



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAULO GONÇALVES DE SOUSA JUNIOR

O USO DO GLICEROL PARA A OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO VIA BIOCATALÍSE

FORTALEZA

2023

PAULO GONÇALVES DE SOUSA JUNIOR

O USO DO GLICEROL PARA A OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO VIA BIOCATÁLISE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química.

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

FORTALEZA

2023

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)

- S698u Sousa Junior, Paulo Gonçalves de.
O uso do glicerol para a obtenção de produtos de alto valor agregado via biocatálise / Paulo Gonçalves de Sousa Junior. – 2023.
59 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.
1. Glicerol. 2. Enzima Eversa Transform 2.0. 3. Biocatálise. 4. Método Taguchi.. 5. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 540

PAULO GONÇALVES DE SOUSA JUNIOR

USO DO GLICEROL PARA A OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO VIA BIOCATALÍSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 07/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Alexandra de Sousa Rios
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais.

Aos meus amigos, a família que escolhi.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante todo o mestrado, possibilitando o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Paulo Gonçalves de Sousa e Maria Elisângela Belisário Silva, pelo incentivo dados aos meus estudos.

Aos meus familiares, em especial à minha tia Eliane que sempre me deu apoio para progredir na vida através dos estudos.

Ao Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos pela orientação do trabalho, pela oportunidade de me manter como seu orientando. Pela confiança, paciência, dedicação e por sempre extrair o melhor de cada aluno.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Marcos, Profa. Dra. Fátima e Profa. Dra. Alexandra pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus amigos do LABS-UFC que são uma família para mim. Aos meus amigos da vida que sempre foram meu suporte emocional e acadêmico.

Aos colegas do grupo GENEZ, pela dedicação e compartilhamento de conhecimentos por meio dos vários trabalhos acadêmicos desenvolvidos coletivamente neste período.

Aos professores, profissionais técnico-administrativos e servidores terceirizados dos departamentos de Química Orgânica e Inorgânica e Química Analítica e Físico Química da Universidade Federal do Ceará. Eles são os pilares da formação e permanência dos alunos dos cursos de Química.

RESUMO

Eversa® Transform 2.0 é uma lipase derivada de *Thermomyces lanuginosus* produzida por um gene geneticamente modificado. Possui baixo custo de produção, alta especificidade de substrato e alta atividade catalítica em síntese orgânica. O glicerol é um subproduto da indústria de biodiesel, neste trabalho é usado como substrato para a obtenção dos glicerídeos. O método Taguchi foi utilizado para avaliar as melhores condições para a esterificação enzimática do glicerol com o ácido acético como agente esterificante. Obteve-se um rendimento de 84,8%, nas condições ótimas (temperatura = 40 °C; razão molar glicerol/ácido = 1:1; biocatalisador = 15% l/l; tempo = 12,5 horas). Após a análise estatística, a temperatura foi considerada o parâmetro mais significativo que influenciou a conversão. A técnica de modelagem molecular foi utilizada para gerar um modelo de homologia da enzima, baseado em outras lipases naturais. O Docking molecular, dinâmica molecular e simulações QM/MM foram aplicados para entender o mecanismo de esterificação e os dados termodinâmicos e cinéticos da reação. A etapa de ataque nucleofílico foi identificada como a etapa limitadora dos mecanismos de reação de acilação (13,1 kcal/mol) e desacilação (13,8 e 12,9 kcal/mol). Embora a enzima seja capaz de esterificar todas as hidroxilas do glicerol, os resultados teóricos mostraram que a esterificação dos álcoois primários é termodinamicamente mais favorável (5 kcal/mol), especialmente em temperaturas mais elevadas.

Palavras-chave: Glicerol; enzima Eversa; método Taguchi; *docking* molecular; dinâmica molecular.

ABSTRACT

Eversa® Transform 2.0 is a lipase derived from *Thermomyces lanuginosus* produced by a genetically modified microorganism. It has a low production cost, high substrate specificity, and high catalytic activity in organic synthesis. Glycerol is a subproduct of the biodiesel industry, and in this research, glycerol is used to produce glycerides. The Taguchi method was used to evaluate the best conditions for the enzymatic esterification of glycerol with acetic acid. A yield of 84.8% was obtained, under the optimal conditions (temperature = 40 °C; molar ratio glycerol/acid = 1:1; biocatalyst = 15% w/w; time = 12.5 h). After the statistical analysis, the temperature was found to be the most significant parameter influencing the reaction conversion. A theoretical study was carried out to generate a homology model of the enzyme, based on other natural lipases. Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM simulations were applied to understand the mechanism of esterification and to derive thermodynamic and kinetic data. The nucleophilic attack step was identified as the rate-limiting step for both acylation (13.1 kcal/mol) and deacylation (13.8 and 12.9 kcal/mol) reaction mechanisms. Although the enzyme is capable of esterifying all three alcohol groups of glycerol, the esterification of the primary alcohols is thermodynamically more favorable (5 kcal/mol), especially at higher temperatures.

Keywords: Glycerol; Eversa enzyme; Taguchi method; molecular docking; molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Reação de esterificação de glicerol e ácido acético. São possíveis dois produtos mono-acilados (MAG) e dois produtos di-acilados (DAG), mostrados em (1) e (2), respectivamente. O produto tri-acilado final (TAG) é representado em (3)..... 24
- Figura 2 – Gráficos de superfícies de contorno geradas para avaliar o efeito do parâmetro mais relevante, a temperatura, nas demais variáveis independentes: (a) razão molar (b) carga do biocatalisador e (c) tempo..... 34
- Figura 3 – Gráfico médio das variações para cada parâmetro estudado..... 35
- Figura 4 – Cromatograma dos picos obtidos pelo método isocrático (7:3) metanol/acetonitrila no comprimento de onda de 254 nm..... 36
- Figura 5 – A) Espectros de hidrogênio para a molécula de triacilglicerídeo (TAG), destacando seus sinais e deslocamentos químicos; B) Espectro para o DAG e MAG quirais, destacando alguns de seus picos mais característicos..... 38
- Figura 6 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ^{13}C) dos produtos da reação de esterificação do glicerol..... 39
- Figura 7 – Gráfico de Ramachandran para modelagem por homologia de ET2, mostrando regiões favoráveis e desfavoráveis para alinhamento de resíduos de aminoácidos..... 40
- Figura 8 – Energia dos melhores confôrmeros obtidos nos arquivos de saída da otimização e frequência dos ligantes (1) monogly1; (2) monogly2; (3) digly1; (4) digly2 e (5) trigly..... 41
- Figura 9 – Complexo ET2 com os ligantes (A) monogly1; (B) monogly2 e (C) trigly, obtidos e tratados no programa Pymol. Os 50 ns finais foram utilizados para formar a figura, mostrando a distância dos ligantes ao sítio ativo..... 42

| | |
|--|----|
| Figura 10 – RMSD do complexo ET2 com os ligantes (a) monogly1; (b) monogly2 e (c) trigly, destacando os extremos de energia obtidos anteriormente em resultados de dinâmica molecular..... | 43 |
| Figura 11 – Modelo computacional do ET2 utilizado nos cálculos mecanísticos. A camada MM inclui toda a estrutura da enzima, substratos e moléculas de água explícitas. A camada QM inclui a tríade catalítica da enzima (Ser ₁₅₃ , His ₂₆₈ e Asp ₂₀₆), um segundo resíduo de coordenação (Tyr ₂₉) e as moléculas de substrato..... | 44 |
| Figura 12 – Mecanismo de acilação promovido por ET2 e ácido acético. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre dos estados de transição e intermediários são mostrados em kcal/mol e são relativos à R _A | 45 |
| Figura 13 – Mecanismo de esterificação do álcool primário de glicerol por ET2. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre são mostrados em kcal/mol..... | 46 |
| Figura 14 – Mecanismo de esterificação do álcool secundário de glicerol por ET2. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre são mostrados em kcal/mol..... | 47 |
| Figura 15 – Gráfico de reação considerando Energia Livre de Gibbs e Caminho reacional..... | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Determinação dos níveis experimentais e faixa de parâmetros independentes..... | 22 |
| Tabela 2 – Desenho experimental das reações geradas pelo método Taguchi, valores de conversão e sinal-ruído para cada um dos nove experimentos..... | 30 |
| Tabela 3 – <i>Ranking</i> de variáveis baseado nas respostas médias das relações S/R obtidas..... | 31 |
| Tabela 4 – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para parâmetros que afetam a produção de glicerídeos..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| 3D | Tridimensional |
| ET2 | Eversa ® <i>Transform 2.0</i> |
| MAG | Monoacilgliceróis |
| DAG | Diacilgliceróis |
| TAG | Triacilgliceróis |
| MM | <i>Molecular Mechanics</i> |
| QM | <i>Quantum Mechanics</i> |
| CHARMM | <i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i> |
| DM | Dinâmica molecular |
| NAMD | <i>Nanoscale Molecular Dynamics</i> |
| NpT | <i>Ensemble Isotérmico-isobárico</i> |
| NVT | <i>Ensemble Isotérmico-isovolumétrico</i> |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PDBQT | <i>Protein Data Bank, Partial Charge (Q), Atom Type (T)</i> |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PME | <i>Particle Mash Ewald</i> |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| vdW | <i>Van der Waals</i> |
| VMD | <i>Virtual Molecular Dynamics</i> |
| EPI | Energia Potencial de Interação |
| S/R | Razão sinal-ruído |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------|-----------------------------------|
| © | <i>Copyright</i> |
| ® | Marca Registrada |
| Å | Angström |
| a_i | Aceleração da partícula i |
| ns | Nanosegundos |
| fs | Femtosegundos |
| n | Número de átomos |
| ΔG | Varição da energia livre de Gibbs |
| Ψ | Ângulo diedro impróprio Psi |
| Φ | Ângulo diedro impróprio Phi |
| K_0 | Constante de força angular |
| F_i | Força atuando na partícula i |
| m_i | Massa da partícula i |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 15 |
| 2.1 | Otimização dos parâmetros reacionais com o Método Taguchi | 16 |
| 2.2 | Desenho de estruturas químicas | 16 |
| 2.3 | Ferramentas de bioinformática | 17 |
| 2.3.1 | <i>Discovery Studio</i> [®] | 17 |
| 2.3.2 | <i>Docking molecular</i> | 18 |
| 2.3.3 | <i>Dinâmica molecular</i> | 19 |
| 3 | OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 | Objetivo geral | 21 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 4 | METODOLOGIA | 22 |
| 4.1 | Parâmetros experimentais e análises estatísticas | 22 |
| 4.2 | Procedimento experimental | 23 |
| 4.2.1 | <i>Materiais e métodos</i> | 23 |
| 4.2.2 | <i>Síntese dos ésteres glicerídicos</i> | 24 |
| 4.2.3 | <i>Análise e caracterização do meio reacional</i> | 25 |
| 4.2.3.1 | <i>Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)</i> | 25 |
| 4.2.3.2 | <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> | 26 |
| 4.3 | Estudo <i>in silico</i> | 25 |
| 4.3.1 | <i>Otimização e cálculo de frequência dos ligantes</i> | 25 |
| 4.3.2 | <i>Modelagem da ET2 via homologia</i> | 25 |
| 4.3.3 | <i>Conformações</i> | 26 |
| 4.3.4 | <i>Docking molecular</i> | 27 |
| 4.3.5 | <i>Dinâmica Molecular (DM)</i> | 28 |
| 4.3.6 | <i>Cálculos híbridos de QM/MM</i> | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 | Parâmetros estatísticos | 30 |
| 5.1.1 | <i>Análise da relação sinal-ruído (S/R)</i> | 31 |
| 5.1.2 | <i>Análise de variância (ANOVA)</i> | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1.3 | <i>Gráficos de superfície de contorno</i> | 34 |
| 5.2 | Caracterização do meio reacional | 35 |
| 5.2.1 | <i>HPLC</i> | 35 |
| 5.2.2 | <i>RMN ¹H e ¹³C</i> | 36 |
| 5.3 | Resultados computacionais | 39 |
| 5.3.1 | <i>Modelagem molecular da ET2</i> | 39 |
| 5.3.2 | <i>Docking molecular e simulações de DM</i> | 40 |
| 5.3.3 | <i>Cálculos mecanísticos de QM/MM</i> | 43 |
| 5.3.3.1 | <i>Mecanismo de acilação</i> | 44 |
| 5.3.3.2 | <i>Mecanismo de desacilação</i> | 45 |
| 6 | CONCLUSÃO | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 49 |
| | APÊNDICE A – LISTA DE AMINOÁCIDOS | 59 |

1 INTRODUÇÃO

Ésteres derivados do glicerol apresentam diversas aplicações industriais, como substrato para biolubrificantes, precursores de fármacos e cosméticos, dentre outras diversas finalidades para a síntese orgânica (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012; ZHENG; CHEN; SHEN, 2008). Apesar de serem obtidos naturalmente em gorduras e óleos, os processos que envolvem sua separação levam a baixos rendimentos, o que torna esse método muitas vezes inviável do ponto de vista econômico (TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013). As rotas químicas, utilizando catalisadores convencionais, requerem altas temperaturas e levam a geração de subprodutos (PEARLSON; WOLLERSHEIM; HILEMAN, 2013). O uso de enzimas como catalisadores dessas reações resulta em produtos mais puros, pois apresentam alta eficiência catalítica (MEHMOOD et al., 2021), permitem condições brandas de reação (NETO et al., 2023), o uso de solventes atóxicos, como a água e baixas temperaturas (CAVALCANTE et al., 2021b), além da alta seletividade e especificidade desses biocatalisadores (WU et al., 2021). O emprego da biocatálise vem sendo investigado em muitos trabalhos que visam a produção de compostos com alto valor agregado e aparece como uma alternativa à catálise química, que para este processo, está associada à maiores custos energéticos, tempos reacionais e geração de resíduos nas etapas de separação e purificação dos monoacilglicerídeos (MAG), diacilglicerídeos (DAG) e triacilglicerídeos (TAG), que são usados como matéria-prima de diversos medicamentos, cosméticos, produtos alimentícios e materiais (ROCHA et al., 2021; RODRIGUEZ; BECKMAN, 2020; SOUZA et al., 2020).

Dentre os diversos estudos direcionados à ampliação do uso de lipases em rotas sintéticas e processos industriais, está o uso de formulações enzimáticas solúveis de baixos custos (ALMEIDA et al., 2021). Dentre elas, a Eversa[®] *Transform 2.0* (ET2), uma formulação enzimática geneticamente modificada da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expressa em uma cepa de *Aspergillus oryzae*, foi lançada como um produto economicamente mais acessível e competitivo para o emprego em produções de larga escala (FRAGA et al., 2019). Possui baixo custo de produção (15 \$/kg), conta com 269 resíduos de aminoácidos, apresentando peso molecular equivalente a 31,5 kDa e atividade de 9100 IU/mL (ACHERKI; BOUAID; MARCHETTI, 2022). Da mesma forma que outras lipases naturais, o sítio catalítico da ET2 possui uma tríade catalítica formada por serina (153), histidina (268) e ácido aspártico (206) (BRANDÃO et al., 2021; DING et al., 2019; POLGÁR, 2005a). O sítio ativo do ET2 está localizado em uma cavidade enterrada, protegida do solvente externo, onde apenas substratos com conformações apropriadas e afinidade química pelos resíduos

catalíticos podem se associar e sofrer catálise (CAVALCANTE et al., 2022). Atualmente, sua produção é patenteada pela *Novozymes* e embora venha se mostrando como um biocatalisador mais eficiente que a enzima nativa, o volume de artigos acadêmicos relatando o seu uso ainda é reduzido (CHANG; CHAN; SONG, 2021). Dessa forma, esta lipase também já demonstrou um alto potencial de aplicação em reações de hidrólise de ácidos graxos, além de serem usadas em sínteses de triglicerídeos de cadeia longa, esterificações, alcoólise e na produção de biomateriais (GERMANO DE SOUSA et al., 2022a).

