular:

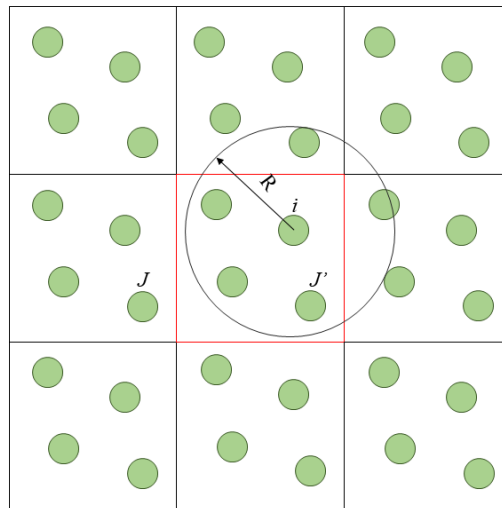
- a) Estabelecer configuração iniciais, que podem ser encontradas em bancos de dados especializados, gerados em cristalografia, ou obtidos através da docagem molecular;
- b) Calcular as forças atuantes sobre cada partícula. Para o cálculo dessas interações interatômicas, utiliza-se um campo de força;
- c) Aprimoramento da estrutura, produzida por meio de algoritmos genéricos ou métodos de gradiente;
- d) Dinâmica da estrutura. Realizada por meio da integração da equação de movimento de Newton empregando-se métodos numéricos;
- e) Avaliação dos resultados mediante as propriedades de equilíbrio.

#### 3.7.1 Condições periódicas de contorno

As condições periódicas de contorno, são empregadas com um meio de assemelhar o sistema estudado a um sistema macroscópico (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Nessa estratégia utiliza-se uma menor quantidade de partículas, que represente significativamente o sistema estudado. Salienta-se que a definição dessas condições é de suma importância, pois, uma maior quantidade de partículas exigiria uma maior capacidade de processamento e, conseqüentemente, um maior tempo de simulação (SEYYEDATTAR; ZENDEHBOUDI; BUTT, 2019). As definições de limites possibilitam que os átomos do sistema sejam

adicionados em uma caixa central rodeados de outras caixas similares a caixa original (POIER et al., 2019). Com isso, os movimentos que ocorrem na caixa central, são replicados nas demais caixas, de modo que se uma molécula sai da caixa inicial, seu reflexo entrará na face oposta, com a mesma velocidade com o intuito manter o mesmo número de moléculas da caixa central (LEE et al., 2016). Conforme está exposto na figura 7, a cada passo de integração, ocorre uma verificação de coordenadas, caso alguma partícula esteja fora da caixa, ela será substituída por sua imagem.

**Figura 7** - Representação esquemática da célula de simulação. O círculo (Raio de corte) é delimitado partindo de um átomo de interesse  $i$  dentro da célula central, e sua interação com o átomo  $j'$ , imagem do átomo  $j$  dentro do raio



Fonte: Adaptado de WAIDYASOORIYA; HARIYAMA; KASAHARA, 2017.

Na figura 7,  $R$  (raio) corresponde ao raio de corte. O raio de corte é empregado no cálculo de interação entre duas partículas, é possível observar que sem essa restrição, uma dada partícula  $i$  poderia interagir com diferentes partículas da vizinhança (PHILLIPS et al., 2020). Logo, a definição do raio de corte reduz o esforço computacional e, por conseguinte, o tempo gasto no processo (DENG; ROUX, 2009). Para essa delimitação, utiliza-se um truncamento do potencial de um raio esférico, em geral equivalente a  $L/2$ , onde  $L$  é o comprimento da caixa de simulação (BROOKS et al., 2009). Com isso, para uma dada partícula  $i$ , só serão contabilizadas as interações com outras partículas com seu centro de massa menor ou igual ao intervalo determinado pelo raio de corte (LEE et al., 2016; WAIDYASOORIYA et al., 2017).

### 3.7.2 Campo de força

O campo de força é uma função que descreve as contribuições das energias potenciais atuantes sob o sistema (LEE et al., 2016). Ele é dividido em contribuições intermoleculares (interações de Coulomb e de Van der Waals e de Coulomb) e intramoleculares ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros), de modo que a soma dessas contribuições representa a energias potencial do sistema (BROOKS et al., 2009). A energia potencial total do sistema pode ser calculada através do somatório dos termos de energias, conforme está exposto na equação (1).

$$V(r) = \sum V_r + \sum V_\theta + \sum V_\varphi + \sum V_{vdW} + \sum V_{ele} \quad (1)$$

---

Onde  $V_r$ ,  $V_\theta$  e  $V_\varphi$  representam as contribuições intramoleculares. Sendo as energias: de estiramento de ligação em relação ao seu valor de equilíbrio, deformação do ângulo de ligação em relação ao seu valor de equilíbrio e a torção em torno de uma ligação, respectivamente. Já  $V_{vdW}$  e  $V_{ele}$ , referem-se as contribuições intermoleculares, sendo elas das interações de Van de Walls e eletroestática, respectivamente (JO et al., 2013; LEE et al., 2016; PHILLIPS et al., 2020). A função que descreve o estiramento de ligação (equação 2) pode ser obtida por meio da Lei de Hook. Essa função, é dada por  $V_r$ , onde  $K_r$ , refere-se a constante da mola, e  $r$  representa os comprimentos de ligação:

$$V_r = k_r (r - r_0)^2 \quad (2)$$

---

Assim como a função de estiramento de ligação, a função de deformação angular pode ser obtida por meio da Lei de Hooke, descrita na equação 3:

$$V_\theta = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

---

Onde,  $K_\theta$  é uma constante de proporcionalidade da força e  $\theta$  refere-se ao ângulo de ligação. Outro fator de interação intermolecular é o movimento torsional que ocorre no entorno da ligação, essa contribuição pode ser obtida por meio da equação 4:

$$V_\varphi = \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\Phi - \gamma)) \quad (4)$$

---

Onde  $n$  refere-se à periodicidade do número de mínimos para o potencial, que variam por meio dos orbitais envolvidos. Já  $\Phi$ , é referente ao ângulo diedro e  $\gamma$  é o ângulo da fase. Como foi citado, as contribuições intermoleculares podem ser descritas por termos de

interações Coulombianas ( $V_{ele}$ ) e de Van der Walls ( $V_{vdw}$ ) expressas pelos potenciais de Leonard-Jones e de Coulomb, elucidadas na equação 5 e 6, respectivamente:

$$V_{vdw} = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

$$V_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \quad (6)$$

Na equação 5,  $\epsilon_{ij}$  refere-se a a amplitude do potencial entre a barreira atrativa e repulsiva,  $\sigma_{ij}$  corresponde a distância em que o potencial interparticular é zero. Tais parâmetros podem ser obtidos experimentalmente. Na equação 4,  $q_i$  e  $q_j$  referem-se ao valor das cargas envolvidas,  $\epsilon_0$  e  $\epsilon_r$  são as constantes de permissividade no vácuo e dielétrica do sistema, respectivamente. Ademais, podem ser empregados outros parâmetros que incorporem o campo de força do sistema com o intuito de apropriar os espectros vibracionais obtidos experimentalmente (WAIDYASOORIYA et al., 2017).

### 3.7.3 Simulação temporal do sistema

Empregando a dinâmica molecular é possível gerar sucessivas configurações de um sistema, por meio da integração das equações de Newton (DENG; ROUX, 2009). Os produtos dessas integrações, geram trajetórias que especificam as variações das posições e velocidade com o tempo (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Essa metodologia possibilita a simulação de um sistema, em uma dada temperatura e pressão, pode ser representada para um sistema atômico simples pela equação 7:

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (7)$$

Onde,  $F_i$  refere-se a força atuante sob cada partícula do sistema em um dado tempo  $t$ ,  $a_i$  descreve a aceleração do átomo  $i$  de massa  $m_i$ . Ao estabelecer o campo de força do sistema estudado, é possível determinar as forças atuantes em cada átomo, por meio da derivada primeira da energia potencial, calculada através do campo de força escolhido em relação a posição dos átomos (HILDEBRAND; ROSE; TIEMANN, 2019), conforme está exposto na equação 8:

$$F_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (8)$$

Através da equação 8, gera-se de maneira direta a aceleração da partícula. Partindo-se dessa e, integrando-se as equações de movimento, é possível gerar as suas velocidades (SEYYEDATTAR; ZENDEHBOUDI; BUTT, 2019). Por meio da integração das velocidades, obtém-se mudanças na posição do átomo. Com isso, por meio das novas posições e velocidades gera-se as energias potencial e cinética do sistema (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Aplicando esse procedimento de maneira sucessiva, obtém-se o que se intitula de “trajetória “. A trajetória pode ser definida como o conjunto de posições velocidades das partículas de um dado sistema ao decorrer do tempo (POIER et al., 2019).

### 3.7.4 Integração numérica da equação de movimento

A resolução das equações de movimento por meio der integrais, pode ser realizada com auxílio de algoritmos baseando-se na diferenciação finita, de modo que a integração é fragmentada em pequenas frações de tempo ( $\Delta t$ ) na qual denomina-se passos de integração (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Essa estratégia permite simular movimentos de maior frequência do sistema estudado. Desse modo, um dos métodos mais empregados em DM na integração das equações de movimento, é o método de Verlet (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Esse método, usa as posições e acelerações dos átomos no tempo ( $t$ ) e as posições dos passos anteriores,  $r(t-\Delta t)$  com o objetivo de estabelecer as novas posições no tempo ( $t+\Delta t$ ), conforme está exposto na equação 9:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \mathbf{a}(t)\Delta t^2 \quad (9)$$

---

O algoritmo de Verlet pode ser obtido por meio da expansão de Taylor das equações 10 e 11 (HILDEBRAND; ROSE; TIEMANN, 2019). Deste modo, para a obtenção da equação 9, após a expansão, realiza-se a somas das equações e isola-se o  $r(t + \Delta t)$ .

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\Delta t^2 + \dots \quad (10)$$

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\Delta t^2 - \dots \quad (11)$$

---

Após o desenvolvimento do algoritmo de Verler, surgiram diversos algoritmos, tais como o de Beeman, Leap-Frog e Velocity-Verlet (LEE et al., 2016). O algoritmo de Velocity-

Verlet é uma versão aprimorada do algoritmo de Verlet, essa metodologia emprega as posições, velocidade e acelerações nos mesmos passos de integração com o intuito de reduzir os erros de aproximações numéricas (DANYLIV et al., 2017). Por conta disso, softwares como *Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD)*, empregam esse algoritmo em suas simulações (PHILLIPS et al., 2020).

### 3.7.5 Controle da temperatura e pressão

A definição do conjunto de pressão, temperatura e número de partículas são constantes é denominado *ensemble* NpT (KASSON; JHA, 2018). Nesse sistema, a fonte térmica empregada é um banho que conserva a temperatura. De modo similar, a pressão do sistema é mantida empregando-se um barostato (DANYLIV et al., 2017). O *NAMD*, utiliza o algoritmo pistão de Langevin, para sistemas isobáricos e isotérmicos. Esse algoritmo, baseia-se nas equações de pressão constante de Hoover aliada as flutuações de pistão controladas pela dinâmica de Langevin, com um termostato de nome idêntico (PHILLIPS et al., 2020).

No ensemble NVT, o conjunto de volume, temperatura e número de partículas são mantidas constante (LEE et al., 2016). Nesse sistema, a energia total é mantida, em dinâmica molecular, esse ensemble pode ser empregado com o intuito de manter o equilíbrio termodinâmico na etapa de equilibração ou produção (DANYLIV et al., 2017).

### 3.7.6 Análise da trajetória gerada

#### 3.7.6.1 Raiz do desvio quadrático médio (RMSD)

A raiz do desvio quadrático médio (*root mean square deviation - RMSD*), é uma equação que é utilizada para obter o desvio padrão médio quadrático para átomos de uma proteína. Por meio dessa equação, é possível avaliar o equilíbrio do sistema, de maneira que quanto menor o *RMSD*, maior será o equilíbrio do complexo estudado. O *RMSD* pode ser obtido avaliando-se a posição de um determinado átomo em diferentes tempos, a equação 12 elucida o *RMSD* de um sistema:

$$\mathbf{RMSD} = (\mathbf{t}_1 \mathbf{t}_2) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|\mathbf{r}_i^{\rightarrow}(\mathbf{t}_1) - \mathbf{r}_i^{\rightarrow}(\mathbf{t}_2)\|^2} \quad (12)$$


---



### 3.7.6.2 Ligação de hidrogênio

As ligações de hidrogênio são interações de grande importância para as moléculas, uma vez que podem influenciar diretamente nas propriedades químicas (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Essas ligações, podem ser tanto inter quanto intramoleculares (QIN; ZHONG; WANG, 2021). As interações intermoleculares, ocorrem entre duas cargas elétricas parciais com cargas distintas. Em proteínas, essas interações podem estar associadas a uma maior estabilidade do complexo avaliado (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

### ***3.8 Método Taguchi***

O método Taguchi, que também é conhecido como design robusto, é uma estratégia de planejamento experimental que tem o intuito de aumentar a produtividade focando na otimização de parâmetros (ZHANG et al., 2019). Através do método, é possível investigar a influência dos parâmetros no processo, esse método mostra-se mais vantajoso ante aos métodos tradicionais, pois, necessita de um menor tempo e recurso. No Taguchi, é utilizado um arranjo de matriz ortogonal apropriado permitindo assim a minimização de cálculos, além de expor com clareza a influência das variáveis estudadas no processo (DA S. MOREIRA et al., 2022; EL KHALIDI et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

A lipase comercial Eversa® transform 2.0 de *Aspergillus oryzae* e lipase de *Thermomyces lanuginosus* foram adquiridas da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (Cotia, São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes químicos eram de grau analítico (Synth, São Paulo, Brasil e Vetec, São Paulo, Brasil). O planejamento experimental foi desenvolvido no software Statistica® 10 (Statsoft, EUA) baseando-se no método Taguchi. O óleo de babaçu refinado que foi utilizado neste trabalho foi adquirido no comércio local de Teresina- PI, pertencente a marca Leve (Maranhão, Brasil).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Hidroesterificação

Neste estudo, os ésteres metílicos de babaçu foram obtidos por meio do processo de hidroesterificação enzimática, essa estratégia é organizada em duas etapas. Na primeira etapa, ocorreu a formação dos ácidos graxo livres utilizando o óleo refinado de babaçu via hidrólise enzimática empregando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) livre como biocatalisador. O sistema reacional foi elaborado baseando-se na metodologia proposta por Carvalho e colaboradores (2021) com adaptações. Inicialmente, a solução contendo óleo e água na razão mássica de 1:1 foi aquecida até que o sistema atingisse a temperatura de 40 °C. Em seguida, foi adicionado 0,4 % do biocatalisador em relação a massa do óleo. O sistema permaneceu sob temperatura de 40 °C durante 4 horas sob agitação constante (CARVALHO et al., 2021).

