UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA ELISA TOGNOLI LEITE

**Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e
suas possíveis aplicações biotecnológicas**

São Carlos

2021

ANA ELISA TOGNOLI LEITE

Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e suas possíveis aplicações biotecnológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Física aplicada
Opção: Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Leite, Ana Elisa T.

Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e suas possíveis aplicações biotecnológicas / Ana Elisa T. Leite; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida - São Carlos, 2021.

112 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. *Bacillus licheniformis*. 2. Esterase. 3. Caracterização bioquímica. 4. Aplicações biotecnológicas. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente minha mãe por estar sempre disposta a me ajudar independentemente do problema e a minha cachorrinha Catarina por ter escutado todas as minhas apresentações de seminário, trabalhos e discussão de matéria de prova além da companhia perfeita e momentos de distração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Polikarpov por ter me recebido em seu laboratório e por todo ensinamento e oportunidades.

Ao Dr. Vanessa, pelos ensinamentos e paciência para explicar quantas vezes necessárias qualquer coisa além da amizade e parceria durante esses anos.

A Paula e Lorenzo pela amizade, ensinamentos e pelos momentos de distração e diversão no laboratório e também fora dele.

Ao Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento pela ajuda em diversas ocasiões.

A todos do laboratório, Ana Gabriela, Raissa, Luana e Kate pela amizade e por sempre me ajudarem quando precisei.

À Dra. Livia Manzine, obrigado pela ajuda no laboratório e auxiliar-me a cada momento no laboratório.

Ao IFSC pela infraestrutura.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação, Sílvia e Ricardo, pela atenção e dedicação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001

Ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

“A ciência, meu rapaz, é feita de erros, mas de erros benéficos, já que conduzem pouco a pouco a verdade.”

Júlio Verne

RESUMO

LEITE, A. E. T. **Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e suas possíveis aplicações biotecnológicas.** 2021. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Lipases e esterases bacterianas são enzimas capazes de realizar a hidrólise de triacilgliceróis. Essa classe de enzima apresenta atividade em diferentes solventes orgânicos e possui diversas aplicações biotecnológicas como em aditivos para detergentes, biossurfactantes e ainda nas indústrias de papel e alimento. Neste trabalho foram realizadas a expressão heteróloga e purificação de duas esterases de *Bacillus licheniformis* (*B/EstA* e *B/EstB*) assim como as suas caracterizações bioquímica, biofísica, cristalização, e estudo de sua possível aplicação como bioemulsificante e na degradação de biofilme bacteriano. A expressão foi realizada em meio *lysogeny broth* (LB) e a purificação por meio de técnicas cromatográficas de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Através da caracterização bioquímica foi determinada uma temperatura ótima de 30°C, um pH ideal 9,0 e a melhor atividade em p-nitrofenil-octanoato para a *B/EstA*. Para a *B/EstB* foi obtido uma temperatura ótima de 50°C, um pH ideal 7,0 e a melhor atividade em pNP-butirato. Através da técnica de ThermoFluor e análise de estabilidade térmica dessas enzimas foi possível detectar uma maior estabilidade na presença de altas concentrações de NaCl. Nos testes de índice de emulsificação E24 foi observado que ambas as enzimas apresentam boa capacidade de emulsificação, atingindo mais de 50%. Quando aplicada na degradação de biofilmes, ambas as enzimas se mostraram capazes de atuarem tanto no tratamento quanto na prevenção do crescimento desse biofilme. Através desses resultados podemos entender melhor as características dessas enzimas e descobrir, a partir disso, possíveis aplicações em indústrias, ou áreas biotecnológicas e médicas no tratamento de biofilmes.

Palavras-chave: *Bacillus licheniformis*. Esterase. Caracterização bioquímica. Aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

LEITE, A. E. T. **Biochemical and biophysical studies of *Bacillus licheniformis* esterases and their possible biotechnological application.** 2021. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Bacterial lipases and esterases are enzymes capable of triacylglycerol hydrolysis. This class of enzyme frequently has activity in different organic solvents and has several biotechnological applications such as additives for detergents, biosurfactants and in the paper and food industries. In this work, heterologous expression, and purification of two esterases of *Bacillus licheniformis* (*B*/EstA and *B*/EstB) were carried out, as well as their biochemical and biophysical characterizations, crystallization, and study of their possible application as a bioemulsifier and in the degradation of bacterial biofilms. Expression was performed in LB medium, and purification used affinity chromatography and gel filtration. Biochemical characterization revealed an optimum temperature of 30 °C, an ideal pH of 9.0 and the best activity in pNP-octanoate for *B*/EstA. For *B*/EstB, an optimum temperature of 50 °C, an ideal pH of 7.0 and the best activity in pNP-butyrate were obtained. Using the ThermoFluor technique and analysis of thermal stability of these enzymes, it was possible to detect greater stability in the presence of high concentrations of NaCl. In the tests of emulsification index E24 it was observed that both enzymes have good emulsification capacity, reaching more than 50%. When applied to the degradation of biofilms, both enzymes were able to act both in the treatment and in preventing the growth of this biofilm. These results allowed to better understand the characteristics of these enzymes and discover their possible applications in industrial and biotechnological areas, such as the treatment of biofilms.

Keywords: *Bacillus licheniformis*. Esterase. Biochemical characterization. Biotechnological applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aplicações das enzimas nas indústrias.....	22
Figura 2 - Crescimento do mercado global de enzimas em bilhões de dólares. ..	23
Figura 3 - Enovelamento α - β -hidrolase onde as α -hélices e folhas β estão representadas em espirais e flechas, respectivamente. O local dos resíduos da tríade catalítica está indicado na própria figura.	24
Figura 4 - Tipos de emulsões a) Emulsão água/óleo b) Emulsão óleo/água c) óleo/água/óleo d) água/óleo/água	27
Figura 5 - Estágios do crescimento do biofilme bacteriano realizado em 5 etapas. Etapa 1, fixação inicial; etapa 2, fixação irreversível; etapa 3, maturação I; etapa 4, maturação II; etapa 5, dispersão.	29
Figura 6 - Locais das possíveis contaminações por biofilme bacteriano de <i>S. aureus</i> causando contaminação em implantes de quadril, carateres e gengivite.....	30
Figura 7 - Esquema utilizado na otimização manual da cristalização da enzima BIEstA.	45
Figura 8 - Esquema utilizado na otimização manual da cristalização da enzima BIEstB.	45
Figura 9 - Esquema representativo dos domínios conservados para cada uma das proteínas. A) domínio conservado da enzima BIEstA, superfamília SGNH hidrolase. B) domínio conservado da enzima BIEstB acetil esterase/lipase.	52
Figura 10 - Resultado alinhamento das enzima BIEstA e BIEstB.....	52
Figura 11 - Gel SDS-PAGE 12% 1- frações eluídas com 100, 150 e 200 mM imidazol; 2- após clivagem com TEV antes da segunda purificação na coluna de níquel; 3- após segunda purificação na coluna de níquel; 4- após cromatografia de exclusão molecular. A) BIEstA b) BIEstB.	53
Figura 12 - Caracterização bioquímica BIEstA a) atividade relativa da enzima em diferentes pHs b) atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) atividade relativa da enzima em diferentes substratos.....	56