A compreensão dos processos enzimáticos pode ser enriquecida pelo conhecimento de detalhes do sistema à nível atômico e molecular (MOREIRA et al., 2020b). Com o avanço e domínio de técnicas computacionais cada vez mais velozes e softwares mais eficazes, a química computacional e a bioinformática consolidaram-se como áreas de pesquisa fundamentais para o entendimento desses processos (CAVALCANTE et al., 2021a). As predições de afinidade, enantioseletividade, ou de possíveis desativações catalíticas, resultantes das interações entre enzima, substrato e solvente, podem ser encontradas e determinadas a partir de análises teóricas, como o *docking* molecular e a modelagem molecular (DM) (OLIVEIRA et al., 2022).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial da lipase ET2 de catalisar as reações de produção dos ésteres glicéricos por meio de estudos de simulações computacionais, otimizar as rotas sintéticas de obtenção desses compostos a partir de parâmetros estatísticos e a caracterização do meio reacional por meio de técnicas cromatográficas. O substrato utilizado é o glicerol, um subproduto da indústria de biodiesel e o ácido acético usado como agente esterificante. A partir dos estudos obtidos com o *docking* molecular foram encontradas as poses de conformações dos ligantes em relação ao sítio catalítico da lipase, bem como a quantidade e a natureza das interações intermoleculares entre eles. Posteriormente, por meio das simulações de dinâmica molecular, foram avaliadas as estabilidades dos complexos enzima-substrato em condições reacionais de produção, considerando a presença de uma grade com moléculas de água ao redor da enzima, pois em pequenas quantidades, a água é essencial para o favorecimento das mudanças conformacionais da lipase em seus processos biocatalíticos. Por fim, foram avaliados os parâmetros cinéticos e termodinâmicos dos mecanismos enzimáticos da lipase com os substratos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Otimização dos parâmetros reacionais com o Método Taguchi

Embora as reações catalisadas por enzimas sejam bastante promissoras e na maioria das vezes apresentem ótimos rendimentos, o planejamento experimental é determinante para a escolha das melhores condições reacionais (MOREIRA et al., 2020a). Esse design experimental possibilita uma redução no número de reações, o que conseqüentemente diminui a produção de resíduos químicos, materiais e aparelhagem, tornando ainda mais viável o uso da biocatálise (MONTEIRO et al., 2019). O método Taguchi permite a escolha dos parâmetros experimentais, empregando um planejamento fatorial fracionário na forma de matriz ortogonal. Esse método tem por objetivo projetar o menor número de reações, usando todas as combinações possíveis das mesmas variáveis selecionadas, o que apresenta inúmeros benefícios, como a diminuição de erros experimentais, custo e montagem, além de aumentar a precisão e eficiência global do processo (ROCHA et al., 2021). São escolhidos os parâmetros independentes, que são variáveis do meio reacional, como a temperatura, quantidade de catalisador, razão molar, tempo e dentre outras. O programa é capaz de fornecer as melhores combinações para essas variáveis dentro de uma taxa determinada pelo operador, também chamada de níveis reacionais. Esses níveis seguem um padrão estabelecido pelo programa, onde o valor mínimo e máximo são usados para determinar o valor médio, a partir de uma média simples, obtendo-se três pontos de referência, o mínimo, o médio e o máximo (DA S. MOREIRA et al., 2022). Com a determinação dessa taxa, o programa faz uma combinação estatística com a finalidade de se obter a máxima resposta para a variável dependente, para este trabalho, a conversão. Por fim, o programa gera nove experimentos com a combinação dos parâmetros independentes, determinando as condições reacionais mais apropriadas estatisticamente, dentro dos níveis reacionais (CHAVAN; GAIKWAD, 2021). Após a etapa estatística, realiza-se os experimentos considerando os parâmetros fornecidos para cada reação e ao obter-se as conversões, o programa gera o ponto ótimo, onde espera-se uma taxa máxima de conversão, podendo essas condições estarem dentro ou não dos nove experimentos previamente realizados na primeira etapa (MONTEIRO et al., 2022).

2.2 Desenho de estruturas químicas

Softwares de desenho de estruturas químicas são especializados no processamento, armazenamento, renderização e edição das estruturas químicas, com base nas suas

propriedades (FATEMAH; RASOOL; HABIB, 2020). Devido ao aumento da utilização desses programas, os desenvolvedores iniciaram um processo de melhorias e aproximações cada vez mais compatíveis com dados os experimentais, o que elevou a qualidade de computadores e *softwares* nos últimos anos, tornando possível a utilização dessas ferramentas profissionais em computadores de uso pessoal, o que antes era exclusivo de computadores com processadores de alto armazenamento e funcionamento (LI et al., 2019). Atualmente, existem dezenas de *softwares* para o desenho de estruturas químicas, tais como o *ChemSketch*, o *BIOVIA Draw*, o *PyMOL* e o *ChemDraw*[®].

Esses programas podem ser usados para construir, visualizar e analisar estruturas químicas tridimensionais. Uma estrutura bidimensional pode ser convertida, criando automaticamente uma estrutura tridimensional apropriada, usando os comprimentos e ângulos de ligação padrão (ERIKSEN; NIELSEN; PITTELKOW, 2020). A estrutura tridimensional pode então ser minimizada, usando diferentes métodos de otimização, dentre eles, uma minimização de energia MM2. Esse campo de força apresenta boas correlações com valores experimentais, sobretudo com pequenas moléculas orgânicas (DANA et al., 2023). Embora não apresentem os melhores resultados, eles ainda conseguem atingir boas conformidades em baixos tempos de processamento e custos computacionais.

2.3 Ferramentas de bioinformática

A bioinformática é um campo interdisciplinar que une a bioquímica e a computação com a finalidade de recuperar, analisar e armazenar conhecimentos de sistemas biológicos, por meio do sequenciamento genético de macromoléculas, como na caracterização de genes, funcionamento de estruturas biológicas e na determinação de funções das proteínas, dentre outras (GAUTHIER et al., 2019). Esses resultados são obtidos com base em análises filogenéticas, e na simulação das interações de materiais biológicos em diferentes sistemas. Apesar de essas ferramentas apresentarem um modelo apenas aproximado dos sistemas reais, elas podem ser utilizadas como base para orientar trabalhos experimentais, que sem elas, demandariam um alto custo e tempo (ZHONG et al., 2020).

2.3.1 *Discovery Studio*[®]

Discovery Studio[®] é uma ferramenta de visualização tridimensional e interativa, que oferece visualização, compartilhamento, análise de proteínas e dados de modelagem.

Possui uma interface gráfica com um pacote abrangente de modelagem e simulação, permitindo a modelagem de proteínas, análise de farmacóforos, desenho baseado em estruturas e avaliação das interações intermoleculares de macromoléculas com seus ligantes, com base nas propriedades físico-químicas (PAWAR; ROHANE, 2021).

2.3.2 Docking molecular

O *docking* molecular é uma técnica de simulação muito utilizada na investigação das interações moleculares entre uma macromolécula de estrutura tridimensional previamente conhecida e um ligante, permitindo determinar as conformações mais energeticamente estáveis do complexo proteína-ligante (CHAUDHARY et al., 2020). Com essa técnica computacional são permitidas simulações das interações onde tanto a proteína quanto o ligante são considerados rígidos ou modelos onde a proteína é rígida e o ligante é flexível.

O modelo de simulação que considera a macromolécula e o ligante rígidos é o método mais antigo e utilizado nas simulações de *docking* (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021). Nele, apenas são considerados três graus de liberdade rotacionais e três graus de liberdade translacionais, sendo mais apropriado para a interação entre proteínas, onde o número de graus de liberdade conformacionais são muito altos para serem amostrados (BEIER; ZACHARIAS, 2010). No *docking* semiflexível, apenas a macromolécula é considerada rígida, ainda com três graus de liberdade rotacional e três translacional, entretanto o ligante é considerado flexível, considerando todos os seus graus de liberdade permitidos estericamente. Este método assume que a conformação fixa da proteína usada é capaz de reconhecer os ligantes que irão interagir com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico (GREENIDGE et al., 2014).

No *docking* molecular as funções de pontuação, ou de *scoring*, são usadas para selecionar as poses dentro dos grupos de poses gerados pelo sistema de amostragem. Dentre os seus tipos, estão as funções baseadas em campos de força, as funções empíricas e as funções baseadas no conhecimento (VIDAL-LIMON; AGUILAR-TOALÁ; LICEAGA, 2022).

Funções de pontuação baseadas em campos de força são baseadas em mecânica molecular, aproximando a energia potencial de um sistema em uma soma de forças intra e intermoleculares e outras contribuições, como termos de solvatação. Funções empíricas são baseadas no somatório de termos de energia empírica, como em interações de Van der Waals, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, modelos de dessolvatação, entropia, interações hidrofóbicas, dentre outras (JAKHAR et al., 2020). Estes termos são ponderados por

coeficientes, que são otimizados para reproduzirem dados de afinidade de ligação de um conjunto de treinamento, por ajuste de mínimos quadrados. Já as funções baseadas no conhecimento assumem que os contatos entre ligante e proteína estatisticamente mais explorados estão relacionados com interações favoráveis. Então, por meio de um banco de dados de estruturas, as frequências dos contatos de todos os pares de átomos do complexo ligante-proteína são calculadas e convertidas em componentes de energia (FAN; FU; ZHANG, 2019).

Para uma análise mais complexas das funções de pontuação e conseqüentemente das interações entre o complexo enzima-ligante, é necessário o uso de técnicas mais abrangentes que considerem todos os graus de liberdade da macromolécula e do ligantes, as energias atrativas e repulsivas do complexo e as propriedades do solvente no sistema, como é possível nas simulações de DM (TORRES et al., 2019).

2.3.3 Dinâmica molecular

Simulações de DM são amplamente utilizadas para estudar a dinâmica e estrutura de macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e bicamadas lipídicas. Estudos de DM podem ser realizados após o *docking* molecular, para que, partindo da melhor pose, seja possível compreender as interações ligante-proteína no decorrer do tempo, as forças envolvidas nessas interações, e o papel do solvente na dinâmica do sistema (SANTOS; FERREIRA; CAFFARENA, 2019).

Em geral, uma simulação de DM inclui três etapas: minimização, equilíbrio e cálculo da trajetória no equilíbrio para geração de dados. Após as etapas de minimização e equilíbrio, que são necessárias para garantir a estabilidade do sistema, ocorre o período da coleta de dados, na qual a trajetória gerada na simulação é gravada para posterior análise (JOSHI; DESHMUKH, 2021).

Para descrever o comportamento de um dado sistema molecular, utiliza-se um campo de força. Ele pode ser escrito como a energia potencial total do sistema calculada a partir de sua estrutura tridimensional. Esta energia potencial total é descrita como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de Coulomb e de Van der Waals e de Coulomb) (PÁLL et al., 2020). Em simulações de DM, a forma como ocorrem as interações induzidas pelo campo de força dependem de outros parâmetros, que são

as condições periódicas de contorno, o raio de corte, a soma de partículas de Ewald (*PME*) e dos controles de temperatura e pressão (WANG; LAMIM RIBEIRO; TIWARY, 2020).

As condições periódicas de contorno são usadas como um mecanismo de aproximação de um sistema macroscópico usando uma quantidade muito menor de partículas, mas ainda assim representativa do sistema. Isso é algo de fundamental importância, visto que quanto maior for a quantidade de partículas do sistema, serão exigidos maiores capacidades de processamento e tempos de simulação (SALO-AHEN et al., 2020). O raio de corte é usado para considerar apenas a contribuição das interações moleculares de curto alcance, como medida para redução do esforço computacional nos cálculos envolvidos em simulações de dinâmica molecular. O método da soma de partículas de Ewald é utilizada para lidar com as interações de longo alcance e suavizar a queda de energia potencial eletrostática. O *ensemble* NpT, bastante utilizado em DM, permite simulações usando a pressão, temperatura e número de partículas constantes. A fonte de energia térmica considerada é um banho que mantém a temperatura fixa. Da mesma forma, uma pressão é fixada usando um barostato (HU et al., 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o uso do glicerol residual da indústria de biodiesel via biocatálise, como uma estratégia para a obtenção de lipídeos estruturados, visando impulsionar inovações no aproveitamento deste resíduo industrial bem como agregar valor comercial aos produtos obtidos.

3.2 Específicos

- Otimizar as etapas reacionais da catálise enzimática do glicerol com ácido acético utilizando o método Taguchi;
- Avaliar estatisticamente a influência dos parâmetros reacionais para a conversão do glicerol em ésteres glicéricos;
- Confirmar a formação dos produtos reacionais via análise cromatográfica e espectroscópica;
- Estudo de *docking* e DM dos produtos com a ET2 para avaliar parâmetros termodinâmicos da reação;
- Utilizar QM/MM para determinar aspectos do mecanismo enzimático da reação.

4 METODOLOGIA

4.1 Parâmetros experimentais e análises estatísticas

Para determinação do número de experimentos e variações experimentais foi adotado o método estatístico de planejamento Taguchi, utilizando uma matriz ortogonal L9 representando o quadrado latino e o número total de experimentos realizados (LIMA et al., 2022). A Tabela 1 apresenta os quatro fatores independentes escolhidos para o procedimento experimental: a razão molar entre o glicerol e o ácido acético (GL:AA), a porcentagem de enzima líquida no meio reacional, onde esta proporção é avaliada em relação ao conteúdo líquido de toda a reação (% de biocatalisador l/l), a temperatura (°C) e o tempo de reação (h).

Tabela 01: Determinação dos níveis experimentais e faixa de parâmetros independentes.

| Níveis | Razão molar (GL/AA) | Biocatalisador (% w/w) | Temperatura (°C) | Tempo (h) |
|--------------|------------------------|---------------------------|------------------|-----------|
| Nível 1 (L1) | 1:1 | 5 | 25 | 1 |
| Nível 2 (L2) | 1:5 | 15 | 40 | 12.5 |
| Nível 3 (L3) | 1:9 | 25 | 55 | 24 |

Fonte: elaborado pelo autor.

A relação sinal-ruído (S/R) avalia como a resposta da variável dependente (% de conversão) muda sob diferentes condições de ruído, geradas pelas variáveis independentes (razão molar, biocatalisador, temperatura e tempo). A relação sinal-ruído utilizada nesta análise foi a função “maior é melhor”, pois o objetivo do estudo é maximizar a resposta da atividade do biocatalisador, onde um S/R maior será considerado mais relevante e mais influente nas taxas de conversão da reação (SOSA-MARTÍNEZ et al., 2021). As relações S/R para cada experimento foram calculadas usando a Equação 1.

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

Onde y é a atividade do biocatalisador para o experimento correspondente, i é o número de repetições, n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator em qualquer combinação paramétrica específica, conforme Tabela 1.

A relação S/R prevista em condições ideais para obter a atividade do biocatalisador foi estimada pela Equação (2).

$$\frac{S}{R_{predicted}} = \frac{\bar{S}}{R} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{R_j} - \frac{\bar{S}}{R} \right) \quad (2)$$

Onde \bar{S}/R é a média aritmética de todas as relações S/R, S/R_j é a razão S/R no ponto ideal para cada fator, e n é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Materiais e métodos

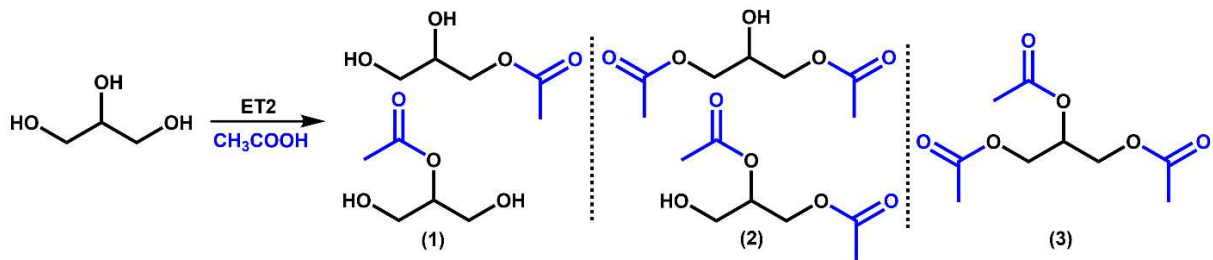
A lipase comercial Eversa[®] *transform* 2.0 de *Aspergillus oryzae* e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foram adquiridas da Sigma-Aldrich Brazil Ltda (Cotia, São Paulo, Brasil). Os substratos, glicerol e ácido acético, e os solventes de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e da Vetec (São Paulo, Brasil). Para o delineamento experimental foi utilizado o software Statistica[®] 10 (StatSoft, EUA), seguindo o método Taguchi.