Após o processo, a solução foi transferida para um funil de separação (500 mL), logo após, foi adicionado 100 mL de água destilada a 60 °C com o intuito de separar a fase aquosa dos ácidos graxos livres (AGLs) produzidos. Com isso, a fase inferior (aquosa) foi excluída e os AGLs foram lavados três vezes. Logo em seguida, a mistura contendo os AGLs foi transferida para um béquer e aquecida a 80 °C durante 10 minutos. Ao final dos 10 minutos, a mistura foi transferida para um funil com papel filtro e sulfato de sódio anidro a 20% m.v<sup>-1</sup> que foi previamente seco em forno mufla a 250 °C por 4 horas (CARVALHO et al., 2021; MOREIRA et al., 2020a).

O índice de acidez (IA) inicial e final (após a etapa de hidrólise) foi calculado a

partir da Equação 13. Para isso, alíquotas de 0,3 g foram retiradas do volume do sobrenadante da reação, diluídas em 10 mL de álcool etílico e adicionadas 3 gotas de fenolftaleína, em seguida foram tituladas com a solução de hidróxido de sódio.

$$IA \left( \frac{mgNaOH}{g} \right) = \frac{MM_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot f \cdot V_{NaOH}}{m} \quad (13)$$

Onde,  $MM_{NaOH}$  (g/mol) é a massa molar de NaOH;  $M_{NaOH}$  (mol/L) é a molaridade da solução de NaOH;  $f$  é o fator de correção determinado mediante a padronização do NaOH;  $V_{NaOH}$  é o volume de NaOH utilizado durante a titulação (L); e,  $m$  (g) é a massa da amostra a ser estudada. A conversão dos ácidos graxos livres em ésteres (Equação 14) foi determinada levando-se em consideração a acidez inicial da amostra ( $IA_I$ ) e da amostra após a reação ( $IA_F$ ) (MOREIRA et al., 2020a).

$$\text{Conversão AGL (\%)} = \left( \frac{IA_I - IA_F}{IA_I} \right) \quad (14)$$

Na segunda etapa, realizou-se a esterificação direta dos AGLs derivados do óleo refinado de babaçu e metanol utilizando a lipase Eversa® Transform 2.0 na sua forma livre como biocatalisador. As reações de produção dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram executadas em erlenmeyers de 10 mL com tampa, comportando o biocatalisador e o substrato, em um agitador rotativo com controle digital de temperatura e rotação (Incubadora TE – 4200) a 200 rpm. Durante os estudos, foram variados a temperatura (25-55 °C), razão molar entre os AGLs e álcool (1:1 a 1:9), porcentagem de biocatalisador (0,1% a 0,9%) e tempo de reação (1-5 horas) conforme o planejamento estático proposto (MOREIRA et al., 2020a). Para a determinação da massa molar dos ácidos produzidos, levou-se em consideração o trabalho de Figueredo e colaboradores (2020) (FIGUEREDO et al., 2020). Já a concentração de proteína, foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

#### 4.2.2 Análise de Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC/MS)

Para a determinação do teor de éster (C) das amostras de biodiesel obtidas, a análise GC/MS foi realizada com base na metodologia descrita na norma EN 14.103 (ALEXANDRE et al., 2022), com adaptações. Aproximadamente 50 mg de amostra de biodiesel foram

adicionados a um frasco (2 mL) contendo 1 mL da solução de nonadecanoato de metila (10 mg/mL). Esta mistura foi injetada (1  $\mu$ L) em um espectrômetro de massa de cromatógrafo a gás SHIMADZU QP-2010 ULTRA (Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar (5%-fenil) - metilpolissiloxano (DB-5) (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m de espessura de filme) usando hélio como gás de arraste no modo sem divisão.

#### 4.2.3 Planejamento experimental e análise estatística (Método Taguchi)

Para a determinação dos parâmetros reacionais empregou-se um planejamento experimental avançado pelo método Taguchi com matriz ortogonal padrão L9 (onde L refere-se ao quadrado latino e 9 ao número de experimentos). Durante o estudo, foram examinados quatro fatores em três níveis a fim de otimizar a produção dos ésteres. A Tabela 3 correlaciona os quatro fatores independentes (temperatura, tempo de reação, porcentagem de biocatalisador e razão molar entre AGLs e álcool) e seus respectivos níveis correspondentes (DA S. MOREIRA et al., 2022).

Tabela 3 - Fatores independentes e seus respectivos níveis correspondentes para a otimização da produção de biodiesel

	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão molar (AGLs/álcool)</b>	<b>Biocatalisador (% m/m)</b>
<b>Nível 1 (L1)</b>	1	25	1:1	0,1
<b>Nível 2 (L2)</b>	3	40	1:5	0,5
<b>Nível 3 (L3)</b>	5	55	1:9	0,9

Fonte: elaborado pelo autor.

O software Statistica® foi empregado para a elaboração do design experimental e análise estatística. A Tabela 5, expõe o design experimental junto com as conversões e relações S/R (sinal-ruído) obtidos. Os resultados das relações de S/R foram obtidos a partir das características da função “maior é melhor”, uma vez que a finalidade desta pesquisa foi potencializar a resposta (conversão). Os valores da relação S/R foram obtidos a partir da Equação 15 (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$\frac{S}{R} = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \cdot 100 \quad (15)$$

---

Onde,  $y_i$  corresponde a variável de resposta,  $i$  representa o número de repetições e  $n$  o número de experimentos para a combinação de níveis de fator para qualquer arranjo de planejamento. Por meio da Equação 16, determinou-se a relação S/R aguardada para as condições ideais de conversão máxima prevista.

$$\frac{S}{R_{\text{PREVISTO}}} = \bar{S}|R + \sum_{i=1}^n (S|R_j - \bar{S}|R) \quad (16)$$

---

Onde,  $\bar{S}|R$  é referente a média aritmética de todas as relações  $S|R$ ,  $S|R_j$  é a razão de S/R no ponto ótimo para cada fator e  $n$  é o número de fatores que influenciam de maneira significativa o procedimento.

#### **4.2.4. Caracterização físico-química do óleo produzido**

##### *4.2.4.1 Viscosidade cinemática*

A viscosidade cinemática a 40 °C foi determinada com base na norma ASTM D-7042. Durante a análise foi empregado um viscodensímetro digital Anton Paar SVM 3000-Stabinger (Áustria).

##### *4.2.4.2 Densidade*

Para a determinação da densidade a 20 °C foi utilizada a norma ASTM D-7042. Para análise, utilizou-se um viscodensímetro digital Anton Paar SVM 3000-Stabinger (Áustria).

#### **4.2.5 Estudo teórico**

##### *4.2.5.1 Modelagem da proteína por homologia*

A modelagem comparativa da proteína lipase Eversa ® Transform 2.0, foi realizada em quatro etapas.

##### *4.2.5.1.1 Reconhecimento e seleção da proteína modelo*

O sequenciamento de aminoácidos da proteína lipase Eversa , com seu número CAS 9001-62-1 da empresa Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0065?lang=pt&region=BR> ), foi submetida a uma análise comparativa por meio do programa BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) ([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST)) (ALTSCHUL et al., 1990) e em sua respectiva base de dados PDB. Assim, uma proteína que estava relacionada à sequência de aminoácidos, a enzima lipase, classificada como hidrolase, foi reconhecida pelo organismo *Aspergillus oryzae*, obtida do Banco de Proteínas (<https://www.rcsb.org/>) com o código 5XK2 sendo a proteína alvo (WEBB; SALI, 2016).

#### 4.2.5.1.2 Alinhamento de sequências de alvo e molde

O alinhamento entre as sequências foi realizado utilizando o programa Modeller (<http://www.salilab.org/modeller/>) (WEBB; SALI, 2016).

#### 4.2.5.1.3 Construção e otimização de modelos

A elaboração do modelo foi realizada pelo programa Modeller (WEBB; SALI, 2016), para que uma nova proteína denominada Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0 fosse obtida, avaliada de acordo com a função objetivo e parâmetros estereoquímicos (BEDOYA; TISCHER, 2015).

#### 4.2.5.1.4 Validação da proteína

A homologação do modelo foi efetuada nos níveis estereoquímico, conformacional e energético. A qualidade do molde foi determinada pelo gráfico de Ramachandran e Verify 3D (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) com o programa PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), que estimou sua estrutura tridimensional, indicando a possível qualidade estereoquímica.

#### 4.2.5.2 Docking molecular

##### 4.2.5.2.1 Preparação da proteína

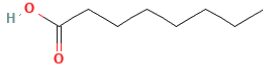
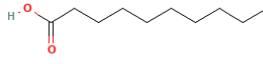
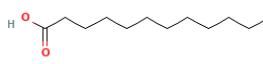
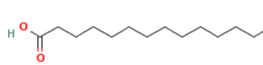
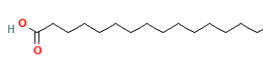
Foi realizado um processo de correção de cargas e adição de átomos de hidrogênio na proteína gerada pela homologia através do Programa *Discovery Studio Visualizer* (MORRIS et al., 2009).

##### 4.2.5.2.2 Obtenção do ligante

As estruturas dos ácidos graxos livres de babaçu foram realizadas utilizando os ácidos caprílico, cáprico, láurico, mirísitico, palmítico e oleico que juntos totalizavam cerca de 95% (Tabela 4) dos ácidos graxo presentes no óleo hidrolisado, conforme dados obtidos em

cromatografia gasosa. Para modulação dessas estruturas, utilizou-se o software ChemDraw 3D e posteriormente a estrutura foi minimizada com o auxílio do campo de força MM2 com gradiente RMS de 0,0001.

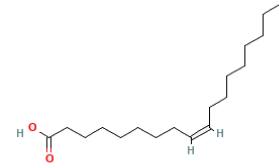
Tabela 4 - Ligante utilizados no processo de docking molecular

<b>Ligante</b>	<b>Composto</b>	<b>Formula</b>	<b>Estrutura</b>
<b>Ligante (I)</b>	Ácido Octanóico	$C_8H_{16}O_2$	
<b>Ligante (II)</b>	Ácido Decanóico	$C_{10}H_{20}O_2$	
<b>Ligante (III)</b>	Ácido Dodecanoico	$C_{12}H_{24}O_2$	
<b>Ligante (IV)</b>	Ácido Tetradecanóico	$C_{14}H_{28}O_2$	
<b>Ligante (V)</b>	Ácido Hexadecanóico	$C_{16}H_{32}O_2$	

**Ligante  
(VI)**

Ácido cis-9-  
octadecenóico

$C_{18}H_{34}O_2$



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2.5.2.3 Docking molecular e visualização de cálculos

A simulação do docking molecular foi realizada com o *UCSF Chimera* (TROTT; OLSON, 2009), considerando um modelo semiflexível. Os resíduos que compõem sítio ativo da lipase de estudo foram obtidos na literatura, sendo formado pela tríade Ser 153-Asp 206-His 268 (BEN HLIMA et al., 2021; CEN et al., 2019). Os perfis de energia das interações ligante-receptor também foram avaliados por software, e a visualização das poses ancoradas foi feita pelo *Discovery Studio Visualizer* (PETTERSEN et al., 2021).

#### 4.2.5.3 Simulações de dinâmica molecular

Para a construção das soluções de estudo, além dos próprios *scripts* de dinâmica molecular, foi usando o *site CHARMM-GUI* (<https://www.charmm-gui.org/>) (BROOKS et al., 2009; LEE et al., 2016). Onde se escolheu o arquivo PDB do complexo formado pela enzima e o ligante em sua melhor pose de docagem, e adicionou-se uma caixa de água retangular ajustada à uma distância de borda de 10 Å da proteína (JORGENSEN et al., 1983). Foi criado então um sistema cúbico de aresta igual a 75 Å e ângulos cristalinos de 90° (Alfa, Beta e Gama). As condições periódicas de fronteira PME e FFT foram geradas automaticamente (CHEATHAM et al., 1995; HESS et al., 1997). O campo de força adotado foi o Charmm36m (ref.). Em todas as simulações de Dinâmica Molecular, foram utilizadas as seguintes condições fixas: temperatura de 310.15 K, pressão de 1atm e pH 7,0 e o modelo de água TIP3P (PHILLIPS et al., 2020). Para cada simulação, foi realizada uma minimização de energia com 10 mil passos em ensemble NVT. Em seguida, foram realizadas simulações de equilíbrio com 10 ns em ensemble NPT, e por fim uma simulação de produção iniciando em 10 ns, sendo estendida até se observar uma situação de equilíbrio do complexo no gráfico de RMSD, mas nunca ultrapassando o tempo de 100 ns. Todas as simulações tiveram um passo de integração de 1 fs (FIELD et al., 2000; PHILLIPS et al., 2020). A visualização dos gráficos foi executada no software Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática proposta, foi realizada de maneira satisfatória, visto que houve um aumento no índice acidez do óleo de 0,75 para 127,03 mgNaOH/g. O índice de acidez obtido é condizente com as expectativas, uma vez que foi empregado durante a etapa de hidrólise o óleo de babaçu refinado. Carvalho e colaboradores (2021), realizaram a hidrólise completa do óleo refinado e residual em 3 horas de reação, neste processo foi empregado a lipase livre de *Candida Rugosa* como biocatalisador (CARVALHO et al., 2021). Já Moreira e colaboradores (2020), optaram por realizar essa etapa através de uma hidrólise química, os autores hidrolisaram completamente o óleo de babaçu por meio dessa metodologia (MOREIRA et al., 2020b). Vale destacar que a hidrólise química gera diversos subprodutos necessitando assim da adição de etapas de separação e purificação. Dessa forma, a hidrólise enzimática pode ser uma alternativa viável a esse processo, uma vez que os biocatalisadores geram uma menor quantidade de subprodutos.