Figura 13 - Caracterização bioquímica BIEstB a) atividade relativa da enzima em diferentes pHs b) atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) atividade relativa da enzima em diferentes substratos.	57
Figura 14 - a) Atividade relativa da enzima BIEstA em diferentes concentrações de sal. b) Temperatura de Melting da BIEstA em diferentes concentrações de sal.	61
Figura 15 - a) Atividade relativa da enzima BIEstB em diferentes concentrações de sal. b) Temperatura de Melting da BIEstB em diferentes concentrações de sal.	61
Figura 16 - Termo estabilidade das esterases a) atividade relativa da enzima BIEstA ao longo do tempo a temperatura de 30°C b) atividade relativa da enzima BIEstB ao longo do tempo a temperatura de 50°C.....	62
Figura 17 - Potencial eletrostático de superfície do modelo de homologia da enzima BIEstA (A) e da enzima BIEstB (B) gerado pelo plug-in PyMOL e APBS (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8 Schrödinger, LLC.). A escala de cores para o potencial eletrostático de superfície foi ajustada de -1 kT / e (vermelho) a 1 kT / e (azul).....	64
Figura 18 - Caracterização bioquímica da enzima BIEstA na presença de NaCl. a) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's b) Atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.....	66
Figura 19 - Caracterização bioquímica da enzima BIEstB na presença de NaCl. a) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's b) Atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.....	66
Figura 20 - Caracterização bioquímica da enzima BIEstB após aquecida a 50°C por 24 horas. a) Atividade relativa da enzima em diferentes tempos de incubação b) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's c) Atividade Relativa das enzimas em diferentes temperaturas d) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.	67
Figura 21 - Árvore filogenética da enzima BIEstA construída no MegaX aplicando MaximumLikelihood usando 1000 bootstraps.	70

Figura 22 - Árvore filogenética da enzima BIEstB construída no MegaX aplicando Maximum- Likelihood usando 1000 bootstraps.	71
Figura 23 - A curva experimental de espalhamento de raios-X BIEstA (círculos pretos abertos) foi comparada com a curva de espalhamento calculada a partir do modelo de baixa resolução restaurado (linha vermelha). Na inserção, o gráfico de Guinier para BIEstA nas concentrações 1 mg / mL e 6 mg / mL.	72
Figura 24 - Análise de dados SAXS. a) função P (r) calculada pelo GNOM (linha preta), mostrando um perfil quase simétrico. b) Gráfico de Kratky adimensional, mostrando perfis de espalhamento de raios-X em duas concentrações de enzima diferentes: 1 mg / mL (nos círculos vermelhos) e 6 mg / mL (nos círculos azuis).	74
Figura 25 - Superposição do envelope SAXS com modelo por homologia da enzima. Superior esquerdo: orientação inicial da enzima. Superior direito: girado 90° sobre o eixo x. Centro inferior: girado 90° em torno do eixo y.	75
Figura 26 - Cristais da proteína BIEstA nas condições 20% PEG 1500 e tampão MES pH 6,0 e 25% PEG 3350 e tampão MES pH 6,5.	75
Figura 27 - Cristais da proteína BIEstA após a otimização das condições iniciais. sendo as condições 25% PEG 3350 em tampão MES pH 6,5; 25% PEG 1500 em tampão MES pH 6,0 E 25% PEG 1500 em tampão MES pH 5,5.	76
Figura 28 - Pequenos cristais em formato de ouriço da proteína BIEstB nas condições 25% PEG 3K 0,1 M MES pH 6,5 E 25% PEG MME 2K E 0,1 M HEPES pH 7,5.	77
Figura 29 - Teste de emulsificação E24 para a enzima BIEstA a) Emulsificação formada em azeite de oliva com diferentes concentrações enzimáticas b) Emulsificação formada em óleo de girassol com diferentes concentrações enzimáticas.	80
Figura 30 - Teste de emulsificação E24 para a enzima BIEstB a) Emulsificação formada em azeite de oliva com diferentes concentrações enzimáticas b) Emulsificação formada em óleo de girassol com diferentes concentrações enzimáticas.	80
Figura 31 - Imagens de microscopia óptica das emulsões formadas com a concentração enzimática de 300 ppm da enzima BIEstB em a) Óleo de girassol b) Azeite de oliva.	82

Figura 32 - Visualização do biofilme bacteriano de <i>S. aureus</i> após 48 horas de crescimento.	83
Figura 33 - Atividade enzimática em biofilme pré-formado com diferentes enzimas em diferentes concentrações enzimáticas e diferentes tempos. a) BIEstA b) BIEstB c) Esterases desnaturadas. ** sem diferença significativa (p-valor >0,05) * com diferença significativa (p-valor<0,05).	85
Figura 34 - Atividade enzimática na prevenção do biofilme de <i>S. aureus</i> em diferentes concentrações enzimáticas para as enzimas BIEstA e BIEstB. * com diferença significativa (p-valor<0,05).	87
Figura 35 - Atividade antimicrobiana calculada pela densidade ótica com e sem as enzimas BIEstA e BIEstB em diferentes tempos. Curva controle e BIEstA ficaram sobrepostas mostrando-se praticamente idênticas.	89
Figura 36 - Análise da atividade anti-adesão das enzimas BIEstA e BIEstB através da análise do número de colônias presentes após o tratamento dos biofilmes. Na inserção, contagem das colônias após o tratamento, com diluição de 5000x.	90
Figura 37 - Esquema indicativo do ângulo de contato formado e sua relação com o grau de molhabilidade da superfície.....	93
Figura 38 - Ângulo de contato da água em biofilmes com e sem tratamento. A) Sem tratamento, biofilme controle B) Tratamento com a enzima BIEstA 0,1 mg/mL por 4 horas C) Tratamento com a enzima BIEstB 0,1 mg/mL por 4 horas.....	91
Figura 39 - Ação diferentes concentrações de antibiótico no biofilme tratado com as enzimas BIEstA e BIEstB, no biofilme sem tratamento e em células planctônicas.....	93
Figura 40 - Imagem confocal do biofilme de <i>S. aureus</i> na presença de corante curcumina a) Controle b) após 1/2 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstA (0,1 mg / mL) c) após 1 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstA (0,1 mg / mL) d) após 4 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstA (0,1 mg / mL).....	95
Figura 41 - Imagem confocal do biofilme de <i>S. aureus</i> na presença de corante curcumina a) Controle b) após 1/2 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstB (0,1 mg / mL) c) após 1 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstB (0,1 mg / mL) d) após 4 h de hidrólise enzimática da esterase BIEstB (0,1 mg / mL).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Emulsões como problemas e soluções.	26
Tabela 2 - Tampões analisados no ensaio de ThermoFluor.	40
Tabela 3 - Tabela de purificação da enzima BIEstA.	54
Tabela 4 - Tabela de purificação da enzima BIEstB.	54
Tabela 5 - Atividade relativa das enzimas BIEstA e BIEstB na presença de diferentes íons metálicos.	58
Tabela 6 - Temperatura de Melting das enzimas BIEstA e BIEstB em diferentes tampões.	59
Tabela 7 - Atividade relativa da enzima BIEstA na presença de diferentes concentrações de diferentes solventes orgânicos.	68
Tabela 8 - Atividade relativa da enzima BIEstB na presença de diferentes concentrações de diferentes solventes orgânicos.	69
Tabela 9 - Propriedades bioquímicas de esterases de diferentes microrganismos encontrados durante a análise filogenética da esterase BIEstA.	70
Tabela 10 - Propriedades bioquímicas de esterases de diferentes microrganismos encontrados durante a análise filogenética da esterase BIEstB.	71
Tabela 11 - Dados da coleta, análise e processamento de SAXS da enzima BIEstA.	73
Tabela 12 - Teste de emulsificação e24 da enzima BIEstA em dois diferentes substratos.	81
Tabela 13 - Teste de emulsificação E24 da enzima BIEstB em dois diferentes substratos.	81
Tabela 14 - Biofilme bacteriano de S. Aureus degradado por diferentes enzimas em diferentes concentrações.	86