4.2.2 Síntese dos ésteres glicerídicos

Para a etapa experimental foram selecionadas as condições dos parâmetros escolhidos no ponto ótimo de reação listado pelo método Taguchi, onde se espera uma maior taxa de conversão. Nessas condições, foram utilizados 73,1 μ L de glicerol (1 mmol) e 57,2 μ L de ácido acético (1 mmol) e a mistura reacional foi colocada em tubo eppendorf de 1 mL e tampada para evitar evaporação do solvente. Em seguida, adicionou-se 19,5 μ L da enzima ET2 (15% do meio reacional) e o meio reacional foi agitado a 250 rpm, a 40 °C por 12,5 h. Simultaneamente, um meio reacional sem a enzima foi utilizado como uma espécie de controle de reação, nas mesmas condições, para que pudesse ser utilizado como padrão no cálculo da taxa de conversão (DE SOUSA et al., 2023a).

A Figura 1 mostra os possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácido acético utilizando ET2. Existem duas possibilidades de formação do produto monoacilado, MAG, duas possibilidades para os produtos diacilados, DAG, e uma única possibilidade de formação do produto triacilado, TAG.

Figura 1 - Reação de esterificação de glicerol e ácido acético. São possíveis dois produtos mono-acilados (MAG) e dois produtos di-acilados (DAG), mostrados em (1) e (2), respectivamente. O produto tri-acilado final (TAG) é representado em (3).



Fonte: elaborado pelo autor.

Foram retiradas quatro alíquotas de 3,0 mg, duas do controle (sem enzima) e duas do meio reacional (com enzima), e foram adicionados 7,5 mL de etanol neutralizado para interromper a reação e analisar a conversão em cada uma delas, utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador ácido-base (ALEXANDRE et al., 2022a). A titulação do ácido acético não consumido pela enzima foi realizada com NaOH 0,1 M. O índice de acidez foi estimado utilizando a Equação (3) como parâmetro.

$$IA \left(\frac{mgNaOH}{g} \right) = \frac{MM_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot f \cdot V_{NaOH}}{m} \quad (3)$$

Onde, MM_{NaOH} (g/mol) é a massa molar do NaOH; M_{NaOH} (M) é a molaridade da solução de NaOH; f é o fator de correção determinado pela padronização do NaOH; V_{NaOH} é o volume de NaOH utilizado durante a titulação e, m (g) é a massa da amostra a ser estudada.

A conversão do ácido acético em ésteres (Equação 4) IA_i corresponde ao valor de acidez inicial, ou seja, a quantidade de AA adicionado na reação, e IA_f ao valor de acidez final, equivalente ao AA restante em solução, não utilizado pela enzima (YESILOGLU; KILIC, 2004).

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

Foram adicionados 5 mL de água à solução e, em seguida, foi realizada uma partição líquido-líquido utilizando 5 mL de acetato de etila como fase orgânica. O procedimento foi repetido três vezes para garantir que a maior quantidade de produto

esterificado migrasse para a fase orgânica (HIROSE et al., 2006). Finalmente, o solvente foi recuperado em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

4.2.3 Análise e caracterização do meio reacional

4.2.3.1 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Uma alíquota do meio reacional no ponto ótimo de conversão foi analisada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), equipada com coluna *Shimadzu* LC-18 e detector ultravioleta. O método isocrático foi utilizado na proporção de 70% de metanol e 30% de acetonitrila. O volume injetado foi de 20 µL por minuto durante 5 minutos a 40°C. O comprimento de onda escolhido para a análise foi 254 nm, onde o espectro apresentou maiores absorções (DE SOUSA JUNIOR et al., 2023).

4.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros unidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono (RMN ¹³C) foram obtidos em um espectrômetro *Bruker*, modelo *Advance* DRX-500, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear, localizado na Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). O experimento foi realizado na frequência de hidrogênio em 500 MHz e na frequência de carbono em 75 MHz. O solvente utilizado para a dissolução das amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) e foram analisadas em tubos de 5 mm (VEGA et al., 2021).

4.3 Estudo *in silico*

4.3.1 Otimização e cálculo de frequência dos ligantes

A obtenção dos modelos dos produtos reacionais foi realizada com o uso do programa *GaussView* 6.0, onde cinco modelos dos ésteres foram desenhados, considerando as possibilidades de modificação estrutural do glicerol para a formação dos MAG, DAG e TAG. O método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foi utilizado para realizar as otimizações estruturais com o funcional híbrido de três parâmetros B3LYP de Becker com o funcional de correlação Lee-Yang-Parr juntamente com o conjunto de bases 6-31+G(d,p) implementado em *Gaussian* 16 pacote (DO NASCIMENTO et al., 2023). Os modos

vibracionais das geometrias otimizadas foram obtidos para verificar se as geometrias são verdadeiros mínimos ou estados de transição. Todos os cálculos foram realizados com o Modelo Contínuo Polarizável com o Formalismo de Equação Integral utilizando água como solvente (COUTINHO et al., 2023). Realizou-se a otimização e frequência das estruturas nos computadores do CENAPAD-UFC, com o objetivo de buscar as menores energias e consequentemente as melhores conformações de cada ligante. Os seus estados de protonação também foram avaliados no programa *Avogadro* 1.2.0.

4.3.2 Modelagem da ET2 via homologia

A enzima ET2 foi modelada por homologia. A sequência primária de aminoácidos foi obtida pelo número CAS 9001-62-1, que é próxima da enzima natural produzida pela *Sigma-Aldrich*. A sequência de aminoácidos, a estrutura primária da enzima e o alinhamento da sequência de aminoácidos obtida foram realizados com o banco de dados BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool Program*) (MAHRAM; HERBORDT, 2015), que foi utilizado para realizar a modelagem por homologia. Dentre as sequências adquiridas, foi possível preencher as lacunas restantes no sequenciamento da ET2 com a sequência com maior percentual de identidade da proteína alvo (LI; LU, 2019).

As sequências de aminoácidos usadas para preencher as lacunas da enzima foram modeladas pelo software *Modeller* (ESWAR et al., 2008). Assim, a proteína relacionada à sequência de aminoácidos mais próxima da enzima lipase, classificada como hidrolase, foi identificada pelo organismo *Aspergillus oryzae* e expressa através de *Escherichia coli-Pichia*, obtida do *Protein Data Bank* (RCSB PDB) (BURLEY et al., 2017) sendo o código 5XK2 da proteína alvo. O *Modeller* também foi utilizado para construir o modelo tridimensional da ET2. É frequentemente descrito na literatura quando a modelagem por homologia é usada, pois é baseada na satisfação de restrições espaciais e parâmetros estereoquímicos, fornecendo um modelo 3D otimizado de uma função de densidade de probabilidade molecular. A validação do modelo foi realizada nos níveis estereoquímico, conformacional e energético (STECULA; HUSSAIN; VIOLA, 2020). O gráfico Ramachandran validou a qualidade do modelo gerado com o programa *PROCHECK*, que avaliou sua estrutura tridimensional, indicando a possível qualidade estereoquímica (LASKOWSKI et al., 1993).

4.3.3 Conformações

O CONCOORD (de CONstraints to COORDinates) versão 2.1.2 37 foi utilizado para gerar 500 novas estruturas com diferentes conformações, com base no modelo otimizado da modelagem por homologia da ET2. O princípio do programa é baseado em restrições geométricas, onde a força da interação e uma gama de limites geométricos superiores e inferiores são adotados para todos os pares de átomos em interação (MUHAMMED; AKI - YALCIN, 2019). Das 500 conformações geradas, as três melhores foram selecionadas considerando alguns fatores, entre eles, a soma das violações, o valor associado à correção das distâncias das localizações dos átomos que estão envolvidos em distâncias interatômicas que violam o ou limite inferior de distância 20. O processo de correção termina quando a soma das violações for igual a zero (HAMEDUH et al., 2020).

4.3.4 Docking molecular

Com a ET2 modelada e validada, foi possível a realização do *Gridbox*. Nesta fase, também chamada de *pré-docking* foi preparado o sistema para realização das simulações. Os hidrogênios polares foram adicionados e as cargas de *Gasteiger* de cada átomo do sistema foram calculadas (CANDRA; WIJAYA, 2021).

A adição de átomos de hidrogênio foi feita no servidor H++, sistema automatizado que calcula valores de pKa de grupos ionizáveis em macromoléculas e adiciona átomos de hidrogênio faltantes de acordo com pH 6,0, referente ao meio reacional (PAHARI; SUN; ALEXOV, 2019).

A caixa de interação foi definida no programa *AutoGrid*, sendo de tamanho 66Åx66Åx66Å (direções x, y e z), mapeando energias de interação para diversos tipos de átomos dos ligantes com o sítio ativo da ET2. O tamanho escolhido foi suficiente para envolver todos os aminoácidos do sítio ativo e adjacentes, juntamente com cada ligante (CALLIL-SOARES; BIASI; PESSOA FILHO, 2023). Estes mapas foram utilizados posteriormente pelo programa *AutoDock* para a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante.

O *Docking* Molecular foi realizado utilizando o programa *AutoDockVina* considerando a enzima rígida e os ligantes flexíveis. Uma configuração de grade, que delimita o perímetro para o acoplamento, foi realizada centralizando o sítio ativo da enzima definido na etapa do *GridBox* (SER₁₅₃, ASP₂₀₆ e HIS₂₆₈). Os perfis de energia das interações ligante-receptor também foram avaliados por software, e a visualização das poses ancoradas foi feita

pelo *AutoDock Tools* (VALDÉS-TRESANCO et al., 2020). Ao final dessa etapa, para cada um dos cinco ligantes ancorados com a enzima, foram selecionados os complexos com melhores conformações e valores de energia, e suas estruturas tridimensionais salvas em formato PDB. Essas escolhas levaram em consideração os menores valores de energia de ligação, por serem as mais prováveis para justificar as interações ET2-ligante.

4.3.5 Dinâmica molecular (DM)

Das três conformações mais favoráveis geradas pelo CONCOORD, simulações DM foram realizadas para a conformação da ET2, usando o pacote *GROningen Machine for Chemical Simulations* (GROMACS) versão 2020.4 implementado com o campo de força CHARMM27 (RABET; RAABE, 2022). Os parâmetros da topologia CHARMM foram gerados pelo servidor *SwissParam* (DAINA; ZOETE, 2019). O potencial intramolecular transferível com 3 pontos (TIP3P) foi o modelo molecular da água utilizado como solvente. A neutralização dos sistemas foi conseguida pela adição de contra-íons (MARK; NILSSON, 2001). O algoritmo *Leap-Frog* incluiu movimento na equação com um intervalo de tempo de 1,0 fs. As interações de longo alcance foram medidas usando a soma de Ewald da Malha de Partículas (PME) com ponto de corte de 1,0 nm. A etapa de equilíbrio consistiu em duas etapas de 0,1 ns, as condições experimentais foram ajustadas com o termostato de reescala V de Berendsen e o barostato Parrinello-Rahman para controlar a temperatura e a pressão das simulações. Finalmente, a simulação DM foi realizada em triplicata, a saída de 100 ns usando as mesmas condições, foi realizada em cada sistema para determinar a interação entre a ET2 e cada ligante. Para cada ligante, a distribuição microespacial e os estados de protonação foram verificados para uma faixa de pH próximo a 6 com o programa *MarvinSketch* (CSIZMADIA, 1999). Após as simulações de DM, o complexo de interação mais estável foi analisado utilizando a Energia Potencial de Interação (EPI, em kcal.mol⁻¹), que pode ser definida como a energia potencial total de interação entre dois grupos, ou seja, a soma das interações intermoleculares do tipo van der Waals e contribuições eletrostáticas de estruturas, que podem ser calculadas de acordo com a equação 5.

$$IPE_{i,j} = \sum_i^{N_i} \cdot \sum_{j \neq i}^{N_j} V_{vdW}(r_{ij}) + V_{elec}(r_j) \quad (5)$$

Onde IPE_{ij} é a energia potencial de interação entre um grupo de átomos de i com um grupo de átomos de j , e N_i e N_j são os números totais de átomos nos grupos i e j , V_{elec} e V_{vdW} são as variáveis correspondentes ao contribuição eletrostática e interações do tipo van der Waals, respectivamente.

4.3.6 Cálculos híbridos de QM/MM

Todos os cálculos QM/MM híbridos foram realizados usando o pacote de *software* Gaussian 16. O método utiliza um padrão substrativo no qual a energia MM [E_{MM} (modelo)] da parte QM (modelo) é subtraída da soma da energia QM do modelo [E_{QM} (modelo)] e da energia MM [E_{MM} (real)] de todo o sistema (real), conforme mostrado na equação 6:

$$E_{QM/MM}(real) = E_{MM}(real) - E_{MM}(modelo) + E_{QM}(modelo) \quad (6)$$

Este método de subtração corrige os artefatos introduzidos usando os átomos de ligação. O procedimento de otimização utiliza macro/microinterações, e as interações eletrostáticas entre o QM e a parte MM foram tratadas por incorporação mecânica (ME). A região QM foi definida como a tríade catalítica (Ser₁₅₃, His₂₆₈ e Asp₂₀₆), um segundo resíduo de coordenação Tyr₂₉ e os substratos. A parte restante do sistema foi incluída na região MM. A região QM foi otimizada sem qualquer restrição geométrica usando o funcional híbrido de correlação de troca B3LYP (LEE et al., 2022). O conjunto de bases 6-311G+(d,p) foi utilizado para implementar os cálculos, e a função de Grimme com efeito de amortecimento de Becke-Johnson (GD3BJ) foi utilizada para levar em conta os efeitos dispersivos. A região MM foi modelada usando o campo de força AMBER implementado no *software* Gaussian 16 (PEDRON et al., 2023).

Os hessianos foram calculados no mesmo nível teórico das otimizações para confirmar a natureza dos pontos estacionários ao longo da coordenada de reação. Os estados de transição foram confirmados como tendo apenas uma frequência imaginária correspondente às coordenadas da reação. Correções vibracionais, térmicas e de entropia de ponto zero foram adicionadas às energias finais (em 298,15 K e 1 atm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros estatísticos

O método de planejamento Taguchi foi utilizado para a análise estatística dos dados. Esta estratégia foi adotada para otimizar e reduzir o número de etapas experimentais necessárias. Assim, através desta metodologia, é possível compreender o efeito e a correlação de cada parâmetro relacionado ao processo (GERMANO DE SOUSA et al., 2022b). A Tabela 2 mostra os valores determinados no desenho experimental e a resposta à atividade do biocatalisador em cada um dos 9 experimentos realizados. É importante ressaltar que todos os experimentos foram realizados em triplicata e que os resultados relatados permaneceram dentro da margem de erro esperada.