### 5.2 Planejamento Taguchi- Otimização da produção de ésteres metílicos de ácidos graxos de babaçu

Nesta etapa do trabalho foi utilizado um planejamento Taguchi de matriz ortogonal L9. Por meio desse método, é possível compreender os efeitos das interações dos parâmetros relacionadas ao processo (AMERI et al., 2020; LI et al., 2021; MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020). A Tabela 5 expõe os resultados obtidos relacionando-os aos parâmetros reacionais propostos. Vale destacar, que todos os experimentos expostos foram realizados em triplicata e que os resultados se mantiveram dentro da margem de erro esperada.

Tabela 5 - Planejamento Taguchi para a reação de esterificação de AGL de babaçu

Reação	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Razão molar (AGLs/álcool)	Biocatalisador (% m/m)	Conversão (%)	S/R
1	1	25	1:1	0,1	3,16 ± 0,48	9,99
2	1	40	1:5	0,5	58,79 ± 0,078	35,39
3	1	55	1:9	0,9	19,43 ± 0,66	25,77
4	3	25	1:5	0,9	95,20 ± 0,031	39,57
5	3	40	1:9	0,1	7,75 ± 0,30	17,79
6	3	55	1:1	0,5	8,44 ± 0,53	18,52
7	5	25	1:9	0,5	94,65 ± 0,036	39,52
8	5	40	1:1	0,9	75,36 ± 0,51	37,54
9	5	55	1:5	0,1	2,80 ± 0,18	8,94

Fonte: elaborado pelo autor.

Com base nos dados da Tabela 5, foi possível observar que o ensaio 4 apresentou os melhores resultados de conversão e de razão sinal ruído (S/R),  $95,20 \pm 0,031$  e  $39,57$ , respectivamente. Neste ensaio, foi empregado 0,9% de biocatalisador, razão molar de 1:5 (AGL/Metanol), em 3 horas de reação a 40 °C. Observa-se que a porcentagem de biocatalisador influenciou de maneira significativa no processo, visto que, os experimentos empregando 0,9 % de catalisador (experimentos 3, 4 e 8) apresentaram, em média, melhores resultados de conversão, e de razão sinal ruído quando comparados aos ensaios conduzidos com 0,1 e 0,5% de biocatalisador. Para a identificação da influência da temperatura, tempo e razão molar é necessária uma análise estatística mais aprofundada.

### 5.2.1 Análise da razão S/R

O planejamento Taguchi emprega relações S/R para identificar o impacto dos parâmetros no processo. Neste trabalho, a função “maior é melhor” foi empregada para determinar as razões S/R, visto que o presente planejamento tem a intenção obter uma maior conversão. A figura 8 elucida o impacto de cada um dos parâmetros com seus respectivos níveis. Já a tabela 6 expõe os valores da figura 8, ademais, na tabela 6 estão apresentados os valores de Delta, esses valores são calculados por meio da diferença entre a razão S/R mais alta e a mais

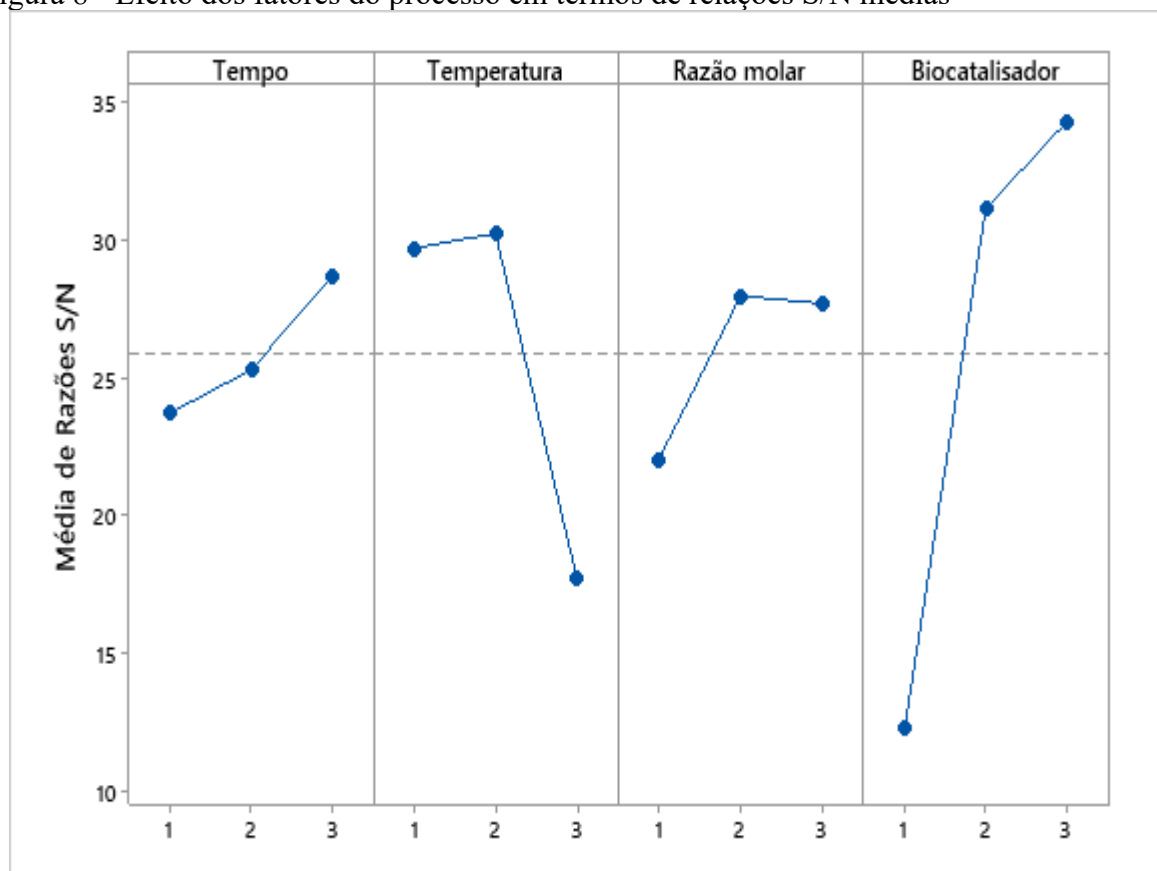
baixa em cada fator. Por meio do delta, é possível avaliar o impacto dos níveis no processo e, por conseguinte, identificar os parâmetros que tiveram maior influência.

Tabela 6 - Resposta de relações S/N

<b>Fatores/level</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Razão molar</b>	<b>Biocatalisador</b>
	<b>(h)</b>	<b>(°C)</b>	<b>(AGL/AL)</b>	<b>(% m/m)</b>
<b>1</b>	23,72	29,70	22,02	12,24
<b>2</b>	25,29	30,24	27,97	31,14
<b>3</b>	28,67	17,74	27,69	34,29
<b>Delta</b>	4,95	12,50	5,95	22,05
<b>Ranking</b>	4	2	3	1

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8 - Efeito dos fatores do processo em termos de relações S/N médias



Fonte: elaborado pelo autor.

É possível observar que a quantidade de biocatalisador e a temperatura foram as variáveis mais influentes no processo, pois apresentaram os maiores valores de delta, 22,05 e

12,50, respectivamente. Deste modo, os dados da tabela 6 confirmam a influência da porcentagem de biocatalisador e da temperatura sobre o processo. Evidencia-se que a ampliação da porcentagem de biocatalisador no meio reacional do nível 1 (0,1 %) para o nível 3 (0,9 %) aumentou de maneira significativa a resposta da relação S/R e, conseqüentemente, a conversão. Essa ampliação, pode ser atribuída ao aumento de sítios catalíticos disponíveis no meio reacional, de modo que essa disponibilidade está relacionada a um maior número de reações ocorrendo de maneira simultânea (BABAKI et al., 2017). Por outro lado, a temperatura apresentou um comportamento diferente, observa-se que a mudança do nível 1 (25 °C) para o nível 2 (40 °C) favorece a ampliação da conversão, entretanto, a mudança do nível 2 (40 °C) para o nível 3 (55 °C) tem efeito contrário. Isso ocorre, pois, as enzimas são materiais biológicos sensíveis que operam em uma faixa específica de temperatura, ademais o aumento excessivo da temperatura pode reduzir a atividade levando à desativação (ARANA-PEÑA et al., 2021). Por fim, os fatores razão molar e tempo de reação demonstraram ser menos efetivos no processo apresentando valores de delta igual a 6,75 e 3,73, respectivamente. Observa-se que a ampliação de metanol no meio reacional do nível 1 (1:1 AGL/metanol), para o nível 2 (1:5 1 AGL/metanol), impactou significativamente na resposta da relação S/R e, conseqüentemente, na conversão. Contudo, a mudança do nível 2 (1:5 1 AGL/metanol) para o nível 3 (1:9 1 AGL/metanol), apresentou uma leve queda na resposta. Essa baixa variância pode ser atribuída a alta resistência da Eversa ao metanol, uma vez que essa enzima foi desenvolvida para a produção de ésteres metílicos (MONTEIRO et al., 2021). Já a baixa variação da resposta da relação S/R do tempo pode estar associada a alta atividade da enzima de modo que, conforme os dados expostos na Tabela I, é possível obter  $95,20 \pm 0,029$  (ensaio 4) em 3 horas de reação.

### ***5.2.2 Análise de variância (ANOVA)***

Os dados de conversão obtidos através do planejamento experimental foram avaliados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA). O valor de  $p$  assegura a significância de cada fator para o processo estudado (CHAVAN; GAIKWAD, 2021). A Tabela 7 expõe os resultados obtidos na ANOVA.

Tabela 7 - Análise de Variância dos parâmetros que afetam na esterificação do óleo de babaçu

<b>Fatores</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F-value</b>	<b>p-value</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>Tempo (h)</b>	38,40	2	-	-	-	3,05%
<b>Temperatura (°C)</b>	299,30	2	149,65	7,79	0,11	23,77%
<b>Razão molar (AGL/AL)</b>	67,62	2	33,812	1,76	0,36	5,37%
<b>Biocatalisador (% m/m)</b>	853,63	2	426,817	22,23	0,043	67,80%
<b>Residual</b>	38,40	2	19,20			-
<b>Total</b>	<b>1258,98</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Fonte: elaborado pelo autor.

Para que seja assegurada a significância de um fator com intervalo de confiança de 95%, é necessário que o valor de  $p$  seja menor que 0,05. Deste modo, a tabela 7 elucida que dentre os fatores estudados apenas a porcentagem de biocatalisador apresentou significância com valor de  $p$  igual a 0,043 e um percentual de contribuição igual a 67,80%. Moreira e colaboradores (2020), estudaram a produção de ésteres etílicos de babaçu, os pesquisadores relataram que a porcentagem de biocatalisador foi o parâmetro mais influente no processo, com valor de  $p$  igual ao obtido neste trabalho (MOREIRA et al., 2020a). Sun, Guo e Chen (2021) estudaram a produção de biodiesel etílico a partir da Semen Abutili (*Abutilon theophrasti Medic.*) (oligenosa presente na China), utilizando a Eversa® Transform 2.0 em sua forma líquida como catalisador. Durante o estudo, os autores verificaram a influência do biocatalisador na velocidade da reação, foi observado que a elevação da porcentagem de biocatalisador de 1% para 6% amplia na mesma proporção a velocidade de produção dos ésteres. Deste modo, os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os dados da literatura, pois, como foi supracitado, a ampliação da porcentagem de biocatalisador está relacionada ao aumento da disponibilidade de sítios ativos e, conseqüentemente, ao maior número de reações ocorrendo simultaneamente (ARANA-PEÑA et al., 2021). Vale destacar, que esse trabalho demonstrou que o óleo de babaçu pode ser uma alternativa viável para a produção de FAME, pois, foi

empregado uma menor quantidade de biocatalisador em um menor tempo quando comparado a autores como Sun, Guo e Chen (2021) (SUN; GUO; CHEN, 2021).

Posto isto, após a análise estatística e discussão dos dados coletados, definiu-se a condição ótima de produção de ésteres metílicos baseando-se no intervalo dos níveis (1, 2 e 3) de cada fator (tempo, temperatura, razão molar (AGL/metanol) e porcentagem de biocatalisador) proposto no Planejamento Taguchi ortogonal do tipo L9. A tabela 08 apresenta as quantidades ótimas em nível de cada fator.

Tabela 8 - Condições ótimas de produção de ésteres metílicos de babaçu estatisticamente definidas

<b>Fatores</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Temperatura (C°)</b>	<b>Razão molar (AGL/álcool)</b>	<b>Biocatalisador (%m/m)</b>
<b>Nível</b>	3	2	2	3
<b>Valor do nível</b>	5 h	40 °C	1:5	0,9%

Fonte: elaborado pelo autor

Nessas condições, a conversão teórica foi de 98,64%. Após a realização da reação proposta, notou-se uma conversão de 95,76% que foi validada pela análise cromatográfica seguindo a norma EM 14103. Essa variação de aproximadamente 2,88% está dentro da margem de erro esperada, pois, biocatalisadores podem perder a sua atividade catalítica facilmente, visto que apresentam uma maior sensibilidade a fatores externos do que os catalisadores químicos (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017).