Tabela 15 - Valores dos ângulos de contato da água para os biofilmes controle e tratados com as diferentes enzimas.	92
Tabela 16 - Tabela comparativa entre os valores médios de pixels presentes nos biofilmes controle e tratados (0,1 mg/mL de enzima por 4 horas) e a formação de colônias do experimento de anti-adesão do controle e do tratado (0,1 mg/mL de enzima por 4 horas).	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF	Acetato borato fosfato
BHI	<i>Brain heart Infusion broth</i>
BI	<i>Bacillus licheniformis</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search Tool</i>
CD search	<i>Conserved Domain search</i>
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
CLSM	Microscopia confocal de fluorescência
D.O.	Densidade óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreiol
EC	<i>Enzyme comission</i>
Est	esterase
IPTG	Isopropil β D-1tiogalactopiranosida
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LD	Corante life /death
LIC	<i>Ligation Independent cloning</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
MES	<i>2 N-morpholino ethane sulfonic</i>
MUSCLE	<i>Multiple Sequence Comparison by Log Expedition</i>
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SAXS	<i>Small angle X-ray Scattering</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Swiss-Prot	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
Tm	Temperatura de Melting
TrEMBL	<i>European Bioinformatics Institute</i>
TRX	Tioredoxina

Sumário

CAPÍTULO 1	21
INTRODUÇÃO	21
1.1 INDÚSTRIAS ENZIMÁTICAS:	21
1.2 LIPASES E ESTERASES:	23
1.3 APLICAÇÕES LIPASES E ESTERASES:	25
1.3.1 <i>Emulsificações:</i>	25
1.3.2 <i>Biofilmes Bacterianos:</i>	28
1.4 ORGANISMOS UTILIZADOS NO ESTUDO:	32
CAPÍTULO 2	35
OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL:	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	35
CAPÍTULO 3	37
MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANÁLISE SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS:	37
3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO:	38
3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA:	39
3.4 ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO:	39
3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS:	39
3.6 ANÁLISE DE ESTABILIDADE TÉRMICA POR <i>THERMAL SHIFT ASSAY</i> :	40
3.7 EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS:	41
3.8 ANÁLISES DE ATIVIDADE E TEMPERATURA DE <i>MELTING</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl:	41
3.9 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO NA PRESENÇA DE NaCl:	42
3.10 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO DA ENZIMA <i>BLÉSTB</i> APÓS AQUECIMENTO:	42
3.11 ANÁLISE FILOGENÉTICA:	43
3.12 AQUISIÇÃO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS DE SAXS:	43
3.13 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO:	44
3.14 TESTE DE EMULSIFICAÇÃO E24:	46
3.15 SÍNTESE DO BIOFILME:	46
3.16 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME FORMADO:	47
3.17 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM BIOFILME JÁ FORMADO:	47
3.18 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PREVENÇÃO DO BIOFILME:	47
3.19 ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DO BIOFILME:	48
3.20 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA:	48

3.21	ATIVIDADE DAS ENZIMAS <i>BLEstA</i> E <i>BLEstB</i> EM BIOFILME:	49
3.22	AÇÃO DO ANTIBIÓTICO EM BIOFILME TRATADO:	49
3.23	MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA:	49
3.24	ANÁLISE ESTATÍSTICA:	50
CAPÍTULO 4		51
RESULTADOS E DISCUSSÃO		51
4.1	ANÁLISE SEQUENCIAL DAS PROTEÍNAS:	51
4.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO:	53
4.2	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA: TEMPERATURA E PH ÓTIMO E SUBSTRATO ESPECÍFICO:	54
4.3	EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS E <i>THERMOFLUOR</i> :	58
4.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO NA PRESENÇA DE NaCl:	64
4.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESPECIFICIDADE DO SUBSTRATO DA ENZIMA <i>BLEstB</i> APÓS AQUECIMENTO:	67
4.6	EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS:	68
4.7	ANÁLISE FILOGENÉTICA:	69
4.8	ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X DE BAIXO ÂNGULO E ENVELOPE MOLECULAR DE BAIXA RESOLUÇÃO DE <i>BLEstA</i>	72
4.9	DE CRISTALIZAÇÃO:	75
CAPÍTULO 5		79
RESULTADOS E DISCUSSÃO - APLICAÇÕES		79
5.1	EMULSIFICAÇÕES:	79
5.1.1	Teste De Emulsificação E24:	79
5.2	BIOFILMES BACTERIANOS:	82
5.2.1	Síntese do biofilme:	82
5.2.2	Atividade em biofilme já formado:	83
5.2.3	Atividade enzimática na prevenção na formação do biofilme:	86
5.2.4	Atividade antimicrobiana:	88
5.2.5	Atividade de anti-adesão das enzimas <i>BLEstA</i> e <i>BLEstB</i> :	89
5.2.6	Análise da hidrofobicidade do biofilme:	90
5.2.7	Ação de antibiótico em biofilme tratado:	92
5.2.8	Microscopia confocal de fluorescência:	94
CAPÍTULO 6		97
CONCLUSÃO:		97
REFERÊNCIAS		99
ANEXOS:		111

Capítulo 1

Introdução

1.1 Indústrias enzimáticas:

A indústria enzimática que conhecemos hoje em dia é o resultado de um rápido desenvolvimento ocorrido nas últimas 4 décadas graças a evolução da biotecnologia. Desde os primeiros tempos da civilização, os homens utilizam enzimas presentes na natureza em suas comunidades primitivas para a produção de comidas e bebidas como queijos, cervejas e vinhos, e *commodities* como couro e roupas, mesmo sem saber.¹⁻² No século 19, o desenvolvimento da bioquímica e o trabalho de diferentes cientistas na área fez com que a natureza das enzimas e como funcionam começassem a ser esclarecidos. Durante o século seguinte, a descoberta de enzimas como proteínas, junto com desenvolvimento da técnica de fermentação e o trabalho dos cientistas James B. Summer e Kaj L. Lang levaram ao desenvolvimento de procedimentos para sua produção e uso industrial.² A comercialização de glucoamilases, que catalisam a produção de glicose, e o lançamento dos primeiros detergentes contendo enzimas foram alguns dos maiores impactos na indústria enzimática dos anos 60.² O desenvolvimento da engenharia genética juntamente, o desenvolvimento da tecnologia do gene recombinante, o desenvolvimento de processos de fermentação e uma produção mais especializada possibilitou a produção em larga escala e a comercialização de novas enzimas causando uma segunda explosão para a indústria enzimática de bilhões de dólares que conhecemos atualmente.¹⁻²

Atualmente essas enzimas podem ser produzidas em larga escala e atendendo a certos pontos de interesse industriais como resistência a altas temperaturas, maior estabilidade ao longo do tempo, resistência à alta salinidade, entre outros. A indústria enzimática está em grande avanço devido a sua constante modernização em diferentes áreas como a de biotecnologia, química e farmacêutica.