Tabela 2. Desenho experimental das reações geradas pelo método Taguchi, valores de conversão e sinal-ruído para cada um dos nove experimentos.

| C | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Razão molar (GL/AA) | Biocatalisador (% I/I) | Conversão (%) | S/R |
|---|--------------|---------------------|------------------------|---------------------------|------------------|-------|
| 1 | 1 | 25 | 1:1 | 5 | 4.3 ± 0.3 | 12.66 |
| 2 | 12.5 | 40 | 1:1 | 15 | 84.8 ± 0.6 | 38.56 |
| 3 | 24 | 55 | 1:1 | 25 | 38.6 ± 0.6 | 31.73 |
| 4 | 24 | 40 | 1:5 | 5 | 66.2 ± 0.3 | 36.41 |
| 5 | 1 | 55 | 1:5 | 15 | 18.4 ± 0.6 | 25.29 |
| 6 | 12.5 | 25 | 1:5 | 25 | 16.3 ± 0.0 | 24.24 |
| 7 | 12.5 | 40 | 1:9 | 5 | 51.7 ± 0.1 | 34.26 |
| 8 | 24 | 25 | 1:9 | 15 | 22.8 ± 0.6 | 27.15 |
| 9 | 1 | 55 | 1:9 | 25 | 61.2 ± 0.3 | 35.73 |

Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme mostrado na Tabela 2, a análise estatística classificou os parâmetros mais relevantes do sistema enzimático para a conversão de glicerol em ésteres de glicerídeos utilizando ET2 como biocatalisador. Percebemos que a temperatura é o parâmetro mais significativo que influencia a conversão do glicerol em ésteres glicerídicos, visto a seguir na análise de variância. Porém, a influência positiva da temperatura na reação enzimática atinge

seu pico em torno de 40°C. Após este ponto, a enzima reduz drasticamente sua atividade catalítica, possivelmente devido à dissociação do complexo enzima-substrato ou à desnaturação da estrutura terciária (KUMAR et al., 2011).

A razão molar dos substratos apresentou influência moderada na reação onde foi observada maior conversão para maior concentração de AA no meio reacional. Isso é esperado, uma vez que uma molécula de glicerol pode reagir com até três moléculas de ácido acético, para produzir produtos mono, di ou triacetilados (LIU et al., 2023). Por fim, a carga de biocatalisador apresentou a menor influência na reação, como pode ser observado na Tabela 3, que determina um ranking de variáveis para a reação, tendo o percentual de biocatalisador como a menor influência do sistema. A partir da análise de variância que será discutida na Tabela 4, também é possível considerar que a contribuição das proporções do biocatalisador, dentro dos níveis selecionados, não é significativa. Embora uma proporção maior de catalisador para substrato aumente o rendimento do produto na maioria dos sistemas catalíticos (em um período de tempo fixo), a quantidade de ET2 não afetou significativamente a conversão de glicerol em glicerídeos dentro dos níveis de tempo estabelecidos para biocatálise. O catalisador apenas reduz a energia de ativação necessária para que a reação ocorra, se o tempo de reação fosse maior a conversão final deveria ser a mesma com ou sem o catalisador. Isto indica que a ET2 pode catalisar eficientemente a esterificação do glicerol, mesmo em baixas concentrações.

5.1.1 Análise da relação sinal-ruído (S/R)

O planejamento Taguchi gera um conjunto de relações S/R para identificar a significância de cada parâmetro estudado. Neste trabalho, a função “maior é melhor” foi empregada para determinar as relações S/R, uma vez que este tratamento estatístico é amplamente utilizado para analisar as taxas de conversão de reações de sistemas enzimáticos (DE SOUSA et al., 2023b). A Tabela 3 apresenta os dados referentes às médias S/R de cada fator, nível e valores de delta. Esses valores são calculados pela diferença entre a maior e a menor relação S/R de cada fator. Através da análise dos valores delta é possível avaliar o impacto de cada nível no processo e identificar os parâmetros que têm influência mais significativa (ALEXANDRE et al., 2022b).

Tabela 3. *Ranking* de variáveis baseado nas respostas médias das relações S/R obtidas.

| Fatores/Níveis | Temperatura (°C) | Tempo (h) | Razão molar (GL: AA) | Biocatalisador (% I/I) |
|----------------|------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 1 | 21.36 | 24.56 | 27.66 | 27.78 |
| 2 | 36.91 | 32.36 | 28.65 | 30.57 |
| 3 | 30.43 | 31.77 | 32.39 | 30.34 |
| Delta | 9.1 | 7.2 | 4.7 | 2.5 |
| Ranking | 1 | 2 | 3 | 4 |

Fonte: elaborado pelo autor.

É possível observar que a temperatura e o tempo de reação foram as variáveis mais influentes no processo, pois apresentaram os maiores valores de delta, 9,1 e 7,2, respectivamente. Assim, os dados da Tabela 3 resumem a significância dessas duas variáveis no procedimento experimental, obtidas a partir dos 9 experimentos apresentados na Tabela 2. É possível inferir que 40°C é a temperatura ideal para o meio reacional, mostrando que o incremento do nível 1 (25°C) ao nível 2 (40°C) apresenta uma resposta mais significativa da relação S/R e, conseqüentemente, um impacto positivo na conversão da reação. Este resultado está de acordo com a temperatura ideal da maioria dos processos enzimáticos, que apresenta máxima atividade catalítica. Por outro lado, a mudança do nível 2 (40°C) para o nível 3 (55°C) teve o efeito oposto. Como mencionado anteriormente, como os catalisadores biológicos são sensíveis às mudanças de temperatura, uma temperatura elevada no meio reacional pode levar à desnaturação ou desativação, reduzindo conseqüentemente a atividade enzimática.

Além disso, é possível observar que o tempo tem um efeito positivo na conversão da reação, uma vez que do nível 1 (1h) para o nível 2 (12,5 h) há um aumento significativo na resposta da relação S/R. Porém, observa-se estabilidade na atividade enzimática quando se analisa a transição do nível 2 para o nível 3, formando um platô, com leve diminuição das 12,5h para as 24h. O aumento de AA no meio reacional do nível 1 (1:1 GL/AA) para o nível 2 (1:5 GL/AA), impactou significativamente a resposta da relação S/R e, conseqüentemente, a conversão. A passagem do nível 2 (1:5 GL/AA) para o nível 3 (1:9 GL/AA) também levou a uma resposta positiva na relação S/R. Isso mostra que o excesso de substrato não inibe esta enzima. Por fim, o aumento da carga do biocatalisador do nível 1 (5%) para o nível 2 (15%) mostrou um aumento na taxa de resposta da relação S/R. Do nível 2 (15%) para o nível 3 (25%) houve queda na taxa de conversão, o que já era esperado devido à saturação do meio

reacional com a enzima. Estes resultados destacam que a ET2 possui notável atividade catalítica para reações de esterificação e potencial aplicabilidade em processos bioquímicos em larga escala.

5.1.2 Análise de variância (ANOVA)

Os valores de conversão obtidos no delineamento experimental também foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA). O valor *p* se destaca na literatura e é utilizado como parâmetro para garantir a significância de cada fator para o processo estudado (NOBRE et al., 2023). A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na ANOVA, onde a Soma dos Quadrados (SS) é utilizada para quantificar a variação das diferenças entre a interação dos parâmetros escolhidos. Os graus de liberdade (DF) avaliam as interações entre pilares e linhas estabelecidas no planejamento experimental. Os quadrados médios (MS) são obtidos dividindo um valor SS específico pelo seu valor DF correspondente. Por outro lado, o valor *F* é calculado dividindo um valor MS específico por outro valor MS. O valor no denominador da equação do valor *F* é definido pelo desenho experimental. O valor *p* é utilizado para avaliar a significância de um parâmetro dentro do desenho experimental e pode indicar a variável independente mais influente na taxa de resposta da variável dependente. Para que a significância de um parâmetro seja garantida com intervalo de confiança de 95%, o valor *p* deve ser inferior a 0,05 (BERTINETTO; ENGEL; JANSEN, 2020).

Tabela 4. Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para parâmetros que afetam a produção de glicerídeos.

| Fatores | SS | DF | MS | Valor <i>f</i> | Valor <i>p</i> | Contribuição (%) |
|----------------|--------|-----|--------|----------------|----------------|------------------|
| Tempo | 112.96 | 2 | 56.48 | 7.87 | 0.112 | 21.8% |
| Temperatura | 366.06 | 2 | 183.03 | 25.53 | 0.037 | 71.0% |
| Razão molar | 37.33 | 2 | 18.66 | 2.60 | 0.277 | 7.2% |
| Biocatalisador | 14.33 | (2) | - | - | 0.430 | - |
| Total | 516.35 | 6 | - | - | - | 100 |

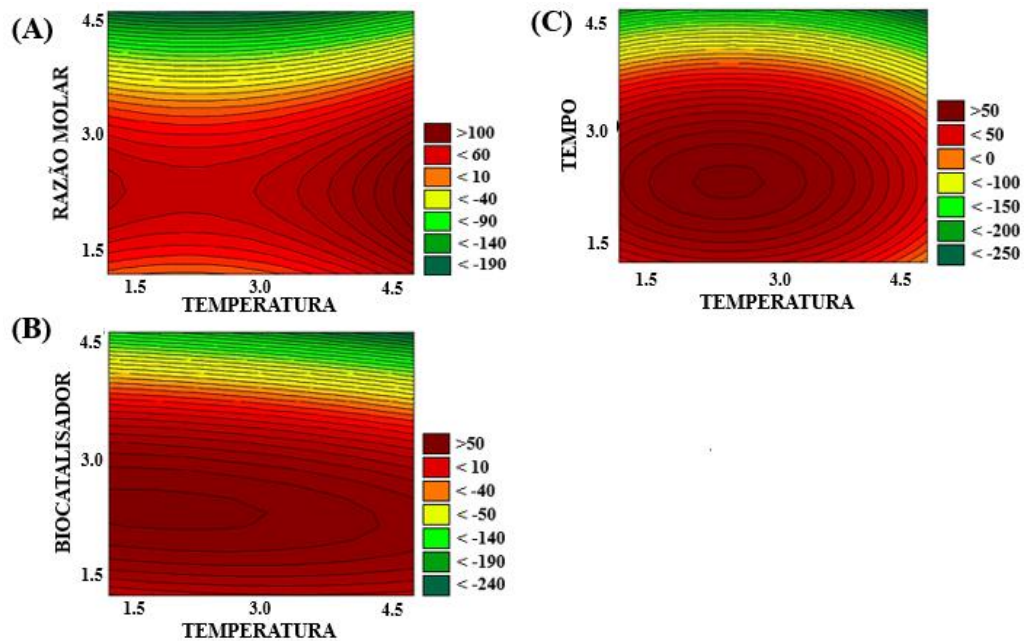
Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre os parâmetros avaliados, apenas a temperatura apresentou valor de p dentro do intervalo de confiança (0,037), enquanto todos os demais parâmetros não apresentaram resultados estatisticamente expressivos. Assim, a temperatura foi o fator que mais influenciou a conversão (contribuição: 71,0%), confirmando os resultados discutidos nas seções anteriores. Após análise estatística e discussão dos dados coletados, foram definidas as condições ótimas para produção de ésteres glicéridos de glicerol com ET2. Com base na faixa de níveis (1, 2 e 3) de cada fator (tempo, temperatura, razão molar e carga de biocatalisador), as condições ótimas foram: tempo 12,5 h, temperatura 40 °C, razão molar 1:1, e carga de catalisador de 15% l/l. Nestas condições, a conversão da reação foi de 84,80% \pm 0,6.

5.1.3 Gráficos de superfície de contorno

Como a temperatura foi o parâmetro mais significativo que afetou a conversão da reação, sua correlação com outros parâmetros independentes foi avaliada para melhor compreender o perfil da conversão da reação. Um gráfico de contorno de superfície demonstrando a correlação entre a temperatura e a razão molar, carga de biocatalisador ou tempo é mostrado na figura 2. Nestes gráficos, as regiões de alta conversão são obtidas avaliando, individualmente, a mudança em cada parâmetro em relação à mudança de temperatura. Na figura 2, os eixos x e y não correspondem às condições de reação, são apenas escalas proporcionais fornecidas pelo programa, para demonstrar os contornos da superfície. As regiões mais escuras e mais próximas do vermelho, apresentam valores de conversão elevados quando combinadas. Já as regiões mais claras e próximas do verde, apresentam baixas taxas de conversão quando combinadas (LI; LU; GAO, 2021).

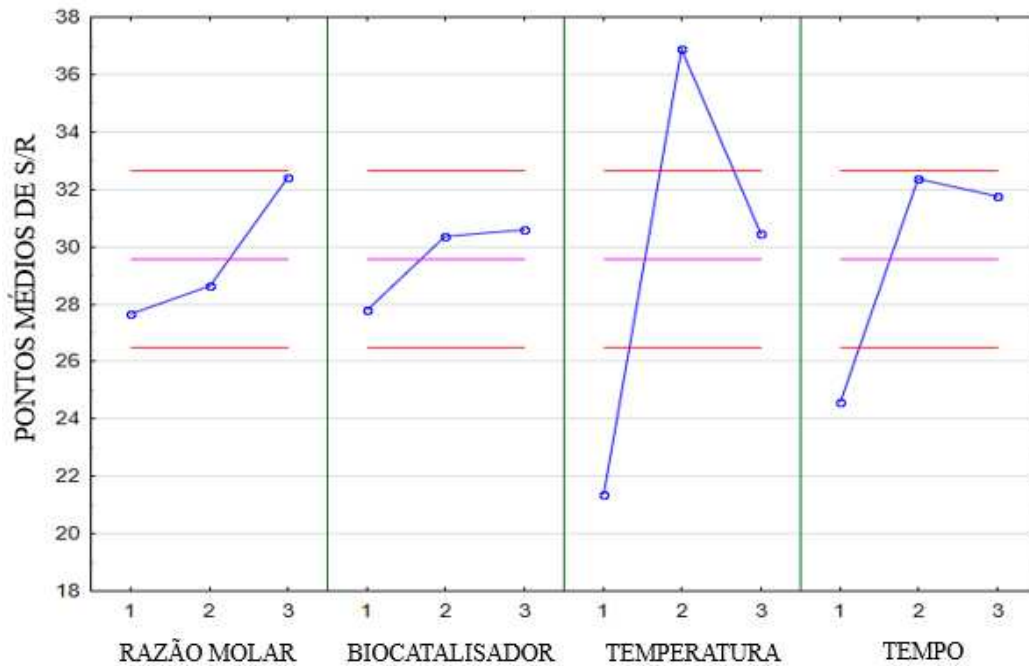
Figura 2 - Gráficos de superfícies de contorno geradas para avaliar o efeito do parâmetro mais relevante, a temperatura, nas demais variáveis independentes: (a) razão molar (b) carga do biocatalisador e (c) tempo.



Fonte: elaborado pelo autor.

O gráfico de médias é outra ferramenta que pode determinar quais parâmetros sofreram mais variação e conseqüentemente mais influenciaram na conversão. Conforme mostrado na Figura 3, a temperatura mais uma vez provou ser o fator mais significativo para uma alta conversão da reação, como mostra a maior variação média no gráfico, maior inclinação e deslocamento mais significativo entre os pontos. A percentagem de biocatalisadores permaneceu como um parâmetro pouco significativo, demonstrado pela baixa inclinação do gráfico e ligeira variação média.