### 5.3 Caracterização físico-química do óleo produzido

Após a reação de hidroesterificação, os ésteres metílicos de babaçu foram separados dos subprodutos (água, glicerina e álcool em excesso) e foram caracterizados em relação a suas propriedades físico-químicas. Os resultados encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas do biodiesel de babaçu

Propriedades	ASTM D6751	ANP 45/2014	Óleo produzido	(FIGUEREDO et al., 2020)
Viscosidade cinemática a 40°C, cSt	1,9 – 6,0	3,0 - 6,0	2,52	2,83
Densidade a 20°C, Kg/m <sup>3</sup>	860 - 900	850 - 900	872,90	870,70

Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados expostos na tabela 9, estão dentro dos padrões de qualidade estabelecidas pela “*American Society for Testing and Materials*” (ASTM). Contudo, é possível observar que o biodiesel produzido apresentou valores de viscosidade cinemática a 40°C, abaixo do índice de referência da resolução N°45/2014 da ANP. A viscosidade cinemática é uma propriedade dos fluidos que relaciona a quantidade de movimento por difusão molecular de um fluido. Essa propriedade é de suma importância, pois, pode interferir de maneira direta na eficiência do motor (KNOTHE; STEIDLEY, 2005). Já a massa específica é uma propriedade intensiva da matéria sendo calculada através da razão entre duas propriedades extensivas (massa/volume) (RAMÍREZ VERDUZCO, 2013).

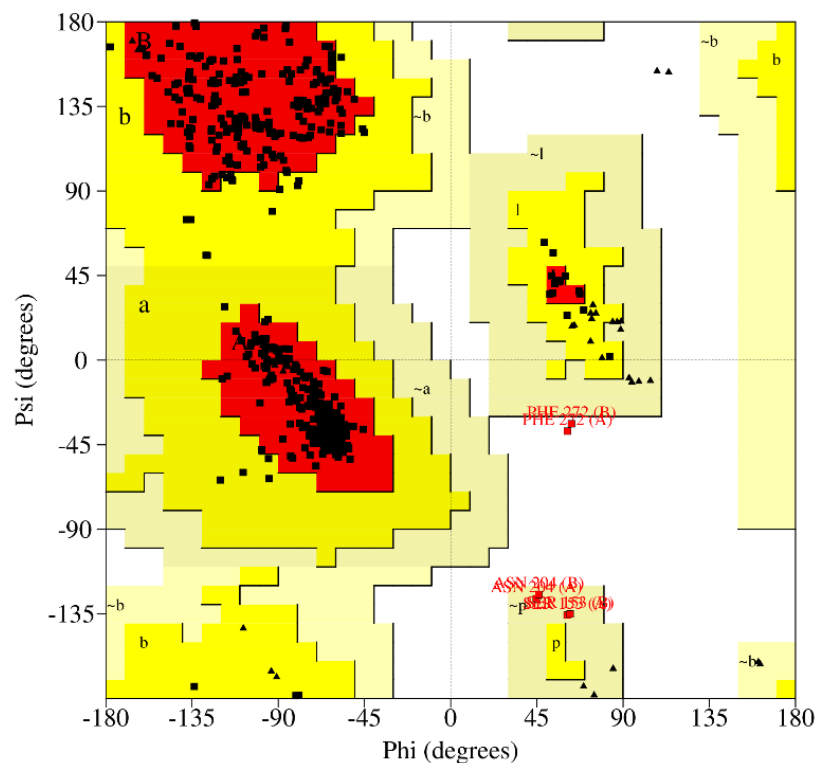
Vale destacar, que os resultados obtidos foram similares aos resultados de Figueredo e colaboradores (2020), conforme está exposto na tabela 9, os autores obtiveram ésteres metílicos de babaçu por meio da transesterificação empregando um catalisador básico. Essa rota pode gerar diversos subprodutos que podem dificultar a purificação dos produtos formados (FIGUEREDO et al., 2020). Deste modo, a rota empregada neste trabalho mostra-se promissora, visto que foi possível obter resultados similares com uma menor quantidade de subprodutos geradas (WANCURA et al., 2019, 2021).

## 5.4 Estudo teórico

### 5.4.1 Modelagem da proteína por Homologia

Para validação da modelagem por homologia foi utilizado o gráfico de Ramachandran, Figura 10. Este diagrama é empregado para representar todas as combinações possíveis de ângulos diédricos ( $\Psi$  versus  $\phi$ ) nos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica (TAM; SINHA; WANG, 2020). Essa técnica expõe as combinações de maior estabilidade desses ângulos, possibilitando validar a provável estrutura da biomolécula (SARKAR et al., 2020).

Figura 9 - Gráfico Ramachandran da proteína obtida por homologia

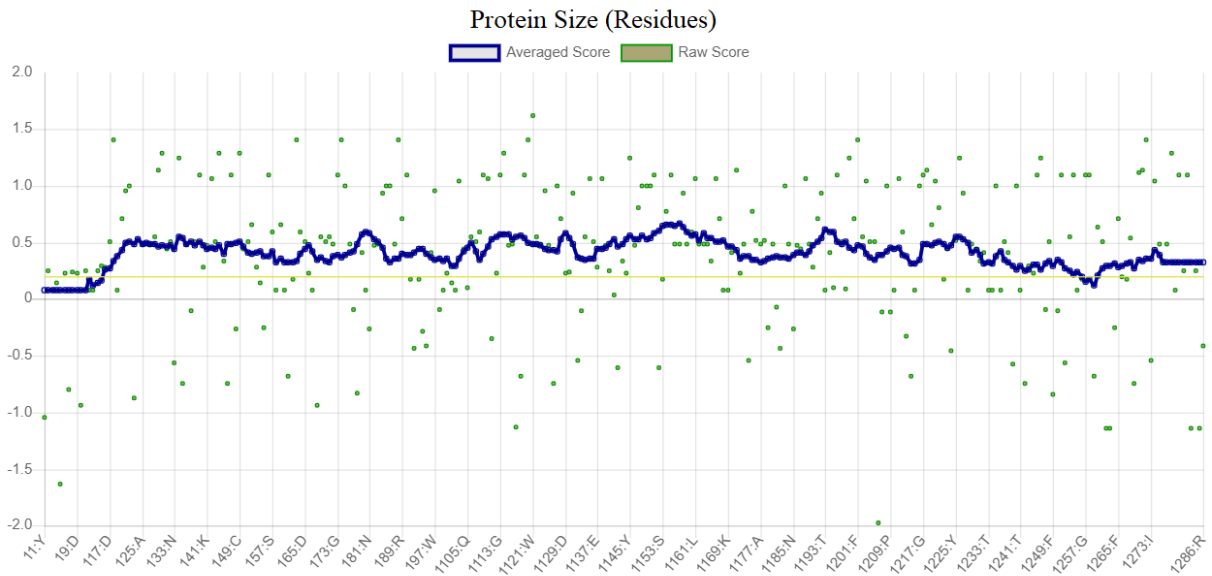


Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo o diagrama exposto acima, 91,5% dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis (região vermelha), 6,5% dos resíduos encontram-se na região adicionalmente permitidas (Regiões a, b, l, p, amarelo), 1,6% estão localizadas nas regiões generosamente permitidas (Regiões ~a, ~b, ~l, ~p, ou seja, amarelo claro) e 0,4% estão em regiões desfavoráveis (região preta). Vale destacar que os resíduos encontrados em regiões desfavoráveis se referem as estruturas utilizadas como molde, ademais, alguns resíduos estão localizados nas extremidades da proteína (SARKAR et al., 2020). A função *VERIFY 3D* (Figura 11), foi empregada para estipular a compatibilidade de um modelo atômico (3D) com uma sequência de aminoácidos (1D) para a proteína modelada. No geral, 80% dos resíduos com pontuação média 3D-1D  $\geq 0,2$  são aceitáveis (QIN; ZHONG; WANG, 2021). No presente estudo, cerca de 93,71% dos resíduos apresentaram pontuação média 3D-1D  $\geq 0,2$ , esses resultados evidenciam que modelo proposto era compatível com sua frequência.



Figura 10 - Os resultados da verificação estrutural da lipase Eversa® por Verify 3D



Fonte: elaborado pelo autor.

Deste modo, por meio do diagrama de Ramachandran foi possível identificar as regiões que mantiveram a estrutura conservada e os locais variáveis com alinhamento, visto que, 91,5% dos resíduos da proteína modelada estão em regiões favoráveis. Ademais, o *VERIFY 3D* comprovou a compatibilidade do modelo atômico (3D) com a sequência de aminoácidos (1D), uma vez que o modelo elaborado apresentou pontuação média 3D-1D  $\geq 0,2$  de 93,71%. Logo, os dados do gráfico Ramachandran e do Verify 3D validam o modelo obtido nesse trabalho.

#### 5.4.2 Docking molecular

A partir do docking molecular foram geradas nove conformações para cada ligantes e os seus respectivos valores de afinidade vinculante e o desvio quadrático médio das posições atômica (RMSD). A melhor conformação estabelecida pelo *Autodock Vina* foi a que exibiu os menores valores de afinidade vinculante e RMSD. A Tabela 10 elucida os valores obtidos na docagem molecular dos seis substratos estudados.

Tabela 11 - Resultados obtidos no processo de docking molecular. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4

<b>Substrato</b>	<b>Pose</b>	<b>Afinidade vinculante (kCal/mol)</b>	<b>Vina RMSD (Å)</b>
Ligante (I)	2	-5,1	1,566
Ligante (II)	2	-5,4	1,561
Ligante (III)	4	-5,6	1,658
Ligante (IV)	2	-5,8	0,970
Ligante (V)	4	-5,8	2,296
Ligante (VI)	5	-6,2	1,426

Fonte: elaborado pelo autor.

Por meio da Tabela 10, é possível observar que o ligante VI apresentou maior afinidade vinculante com o sítio catalítico. Ademais, é possível observar que há uma relação direta entre o aumento da afinidade vinculante e o aumento da cadeia carbônica dos ésteres, essa ampliação pode estar relacionada com ao aumento número de interações entre os ligantes e o sítio catalítico da enzima. No geral, os ligantes estudados apresentaram boa afinidade energética, a afinidade do Ligante VI (Ácido cis-9-octadecenóico) esteve por volta de -6,2 kcal/mol, este resultado sugere que a combinação desse substrato com a enzima foi a mais estável e adequada para esterificação (BRONOWSKA, 2011; QIN; ZHONG; WANG, 2021).

Os tipos de resíduos envolvidos nas interações entre os ácidos graxos livres e a Eversa® Transform 2.0 estão expostos na Tabela 11, e representados na Figura 11. Vale ressaltar, que além do sítio ativo, a cavidade oxiânion da enzima interagiu com o substrato, visto que a função dos resíduos desta região é equilibrar as cargas negativas dos intermediários formados durante a reação. Como foi supracitado, a tríade catalítica da lipase *Eversa® Transform 2.0* é composta por Asp206, His268 e Ser153 (CAVALCANTE et al., 2022). Já a cavidade oxiânion contém resíduos de Leu154 e Ser91 (LAN et al., 2021). As interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de forças de Van der Waals são de grande importância pois dão estabilidade no processo de formação do complexo enzima-substrato (LIU et al., 2018; TAMBOLI et al., 2017).

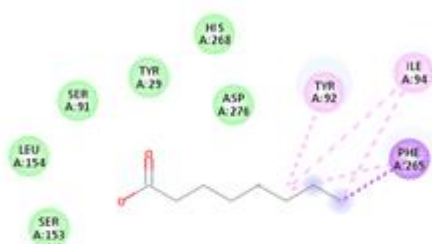
Tabela 11 - Interações dos ligantes com a lipase após as docagens. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4

Ligante	Resíduos envolvidos			
	Ligações de hidrogênio	Interações de Van der Waals	Interações Hidrofóbicas	Interação desfavorável
Ligante (I)	-	ASP276, HIS268, LEU154, SER91, SER153, TYR29	ILE94, PHE265, TYR92, ILE94, PHE265	-
Ligante (II)	TYR92 (2,94 Å)	ASP276, HIS268, LEU154, SER91, SER153, TYR29		-
Ligante (III)	HIS152 (3,06 Å)	ASP276, HIS268, LEU154, SER153, TYR29	ILE94, LEU262, PHE265, TYR92	-
Ligante (IV)	-	ASP276, HIS266, HIS268, HIS274, ILE94, LEU154, LEU285, SER153, TYR29	LEU283, PHE265, TYR92, VAL269	-
Ligante (V)	HIS152 (2,73 Å), HIS268 (2,96 Å), SER153 (2,86 Å), TYR29 (2,78 Å), TYR29 (2,59 Å)	ASP276, LEU154, LEU262, VAL269	ILE94, LEU283, PHE265, TYR92	-
Ligante (VI)	SER 91 (2,27 Å)	APS276, HIS266, HIS268, HIS274, LEU154, TYR29, SER 153, SER93	ILE94, LEU283, PHE265, VAL269, TYR92	-

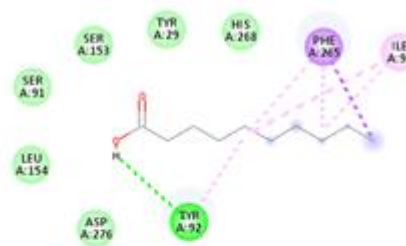
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 - Representação diagramática das interações entre os ligantes e sítio ativo da enzima

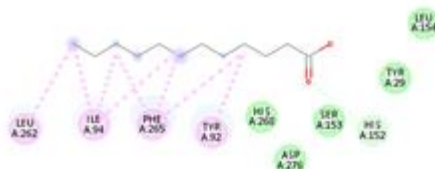
**Ligante I**



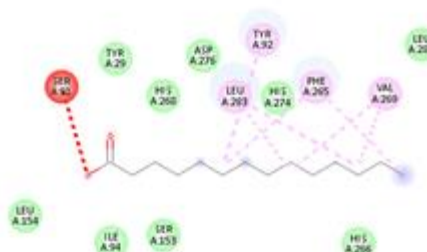
**Ligante II**



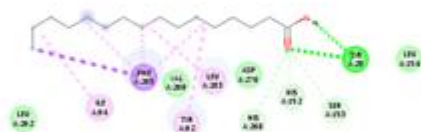
**Ligante III**



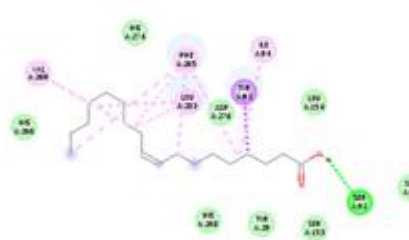
**Ligante IV**



**Ligante V**



**Ligante VI**



Fonte: elaborado pelo autor.