Além dessa grande área de atuação, atualmente, mais de 500 produtos são produzidos através da utilização de enzimas em diferentes indústrias. Por exemplo, proteases podem ser aplicadas em indústrias alimentícias como na coagulação do leite, nas de detergente como na remoção de proteínas; amilases podem ser aplicadas na indústria de pão para maior volume e maciez dos pães, nas de detergentes para remoção de amidos. As lipases nas indústrias de detergente para remoção de lipídeos, nas de comidas como flavorizante de queijos, nas de óleos e gorduras em processos de transesterificação; entre outras.¹ Esse mercado global de enzimas pode ser dividido de acordo com a classe de enzima utilizada (carboidrases, polimerases, nucleases, lipases, entre outras), aplicações (setor de pesquisa, biocatálises, biocombustíveis, alimentação animal, indústrias farmacêuticas, de comidas e bebidas, entre outras) (Figura 1) e pela região (América do Norte, Europa, Ásia-Pacífico, América Latina, Oriente médio e África).³⁻⁴

Figura 1 - Aplicações das enzimas nas indústrias.

Fonte: Adaptada de GLOBAL ³

O mercado enzimático foi avaliado em US \$ 8,2 bilhões em 2015 e deve crescer 6,6% entre 2016 e 2024, culminando em uma receita global de US \$ 17,6 bilhões em 2024 (Figura 2), com lipases e esterases contribuindo com aproximadamente 10% desse total.⁵⁻⁷

Figura 2 - Crescimento do mercado global de enzimas em bilhões de dólares.

Fonte: Adaptada de ENZYMES MARKET OUTLOOK TO 2024⁶

1.2 Lipases e esterases:

Lipases e esterases são enzimas pertencentes a classes das hidrolases (EC 3), que utilizam a água para quebrar uma ligação química a fim de dividir uma molécula grande em duas menores, como triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol. Elas são classificadas em 13 classes, de acordo com a ligação em que elas agem, como clivagem de ligações ésteres (EC 3.1), ligações carbono-nitrogênio (EC 3.5), ligações carbono-carbono (EC 3.7), ligações enxofre-carbono (EC 3.13), entre outras.⁸⁻⁹

Esterases (EC 3.1.1.X) formam um diverso grupo de hidrolases que catalisam a quebra e a formação de ligações ésteres.¹⁰ Duas subclasses principais de hidrolases são de extrema importância: as lipases (EC 3.1.1.1) e as “verdadeiras” esterases (EC 3.1.1.3). A estrutura tridimensional da grande maioria dessas enzimas apresenta o enovelamento α - β -hidrolase, uma ordem definida de α -hélices e folhas β

(Figura 3). O sítio catalítico delas é composto pela tríade Ser-Asp-His e geralmente também uma sequência consenso de Gly-X-Ser-X-Gly (X representa um resíduo de aminoácido arbitrário) é encontrada em torno da serina no sítio ativo.¹⁰ Até alguns anos, acreditava-se que todas as lipases e carboxil esterases apresentavam a sequência consenso Gly-X-Ser-X-Gly ao redor do sítio ativo. A grande maioria dessas enzimas apresentam esse motivo, porém, algumas lipases e esterases são pertencentes a família GDSL e apresentam Gly-Asp-Ser-Leu como sequência consenso. Elas apresentam propriedades multifuncionais e sítio catalítico Ser-His ao invés da tríade e apresentam em seu enovelamento uma estrutura alfa / beta / alfa de três camadas, em que as folhas betas são compostas por cinco filamentos paralelos.¹¹ A família GDSL é amplamente encontrada no mundo microbiano, como em *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens* e também em plantas.¹¹⁻¹²

Figura 3 - Enovelamento α - β -hidrolase onde as α -hélices e fitas β estão representadas em espirais e flechas, respectivamente. O local dos resíduos da tríade catalítica está indicado na própria figura.

Fonte: Adaptada de SUHAS¹³

A classificação dessas enzimas pode ser feita com base em sua especificidade de substrato, onde lipases hidrolisam ácidos graxos de cadeia mais longa (acima de 10 carbonos) e esterases ácidos graxos de cadeias mais curtas (menos de 10 carbonos), ou por alinhamentos de sequência.¹⁰ Lipases e esterases são encontradas em diferentes espécies de plantas, fungos, leveduras ou bactérias, e apresentam diversas aplicações fisiológicas como a hidrólise de triglicerídeos e industriais.¹³⁻¹⁵

As lipases e esterases podem estar presentes na degradação de diferentes materiais naturais e ainda em diversos setores industriais com diferentes aplicações.^{7,12,16-17} Dentre essas aplicações podemos citar aplicação na indústria de detergente através da remoção das cadeias lipídicas, na indústria alimentícia como flavorizante em queijo e estabilidade por emulsificação em certos alimentos. Em indústrias de óleos e gorduras por atuarem no processo de transesterificação e ainda em atuação conjunta a outras enzimas como xilanases e celulases em sinergismo para uma melhor degradação da biomassa para a produção de biocombustíveis além de possível atuação no tratamento de biofilmes bacterianos.^{6,12-13,17-18}

1.3 Aplicações lipases e esterases:

1.3.1 Emulsificações:

Emulsões podem ser definidas como um sistema bifásico formado por dois líquidos imiscíveis onde um constitui as gotículas que estão dispersas no outro líquido, chamado de fase contínua.²⁰ Emulsões são amplamente utilizadas em nosso dia a dia como por exemplo em leites, manteigas, cremes e loções.²⁰⁻²¹ As emulsões nas diferentes indústrias em que estão presentes podem ser formadas intencionalmente para utilização em algumas aplicações ou, em muitos casos, ela pode ser indesejada e causar sérios problemas, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Emulsões como problemas e soluções.

Aplicação		Motivo	
Emulsão como problema		<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento de óleo 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta tempo de retenção, problemas na passagem do gás, custo adicional por motivos químicos e de aquecimento.
		<ul style="list-style-type: none"> • Transporte de óleo 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas de equipamento como corrosão de tubulação e incrustação, afetando o rendimento do projeto
Emulsão como solução		<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação de óleo (remoção de óleo ao nível dos poros e remoção em grande escala relacionado à conformação geológica do reservatório e à superfície química). 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora a recuperação de óleo devido a suas propriedades termodinâmicas
		<ul style="list-style-type: none"> • Estimulação de poço (intervenção realizada em um poço de petróleo ou gás para aumentar a produção através da abertura de novos canais na rocha para que o óleo e o gás fluam facilmente) 	<ul style="list-style-type: none"> • Retarda a reação ácido-rocha e aumenta a penetração

Fonte: Adaptada de MOHYALDINN²¹

Quando utilizadas nas indústrias de óleo e petróleo, as lipases e esterases precisam apresentar uma série das características, não somente a de boa termo estabilidade, mas também a especificidade por certos substratos, a tolerância a solventes orgânicos, a presença de atividade em condições extremas de pH ou na presença de alta concentração de sal.²²⁻²³ Essas enzimas, além de serem enzimas que possuem algumas dessas características, apresentam uma atuação na interação água-óleo-superfície e boas propriedades emulsificantes, aumentando assim a mobilidade do óleo e facilitando sua produção e limpeza.²⁴⁻²⁵