Figura 3 - Gráfico médio das variações dos parâmetros para cada parâmetro estudado.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Caracterização do meio reacional

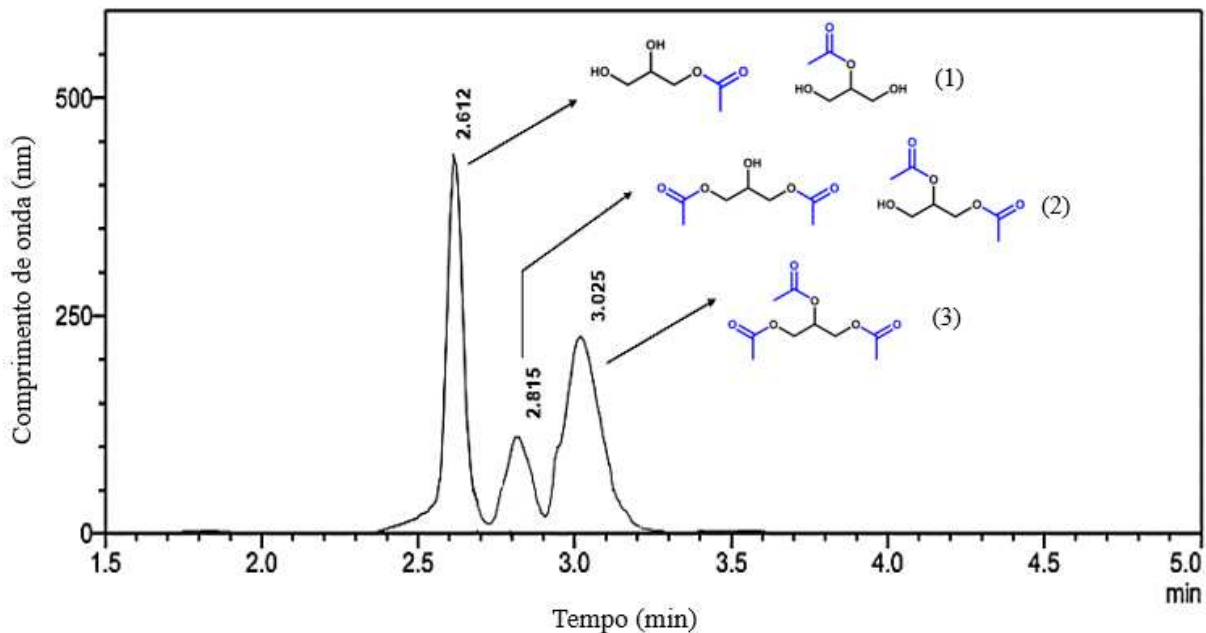
5.2.1 CLAE

O sistema reacional foi por CLAE com a finalidade de se obter um perfil dos produtos esterificados, como forma qualitativa para confirmar a formação das três possibilidades avaliadas inicialmente a partir do glicerol. Os picos exibidos no cromatograma mostrado na Figura 4 estão associados aos produtos de reação mono-, di- e tri-acetilados obtidos da reação enzimática. A coluna de fase reversa interage mais fortemente com os produtos de polaridade mais baixa, enquanto a combinação polar de solventes arrasta os produtos de polaridade mais alta (AITZETMÜLLER, 1977; TAKANO; KONDOH, 1987). Os picos para cada componente da mistura de ésteres tiveram sua absorvância máxima observada na região de 254 nm.

O primeiro pico foi atribuído aos produtos MAG, por apresentarem maior polaridade devido a presença de mais hidroxilas, grupo mais polar que o éster. Esse produto interage com o solvente polar e elui mais rapidamente pela coluna, o que leva a um menor fator de retenção. Atribui-se o segundo pico aos produtos DAG, apresentando polaridade intermediária dentre os produtos reacionais. O terceiro pico foi atribuído ao produto TAG que apresenta a menor polaridade e conseqüentemente uma forte interação com a coluna de fase

reversa, portanto, o maior fator de retenção está associado a esse composto (BAUZA et al., 1992).

Figura 4 - Cromatograma dos picos obtidos pelo método isocrático (7:3) metanol/acetonitrila no comprimento de onda de 254 nm.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2 RMN ^1H E ^{13}C

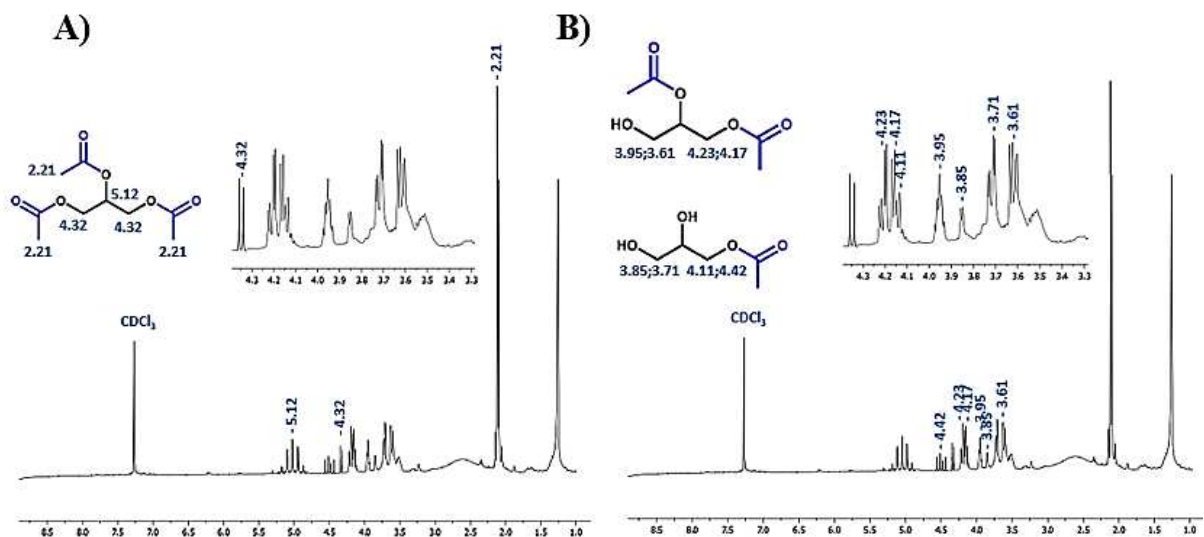
No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do meio reacional é possível observar os picos em comum para os ésteres glicéricos. Na Figura 5A destacam-se alguns deslocamentos químicos importantes do produto TAG, como o sinal intenso próximo a δ 2.11, característico de singlete relacionado aos hidrogênios metílicos nas posições α a carbonila (CORAL et al., 2013). O duplete com deslocamento químico próximo a δ 4.32 ppm está relacionado aos hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao átomo de oxigênio do grupo éster. Além disso, o multiplete (quinteto) observado na região de δ 5.12 ppm está relacionado ao hidrogênio do grupo –CH ligado diretamente ao éster central da molécula (SARAF et al., 2021). Apesar de o espectro da mistura reacional apresentar diversos picos em comum sobrepostos, é possível destacar os picos mais importantes como critério para determinar presença desses produtos no meio reacional.

Picos dos demais produtos MAG e DAG produzidos no meio reacional, também são exibidos no espectro. Os hidrogênios de ésteres glicéricos apresentaram sinais com

deslocamento químico muito próximo, devido as suas semelhanças estruturais (TSUZUKI et al., 1995). Entretanto, é possível destacar alguns picos e perfis de deslocamentos químicos esperados para os demais compostos.

Na Figura 5B foram selecionados os dois compostos do tipo MAG e DAG ambos com centro de quiralidade, para destacar as suas particularidades no espectro. Moléculas quirais não possuem elementos de simetria e com isso os grupos metilênicos vizinhos ao centro de quiralidade irão apresentar deslocamentos químicos diferentes, onde cada hidrogênio irá apresentar um deslocamento característico diferente do esperado caso o carbono vizinho não apresentasse assimetria (LI; YANG; SUN, 2023). Na Figura 5B, os multipletos em δ 3.95 e 3.61 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados diretamente a hidroxila em DAG e em δ 4.23 e 4.17 ppm aos hidrogênios ligados diretamente ao éster da extremidade da molécula. Para o produto MAG o mesmo perfil foi observado, onde os multipletos em δ 3.85 e 3.71 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados diretamente a hidroxila e os deslocamentos em δ 4.11 e 4.42 ppm aos hidrogênios ligados diretamente ao éster da extremidade da molécula (MELLO et al., 2008). É importante ressaltar que o espectro equivale a uma mistura dos ésteres glicéricos, para uma caracterização estrutural minuciosa de cada componente, seria necessário a aplicação de uma técnica cromatográfica para isolamento previamente à caracterização.

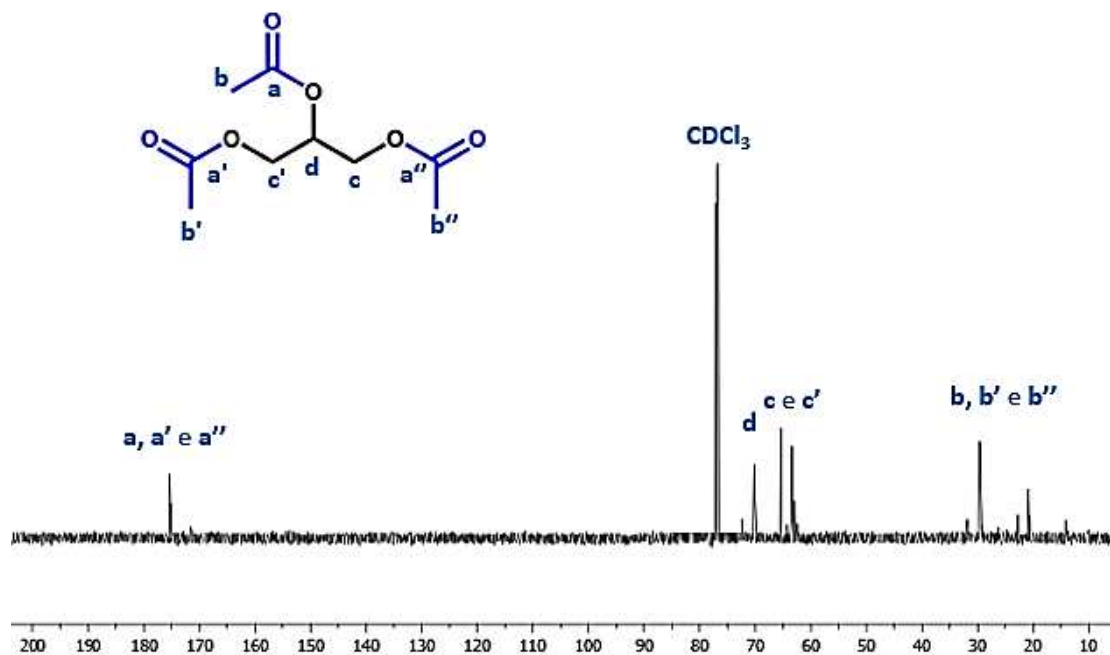
Figura 5 - A) Espectros de hidrogênio para a molécula de triacilglicerídeo (TAG), destacando seus sinais e deslocamentos químicos; B) Espectro para o DAG e MAG, destacando alguns de seus picos mais característicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 6 representa o espectro de ^{13}C , responsável por indicar o pico do carbono carbonílico do éster, comprovando que houve conversão do glicerol em ésteres (BELLA; ROTONDO, 2020). No espectro de ^{13}C os sinais de menor intensidade na região de δ 30 ppm foram atribuídos aos carbonos metílicos dos ésteres (b, b', b''), por apresentarem os menores deslocamentos químicos. Os picos na região próxima a δ 60 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos dos ésteres ligados diretamente aos átomos de oxigênio das extremidades da molécula (c, c', c'') (VLAHOV, 2008). O carbono central da molécula, CH, (d) foi referenciado ao sinal em δ 70 ppm, apresentando um deslocamento químico um pouco maior devido a uma maior intensidade do efeito de desproteção dos dois grupos retiradores de densidade vizinhos a ele. Os sinais de baixa intensidade em δ 175 ppm foram atribuídos aos carbonos carbonílicos dos ésteres (a, a' e a'') (MANNINA et al., 1999; RABILLER; MAZE, 1989). Essa região de deslocamento químico é característica de carbonos não-hidrogenados ou carbonílicos de um éster, podendo ser alterada por alguns fatores como ressonância, grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica, quelação, dentre outras (VLAHOV; CHEPKWONY; NDALUT, 2002).

Figura 6 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ^{13}C) dos produtos da reação de esterificação do glicerol.



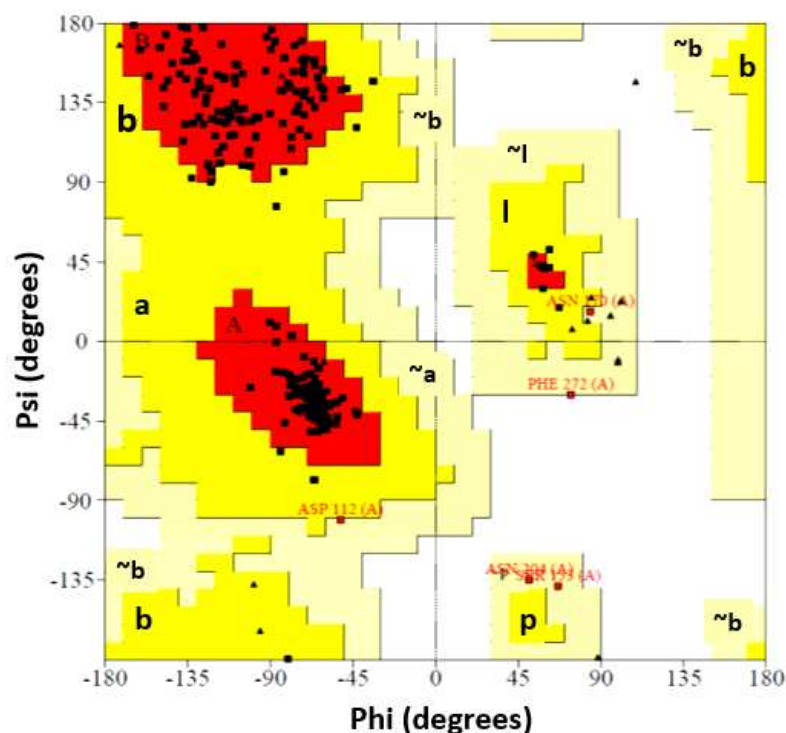
Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Resultados computacionais

5.3.1 Modelagem molecular da ET2

O gráfico de Ramachandran foi utilizado para avaliar a qualidade do empacotamento global da proteína, as possíveis incertezas estruturais em regiões específicas do modelo e os parâmetros estereoquímicos que têm grande relevância na qualidade geral do modelo (SOBOLEV et al., 2020). Na Figura 7 é possível observar que a estrutura prevista apresentou cerca de 91,5% dos resíduos nas regiões vermelhas, representando regiões favoráveis ao arranjo (DONG et al., 2020). As regiões em amarelo (a, b, l e p) são adicionalmente permitidas e representaram 6,5%. As regiões mais claras (~a, ~b, ~l e ~p) são altamente permitidas e representaram 1,6%. Nas regiões desfavoráveis, representadas pelos pontos pretos, foi de 0,4%. Alguns dos resíduos presentes na proximidade do terminal N e C da enzima são aqueles encontrados em regiões desfavoráveis e estão associados a estruturas da enzima modelo escolhida (ROSE, 2019). Assim, ao analisar os resultados do gráfico Ramachandran, pode-se inferir que o modelo computacional é uma boa representação da estrutura tridimensional da proteína, considerando seus aspectos espaciais, angulares e torcionais (PARK et al., 2023).

Figura 7 - Gráfico de Ramachandran para modelagem por homologia de ET2, mostrando regiões favoráveis e desfavoráveis para alinhamento de resíduos de aminoácidos.