Pode-se observar que todos os ligantes interagiram com a His268 e Ser153. Vale destacar, que o Asp206 foi o único resíduo que não interagiu com os ligantes. Além disso, como foi supracitado, é possível observar um aumento de afinidade energética entre o ligante e sítio catalítico com o aumento da cadeia carbônica do ligante, isso ocorre pois esse aumento no

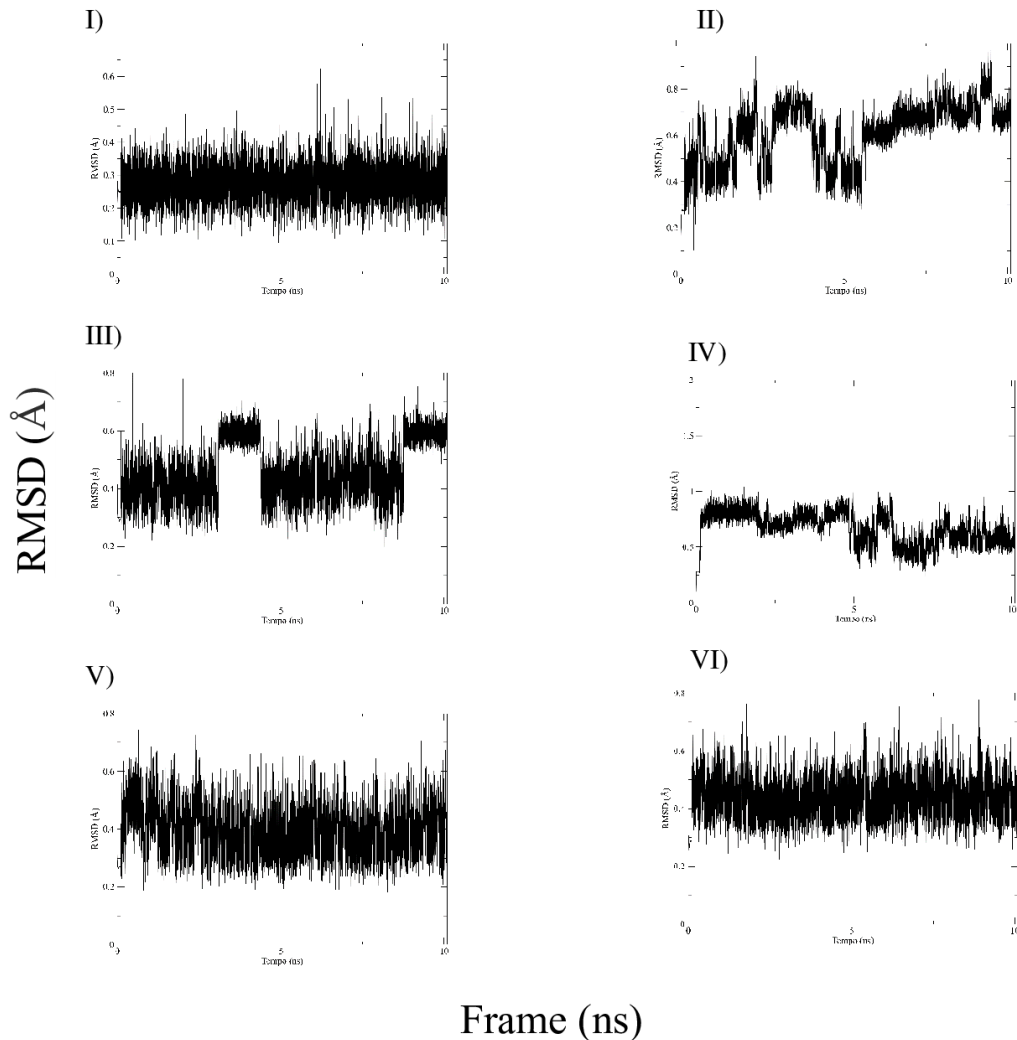
número de átomos amplia o número de interações entre o ligante e a enzima, como pode ser visto na Figura 11 (BRANDÃO et al., 2021). O resíduo da região oxianion Leu154 interagiram diretamente com todos os ligantes, em sua grande maioria, a partir de forças de Van der Waals. Como foi citado, o ligante VI apresentou maior afinidade energética. Em geral, as interações de Van der Waals apresentam baixa energia de ligação. Contudo, a junção de diversas forças de Van der Waals confere uma força estabilizadora aos complexos proteína-proteína e proteína-ligante (FATMA et al., 2021). Na maioria das vezes, as primeiras interações entre a enzima e o substrato são não covalentes, ou seja, são interações eletrostáticas, de Van der Waals, hidrofóbicas, dentre outras. Com isso, a formação dessas interações irão favorecer a ocorrência de reação (BRONOWSKA, 2011; QIN; ZHONG; WANG, 2021; WILLIAMS; WESTWELL, 1998).

### **5.4.3 Simulações de dinâmica molecular**

#### **5.4.3.1 Root Mean Square Deviation – RMSD**

Observou-se que os ligantes estudados foram acomodados com êxito no sítio catalítico da lipase Eversa<sup>®</sup> (GUIMARÃES et al., 2021). Deste modo, por meio dos complexos lipase-ligantes (I-VI), foram realizados estudos de simulação com o intuito de avaliar não só as mudanças conformacionais da enzima, mas como também, a sua estabilidade após cada mudança conformacional. A Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos complexos lipase-ligante, foram empregadas com o intuito de avaliar as extensões na qual ocorre mudanças conformacionais na molécula estudada, durante o tempo de simulação. A figura 12 expõe os comportamentos *RMSD* dos complexos estudados na etapa de estabilização.

Figura 12 - Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD), em relação à conformação inicial dos complexos versus o tempo de simulação (ns) na etapa de equilíbrio. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4

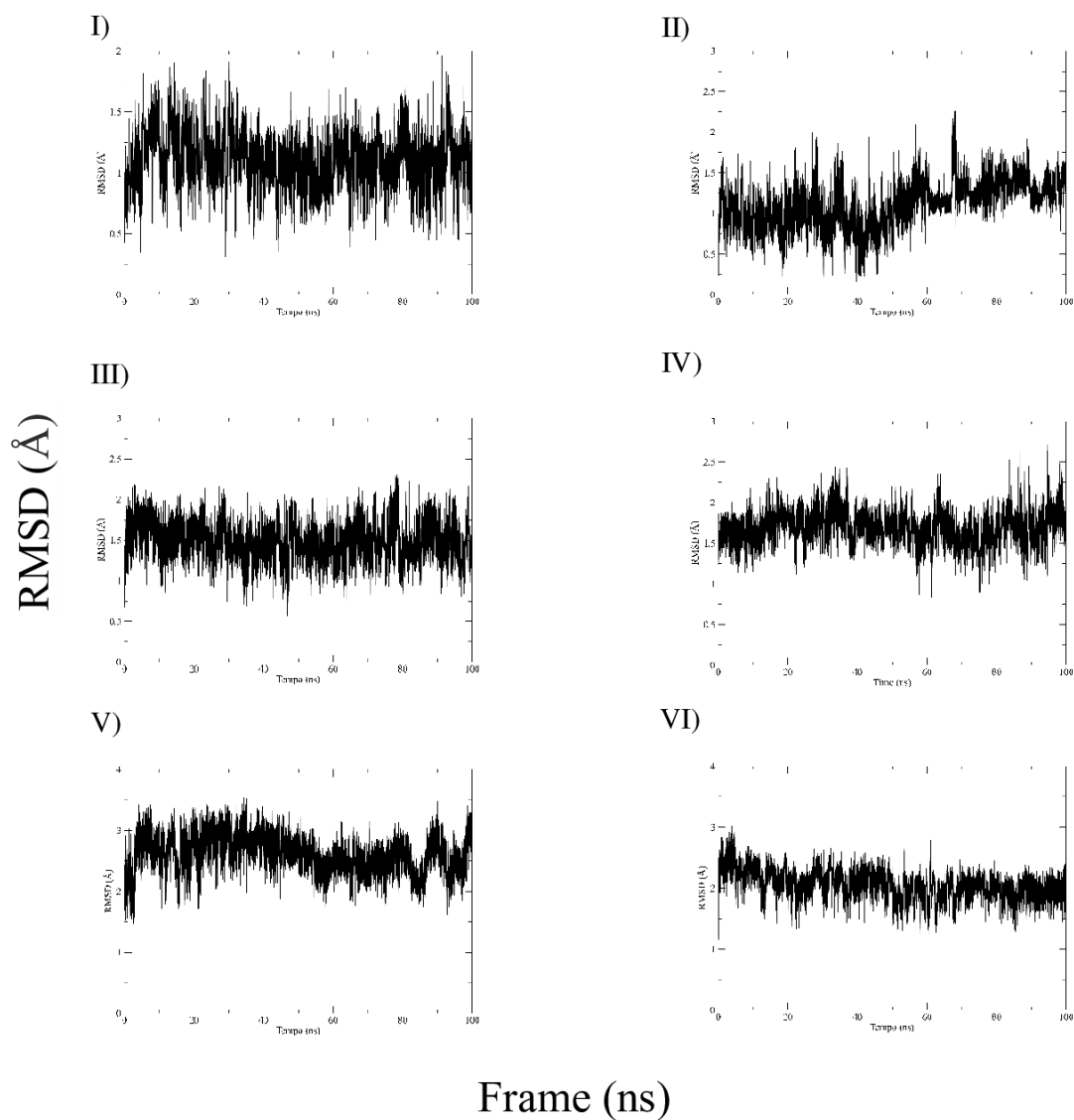


Fonte: elaborado pelo autor.

A partir das simulações de equilíbrio dos complexos lipase-ligante no solvente, foi possível obter informações preliminares do comportamento das conformações para a dinâmica. Antes da estabilização, é realizada uma etapa de minimização com o intuito de remover possíveis tensões existentes no arranjo inicial (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Logo após, é realizada a fase de equilíbrio com o objetivo de posicionar o sistema em estado de equilíbrio termodinâmico (HILDEBRAND; ROSE; TIEMANN, 2019). Essas etapas são de suma importância para a remoção de interações repulsivas e de Van der Waals que possam estar presentes no sistema. Caso seja mantida essas interações, pode haver alterações estruturais no

local, interferindo de maneira direta na simulação (JOSHI et al., 2020). Nesta etapa foi observado que os valores de estabilização de RMSD dos ligantes estudados oscilaram entre 0,25 e 1,0 Å, no tempo avaliado. Esses baixos valores de RMSD podem estar associados a movimentação dos íons e solvente do sistema, em relação a conformação inicial dos complexos. A figura 13 expõe os resultados obtidos na etapa de produção.

Figura 13 - Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD), em relação à conformação inicial do complexo versus o tempo de simulação (ns) na etapa de produção. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4



Fonte: elaborado pelo autor.

Observa-se que os valores de estabilização de *RMSD* da etapa de produção, variaram entre 0,5 e 3,5 Å, no tempo analisado. Conforme a figura 13, os Ligante I, II, III e IV, (ácidos, octanóico, decanoico, dodecanoico e tetradecanoico respectivamente) apresentaram, em média, valores de *RMSD* abaixo de 2,0 Å. Já os Ligantes V e VI (hexadecanoico e cis-9-octadecenoico, respectivamente) apresentaram valores por volta de 3,0 Å. Logo, conclui-se que não houve grandes modificações conformacionais dos complexos estudados durante os períodos de simulação (JOSHI et al., 2020). Com isso, os resultados teóricos e experimentais expostos nesse trabalho, indicam que os ácidos graxos advindos do óleo de babaçu formam complexos estáveis com o sítio catalítico da Eversa (Ser 153, His 268 e Asp 206), o que corrobora os dados obtidos experimentalmente e valida a aplicação da Eversa como biocatalisador na produção de esteres metílicos.