As emulsões podem ser de diferentes tipos como água/óleo, óleo/água, óleo/água/óleo e água/óleo/água, porém as mais comuns são as duas primeiras. Na emulsão óleo/água, o óleo é disperso em forma de bolhas na fase aquosa, já na emulsão água/óleo ocorre o contrário, onde o óleo forma a fase contínua na quais gotas de água ficam dispersas como mostra o esquema da Figura 4.²⁶

Figura 4 - Tipos de emulsões a) Emulsão água/óleo b) Emulsão óleo/água c) óleo/água/óleo d) água/óleo/água

Fonte: Elaborada pela autora

As emulsões água/óleo podem ser classificadas de acordo com a sua estabilidade podendo ser divididas em estáveis, meso-estáveis, retidas e não estáveis baseadas na sua aparência, viscosidade e elasticidade. Para a aplicação nas áreas de recuperação do óleo, estimulação do poço e transporte do petróleo pesado as emulsões precisam ser estáveis, porém, emulsões muito estáveis são grandes problemas para processos de separação e tratamento, causando um maior custo e gasto.²¹

Para haver a formação dessas emulsões a partir de fases líquidas inicialmente em equilíbrio, deve-se fornecer energia para esse sistema através de agitação mecânica, causando um efeito de turbulência, e quebrar as duas fases imiscíveis contribuindo na construção de uma força de adesão entre as gotículas das duas fases;^{21,27} esse processo é chamado de emulsificação. Essas emulsões podem ser formadas com a ajuda de agentes emulsificantes como os surfactantes, moléculas anfipáticas formadas por uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica. Devido a essa composição, os surfactantes podem se distribuir nas interfaces fluidas e se agregarem na forma de micelas. Isso confere aos surfactantes características como

detergência, emulsificação e outras propriedades que permite a eles várias aplicações industriais.²⁸ Assim como os surfactantes nós temos os bioemulsificantes, que são biopolímeros produzidos por uma ampla gama de microrganismos, que podem formar e estabilizar com eficiência o óleo/água em emulsões. Eles são misturas anfipáticas complexas que podem ser compostas de polissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas.²⁹

Biossurfactantes apresentam diferentes propriedades como aumento da solubilidade de compostos hidrofóbicos, ligação de metal pesado, agregação e adesão celular, patogênese bacteriana e atuação na formação de biofilme, podendo ser utilizados em remediação de poluição, atividade antimicrobiana, entre outros.³⁰⁻³¹ Bioemulsificantes, classe de surfactantes que estabiliza dispersão de um líquido em outro, apresentam importante papel na fixação e não fixação de microrganismos a superfícies, além das emulsões estarem envolvidas no processo de formação do biofilme.³²

A adesão dos microrganismos e subsequentemente a formação do biofilme é uma técnica utilizada por microrganismos para proteção contra desidratação, predadores, biocidas e condições extremas.³¹ Biossurfactantes inibem a adesão de organismos patogênicos a superfícies sólidas ou a locais de infecção. Esse efeito anti-adesão pode constituir um novo modo de combater a colonização por microrganismos patogênicos.^{30-31,33}

1.3.2 Biofilmes bacterianos:

Biofilmes bacterianos são formados por organismos unicelulares que assumem temporariamente um estilo de vida multicelular onde passam a viver dentro de uma matriz polimérica hidratada produzida pelas próprias bactérias para proteção das mesmas contra diversas adversidades como a falta de nutrientes, o uso de um antibiótico ou algum agente químico. Os biofilmes se ligam a superfícies vivas ou abióticas e tem em sua composição polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e glicoproteínas.³⁴⁻³⁸ Para sua formação é necessário inicialmente que ocorra a adesão das bactérias de forma aleatória, o qual ainda é reversível. Uma segunda etapa é a transição do estado reversível para o irreversível

onde as bactérias passam a secretar as substâncias responsáveis pela adesão e envolvimento. Nas etapas 3 e 4 formam-se as micro colônias e o biofilme maduro. Quando o ambiente não é mais favorável ocorre a quinta e última etapa onde há o desprendimento do biofilme e liberação das bactérias (Figura 5).³⁴⁻³⁵

Figura 5 - Estágios do crescimento do biofilme bacteriano realizado em 5 etapas. Etapa 1, fixação inicial; etapa 2, fixação irreversível; etapa 3, maturação I; etapa 4, maturação II; etapa 5, dispersão.

Fonte: Adaptada de DON MONROE³⁵

O primeiro cientista a estudar biofilmes foi Anthony van Leewenhock no século 17, após isolar do próprio dente um tipo de animal, não visível a olho nu, que ele chamou de animalcules. A partir desse ponto, diversos outros cientistas como Arthur Henrici, Heukelikian e Helles começaram a estudá-los, porém, até o início dos anos 1970, suas propriedades químicas e físicas ainda não eram investigadas.^{34,39}

Os biofilmes são fontes de muitas infecções e contaminações em sistemas médicos e industriais. Diversas bactérias podem ser responsáveis pela formação dos biofilmes assim como pelas contaminações de diversos dispositivos médicos.

Podemos citar como alguns exemplos a *Pseudomonas aeruginosa* responsável pela contaminação de lentes de contatos, a *Candida* spp. responsável pela contaminação de dentaduras e cateteres urinários, e a *Staphylococcus aureus* por contaminações em cateteres venoso central, válvula mecânica cardíaca e próteses artificiais de quadril (Figura 6).^{34,37}

Figura 6 - Locais das possíveis contaminações por biofilme bacteriano de *S. aureus* causando contaminação em implantes de quadril, cateteres e gengivite.

Fonte: Adaptada de HALL-STOODLEY⁴⁰

Os biofilmes apresentam resistência a diversos agentes antimicrobianos como antibióticos e a certas lavagens. O motivo da resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos e lavagens pode estar associado a viscoelasticidade da matriz, que faz com que a difusão seja prejudicada, além de proteger as bactérias da luz ultravioleta. Pode estar relacionado ao estado fisiológico dos organismos, os quais

ficam em um tipo de estado estacionário, fazendo aumentar o fator de resistência, ou ainda a hidrofobicidade dos biofilmes, que faz com que sejam repelidos água e antibióticos que atuariam nos filmes.⁴⁰

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), *S. aureus* é o patógeno nosocomial mais frequentemente isolado das unidades de tratamento intensivo de hospitais onde alta porcentagem de microrganismos isolados é resistente a meticilina.⁴¹ Essa resistência a antibióticos pode estar relacionada a diversos fatores genéticos (cromossômicos ou codificados por plasmídeos) ou ainda, os estafilococos apresentam mecanismos de resistência inespecíficos dos quais a formação do biofilme é o mais importante.⁴² As infecções causadas por essas bactérias são similares a do *S. epidermidis*, cujo principal tipo de infecção é a infecção no sangue principalmente de imunocomprometidos., Tratamento envolve uso mais intensivo de antibióticos e troca frequente dos dispositivos médicos ⁴³⁻⁴⁴ Como resultado das doenças relacionadas a biofilmes de estafilococos, ocorre uma maior mortalidade, necessidade de novas cirurgias e maior tempo de internação, causando um aumento significativo nas despesas associadas a *S. aureus*, com estimativa anual de 450 milhões de dólares para a última década.⁴⁵

A remoção desses biofilmes pode ser realizada de diferentes maneiras. Biocidas e desinfetantes costumam ser utilizados para o controle desse biofilme em diversas indústrias como em torres de água, ou em processamento de alimentos. Porém são ineficientes tanto pelo seu rendimento quanto pela sustentabilidade desse método. Agentes antimicrobianos também apresentam grande problemática em sua atuação como, por exemplo, a baixa atividade desses agentes devido a hidrofobicidade dos biofilmes ou devido a essa remoção ser do tipo indireta já que os agentes atuam eliminando as bactérias que sintetizam esse biofilme, fazendo com que essa eliminação seja pelo descolamento natural dos biofilmes, o que é um processo bem lento.⁴⁶⁻⁴⁸ Estudos com a utilização de enzimas bacterianas ou fúngicas vem sendo realizados nos últimos anos e com bastante sucesso. Diversas classes de enzimas como celulasas, xilanases ou ainda lipases vêm sendo utilizadas.