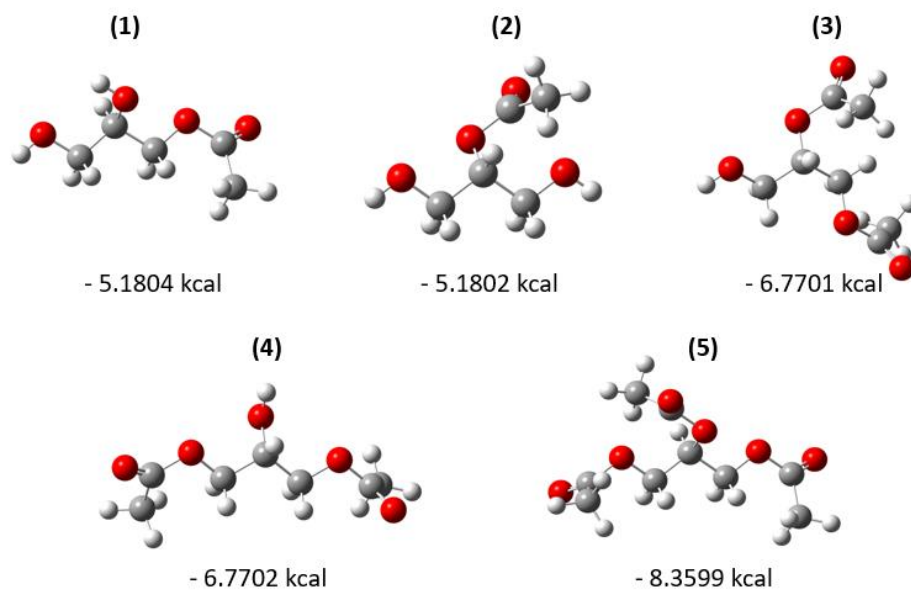


Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.2 Docking molecular e simulações de DM

Os ligantes otimizados apresentaram frequências positivas, mostrando que não são estados de transição. A melhor conformação, com menor valor energético, foi selecionada para o trabalho de *docking* com a enzima (LEE et al., 2023). A Figura 8 mostra os melhores confôrmeros e seus respectivos valores de energia, com todas as estruturas otimizadas e o cálculo de frequência feito para determinar se os ligantes em questão são quimicamente possíveis.

Figura 8 - Energia dos melhores confôrmeros obtidos nos arquivos de saída da otimização e frequência dos ligantes (1) monogly1; (2) monogly2; (3) digly1; (4) digly2 e (5) trigly.

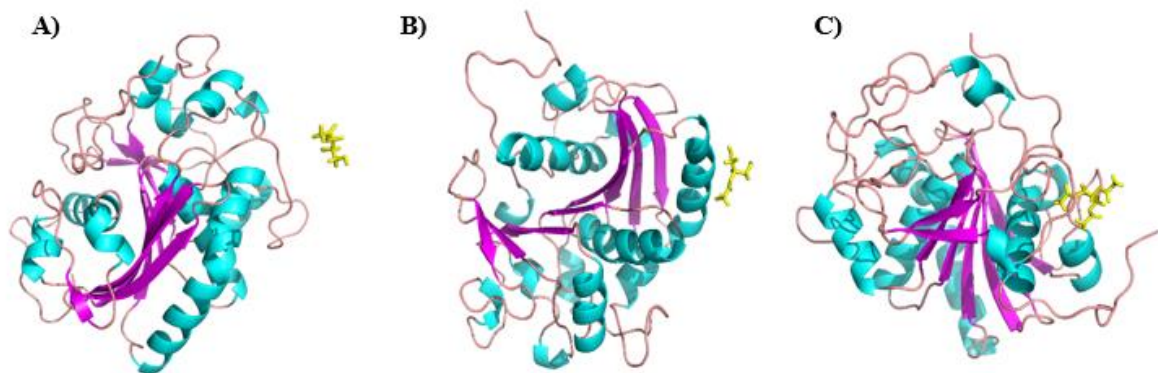


Fonte: elaborado pelo autor.

O *Docking* Molecular gerou nove poses para cada ligante, e dentre os modelos, aquele com menor energia e mais próximo do sítio catalítico da enzima foi selecionado para visualização no *AutoDock Tools*. A tríade catalítica compreende os resíduos de aminoácidos Ser₁₅₃, His₂₆₈ e Asp₂₀₆, com o resíduo de serina atuando como nucleófilo. Substratos com conformações adequadas e afinidade química com os resíduos catalíticos podem ocupar esses subsítios para serem submetidos à catálise. O ligante TAG apresentou energias mais favoráveis e melhores conformações no sítio catalítico quando orientado pelo carbono alfa de Ser₁₅₃.

Simulações de DM foram realizadas para determinar a energia de interação entre a ET2 e os ligantes estudados. As imagens da Figura 9 foram geradas a partir de simulações DM. As Figuras 9A e 9B mostram a aproximação do ligante MAG. Dentre as duas possibilidades, monogly1 e monogly2, observou-se que a segunda apresenta melhor aproximação e energia de interação com o sítio ativo da ET2 menor do que a primeira possibilidade. A Figura 9C corresponde ao ligante TAG e mostra, que dentre os demais ligantes, é o complexo ligante-proteína mais estável, com menores valores de energia de interação e posições muito favoráveis no sítio catalítico.

Figura 9 - Complexo ET2 com os ligantes (A) monogly1; (B) monogly2 e (C) trigly, obtidos e tratados no programa Pymol. Os 50 ns finais foram utilizados para formar a figura, mostrando a distância dos ligantes ao sítio ativo.



Fonte: elaborado pelo autor.

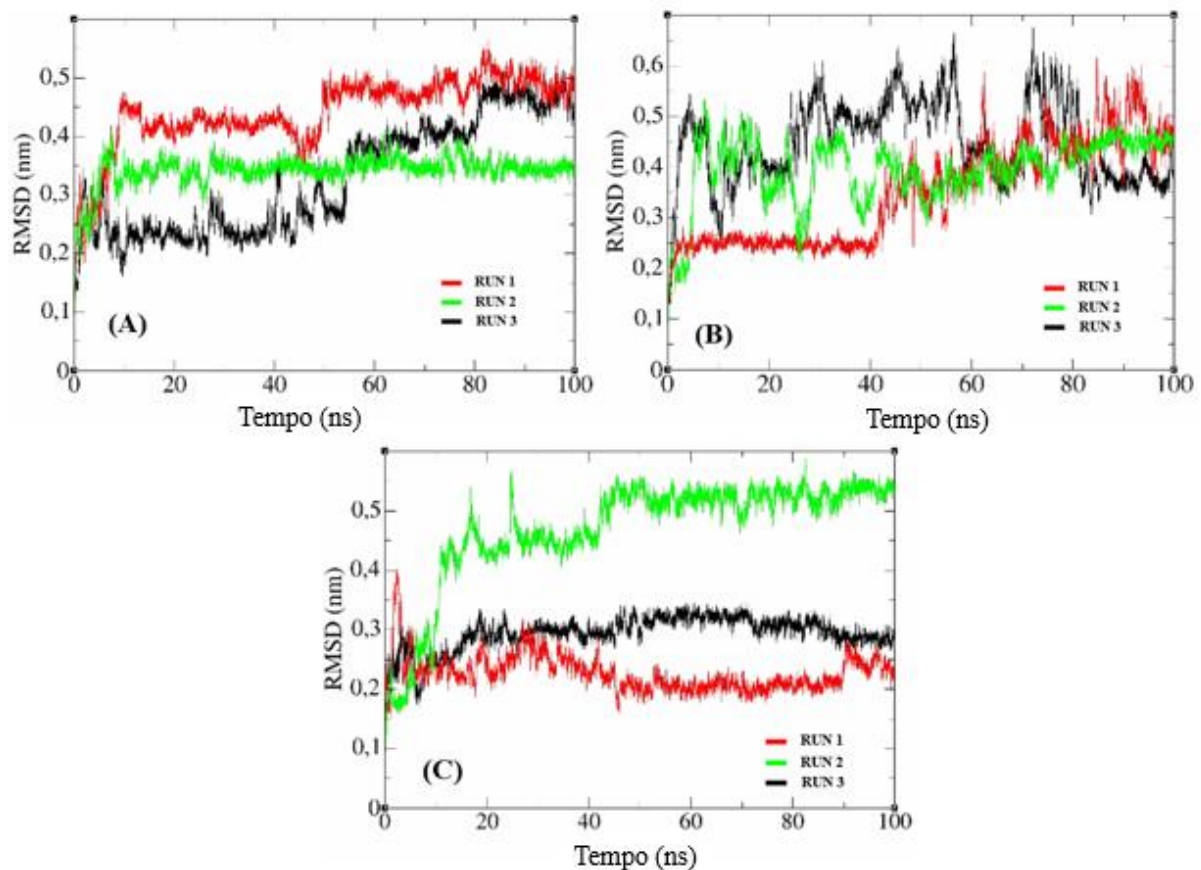
A partir desses resultados foram selecionados os extremos de energia, os de maior energia, os monoacilgliceróis, e os de menor energia, os triacilgliceróis, para cálculos de DM, para avaliar suas diferenças energéticas e conformacionais.

A Figura 10 ilustra o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre a ET2 e os ligantes. Os complexos analisados atingiram o equilíbrio na faixa triplicada de 50-100 ns. Assim, as análises do EPI foram realizadas dentro deste intervalo de tempo. O RMSD foi utilizado para calcular a diferença de energia dos confôrmeros da proteína ao longo da DM, mostrando as deformações espaciais da proteína (DA FONSECA et al., 2023).

Para cada simulação de DM, foi realizada uma triplicata para garantir a validação dos cálculos para os ésteres glicerídicos. Em média, os resultados do RMSD de cada ligante triplicado apresentaram variação aceitável entre uma simulação DM e outra, demonstrando resultados satisfatórios. Agora, analisando o RMSD entre os ligantes, percebe-se que a

variação mais estável do esqueleto da enzima orientado pelo $C\alpha$ é atribuída ao produto TAG, sendo termodinamicamente mais favorecida em relação aos dois casos dos produtos MAG, pré-definindo variações brutas em aproximadamente 50 ns de simulação. Isto pode indicar que a interação entre a ET2 e o produto TAG é a mais favorável.

Figura 10 - RMSD do complexo ET2 com os ligantes (a) monogly1; (b) monogly2 e (c) trigly, destacando os extremos de energia obtidos anteriormente em resultados de dinâmica molecular.



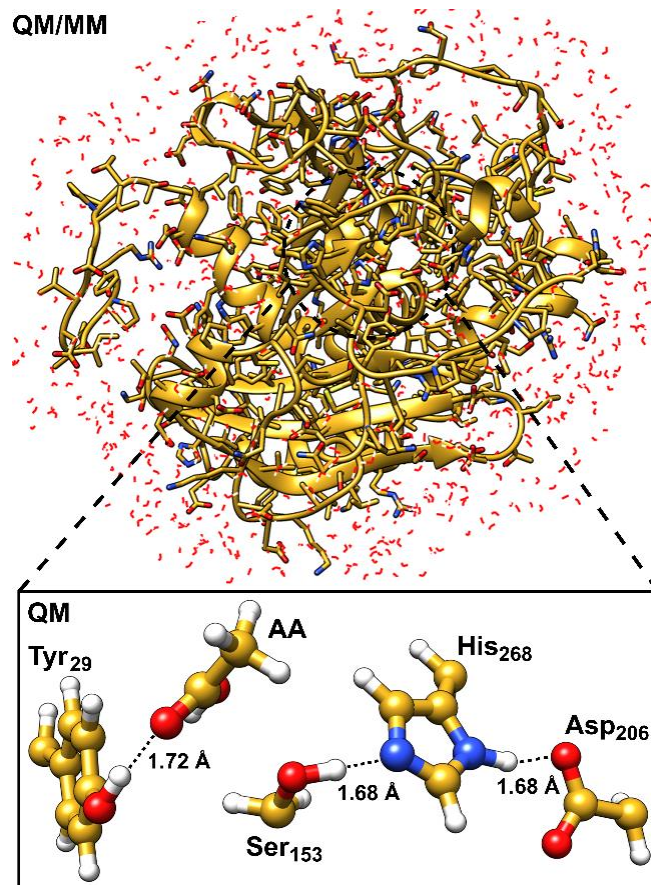
Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.3 Cálculos mecanísticos de QM/MM

O sítio ativo da ET2, semelhante à outras lipases naturais, é composto por uma tríade catalítica formada pelos resíduos Ser₁₅₃, His₂₆₈ e Asp₂₀₆, conforme mostrado na Figura 11 (POLGÁR, 2005b). Substratos com conformações adequadas e afinidade química com os resíduos catalíticos podem ligar-se a esse local e sofrerem catálise (HALL; BARLOW, 2003). O mecanismo catalítico geral dessas enzimas é dividido em duas vias individuais: acilação e desacilação. Na etapa de acilação, a enzima ataca uma molécula de ácido acético, produzindo

um intermediário acil-enzima. Consecutivamente, na etapa de desacilação, o resíduo de acil-serina ativado entrega o grupo acil a uma molécula de glicerol livre. No caso do glicerol, este ciclo pode ser repetido múltiplas vezes, produzindo produtos mono, di ou trissubstituídos.

Figura 11 - Modelo computacional da ET2 utilizado nos cálculos mecanísticos. A camada MM inclui toda a estrutura da enzima, substratos e moléculas de água explícitas. A camada QM inclui a tríade catalítica da enzima (Ser₁₅₃, His₂₆₈ e Asp₂₀₆), um segundo resíduo de coordenação (Tyr₂₉) e as moléculas de substrato.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.3.1 Mecanismo de acilação

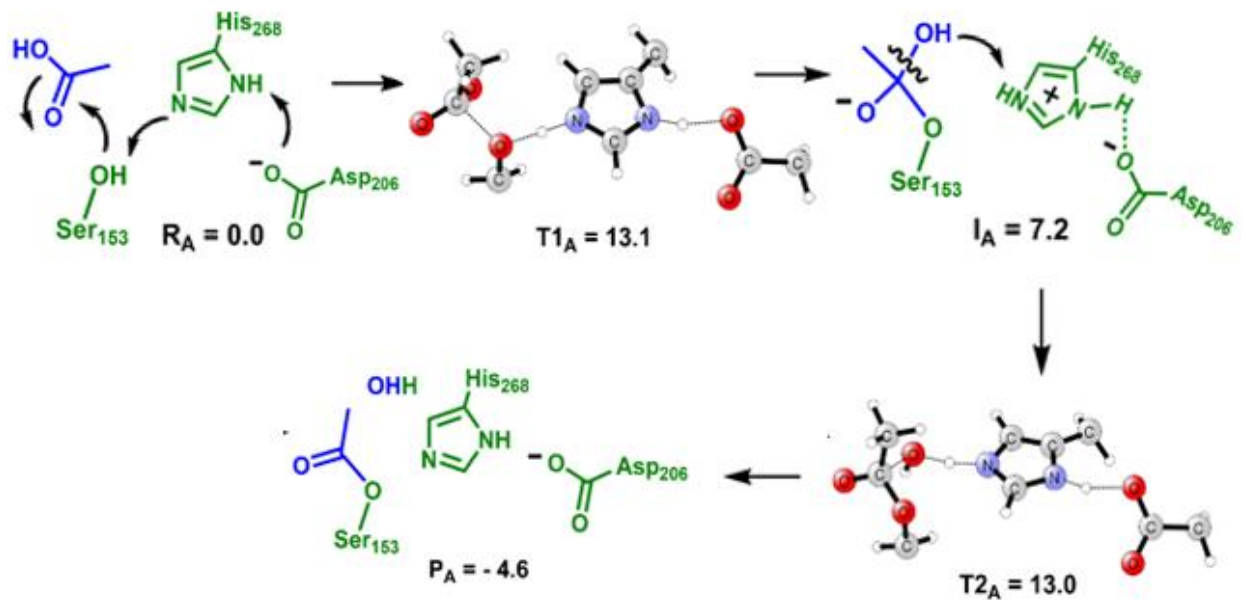
Na estrutura do reagente (R_A) para a etapa de acetilação, o átomo de carbono eletrofílico da molécula de AA está posicionado a 2,98 Å do átomo de oxigênio nucleofílico de Ser₁₅₃. Além disso, o átomo de oxigênio carbonílico de AA forma uma ligação de hidrogênio com o segundo resíduo de coordenação Tyr₂₉. Interações fracas entre o grupo

metila do AA e os resíduos hidrofóbicos Ile₉₄ e Leu₁₅₄ também são responsáveis pela estabilização do complexo enzima-substrato.