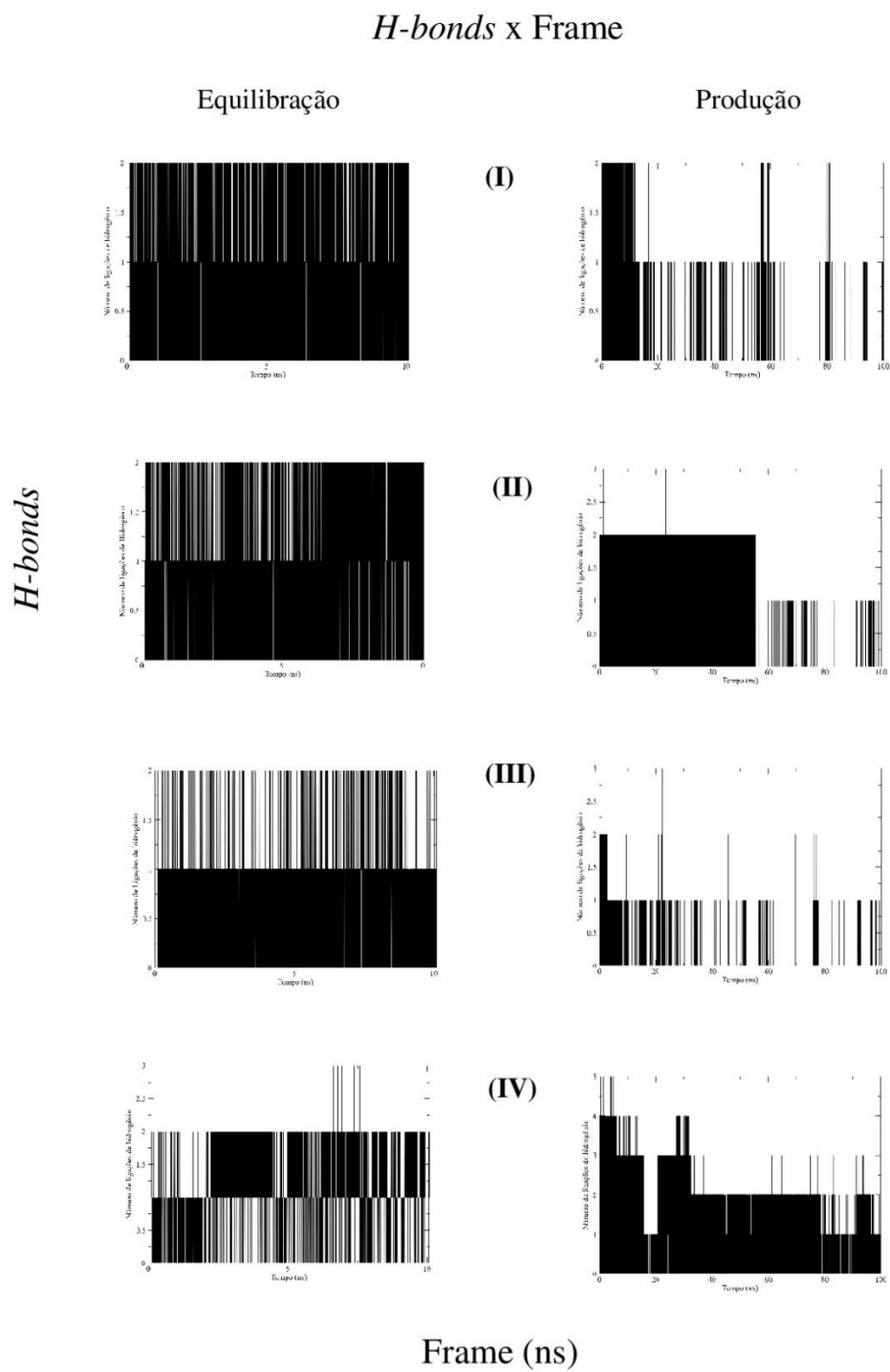
Vale destacar, que os dados apresentados neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Qin, Zhong e Wang (2021). Os autores avaliaram a afinidade e estabilidade molecular de diferentes ácidos graxos (ácidos octanóico, tetradecanoico, octadecanoico, cis-9-octadecenoico, (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico e (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico) com a T1 lipase de *Geobacillus zaliha*. Assim como no presente trabalho, os autores observaram que dentre os complexos estudados, o ácido cis-9-octadecenoico apresentou um dos maiores valores de *RMSD* e, por conseguinte, uma das menores estabilidade quando comparado aos demais complexos (QIN; ZHONG; WANG, 2021).

#### 5.4.3.2 Ligações de hidrogênio

Outra análise realizada, refere-se ao número de ligações de hidrogênio intermoleculares, uma vez que essas ligações são de grande importância para a estabilidade do complexo. A Figura 14, elucida as ligações de hidrogênio formadas entre os ligantes e a lipase nas etapas de equilíbrio e produção.



Figura 14 - Ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o ligante durante as duas etapas de simulação. Os índices numéricos referem-se à ordem apresentada na Tabela 4





diferença entre um processo dinâmico (dinâmica molecular) e estático (docking molecular) (FATMA et al., 2021).

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado a produção biocatalítica de biodiesel da composição lipídica babaçu por meio da hidroesterificação enzimática. Esse processo apresenta diversas vantagens em relação aos processos convencionais, pois permite a aplicação de qualquer matéria-prima (óleo vegetal, gordura animal e óleo residuais) independente do seu nível de umidade e acidez. A hidrólise enzimática proposta, foi realizada com sucesso, visto que houve um aumento no índice acidez do óleo de 0,75 para 127,03 mgNaOH/g.

Na otimização da produção de ésteres de babaçu foi utilizado um planejamento Taguchi de matriz ortogonal L9. A análise de variância dos fatores relacionados ao processo (ANOVA), expôs que a porcentagem de biocatalisador contribuiu de maneira significativa no processo (67,80%) com *p-value* 0,043. Nas condições ótimas (5 h, 40 °C, razão molar AGL/álcool 1:5 e 0,9% de biocatalisador) a conversão teórica foi de 98,64%. Após a realização da reação proposta, notou-se uma conversão de 95,76% que foi validada pela análise cromatográfica seguindo a norma EM 14103. A diferença de resultado entre a conversão teórica e a reação real, pode ser explicada devida a influência de fatores externos no sistema. Os resultados de viscosidade cinemática e densidade indicam que o biodiesel produzido tem potencial para aplicações futuras.

A modelagem da Eversa® transform 2.0 foi validada pelo gráfico de Ramachandran, onde apresentou 91,5% dos resíduos da em regiões favoráveis. Além disso, o modelo obtido apresentou pontuação média 3D-1D  $\geq 0,2$  de 93,71% na função *Verify 3D* comprovando a compatibilidade do modelo atômico com a sequência. Deste modo, a enzima modelada mostrou-se valida e adequada para estudos posteriores.

Os resultados de docking molecular sugerem que os ligantes estudados apresentaram afinidade energética com o sítio catalítico da enzima. Foi possível observar que todos os ligantes estudados interagiram diretamente com o sítio catalítico e com a cavidade oxianion. Através desses resultados, gerou-se os complexos que foram avaliados em simulações de dinâmica molecular.

Por meio da dinâmica molecular, foi possível observar que os complexos formados apresentaram alta estabilidade durante as etapas de equilíbrio e produção. Os complexos enzima-substrato apresentaram baixos valores de *RMSD*, esses resultados indicam que as poses escolhidas foram apropriadas para o estudo. Os gráficos de ligações de hidrogênio expuseram que os complexos formados demonstraram estabilidade. Ademais, os resultados teóricos e experimentais expostos nesse trabalho, indicam que os ácidos graxos advindos do óleo de

babaçu formam complexos estáveis com o sítio catalítico da Eversa (Ser 153, His 268 e Asp 206), o que valida a aplicação da Eversa como biocatalisador na produção de esteres metílicos.

## REFERÊNCIAS

- ABDELSATTAR, Abdallah S.; DAWOUD, Alyaa; HELAL, Mohamed A. Interaction of nanoparticles with biological macromolecules: a review of molecular docking studies. **Nanotoxicology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 66–95, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17435390.2020.1842537>. Acesso em: 16 mar. 2022.
- ABUDU, Hermas; SAI, Rockson. Examining prospects and challenges of Ghana's petroleum industry: A systematic review. **Energy Reports**, [S. l.], v. 6, p. 841–858, 2020.
- ADEWALE, Peter; VITHANAGE, Lakmali Nilmini; CHRISTOPHER, Lew. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 154, p. 81–91, 2017.
- AGHBASHLO, Mortaza; PENG, Wanxi; TABATABAEI, Meisam; KALOGIROU, Soteris A.; SOLTANIAN, Salman; HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, Homa; MAHIAN, Omid; LAM, Su Shiung. Machine learning technology in biodiesel research: A review. **Progress in Energy and Combustion Science**, [S. l.], v. 85, p. 100904, 2021.
- ALEMAN-RAMIREZ, J. L.; MOREIRA, Joel; TORRES-ARELLANO, S.; LONGORIA, Adriana; OKOYE, Patrick U.; SEBASTIAN, P. J. Preparation of a heterogeneous catalyst from moringa leaves as a sustainable precursor for biodiesel production. **Fuel**, [S. l.], v. 284, p. 118983, 2021.
- ALEXANDRE, Jeferson Yves Nunes Holanda et al. A Theoretical and Experimental Study for Enzymatic Biodiesel Production from Babassu Oil (*Orbignya sp.*) Using Eversa Lipase. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1322, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/12/11/1322/htm>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- ALONSO, Hernán; BLIZNYUK, Andrey A.; GREASY, Jill E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.20067>. Acesso em: 16 mar. 2022.
- ALTSCHUL, Stephen F.; GISH, Warren; MILLER, Webb; MYERS, Eugene W.; LIPMAN, David J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Acesso em: 5 mar. 2022.
- AMARO, Rommie E.; MULHOLLAND, Adrian J. Multiscale methods in drug design bridge chemical and biological complexity in the search for cures. **Nature Reviews Chemistry**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 1–12, 2018.. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41570-018-0148>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- AMERI, Atefeh; SHAKIBAIE, Mojtaba; KHOOBI, Mehdi; FARAMARZI, Mohammad Ali; AMERI, Alieh; FOROOTANFAR, Hamid. Immobilization of Thermoalkalophilic Lipase from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 on Amine-Modified Graphene Oxide Nanostructures: Statistical Optimization and Its Application for Pentyl Valerate Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 191, n. 2, p. 579–604, 2020.

ANAND KUMAR, S. A.; SAKTHINATHAN, G.; VIGNESH, R.; RAJESH BANU, J.; AL-MUHTASEB, Ala'a H. Optimized transesterification reaction for efficient biodiesel production using Indian oil sardine fish as feedstock. **Fuel**, [S. l.], v. 253, p. 921–929, 2019.

ARANA-PEÑA, Sara; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLLING, Roberto; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCÁNTARA, Andrés R.; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not? **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 51, p. 107584, 2021.

ARANA-PEÑA, Sara; LOKHA, Yuliya; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts** 2018, Vol. 8, Page 511, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 511, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/11/511/htm>. Acesso em: 27 jun. 2022.

ASHKAN, Zahra; HEMMATI, Roohullah; HOMAELI, Ahmad; DINARI, Ali; JAMLIDOOST, Marzieh; TASHAKOR, Amin. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 168, p. 708–721, 2021.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. Abdul. Biodiesel separation and purification: A review. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 437–443, 2011.

AWOGBEMI, Omojola; KALLON, Daramy Vandi Von; AIGBODION, Victor Sunday. Trends in the development and utilization of agricultural wastes as heterogeneous catalyst for biodiesel production. **Journal of the Energy Institute**, [S. l.], v. 98, p. 244–258, 2021.

BABAKI, Mohadese; YOUSEFI, Maryam; HABIBI, Zohreh; MOHAMMADI, Mehdi. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 105, p. 465–472, 2017.

BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, [S. l.], v. 479, p. 110607, 2019.

BEDOYA, Oscar F.; TISCHER, Irene. Detección de homología remota de proteínas usando modelos 3D enriquecidos con propiedades fisicoquímicas. **Ingeniería Y Competitividad**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 75–84, 2015.

BELL, Elizabeth L. et al. Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s43586-021-00044-z>. Acesso em: 5 mar. 2022.

BEN HLIMA, Hajer; DAMMAK, Mouna; KARRAY, Aida; DRIRA, Maroua; MICHAUD, Philippe; FENDRI, Imen; ABDELKAFI, Slim. Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. **Marine drugs**, [S. l.], v. 19, n. 2, 2021.

BÖHM, Hans Joachim. Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 309–309, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007999920146>. Acesso em: 16 mar. 2022.

BONAZZA, Horacio L.; MANZO, Ricardo M.; DOS SANTOS, José C. S.; MAMMARELLA, Enrique J. Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 182–196, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-017-2546-9>. Acesso em: 5 mar. 2022.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRANDÃO, Luma M. de S.; BARBOSA, Milson S.; SOUZA, Ranyere L.; PEREIRA, Matheus M.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M. F. Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. e3064, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/btpr.3064>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BRONOWSKA, Agnieszka K. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design. **Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/21844>. Acesso em: 18 mar. 2022.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.21287>. Acesso em: 4 jul. 2022.

CACICEDO, Maximiliano L.; MANZO, Ricardo M.; MUNICOY, Sofia; BONAZZA, Horacio L.; ISLAN, German A.; DESIMONE, Martín; BELLINO, Martín; MAMMARELLA, Enrique J.; CASTRO, Guillermo R. Immobilized Enzymes and Their Applications. **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology**, [S. l.], p. 169–200, 2019.

CAO, Minghe; PENG, Libo; XIE, Qinglong; XING, Kainan; LU, Meizhen; JI, Jianbing. Sulfonated *Sargassum horneri* carbon as solid acid catalyst to produce biodiesel via esterification. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 324, p. 124614, 2021.

CARVALHO, Wagner C. A.; LUIZ, Jaine H. H.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; HIRATA, Daniela B.; MENDES, Adriano A. Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0) as heterogeneous catalyst. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 155, 2021.

CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, [S. l.], v. 288, p. 119577, 2021.



CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares; DA FONSECA, Aluisio Marques; HOLANDA ALEXANDRE, Jeferson Yves Nunes; DOS SANTOS, José C. S. A stepwise docking and molecular dynamics approach for enzymatic biolubricant production using Lipase Eversa® Transform as a biocatalyst. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 187, p. 115450, 2022.

CEN, Yixin; SINGH, Warispreet; ARKIN, Mamatjan; MOODY, Thomas S.; HUANG, Meilan; ZHOU, Jiahai; WU, Qi; REETZ, Manfred T. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 215–216, p. 491–499, 2013.

CHANG, Mun Yuen; CHAN, Eng Seng; SONG, Cher Pin. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel**, [S. l.], v. 283, 2021.

CHAPMAN, Jordan; ISMAIL, Ahmed E.; DINU, Cerasela Zoica. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 238, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/6/238/htm>. Acesso em: 5 mar. 2022.

CHAVAN, Shivanand; GAIKWAD, Ashwin. Optimization of enzymatic hydrolysis of bamboo biomass for enhanced saccharification of cellulose through Taguchi orthogonal design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 104807, 2021.

CHEATHAM, T. E.; MILLER, J. L.; FOX, T.; DARDEN, T. A.; KOLLMAN, P. A. Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 1, 1995.

COSTA, Matheus J.; SILVA, Milena R. L.; FERREIRA, Eric E. A.; CARVALHO, Ana Karine F.; BASSO, Rodrigo C.; PEREIRA, Ernandes B.; DE CASTRO, Heizir F.; MENDES, Adriano A.; HIRATA, Daniela B. Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [S. l.], v. 157, p. 108131, 2020.