As enzimas em contato com um ambiente biológico podem atuar contra o biofilme de várias maneiras. Elas podem prejudicar a etapa inicial da colonização da

superfície por microrganismos pela clivagem de proteínas e carboidratos, onde enzimas como as proteases podem impedir a adesão microbiana, hidrolisando ligações peptídicas, enquanto as hidrolases quebram especificamente ligações éster de polissacarídeos, que são os principais constituintes da microbiota adesiva. As enzimas podem ter um efeito biocida comprometendo a viabilidade dos organismos vivos que crescem nas superfícies.⁴⁹ Podem ainda contribuir para a degradação do biofilme já formado através da ação específica de cada uma das enzimas.³⁶

1.4 Organismos utilizados no estudo:

Um dos microrganismos capazes de secretar lipases e esterases é a bactéria *Bacillus licheniformis*. Essa bactéria apresenta possíveis aplicações em diferentes áreas como a alimentícia, farmacêutica e química devido a sua alta taxa de crescimento e a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular, o fato de que ele pode ser aeróbio ou anaeróbio facultativo, o que permite seu crescimento em diferentes nichos, além da sua não patogenicidade. É uma bactéria gram-positiva normalmente encontrada no solo ou em penas do peito e das asas de aves aquáticas (patos) ou pássaros mais terrestres (pardais).⁵⁰ As bactérias do gênero *Bacillus* são ótimas produtoras de enzimas para indústria, como proteases, lipases, esterases e α -amilases.⁵¹ *Bacillus licheniformis* apresenta crescimento ótimo em 37 °C com pH na faixa entre 6 e 8 e já apresenta seu genoma completamente sequenciado,⁵² estando disponível no GenBank: CP000002.3 (ATCC 14580, genoma completo).

O segundo microrganismo utilizado nesse estudo foi a bactéria *S. aureus*. É uma bactéria gram-positiva que apresenta forma de cocos e tende a se organizar em cachos. Esses organismos podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos, e crescem em temperaturas entre 18°C e 40°C.⁵³ Essa bactéria pode ser dividida em duas cepas: *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).⁵⁴ Essas duas linhagens (MRSA; ATCC 33591) e (MSSA; ATCC 25923) são as mais utilizadas em estudos de patogêneses ou ensaios diversos.⁵⁵ Um dos possíveis antibióticos utilizados para essa bactéria é a gentamicina.⁵⁶ A gentamicina é ativa contra várias bactérias gram-negativas patogênicas como *E.*

coli, *P. aeruginosa* e alguns cocos gram-positivos, como *S. aureus*.⁵⁶⁻⁵⁷ Ela um bactericida pertencente a classe dos aminoglicosídeos, cuja principal função é inibir a síntese proteica pela ligação ao ribossomo.⁵⁸ Por sua especificidade, disponibilidade e baixo custo, é um dos antibióticos aminoglicosídeos mais utilizados.⁵⁷ No presente estudo foi utilizado *S. aureus* MSSA (ATCC 25923).

No presente estudo, descrevemos duas esterases (*B/EstA* e *B/EstB*) de *Bacillus licheniformis* no qual o estudo consistiu na expressão heteróloga, purificação, caracterização bioquímica e biofísica destas enzimas, contando com algumas análises na presença de NaCl, além de estudos de cristalização. Realizou-se também teste com as enzimas para uma possível aplicação como bioemulsificante, para potenciais aplicações em indústrias de petróleo ou processos de recuperação de óleo. Realizou-se também a análise dessas enzimas no tratamento e prevenção de biofilme bacteriano de *S. aureus* (ATCC 25923), para possível aplicação na área da saúde. Contribuindo assim com o grupo de pesquisa adicionando informações sobre as enzimas aqui estudadas e caracterizadas e possibilitando início a uma nova área de estudo do grupo, a atuação na degradação de biofilmes bacterianos.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Devido a importância dessa classe de enzimas para diversas aplicações, nesse trabalho foram realizados estudos de caracterização bioquímica e biofísica de duas esterases de *Bacillus licheniformis*, *B/EstA* e *B/EstB*, assim como seus estudos estruturais para entender suas principais características. Foi realizado também estudos para aplicações como bioemulsificante e na degradação e prevenção de biofilmes bacterianos.

2.2 Objetivos específicos:

1. Expressão e purificação heteróloga das enzimas *B/EstA* e *B/EstB*;
2. Análise sequencial e filogenética das enzimas *B/EstA* e *B/EstB*;
3. Caracterização bioquímica das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* para a determinação do pH, temperatura e substrato preferencial das enzimas;
4. Avaliação da atividade enzimática da *B/EstA* e da *B/EstB* na presença de metais, solventes orgânicos e em diferentes concentrações de sal;
5. Análise de termo estabilidade das enzimas por meio da técnica de *ThermoFluor*;
6. Medidas de SAXS da enzima *B/EstA*;
7. Ensaio de cristalização e promover protocolo de otimização dos cristais das enzimas *B/EstA* e *B/EstB*;
8. Aplicações biotecnológicas como bioemulsificante (E24) analisando a possível formação de emulsão assim como sua qualidade;

9. Aplicações biotecnológicas para prevenção e tratamento de biofilme bacteriano de *S. aureus* com a utilização de diversas ferramentas como medidas de absorvância e microscopia confocal.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Análise sequencial das proteínas:

A análise das sequências das proteínas *B/EstA* e *B/EstB* foi realizada com a utilização de dois diferentes meios, o ProtParam e o CD search.⁵⁹⁻⁶⁰ O ProtParam é uma ferramenta na qual diferentes parâmetros como peso molecular, pI teórico, coeficiente de extinção entre outros são calculados para a proteína armazenada no Swiss-Prot ou TrEMBL ou para sequência inserida pelo usuário. Ele foi utilizado para através do peso molecular exato e do coeficiente de extinção calcularmos a concentração enzimática da proteína, assim como o rendimento da purificação. Já o CD search, Conserved Domain Search Service, é uma ferramenta presente no site do NCBI para analisar e identificar domínios conservados presentes nas proteínas cujas sequências foram carregadas pelos usuários. Nesta ferramenta pode-se mudar a base de dados pesquisada, na qual a utilizada foi CDD que é um super conjunto que inclui domínio e dados de todos os outros banco selecionados anteriormente. Pode-se mudar também o E-value, utilizado 0,01 para diminuir a probabilidade dos falsos positivos.⁶¹⁻⁶²