Na primeira etapa do mecanismo de acetilação, mostrado na Figura 12, o átomo de carbono eletrofílico do AA sofre um ataque nucleofílico do resíduo Ser₁₅₃. Essa etapa ocorre com uma barreira de energia livre de 13,1 kcal/mol e é a etapa limitante de todo o mecanismo. Juntamente com o ataque nucleofílico, também ocorre uma etapa de transferência de prótons, onde o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila de Ser₁₅₃ é transferido para o átomo de nitrogênio de His₂₆₈. O estado de transição T1_A tem uma distância eletrófilo-nucleófilo de 1,95 Å e uma distância de ligação de hidrogênio de 2,52 Å entre o átomo de oxigênio da Ser₁₅₃ e o átomo de nitrogênio da His₂₆₈. O papel do Asp₂₀₆ neste mecanismo é aumentar a basicidade de His₂₆₈, tornando os eventos de protonação-desprotonação mais favoráveis. A distância entre os átomos pesados desses aminoácidos (O e N) sugere que o próton é igualmente compartilhado entre esses resíduos (SERAFIM et al., 2023).

Um intermediário *gem*-diolato é gerado após o primeiro estado de transição. No intermediário I_A, o segundo resíduo de coordenação Tyr₂₉ é responsável por estabilizar a carga negativa desenvolvida no átomo de oxigênio carbonílico do diolato. No entanto, I_A ainda é endergônico em 7,2 kcal/mol. Este intermediário relativamente instável pode então se desfazer através de uma etapa de transferência de prótons, promovida pelo His₂₆₈ protonado que atua como um ácido geral. O colapso deste intermediário *gem*-diolato ocorre com uma barreira energética de 5,8 kcal/mol de I_A. Nesse processo é liberada uma molécula de água, que leva à forma acilada da enzima P_A, que é exergônica em 4,6 kcal/mol.

Figura 12 - Mecanismo de acilação promovido por ET2 e ácido acético. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre dos estados de transição e intermediários são mostrados em kcal/mol e são relativos à R_A.



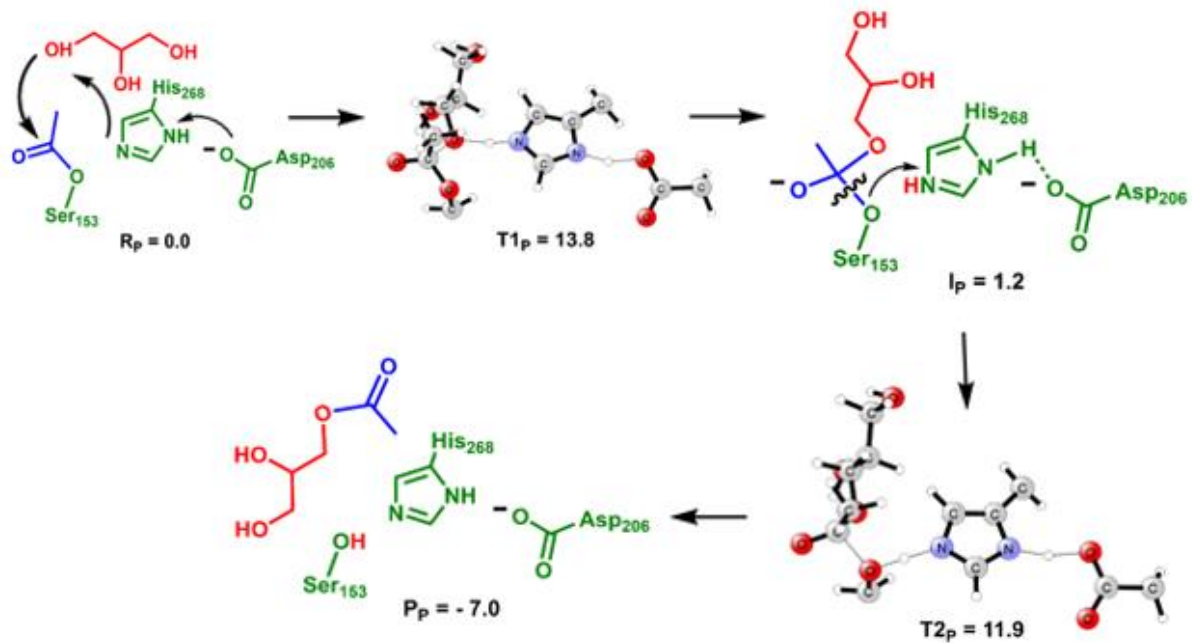
Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.3.2 Mecanismo de desacilação

A enzima acil ativada, formada após o processo de acilação, pode reagir com uma molécula de álcool livre para promover uma reação de esterificação. Como existem dois álcoois primários e um álcool secundário na estrutura química do glicerol, são possíveis múltiplos produtos de esterificação. A energética das duas reações distintas de esterificação foi avaliada e é mostrada na Figura 13 (álcool primário) e Figura 14 (álcool secundário).

Na primeira etapa do mecanismo de desacilação, o grupo OH do glicerol ataca o átomo de carbono eletrofílico da Ser₁₅₃ acilado. Esta etapa ocorre com uma barreira de energia livre de 13,8 e 12,9 kcal/mol para os grupos OH primário e secundário, respectivamente. A distância eletrófilo-nucleófilo em T_{1P} e T_{1S} é aproximadamente a mesma (1,58 Å), e a diferença de energia entre os dois está associada à acomodação do substrato no sítio ativo da enzima. Sabe-se que as enzimas facilitam uma via de reação em detrimento de outras com base na orientação do substrato. As lipases são comumente exploradas como catalisadores quirais em síntese orgânica devido à sua notável enantioseletividade (ITOH et al., 2004; MALDONADO et al., 2021). Ambas as etapas de ataque nucleofílico também ocorrem acopladas a uma etapa de transferência de prótons promovida pela His₂₆₈, que atua como base, polarizada por Asp₂₀₆, gerando os intermediários *gem*-diolato. No entanto, o substrato (glicerol) é a fonte de próton neste mecanismo, e não o Ser₁₅₃.

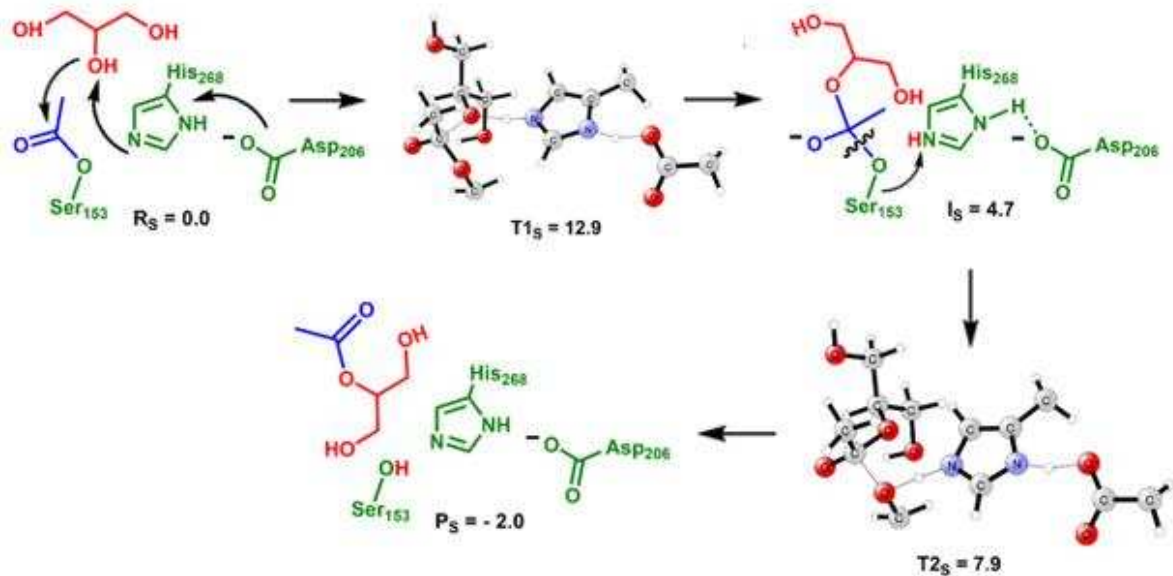
Figura 13 - Mecanismo de esterificação do álcool primário de glicerol por ET2. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre são mostrados em kcal/mol.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os intermediários I_p e I_s possuem uma diferença energética mais significativa (3,5 kcal/mol). Embora o *gem*-diolato secundário seja produzido mais rapidamente do que o seu homólogo primário (0,9 kcal/mol de energia de ativação mais baixa), ele é mais instável e pode sofrer dissociação, especialmente em altas temperaturas. Ambos os intermediários podem colapsar com barreiras de energia livre de 10,7 e 3,2 kcal/mol para os álcoois primários e secundários, respectivamente de I_p e I_s. Essa etapa ocorre com a transferência de prótons de His₂₆₈ para Ser₁₅₃, liberando o produto e regenerando a enzima livre (não acilada). O monoacilglicerol, acilado na posição primária, é 5 kcal/mol mais exergônico que seu equivalente secundário. Com base na energética dessas duas possíveis vias, é possível inferir que a esterificação do álcool secundário produz o produto cinético e é favorável em baixas temperaturas. Por outro lado, a esterificação do álcool primário produz o produto termodinâmico mais estável e é provavelmente o mecanismo de reação utilizado pela ET2, uma vez que a reação é realizada a 40°C.

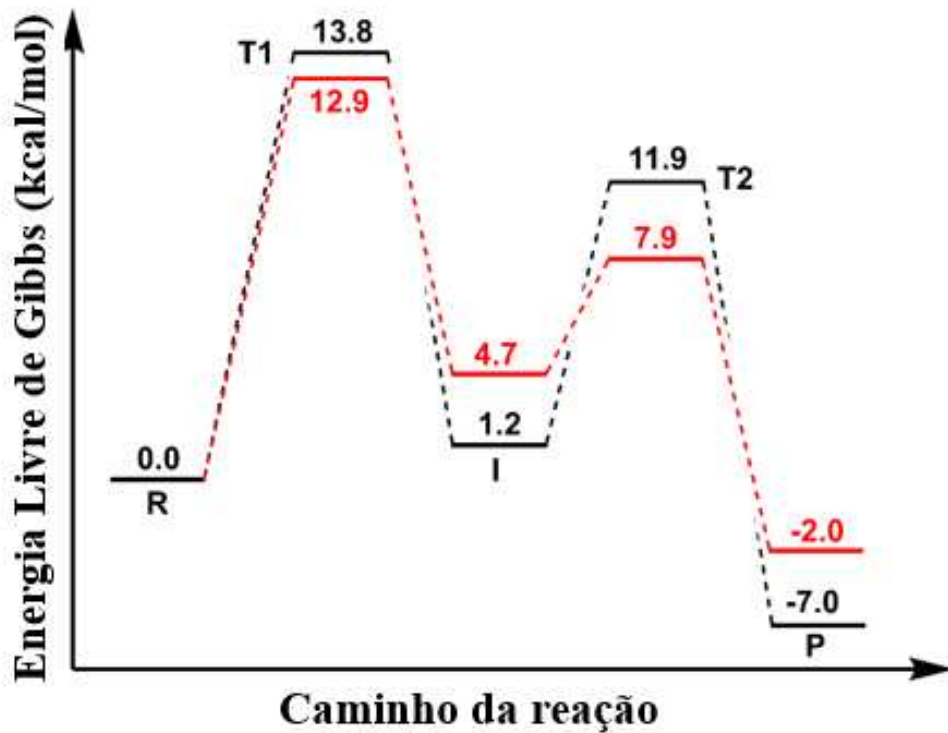
Figura 14 - Mecanismo de esterificação do álcool secundário de glicerol por ET2. Os resíduos não catalíticos são omitidos para maior clareza. Os valores de energia livre são mostrados em kcal/mol.



Fonte: elaborado pelo autor.

O gráfico da Fig. 15 mostrou aspectos cinéticos e termodinâmicos para esse perfil reacional. O caminho reacional em vermelho equivale ao produto cinético da reação, pois possui barreira energética de ativação menor, entretanto, a variação de energia entre o intermediário reacional e o segundo estado de transição é pequena, podendo deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise. Já o caminho reacional em preto representa o caminho reacional para o produto termodinâmico, que embora apresenta maior barreira energética associada à sua formação, possui maior variação de energia entre o intermediário reacional e o segundo estado de transição, favorecendo a continuação do equilíbrio da reação no sentido dos produtos.

Figura 15 - Gráfico de reação considerando Energia Livre de Gibbs e Caminho reacional.



Fonte: elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Através da aplicação do método estatístico Taguchi foi possível determinar quais são os parâmetros mais influentes para uma conversão enzimática eficiente de glicerol em ésteres. Os resultados indicaram que a temperatura na qual a reação é realizada pode influenciar grandemente a quantidade de glicerídeos produzidos (conversão) em um período fixo. Conforme previsto pelas análises S/R e ANOVA, os demais parâmetros: a razão molar dos substratos, a carga do biocatalisador e o tempo de reação tiveram menos influência na conversão da reação do que a temperatura. Com base em todas as análises estatísticas realizadas, as condições ótimas para uma síntese eficiente de glicerídeos a partir de glicerol e ácido acético por ET2 são 40°C, Gl:AA 1:1, 15% l/l de biocatalisador e 12,5h.

Através de técnicas de modelagem por homologia, foi proposto um modelo computacional de ET2 (lipase de *Thermomyces lanuginosus*), considerando toda a estrutura primária (286 aminoácidos). O gráfico de Ramachandran confirmou a precisão do modelo, apresentando regiões mínimas desfavoráveis (0,4%).

Os valores de EPI para as simulações de DM são consistentes com os resultados estatísticos e experimentais do trabalho. O menor valor médio de EPI (-35,9071 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

refere-se ao ligante TAG, o que concorda com os resultados experimentais, onde o triacilglicerol obteve o perfil com maior rendimento entre os possíveis produtos do meio reacional. Comparando com os resultados estatísticos obtidos com o auxílio do método Taguchi é possível perceber a correlação entre os resultados teóricos e experimentais uma vez que o rendimento da reação obtido trouxe a maior parte do triglicerídeo em solução o que pode ser justificado pela menor energia e, conseqüentemente, maior estabilidade do complexo triglicerídeo formado. Além disso, o caso monogly2 (valor médio: $-13,8055 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) é mais favorável que o monogly1 (valor médio: $-10,9877 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), mostrando que o carbono central possui a característica de monoesterificação. Portanto, estudos experimentais e teóricos apontam que o caso dos triglicerídeos apresenta as condições mais favoráveis para conversão.