DA S. MOREIRA, Katerine et al. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 177, p. 223–244, 2022.

DA SILVA, Josany Saibrosa; DOS SANTOS, Mirian Lima; DA SILVA FILHO, Edson Cavalcante; CARVALHO, Maria das Graças Freire de Medeiros; NUNES, Lívio César Cunha. Subprodutos do babaçu (*Orbignya sp*) como novos materiais adsorptivos: uma revisão. **Matéria**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rmat/a/D9fKRLkP8w66CKWcmTBJJQx/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 20 jul. 2022.

DANYLIV, Andriy; GLANVILLE, Julie; MCCOOL, Rachael; FERREIRA, Alberto; SKELLY, Adrian; JACOB, Ruth Pulikottil. The Clinical Effectiveness of Ranibizumab Treat and Extend Regimen in nAMD: Systematic Review and Network Meta-Analysis. **Advances in Therapy**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 611–619, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12325-017-0484-0>. Acesso em: 7 jul. 2022.

DENG, Yuqing; ROUX, Benoît. Computations of standard binding free energies with molecular dynamics simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 113, n. 8, p. 2234–2246, 2009.

DIAS, Raquel; DE AZEVEDO JR., Walter. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1040–1047, 2008.

DING, Hui; YE, Wei; WANG, Yongqiang; WANG, Xianqin; LI, Lujun; LIU, Dan; GUI, Jianzhou; SONG, Chunfeng; JI, Na. Process intensification of transesterification for biodiesel production from palm oil: Microwave irradiation on transesterification reaction catalyzed by acidic imidazolium ionic liquids. **Energy**, [S. l.], v. 144, p. 957–967, 2018.

DOS PASSOS GOMES, Gabriel; POLLICE, Robert; ASPURU-GUZYK, Alán. Navigating through the Maze of Homogeneous Catalyst Design with Machine Learning. **Trends in Chemistry**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 96–110, 2021.

DOS SANTOS, Alessio Moreira; MITJA, Danielle; DELAÎTRE, Eric; DEMAGISTRI, Laurent; DE SOUZA MIRANDA, Izildinha; LIBOUREL, Thérèse; PETIT, Michel. Estimating babassu palm density using automatic palm tree detection with very high spatial resolution satellite images. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 193, p. 40–51, 2017.

DOS SANTOS, Jose C. S.; RUEDA, Nazzoly; SANCHEZ, Alfredo; VILLALONGA, Reynaldo; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c5ra03798k>. Acesso em: 5 mar. 2022.

EL KHALIDI, Zahira; HARTITI, Bouchaib; FADILI, Salah; THEVENIN, Philippe. Nickel oxide optimization using Taguchi design for hydrogen detection. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 43, n. 27, p. 12574–12583, 2018.

ELGHARBAWY, Amal A.; RIYADI, Fatimah Azizah; ALAM, Md Zahangir; MONIRUZZAMAN, Muhammad. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 251, p. 150–166, 2018.

EMMERICH, F. G.; DE SOUSA, J. C.; TORRIANI, I. L.; LUENGO, C. A. Applications of a granular model and percolation theory to the electrical resistivity of heat treated endocarp of babassu nut. **Carbon**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 417–424, 1987.

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 83–89, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40484-019-0172-y>. Acesso em: 16 mar. 2022.

FATIH DEMIRBAS, M. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, [S. l.], v. 86, n. SUPPL. 1, p. S151–S161, 2009.

FATMA, Tehsin; ZAFAR, Zeeshan; FATIMA, Sidra; PARACHA, Rehan Zafar; ADNAN, Fazal; SHEIKH, Zeshan; VIRK, Nasar; BHATTI, Muhammad Faraz. Computational Assessment of *Botrytis cinerea* Lipase for Biofuel Production. **Catalysts**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1319, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/11/1319/htm>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 43–49, 2004.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FERREIRA MOTA, Gabrielly et al. Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. **Algal Research**, [S. l.], v. 62, p. 102616, 2022.

FERREIRA-LEITÃO, Viridiana Santana; CAMMAROTA, Magali Christe; AGUIEIRAS, Erika Cristina Gonçalves; DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; FREIRE, Denise Maria Guimarães. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 9, 2017. DOI: 10.3390/CATAL7010009. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/7/1/9/htm>. Acesso em: 5 mar. 2022.

FIELD, Martin J.; ALBE, Marc; BRET, Céline; PROUST-DE MARTIN, Flavien; THOMAS, Aline. The Dynamo Library for Molecular Simulations Using Hybrid Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 1088–1100, 2000.

FIGUEREDO, Igor De M.; RIOS, M. Alexandra De S.; CAVALCANTE, Célio L.; LUNA, F. Murilo T. Effects of Amine and Phenolic Based Antioxidants on the Stability of Babassu Biodiesel Using Rancimat and Differential Scanning Calorimetry Techniques. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 18–24, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.iecr.9b05209>. Acesso em: 20 abr. 2022.

FILHO, Danielle Gonçalves; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2019 103:18, [S. l.], v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10027-6>. Acesso em: 5 mar. 2022.

GAUTHIER, Jeff; VINCENT, Antony T.; CHARETTE, Steve J.; DEROME, Nicolas. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/bib/article/20/6/1981/5066445>. Acesso em: 5 mar. 2022.

GHOSH, Subhadip; SOMASUNDAR, Ambika; SEN, Ayusman. Enzymes as Active Matter. **Annual reviews**, [S. l.], v. 12, p. 177–200, 2021. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-conmatphys-061020-053036>. Acesso em: 5 mar. 2022.

GOH, Brandon Han Hoe; ONG, Hwai Chyuan; CHEAH, Mei Yee; CHEN, Wei Hsin; YU, Kai Ling; MAHLIA, Teuku Meurah Indra. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 107, p. 59–74, 2019. DOI: 10.1016/J.RSER.2019.02.012. Acesso em: 4 mar. 2022.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-013-0130-2>. Acesso em: 16 mar. 2022.

GUIMARÃES, José Renato; MIRANDA, Letícia Passos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 193, 2021.

HANSSON, Tomas; OOSTENBRINK, Chris; VAN GUNSTEREN, Wilfred F. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 190–196, 2002.

HANWELL, Marcus D.; CURTIS, Donald E.; LONIE, David C.; VANDERMEERSCHD, Tim; ZUREK, Eva; HUTCHISON, Geoffrey R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 1–17, 2012. Disponível em: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-4-17>. Acesso em: 6 mar. 2022.

HESS, Berk; BEKKER, Henk; BERENDSEN, Herman J. C.; FRAAIJE, Johannes G. E. M. LINC: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HILDEBRAND, Peter W.; ROSE, Alexander S.; TIEMANN, Johanna K. S. Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 44, n. 11, p. 902–913, 2019.

HOANG, Anh Tuan; ONG, Hwai Chyuan; FATTAH, I. M. Rizwanul; CHONG, Cheng Tung; CHENG, Chin Kui; SAKTHIVEL, R.; OK, Yong Sik. Progress on the lignocellulosic biomass pyrolysis for biofuel production toward environmental sustainability. **Fuel Processing Technology**, [S. l.], v. 223, p. 106997, 2021.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JACKSON, Frank L.; LONGENECKER, Herbert E. The fatty acids and glycerides of babassu oil. **Oil & Soap** **1944** **21:3**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 73–75, 1944. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02568011>. Acesso em: 4 mar. 2022.

JAKHAR, Ritu; DANGI, Mehak; KHICHI, Alka; CHHILLAR, Anil Kumar. Relevance of Molecular Docking Studies in Drug Designing. **Current Bioinformatics**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 270–278, 2019.

JHA, B. K.; SVENSSON, M.; KRONBERG, B.; HOLMBERG, K. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 213, n. 1, p. 262–264, 1999.

JO, Sunhwan; JIANG, Wei; LEE, Hui Sun; ROUX, Benoît; IM, Wonpil. CHARMM-GUI ligand binder for absolute binding free energy calculations and its application. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 267–277, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ci300505n>. Acesso em: 4 jul. 2022.

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

JOSHI, Tushar; JOSHI, Tanuja; SHARMA, Priyanka; CHANDRA, Subhash; PANDE, Veena. Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 823–840, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2020.1719200>. Acesso em: 4 jul. 2022.

KASIRAJAN, Ramachandran. Biodiesel production by two step process from an energy source of *Chrysophyllum albidum* oil using homogeneous catalyst. **South African Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 37, p. 161–166, 2021.

KASSON, Peter M.; JHA, Shantenu. Adaptive ensemble simulations of biomolecules. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 52, p. 87–94, 2018.

KHOOBBAKHT, Golmohammad; KHEIRALIPOUR, Kamran; YUAN, Wenqiao; SEIFI, Mohammad Reza; KARIMI, Mahmoud. Desirability function approach for optimization of enzymatic transesterification catalyzed by lipase immobilized on mesoporous magnetic nanoparticles. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 158, p. 253–262, 2020.

KNOTHE, Gerhard; STEIDLEY, Kevin R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, [S. l.], v. 84, n. 9, p. 1059–1065, 2005.

KROVAT, E.; STEINDL, T.; LANGER, T. Recent Advances in Docking and Scoring. **Current Computer Aided-Drug Design**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 93–102, 2006.

KUMAR, Amit; DAW, Prosenjit; MILSTEIN, David. Homogeneous Catalysis for Sustainable Energy: Hydrogen and Methanol Economies, Fuels from Biomass, and Related Topics. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 122, n. 1, p. 385–441, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.1c00412>. Acesso em: 14 nov. 2022.

LAN, Dongming; ZHAO, Ge; HOLZMANN, Nicole; YUAN, Shuguang; WANG, Jia; WANG, Yonghua. Structure-Guided Rational Design of a Mono- And Diacylglycerol Lipase from *Aspergillus oryzae*: A Single Residue Mutant Increases the Hydrolysis Ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 69, n. 18, p. 5344–5352, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.1c00913>. Acesso em: 18 mar. 2022.

LEE, Adam F.; BENNETT, James A.; MANAYIL, Jinesh C.; WILSON, Karen. Heterogeneous catalysis for sustainable biodiesel production via esterification and transesterification. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 43, n. 22, p. 7887–7916, 2014.

LEE, Jumin et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 405–413, 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jctc.5b00935>. Acesso em: 4 jul. 2022.

LI, Shiqian; ZHONG, Lian; WANG, Han; LI, Jin; CHENG, Huali; MA, Qimin. Process optimization of polyphenol oxidase immobilization: Isotherm, kinetic, thermodynamic and removal of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 185, p. 792–803, 2021.

LI, Ying; HU, Shuanglan; CHENG, Jianhua; LOU, Wenyong. Acidic ionic liquid-catalyzed esterification of oleic acid for biodiesel synthesis. **Chinese Journal of Catalysis**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 396–406, 2014.

LIU, Zhifeng et al. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, [S. l.], v. 203, p. 139–150, 2018.

MA, Fangrui; HANNA, Milford A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 1–15, 1999.

MAHMOOD KHAN, Haris; IQBAL, Tanveer; HAIDER ALI, Chaudhry; JAVAID, Ansar; IQBAL CHEEMA, Izzat. Sustainable biodiesel production from waste cooking oil utilizing waste ostrich (*Struthio camelus*) bones derived heterogeneous catalyst. **Fuel**, [S. l.], v. 277, p. 118091, 2020.

MANAF, Intan Shafinaz Abd; EMBONG, Nurul Hajar; KHAZAAI, Siti Norhafiza Mohd; RAHIM, Mohd Hasbi Ab; YUSOFF, Mashitah M.; LEE, Keat Teong; MANIAM, Gaanty Pragas. A review for key challenges of the development of biodiesel industry. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 185, p. 508–517, 2019.

- MANDARI, Venkatesh; DEVARAI, Santhosh Kumar. Biodiesel Production Using Homogeneous, Heterogeneous, and Enzyme Catalysts via Transesterification and Esterification Reactions: a Critical Review. **BioEnergy Research** 2021, [S. l.], v. 1, p. 1–27, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-021-10333-w>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- MANIGLIA, Bianca Chierogato; TAPIA-BLÁCIDO, Delia R. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 55, p. 47–55, 2016.
- MIRANDA, Leticia Passos; GUIMARÃES, José Renato; GIORDANO, Roberto Campos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. Composites of crosslinked aggregates of eversa® transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, n. 8, 2020.
- MOAZENI, Faegheh; CHEN, Yen Chih; ZHANG, Gaosen. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 216, p. 117–128, 2019.
- MOFIJUR, M.; SIDDIKI, Sk Yasir Arafat; SHUVHO, Md Bengir Ahmed; DJAVANROODI, F.; FATTAH, I. M. Rizwanul; ONG, Hwai Chyuan; CHOWDHURY, M. A.; MAHLIA, T. M. I. Effect of nanocatalysts on the transesterification reaction of first, second and third generation biodiesel sources- A mini-review. **Chemosphere**, [S. l.], v. 270, p. 128642, 2021.
- MOHADESI, Majid; AGHEL, Babak; MALEKI, Mahmoud; ANSARI, Ahmadreza. Production of biodiesel from waste cooking oil using a homogeneous catalyst: Study of semi-industrial pilot of microreactor. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 136, p. 677–682, 2019.
- MOHD HUSSIN, Fathin Najihah Nor; ATTAN, Nursyafreena; WAHAB, Roswanira Abdul. Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 136, p. 109506, 2020.
- MOLINA-GUTIÉRREZ, María; ALCARAZ, Lorena; LÓPEZ, Félix A.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, Leonor; MARTÍNEZ, María Jesús; PRIETO, Alicia. Immobilized Forms of the *Ophiostoma piceae* Lipase for Green Synthesis of Biodiesel. Comparison with Eversa Transform 2.0 and Cal A. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 822, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/10/822/htm>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- MONTEIRO, Rodolpho R. C.; ARANA-PEÑA, Sara; DA ROCHA, Thays N.; MIRANDA, Leticia P.; BERENQUER-MURCIA, Ángel; TARDIOLI, Paulo W.; DOS SANTOS, José C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, [S. l.], v. 164, p. 1566–1587, 2021.
- MOREIRA, Katerine da S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, 2020.