B/EstA (GenBank: AAU39460.1):

```
>MTLQY TALGDSLTVGVGAGLFEPGFVQRYKRKMEEDLN EEVSLIVFAKSGLETSEI
LAMLNEPFIMEQVKKADVITITGCGNDLLQSLEIYEKEKDEHVFLEASSHCQKNYSG
MLEKIREIKGEKDTRYLVRLNLNYPFPSIELADKWISGFNRHLKQLESAPQIKVIDTY
AVFKGREKEYLSIDRVHPSSRGYEAMSEKLRAAGYGRLEG
```

B/EstB (GenBank: AAU41692.1):

```
>MRGFIKWAGLAILCIGLFACTSNRNAENVHYAKDDRQTLDIYTPQSNEGEKHPVLIY
LHGGGWTSGDKSRAASKPAFFTDNGYVFVSVNYRLHPDVQYDEMADDAAKAVKW
VMDHADEYQIDPSKINVMGHSAGGHLAAGLIAADSTYLN RVGLTPAALNSIVLDGPL
DMKRFIEAIPSYKEVFGTDEKVWTKASPLSYINNSKLPPAYLVTRWEDPAVYKFAET
ANKAKATEFVYQVNSLSHSDLNKMFGSPDAPAEAQNLT KAVMAFLEKENK
```

Foi realizado também um alinhamento entre as duas sequências para analisarmos a similaridade entre elas pelos programas MUSCLE e UniProt⁶³⁻⁶⁴ disponíveis em plataformas online.

3.2 Expressão e purificação:

A metodologia de clonagem das enzimas de *Bacillus licheniformis*, o desenho dos *primers*, as condições de PCR, posterior purificação e transformação do vetor pET Trx-1a / LIC foram realizadas com base em um protocolo previamente estabelecido em nosso grupo.⁶⁵ As células de *E. coli* Rosseta 2 DE3 foram cultivadas em meio LB⁶⁶ contendo cloranfenicol (35 µg / mL) e canamicina (50 µg / mL) a 37 °C e 180 rpm. Após 5 horas, a temperatura foi reduzida para 18 °C e incubada por 16 horas, após indução com IPTG 1mM. As células foram recolhidas por centrifugação a 6000 rpm, a 4 °C durante 20 minutos e suspensas em tampão (20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 10% (v / v) de glicerol, 100 µL de lisozima, 1 mM de DTT e 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)) seguido de lise por ultrassom com um Sonicador de 550 Sonar (Fisher Scientific). O lisado celular foi centrifugado (23.000 xg, 30 min, 4) para remover os detritos celulares.

O sobrenadante foi carregado em uma resina de afinidade Ni²⁺ - Sepharose (GE Healthcare, EUA), previamente equilibrada com 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de NaCl, 10 mM de imidazol. Utilizaram-se concentrações crescentes de 100, 150 e 200 mM de imidazol para eluir as enzimas e as frações foram recolhidas e concentradas utilizando o concentrador GE Vivaspinn 20, 10 KDa MWCO polyethersulfone. Adicionou-se protease do Vírus da Gravidade do Tabaco (TEV) numa concentração de 1 mg de protease por 50 mg de proteína e incubou-se durante 20 horas a 10 °C para clivagem da cauda de histidina. Finalmente, a amostra foi aplicada numa coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) e eluída usando 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de NaCl. Todas as frações proteicas dos passos de purificação foram analisadas em SDS-PAGE a 12%.

3.3 Caracterização bioquímica:

As atividades relativas das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* foram determinadas por medidas de espectrofotometria a 405 nm identificando a quantidade de *p*-nitrofenol libertado. As leituras de absorbância foram realizadas com o leitor de microplacas Synergy HT. O pH e a temperatura ótimos foram determinados usando *p*-nitrofenil butirato (Sigma-Aldrich) como substrato com uma faixa de pH de 2 a 10 tampão acetato-borato-fosfato (ABF) e faixa de temperatura de 20 a 80 °C. As reações foram incubadas durante 2 minutos, seguidos da adição do substrato. As reações prosseguiram durante 30 minutos com a leitura da absorbância a 405 nm a cada 51 segundos. A quantidade de pNP foi determinada usando espectrofotômetro e todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.4 Especificidade do substrato:

A especificidade do substrato para as enzimas foi também determinada medindo a quantidade de *p*-nitrofenol libertado a partir dos substratos acetato de *p*-nitrofenil, butirato, octanoato, decanoato, decanoato, meristato e palmitato. As reações foram realizadas sob condições ótimas de pH e temperatura. A reação prosseguiu durante 30 minutos e a absorbância a 405 nm foi lida a cada 51 segundos. A quantidade de pNP foi determinada usando espectrofotômetro e todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.5 Atividade enzimática na presença de íons metálicos:

Os efeitos dos íons metálicos na atividade catalítica da *B/EstA* e da *B/EstB* foram avaliados utilizando *p*-nitrofenil octanoato como substrato a uma concentração final de 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 9,0 a 30 °C para a *B/EstA* e *p*-nitrofenil butirato a uma concentração 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 7,0, a 50 °C para a *B/EstB*. As concentrações finais dos íons metálicos estudados foram de 1 mM, como publicado em estudos anteriores.⁶⁷⁻⁶⁸ Os sais metálicos utilizados nas análises

foram LiCl, CaCl₂, CoCl₂, CsCl₂, CuCl₂, MgCl₂, MnCl₂, NiSO₄, SrCl₂, ZnSO₄ e FeCl₃. A atividade foi também determinada medindo a quantidade de *p*-nitrofenil libertado com leitura de absorbância a 405 nm.

3.6 Análise de estabilidade térmica por *Thermal shift assay*:

Os experimentos foram realizados utilizando o Sistema Bio-Rad CFX96 Real-Time e o Termociclador C-100 com o software Bio-Rad CFX. Sonda de proteína SYPRO Orange da Thermo Fisher Scientific foi usada em uma concentração final de 25% (v / v). As medições foram realizadas de 20 a 95 °C em intervalos de 1 grau a cada 30 segundos, utilizando a concentração de enzima de 1,5 mg / mL. A análise *ThermoFluor* foi realizada com diferentes tampões em uma concentração de 100 mM e duas concentrações salinas diferentes como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 Tampões analisados no ensaio de ThermoFluor.

Tampão	pH	NaCl (mM)
Água	-	-
HCl	1,2	-
HCl	2	-
Ácido Citrico	3	-
Citrato De Sódio	4	-
Acetato De Sódio	4,5	-
Citrato De Sódio	4,7	-
Acetato De Sódio	5	-
Fosfato De Sódio	5	-
Citrato De Sódio	5,5	-
Fosfato De Sódio	5,5	-
Fosfato De Sódio	6	-
Bis-Tris	6,2	-
MES	6,2	-
Fosfato De Sódio	6,5	-
Cacodilato De Sódio	6,5	-
Bis-Tris	6,5	-
Bis-Tris	6,7	-
Fosfato De Potássio	7	-
Hepes	7	-
Bis-Tris	7	-
Tris	7,5	-
Imidazol	8	-

Continua

<i>Continuação</i>		
Bicina	8	-
Tris	8,5	-
Bicina	9	-
Carbonato De Sódio	9,5	-
Carbonato De Sódio	10	-
Ácido Cítrico	3	300
Acetato De Sódio	4,5	300
Fosfato De Potássio	5	300
Fosfato De Sódio	5,5	300
Citrato De Sódio	5,5	300
MES	5,8	300
Bis-Tris	6	300
Fosfato De Sódio	6,5	300
Bis-Tris	7	300
Hepes	7	300
Tris	7,5	300

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Efeito de solventes orgânicos na atividade das enzimas:

O efeito de solventes orgânicos na atividade catalítica das enzimas foram avaliados utilizando *p*-nitrofenil octanoato como substrato a uma concentração final de 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 9,0 a 30 °C para a *B*/EstA e *p*-nitrofenil butirato a uma concentração 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 7,0, a 50 °C para a *B*/EstB. A atividade relativa foi determinada em diferentes concentrações de solventes (0, 10, 20, 30, 40 e 50% v / v) em triplicata. Os solventes orgânicos analisados no presente estudo foram etanol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade foi também determinada medindo a quantidade de *p*-nitrofenil libertado com leitura de absorbância a 405 nm.