Os estudos mecanísticos QM/MM mostraram que a reação de esterificação do glicerol e do ácido acético pode prosseguir através de um ciclo catalítico de acilação e desacilação. Nesse mecanismo, a enzima ativa uma molécula de ácido acético, com energia livre de ativação de $13,1 \text{ kcal/mol}$, através de um ataque nucleofílico acoplado a uma transferência de prótons, promovida pela tríade catalítica. O ciclo de desacilação ocorre com barreira energética semelhante, $13,8$ e $12,9 \text{ kcal/mol}$, para os álcoois primários e secundários do glicerol. Estes resultados sugerem que a esterificação do álcool secundário gera o produto cinético, enquanto a esterificação do álcool primário leva ao produto termodinâmico mais estável, com maior probabilidade de ser produzido na temperatura em que o experimento foi realizado. A área de biocatálise associada aos avanços em bioinformática tem trazido mais precisão na aplicação de resíduos industriais e demais subprodutos na obtenção de produtos de alto valor agregado

REFERÊNCIAS

- ACHERKI, H.; BOUAID, A.; MARCHETTI, J. M. Optimization of the enzymatic butanolysis of jatropha oil for biodiesel production using Eversa. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 16, n. 1, p. 219–227, 15 jan. 2022.
- AITZETMÜLLER, K. High-performance liquid chromatographic analysis of partial glycerides and other technical lipid mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 139, n. 1, p. 61–68, set. 1977.
- ALEXANDRE, J. Y. N. H. 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, 27 out. 2022a.
- ALMEIDA, F. L. C. et al. Biodiesel production by lipase-catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 4, p. 1141–1159, 23 jul. 2021.
- BAUZA, R. et al. Separation of Mono-, Di-, and Tristearin from an Industrial Mixture of Glycerides by Normal- and Reverse-Phase HPLC. **Separation Science and Technology**, v. 27, n. 5, p. 645–661, abr. 1992.
- BEIER, C.; ZACHARIAS, M. Tackling the challenges posed by target flexibility in drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 347–359, 29 abr. 2010.
- BELLA, G.; ROTONDO, A. Theoretical prediction of ¹³C NMR spectrum of mixed triglycerides by mean of GIAO calculations to improve vegetable oils analysis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 232, p. 104973, out. 2020.
- BERTINETTO, C.; ENGEL, J.; JANSEN, J. ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta: X**, v. 6, p. 100061, nov. 2020.
- BRANDÃO, L. M. DE S. et al. Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 1, 27 jan. 2021.
- BURLEY, S. K. et al. Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. **Methods Mol Biol.**, v. 1607, p. 627–641, 2017.
- CALLIL-SOARES, P. H.; BIASI, L. C. K.; PESSOA FILHO, P. DE A. Effect of preprocessing and simulation parameters on the performance of molecular docking studies. **Journal of Molecular Modeling**, v. 29, n. 8, p. 251, 15 ago. 2023.
- CANDRA, G. N. H.; WIJAYA, I. M. A. P. Molecular Docking Kaempferol sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis secara In Silico. **Jurnal Ilmiah Medicamento**, v. 7, n. 1, p. 13–18, 31 mar. 2021.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577, mar. 2021a.

CAVALCANTE, F. T. T. et al. Current Status and Future Perspectives of Supports and Protocols for Enzyme Immobilization. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1222, 11 out. 2021b.

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

CHANG, M. Y.; CHAN, E.-S.; SONG, C. P. 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**, v. 283, p. 119266, jan. 2021.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13–27, 13 jul. 2012.

CHAUDHARY, M. K. et al. Computational evaluation on molecular stability, reactivity, and drug potential of frovatriptan from DFT and molecular docking approach. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1191, p. 113031, dez. 2020.

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

CORAL, N. et al. Soybean biodiesel methyl esters, free glycerin and acid number quantification by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 69–71, 7 fev. 2013.

COUTINHO, L. P. et al. A mechanistic insight for the biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine: An ONIOM theoretical approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 678, p. 148–157, out. 2023.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. **Anais...**Basel, Switzerland: MDPI, 1 nov. 1999.

DA FONSECA, A. M. et al. Screening of Potential Inhibitors Targeting the Main Protease Structure of SARS-CoV-2 via Molecular Docking, and Approach with Molecular Dynamics, RMSD, RMSF, H-Bond, SASA and MMGBSA. **Molecular Biotechnology**, 25 jul. 2023.

DA S. MOREIRA, K. 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**, v. 177, p. 223–244, jan. 2022.

DAINA, A.; ZOETE, V. Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4612, 18 set. 2019.

DANA, A. G. et al. Automated reaction kinetics and network exploration (Arkane): A statistical mechanics, thermodynamics, transition state theory, and master equation software. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 55, n. 6, p. 300–323, 3 jun. 2023.

- DE SOUSA, I. G. et al. Renewable processes of synthesis of biolubricants catalyzed by lipases. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 109006, fev. 2023a.
- DE SOUSA JUNIOR, P. G. et al. Optimization and theoretical analysis of lipase-catalyzed enzymatic esterification of glycerol for efficient glycerides synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109033, set. 2023.
- DING, L.-N. et al. Advances in plant GDSL lipases: from sequences to functional mechanisms. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 9, p. 151, 3 set. 2019.
- DO NASCIMENTO, C. P. G. et al. Degradation of xanthene-based dyes by photoactivated persulfate: experimental and computational studies. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 23 set. 2023.
- DONG, S. et al. A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1542–1548, 29 set. 2020.
- ERIKSEN, K.; NIELSEN, B. E.; PITTELKOW, M. Visualizing 3D Molecular Structures Using an Augmented Reality App. **Journal of Chemical Education**, v. 97, n. 5, p. 1487–1490, 12 maio 2020.
- ESWAR, N. et al. Protein Structure Modeling with MODELLER. **Methods Mol Biol.**, v. 426, p. 145–159, 2008.
- FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 4 jun. 2019.
- FATEMAH, A.; RASOOL, S.; HABIB, U. Interactive 3D Visualization of Chemical Structure Diagrams Embedded in Text to Aid Spatial Learning Process of Students. **Journal of Chemical Education**, v. 97, n. 4, p. 992–1000, 14 abr. 2020.
- FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 653–658, fev. 2019.
- GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 27 nov. 2019.
- GERMANO DE SOUSA, I. et al. A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa ® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1–22, 11 nov. 2022a.
- GREENIDGE, P. A. et al. Improving Docking Results via Reranking of Ensembles of Ligand Poses in Multiple X-ray Protein Conformations with MM-GBSA. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 10, p. 2697–2717, 27 out. 2014.
- HALL, B. G.; BARLOW, M. Structure-Based Phylogenies of the Serine α -Lactamases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 3, p. 255–260, 1 set. 2003.

HAMEDUH, T. et al. Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3494–3506, 2020.

HIROSE, T. et al. Synthesis of triacylglycerol containing conjugated linoleic acid by esterification using two blended lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 1, p. 35–38, jan. 2006.

HU, X. et al. Molecular dynamics simulation of the interaction of food proteins with small molecules. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134824, mar. 2023.

ITOH, T. et al. Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 437, 2004.

JAKHAR, R. et al. Relevance of Molecular Docking Studies in Drug Designing. **Current Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 270–278, 11 jun. 2020.

JOSHI, S. Y.; DESHMUKH, S. A. A review of advancements in coarse-grained molecular dynamics simulations. **Molecular Simulation**, v. 47, n. 10–11, p. 786–803, 24 jul. 2021.

KUMAR, R. et al. Estimation of Glycerides and Free Fatty Acid in Oils Extracted From Various Seeds from the Indian Region by NMR Spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 11, p. 1675–1685, 8 nov. 2011.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEE, C. et al. GalaxyDock2-HEME: Protein–ligand docking for heme proteins. **Journal of Computational Chemistry**, v. 44, n. 14, p. 1369–1380, 30 maio 2023.

LEE, J. et al. Faster Exact Exchange for Solids via occ-RI-K: Application to Combinatorially Optimized Range-Separated Hybrid Functionals for Simple Solids with Pseudopotentials Near the Basis Set Limit. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, n. 12, p. 7336–7349, 13 dez. 2022.

LI, X.; YANG, X.; SUN, H. NMR for Stereochemical Elucidation. Em: **Chiral Separations and Stereochemical Elucidation**. v.1. p. 505–549, jun 2023.

LI, Y. et al. Deep learning in bioinformatics: Introduction, application, and perspective in the big data era. **Methods**, v. 166, p. 4–21, ago. 2019.

LI, Y.-C.; LU, Y.-C. BLASTP-ACC: Parallel Architecture and Hardware Accelerator Design for BLAST-Based Protein Sequence Alignment. **IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems**, v. 13, n. 6, p. 1771–1782, dez. 2019.

LI, Z.; LU, D.; GAO, X. Optimization of mixture proportions by statistical experimental design using response surface method - A review. **Journal of Building Engineering**, v. 36, p. 102101, abr. 2021.

LIMA, P. J. M. et al. An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial

products via chemical and biochemical routes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2794–2818, 5 dez. 2022.

LIU, W. et al. Use of different approaches for deacidification of high-acid rice bran oil: A comparison of glyceride lipid profiles. **LWT**, v. 173, p. 114284, jan. 2023.

MAHRAM, A.; HERBORDT, M. C. NCBI BLASTP on High-Performance Reconfigurable Computing Systems. **ACM Transactions on Reconfigurable Technology and Systems**, v. 7, n. 4, p. 1–20, 23 jan. 2015.

MALDONADO, M. R. et al. Key mutation sites for improvement of the enantioselectivity of lipases through protein engineering. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, p. 108047, ago. 2021.

MANNINA, L. et al. Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a ¹³C NMR study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 103, n. 1–2, p. 47–55, dez. 1999.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 1 nov. 2001.

MEHMOOD, U. et al. Biocatalytic Processes for Biodiesel Production. Em: **Biodiesel Technology and Applications**. [s.l.] Wiley, 2021. p. 1–58.

MELLO, V. M. et al. Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using ¹H-NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1051–1054, nov. 2008.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5807, 19 nov. 2019.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Improvement of enzymatic activity and stability of lipase A from *Candida antarctica* onto halloysite nanotubes with Taguchi method for optimized immobilization. **Applied Clay Science**, v. 228, p. 106634, out. 2022.

MOREIRA, K. 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**, v. 8, 30 jun. 2020a.

MOREIRA, K. S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya sp.*) via RSM. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 414, 9 abr. 2020b.

MUHAMMED, M. T.; AKI-YALCIN, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 12–20, 8 jan. 2019.

NETO, F. S. et al. Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis. **Polymers**, v. 15, n.

9, p. 2057, 26 abr. 2023.

NOBRE, M. M. R. et al. Ester Production Using the Lipid Composition of Coffee Ground Oil (*Coffea arabica*): A Theoretical Study of Eversa® Transform 2.0 Lipase as an Enzymatic Biocatalyst. **Compounds**, v. 3, n. 3, p. 411–429, 28 jul. 2023.

OLIVEIRA, A. P. S. et al. Virtual screening of flavonoids from *Chamaecrista* genus: ADME and pharmacokinetic properties, interactions of flavonoid–DNA complex by molecular docking and molecular dynamics. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–9, 19 set. 2022.

PAHARI, S.; SUN, L.; ALEXOV, E. PKAD: a database of experimentally measured pKa values of ionizable groups in proteins. **Database**, v. 2019, 1 jan. 2019.

PÁLL, S. et al. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 13, 7 out. 2020.

PARK, S. W. et al. Revisiting the Ramachandran plot based on statistical analysis of static and dynamic characteristics of protein structures. **Journal of Structural Biology**, v. 215, n. 1, p. 107939, mar. 2023.

PAWAR, S. S.; ROHANE, S. H. Review on Discovery Studio: An important Tool for Molecular Docking. **Asian Journal Of Research in Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 1–3, 2021.

PEARLSON, M.; WOLLERSHEIM, C.; HILEMAN, J. A techno-economic review of hydroprocessed renewable esters and fatty acids for jet fuel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 1, p. 89–96, jan. 2013.

PEDRON, F. N. et al. Novel Lennard-Jones Parameters for Cysteine and Selenocysteine in the AMBER Force Field. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 2, p. 595–604, 23 jan. 2023.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19–20, p. 2161–2172, 7 out. 2005.

RABET, S.; RAABE, G. Comparison of the GAFF, OPLSAA and CHARMM27 force field for the reproduction of the thermodynamics properties of furfural, 2-methylfuran, 2,5-dimethylfuran and 5-hydroxymethylfurfural. **Fluid Phase Equilibria**, v. 554, p. 113331, mar. 2022.

RABILLER, C.; MAZE, F. Quantitative analysis and determination of the enantiomeric purity of glycerides by ¹³C NMR spectroscopy. Application to the lipase-catalysed transesterification of triacylglycerides. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 582–584, jun. 1989.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 4, p. 1155–1166, 2 abr. 2021.

RODRIGUEZ, G.; BECKMAN, E. J. Modelling phase behavior of triglycerides, diglycerides and monoglycerides related to biodiesel transesterification in mixtures of alcohols and CO₂ using a polar version of PC-SAFT. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, p. 112303, jan. 2020.

ROSE, G. D. Ramachandran maps for side chains in globular proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 87, n. 5, p. 357–364, 22 maio 2019.

SALO-AHEN, O. M. H. et al. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 71, 30 dez. 2020.

SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. Em: [s.l: s.n.]. p. 13–34.

SARAF, I. et al. Quantitative Chemical Profiling of Commercial Glyceride Excipients via ¹H NMR Spectroscopy. **AAPS PharmSciTech**, v. 22, n. 1, p. 11, 3 jan. 2021.

SERAFIM, L. F. et al. Distinct chemical factors in hydrolytic reactions catalyzed by metalloenzymes and metal complexes. **Chemical Communications**, v. 59, n. 58, p. 8911–8928, 2023.

SOBOLEV, O. V. et al. A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. **Structure**, v. 28, n. 11, p. 1249–1258.e2, nov. 2020.

SOSA-MARTÍNEZ, J. et al. Process performance improvement for the simultaneous production of ligninolytic enzymes in solid culture using agricultural wastes through the Taguchi method. **Journal of Environmental Management**, v. 293, p. 112966, set. 2021.

SOUZA, J. E. S. et al. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 254, 15 jun. 2020.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Wiley**, v.1, p. 273–343, jan. 2006.

STECULA, A.; HUSSAIN, M. S.; VIOLA, R. E. Discovery of Novel Inhibitors of a Critical Brain Enzyme Using a Homology Model and a Deep Convolutional Neural Network. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 16, p. 8867–8875, 27 ago. 2020.

TAKANO, S.; KONDOH, Y. Monoglyceride analysis with reversed phase HPLC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 64, n. 7, p. 1001–1003, jul. 1987.

TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118–127, nov. 2013.

TORRES, P. H. M. et al. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 15 set. 2019.

TSUZUKI, W. et al. Conformation analysis of glycerides by nuclear magnetic resonance. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 76, n. 1, p. 93–102, maio 1995.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. **Biology Direct**, v. 15, n. 1, p. 12, 16 dez. 2020.

VEGA, K. et al. Chemoenzymatic Synthesis of Apremilast: A Study Using Ketoreductases and Lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.

VIDAL-LIMON, A.; AGUILAR-TOALÁ, J. E.; LICEAGA, A. M. Integration of Molecular Docking Analysis and Molecular Dynamics Simulations for Studying Food Proteins and Bioactive Peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 934–943, 2 fev. 2022.

VLAHOV, G. ^{13}C NMR Spectroscopy to Determine Structure and Composition of Waxes and Glycerides. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 126–136, 1 ago. 2008.

VLAHOV, G.; CHEPKWONY, P. K.; NDALUT, P. K. ^{13}C NMR Characterization of Triacylglycerols of *Moringa oleifera* Seed Oil: An “Oleic-Vaccenic Acid” Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 970–975, 1 fev. 2002.

WANG, Y.; LAMIM RIBEIRO, J. M.; TIWARY, P. Machine learning approaches for analyzing and enhancing molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 61, p. 139–145, abr. 2020.

WU, S. et al. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 1, p. 88–119, 4 jan. 2021.

YESILOGLU, Y.; KILIC, I. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and oleic acid. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 81, n. 3, p. 281–284, mar. 2004.

ZHENG, Y.; CHEN, X.; SHEN, Y. Commodity Chemicals Derived from Glycerol, an Important Biorefinery Feedstock. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 12, 10 dez. 2008.

ZHONG, X.-Z. et al. Dynamic change of bacterial community during dairy manure composting process revealed by high-throughput sequencing and advanced bioinformatics tools. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123091, jun. 2020.

APÊNDICE A - LISTA DE AMINOÁCIDOS

| | | |
|-----|---|-----------------|
| Ala | A | Alanina |
| Cys | C | Cisteína |
| Asp | D | Ácido Aspártico |
| Glu | E | Ácido Glutâmico |
| Phe | F | Fenilalanina |
| Gly | G | Glicina |
| His | H | Histidina |
| Ile | I | Isoleucina |
| Lys | K | Lisina |
| Leu | L | Leucina |
| Met | M | Metionina |
| Asn | N | Asparagina |
| Pro | P | Prolina |
| Gln | Q | Glutamina |
| Arg | R | Arginina |
| Ser | S | Serina |
| Thr | T | Treonina |
| Val | V | Valina |
| Trp | W | Triptofano |
| Tyr | Y | Tirosina |