MOREIRA, Katerine S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya sp.*) via RSM. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 414, 2020. b. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/4/414/htm>. Acesso em: 5 mar. 2022.

MORRIS, Garrett M.; RUTH, Huey; LINDSTROM, William; SANNER, Michel F.; BELEW, Richard K.; GOODSELL, David S.; OLSON, Arthur J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.21256>. Acesso em: 5 mar. 2022.

MOSAROF, M. H.; KALAM, M. A.; MASJUKI, H. H.; ASHRAFUL, A. M.; RASHED, M. M.; IMDADUL, H. K.; MONIRUL, I. M. Implementation of palm biodiesel based on economic aspects, performance, emission, and wear characteristics. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 105, p. 617–629, 2015.

MOSTAFA MARZOUK, Nermein; ABO EL NAGA, Ahmed O.; YOUNIS, Sherif A.; SHABAN, Seham A.; EL TORGOMAN, Abdel Monem; EL KADY, Fathy Y. Process optimization of biodiesel production via esterification of oleic acid using sulfonated hierarchical mesoporous ZSM-5 as an efficient heterogeneous catalyst. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 105035, 2021.

MUANRUKSA, Papananee; KAEWKANNETRA, Pakawadee. Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 146, p. 901–906, 2020.

MUKHTAR, Ahmad et al. Current status and challenges in the heterogeneous catalysis for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 157, p. 112012, 2022.

MUÑIZ, Jesús; CASTILLO, Roger; ROBLES, José B.; SANSORES, Enrique. Density functional theory study of the reactivity and electronic structure of the transesterification of triacetin in biodiesel production via a sulfated zirconia heterogeneous catalysis. **International Journal of Quantum Chemistry**, [S. l.], v. 116, n. 13, p. 988–999, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/qua.25116>. Acesso em: 4 mar. 2022.

PADJADJARAN, Universitas. Characteristics, immobilization, and application of *Candida rugosa* lipase: a review Syamsul Huda Characteristics, immobilization, and application of *Candida rugosa* lipase: a review. **Journal homepage**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 1391–1401, 2020.

PAGADALA, Nataraj S.; SYED, Khajamohiddin; TUSZYNSKI, Jack. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews** 2017 9:2, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-016-0247-1>. Acesso em: 16 mar. 2022.

PATEL, Ashok; AGRAWAL, Basant; RAWAL, B. R. Pyrolysis of biomass for efficient extraction of biofuel. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, [S. l.], v. 42, n. 13, p. 1649–1661, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15567036.2019.1604875>. Acesso em: 4 mar. 2022.



PELLIS, Alessandro; CANTONE, Sara; EBERT, Cynthia; GARDOSI, Lucia. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 40, p. 154–169, 2018.

PENG, Licheng; FU, Dongdong; CHU, Huaqiang; WANG, Zezheng; QI, Huaiyuan. Biofuel production from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [S. l.], v. 18, p. 285–297, 2020.

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; MENG, Elaine C.; COUCH, Gregory S.; CROLL, Tristan I.; MORRIS, John H.; FERRIN, Thomas E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

PHILLIPS, James C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. 044130, 2020. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/5.0014475>. Acesso em: 4 jul. 2022.

PLANAS-IGLESIAS, Joan; MARQUES, Sérgio M.; PINTO, Gaspar P.; MUSIL, Milos; STOURAC, Jan; DAMBORSKY, Jiri; BEDNAR, David. Computational design of enzymes for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 47, p. 107696, 2021.

POIER, Pier Paolo; LAGARDÈRE, Louis; PIQUEMAL, Jean Philip; JENSEN, Frank. Molecular Dynamics Using Nonvariational Polarizable Force Fields: Theory, Periodic Boundary Conditions Implementation, and Application to the Bond Capacity Model. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 6213–6224, 2019.. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jctc.9b00721>. Acesso em: 28 jun. 2022.

POURKARIMI, Sara; HALLAJISANI, Ahmad; ALIZADEHDAKHEL, Asghar; NOURALISHAHI, Amideddin. Biofuel production through micro- and macroalgae pyrolysis – A review of pyrolysis methods and process parameters. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S. l.], v. 142, p. 104599, 2019.

POURZOLFAGHAR, Hamed; ABNISA, Faisal; DAUD, Wan Mohd Ashri Wan; AROUA, Mohamed Kheireddine. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 61, p. 245–257, 2016.

QIN, Xiaoli; ZHONG, Jinfeng; WANG, Yonghua. A mutant T1 lipase homology modeling, and its molecular docking and molecular dynamics simulation with fatty acids. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 337, p. 24–34, 2021.

QU, Pingping; LI, Dongdong; LAZIM, Raudah; XU, Rui; XIAO, Dunchi; WANG, Fei; LI, Xun; ZHANG, Yu. Improved thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase by molecular dynamics simulation and in silico mutation prediction and its application in biodiesel production. **Fuel**, [S. l.], v. 327, p. 125039, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236122018816>. Acesso em: 14 jul. 2022.

RAGUNATHAN, Adhithya; MALATHI, Kullappan; ANBARASU, Anand. MurB as a target in an alternative approach to tackle the *Vibrio cholerae* resistance using molecular docking and simulation study. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 119, n. 2, p. 1726–1732, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.26333>. Acesso em: 4 jul. 2022.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, [S. l.], v. 23, n. C, p. 283–437, 1968.

RAMÍREZ VERDUZCO, Luis Felipe. Density and viscosity of biodiesel as a function of temperature: Empirical models. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 19, p. 652–665, 2013.

REMONATTO, Daniela; MIOTTI, Rodney H.; MONTI, Rubens; BASSAN, Juliana C.; DE PAULA, Ariela Veloso. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 114, p. 1–20, 2022.

REUL, Lizzia T. A.; PEREIRA, Camila A. B.; SOUSA, Fernanda M.; SANTOS, Raquel M.; CARVALHO, Laura H.; CANEDO, Eduardo L. Polycaprolactone/babassu compounds: Rheological, thermal, and morphological characteristics. **Polymer Composites**, [S. l.], v. 40, n. S1, p. E540–E549, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pc.24861>. Acesso em: 4 mar. 2022.

SALGADO, Cleonice Aparecida; DOS SANTOS, Clarissa Isabela Aparecida; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 45, p. 101509, 2022.

SALUJA, Rajesh Kumar; KUMAR, Vineet; SHAM, Radhey. Stability of biodiesel – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 62, p. 866–881, 2016.

SANTOS, Samuel; PUNA, Jaime; GOMES, João. A Review on Bio-Based Catalysts (Immobilized Enzymes) Used for Biodiesel Production. **Energies**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 3013, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1073/13/11/3013/htm>. Acesso em: 5 mar. 2022.

SARAIVA RODRIGUES, Samara Clotildes; SILVA, Alissandra Suime Da; CARVALHO, Laura Hecker De; ALVES, Tatianny Soares; BARBOSA, Renata. Morphological, structural, thermal properties of a native starch obtained from babassu mesocarp for food packaging application. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 15670–15678, 2020.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P. Senthil; VO, Dai Viet N.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; YAASHIKAA, P. R. A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 419, p. 126451, 2021.

SARKAR, Shrabana; BANERJEE, Aparna; CHAKRABORTY, Nibedita; SOREN, Karuna; CHAKRABORTY, Priyanka; BANDOPADHYAY, Rajib. Structural-functional analyses of textile dye degrading azoreductase, laccase and peroxidase: A comparative in silico study. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 43, p. 48–54, 2020.

SARMAH, Nipon; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SEYYEDATTAR, Masoud; ZENDEHBOUDI, Sohrab; BUTT, Stephen. Molecular dynamics simulations in reservoir analysis of offshore petroleum reserves: A systematic review of theory and applications. **Earth-Science Reviews**, [S. l.], v. 192, p. 194–213, 2019.

SHAY, E. Griffin. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 227–242, 1993.

SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 118, n. 2, p. 801–838, 2017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.7b00203>. Acesso em: 5 mar. 2022.

SHOICHET, Brian K.; MCGOVERN, Susan L.; WEI, Binqing; IRWIN, John J. Lead discovery using molecular docking. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 439–446, 2002.

SINGH, Digambar; SHARMA, Dilip; SONI, S. L.; INDA, Chandrapal Singh; SHARMA, Sumit; SHARMA, Pushpendra Kumar; JHALANI, Amit. A Comprehensive Review on 1st-Generation Biodiesel Feedstock Palm Oil: Production, Engine Performance, and Exhaust Emissions. **BioEnergy Research** 2020 14:1, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–22, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-020-10171-2>. Acesso em: 4 mar. 2022.

STAUFENBERG, Gerrit et al. Preparation of activated carbon from babassu endocarp under microwave radiation by physical activation. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 012116, 2018. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/105/1/012116>. Acesso em: 4 mar. 2022.

SUN, Shangde; GUO, Jingjing; CHEN, Xiaowei. Biodiesel preparation from Semen Abutili (*Abutilon theophrasti* Medic.) seed oil using low-cost liquid lipase Eversa® transform 2.0 as a catalyst. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 169, p. 113643, 2021.

SUNDARAMAHALINGAM, M. A. et al. An intensified approach for transesterification of biodiesel from *Annona squamosa* seed oil using ultrasound-assisted homogeneous catalysis reaction and its process optimization. **Fuel**, [S. l.], v. 291, p. 120195, 2021.

TAM, Benjamin; SINHA, Siddharth; WANG, San Ming. Combining Ramachandran plot and molecular dynamics simulation for structural-based variant classification: Using TP53 variants as model. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 18, p. 4033–4039, 2020.

TAMBOLI, Asif S.; WAGHMARE, Pankajkumar R.; KHANDARE, Rahul V.; GOVINDWAR, Sanjay P. Comparative analyses of enzymatic activity, structural study and docking of fungal cellulases. **Gene Reports**, [S. l.], v. 9, p. 54–60, 2017.

TANG, Zo Ee; LIM, Steven; PANG, Yean Ling; ONG, Hwai Chyuan; LEE, Keat Teong. Synthesis of biomass as heterogeneous catalyst for application in biodiesel production: State of the art and fundamental review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 92, p. 235–253, 2018.

TEIXEIRA, Marcos Alexandre. Babassu—A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 32, n. 9, p. 857–864, 2008.

TEMÓTEO, Rafael L.; DA SILVA, Marcio J.; DE ÁVILA RODRIGUES, Fabio; DA SILVA, Wagner F.; DE JESUS SILVA, Deusanilde; OLIVEIRA, Cesar M. A Kinetic Investigation of Triacetin Methanolysis and Assessment of the Stability of a Sulfated Zirconium Oxide Catalyst. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S. l.], v. 95, n. 7, p. 865–874, 2018.. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aocs.12085>. Acesso em: 4 mar. 2022.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], p. NA-NA, 2009.

VAKSER, I. A. Protein docking for low-resolution structures. **Protein Engineering, Design and Selection**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 371–378, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article/8/4/371/1496102>. Acesso em: 16 mar. 2022.

VICENTE, Gemma; MARTÍNEZ, Mercedes; ARACIL, José. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 297–305, 2004.

WAIDYASOORIYA, Hasitha Muthumala; HARIYAMA, Masanori; KASAHARA, Kota; MUTHUMALA WAIDYASOORIYA, Hasitha. An FPGA accelerator for molecular dynamics simulation using OpenCL Medical Information Processing View project An FPGA Accelerator for Molecular Dynamics Simulation Using OpenCL. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311824830>. Acesso em: 5 jul. 2022.

WANCURA, João H. C.; FANTINEL, Antonio L.; UGALDE, Gustavo A.; DONATO, Filipe F.; VLADIMIR DE OLIVEIRA, J.; TRES, Marcus V.; JAHN, Sérgio L. Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 285, p. 124838, 2021.

WANCURA, João H. C.; ROSSET, Daniela V.; MAZUTTI, Marcio A.; UGALDE, Gustavo A.; DE OLIVEIRA, J. Vladimir; TRES, Marcus V.; JAHN, Sérgio L. Improving the soluble lipase-catalyzed biodiesel production through a two-step hydroesterification reaction system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 103, n. 18, p. 7805–7817, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10075-y>. Acesso em: 4 mar. 2022.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 5.6.1–5.6.37, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpbi.3>. Acesso em: 5 mar. 2022.

WILLIAMS, Dudley H.; WESTWELL, Martin S. Aspects of weak interactions. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 57–64, 1998. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1998/cs/a827057z>. Acesso em: 18 mar. 2022.

WU, Shuke; SNAJDROVA, Radka; MOORE, Jeffrey C.; BALDENIUS, Kai; BORNSCHEUER, Uwe T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 88–119, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202006648>. Acesso em: 5 mar. 2022.

YI, Dong; BAYER, Thomas; BADENHORST, Christoffel P. S.; WU, Shuke; DOERR, Mark; HÖHNE, Matthias; BORNSCHEUER, Uwe T. Recent trends in biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 50, n. 14, p. 8003–8049, 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/cs/d0cs01575j>. Acesso em: 5 mar. 2022.

ZHANG, Heng; LI, Hu; PAN, Hu; LIU, Xiaofang; YANG, Kaili; HUANG, Shan; YANG, Song. Efficient production of biodiesel with promising fuel properties from *Koelreuteria integrifoliola* oil using a magnetically recyclable acidic ionic liquid. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 138, p. 45–53, 2017.

ZHANG, Qingqing; FENG, Jianmei; ZHANG, Quanquan; PENG, Xueyuan. Performance prediction and evaluation of the scroll-type hydrogen pump for FCVs based on CFD–Taguchi method. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 44, n. 29, p. 15333–15343, 2019.

ZIĘBA, A.; DRELINKIEWICZ, A.; CHMIELARZ, P.; MATACHOWSKI, L.; STEJSKAL, J. Transesterification of triacetin with methanol on various solid acid catalysts: A role of catalyst properties. **Applied Catalysis A: General**, [S. l.], v. 387, n. 1–2, p. 13–25, 2010.