3.8 Análises de atividade e temperatura de *Melting* na presença de diferentes concentrações de NaCl:

A atividade relativa das enzimas na presença de diferentes concentrações de NaCl foi também determinada por um modo espectrofotométrico a 405 nm utilizando

4-nitrofenil butirato como substrato a uma concentração final de 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 9,0, a 30 °C para a *B/EstA* e 4-nitrofeil butirato a uma concentração 0,02 mM em tampão ABF 50 mM pH 7,0, a 50 °C para a *B/EstB*. Um gradiente de NaCl (0, 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 e 3 M) foi realizado para idealizar as melhores condições para a atividade dessas enzimas. Em paralelo e de forma independente, também usamos o *ThermoFluor* para analisar a temperatura de *Melting* (T_m) das enzimas com e sem a adição de NaCl.

3.9 Caracterização bioquímica e especificidade do substrato na presença de NaCl:

As atividades relativas e especificidade das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* na presença da melhor concentração de sal (2,0 M para a enzima *B/EstA* e 2,5 M para a enzima *B/EstB*) também foram determinadas por medidas de espectrofotometria a 405 nm identificando a quantidade de *p*-nitrofenol libertado. As leituras de absorbância foram realizadas com o mesmo leitor de microplacas, Synergy HT. O pH e a temperatura ótimos foram determinados usando *p*-nitrofenil octanoato (*B/EstA*) ou butirato (*B/EstB*) como substrato com uma faixa de pH de 2 a 10 tampão ABF e faixa de temperatura de 20 a 80 °C. A especificidade foi realizada a partir dos substratos acetato de *p*-nitrofenil, butirato, octanoato, decanoato, decanoato, meristato e palmitato, sob condições ótimas de pH e temperatura. As reações foram incubadas durante 2 minutos e seguidas da adição do substrato. As reações prosseguiram durante 30 minutos com a leitura da absorbância a 405 nm a cada 51 segundos. A quantidade de pNP foi determinada usando espectrofotômetro e todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.10 Caracterização bioquímica e especificidade do substrato da enzima *B/EstB* após aquecimento:

A atividade relativa para pH e temperatura assim como a especificidade do substrato da enzima *B/EstB* após aquecimento também foi determinada por medidas

de espectrofotometria a 405 nm identificando a quantidade de *p*-nitrofenol libertado. Como descrito no item anterior.

3.11 Análise filogenética:

Para realizar estudos filogenéticos, foi realizado um BLAST com as sequências das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* usando o BLASTp⁶⁹ contra sequências de proteínas não redundantes e bancos de dados PDB (Protein Data Bank). Quinze sequências de diferentes microrganismos foram selecionadas e então alinhadas com o programa MUSCLE.⁶³ Finalmente, a árvore filogenética foi montada pelo programa MEGA7⁷⁰ aplicando o método de Máxima Verossimilhança usando 1000 bootstraps.

3.12 Aquisição, processamento e análise dos dados de SAXS:

Para obter informações moleculares da enzima *B/EstA* em solução, experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram conduzidos na linha de luz SAXS1 D01B do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). A coleta de dados foi realizada a 20 °C, modo descontínuo e tempos de exposição de quadros de 12 x 25 s, usando amostras nas concentrações de 1 e 6 mg / mL em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 9,0 suplementado com 200 mM NaCl. Todo processo de aquisição, processamento e análise dos dados foi realizada por Dr. Lorenzo Briganti.

Os quadros de espalhamento foram adquiridos em um detector de pixel PILATUS 300K (DETRICS, Baden, Suíça) dentro da faixa de transferência de momento q cobrindo faixa de $0,13 \text{ nm}^{-1} < q < 5,05 \text{ nm}^{-1}$. Aqui $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda. Para obter as intensidades de espalhamento, a redução e o processamento dos dados foram conduzidos com um *pipeline* automatizado em linha usando o programa FIT2D.⁷¹

Os parâmetros estruturais $I(0)$ e R_g foram obtidos a partir das intensidades de espalhamento dos gráficos de Guinier,⁷²⁻⁷⁴ assumindo $q_{\text{max}} = 1,3 / R_g$. A compactação e globularidade da proteína foram avaliadas usando gráficos de

Kratky, e a massa molecular calculada a partir da intensidade de SAXS foi determinada pelo programa SAXSMoW2.0.⁷⁵

Para calcular a função de distribuição de distância, $P(r)$, e a dimensão máxima da proteína (D_{max}), a intensidade de espalhamento mesclada recuperada de baixa (até $0,13-1,00 \text{ nm}^{-1}$) e alta ($1,00-5,05 \text{ nm}^{-1}$) concentrações de proteína foram usadas no programa Gnom⁷⁶. Dez modelos de baixa resolução foram restaurados e, em seguida, o modelo médio foi obtido usando os programas GASBOR⁷⁷ e DAMAVER,⁷⁸ respectivamente. Além disso, o modelo de homologia gerado usando PHYRE2⁷⁹ foi sobreposto ao modelo SAXS restaurado médio usando SUPCOMB⁸⁰ e as intensidades de espalhamento computadas geradas usando servidor web FOXS.⁸¹

3.13 Ensaios de cristalização:

Os ensaios de cristalização foram realizados com a amostra com um grau de pureza superior a 95%, confirmado por SDS-PAGE para ambas as enzimas. Foram inicialmente realizadas utilizando kits comerciais e através de robô de cristalização Honeybee (DIGILAB, Massachusetts, USA). Para a enzima *B/EstA* foi utilizada uma concentração de 10 mg/mL e 3 kits comerciais, Crystal Screen, PACT premier e PEGs Suite. Após a visualização de cristais formados nesses kits comerciais foram realizadas otimização manual variando concentrações de PEG 3350 e PEG 1500 entre 10 e 25% e pHs do tampão variando entre 6,0 e 7,5 como mostra a Figura 7.

Figura 7- Esquema utilizado na otimização manual da cristalização da enzima *B/EstA*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a enzima *B/EstB* foi utilizada uma concentração de 13 mg/mL e 4 kits comerciais, Crystal Screen, PACT Premier, PEGs Suite e JCSG Plus seguido de otimização manual, após a verificação de cristais formados nos kits comerciais, com variações nas concentrações de PEG 2000 MME e 3K de 10 a 25% e pH do tampão utilizado entre 6,0 e 7,5 como indicado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema utilizado na otimização manual da cristalização da enzima *B/EstB*.

Fonte: Elaborada pela autora

3.14 Teste de emulsificação E24:

A atividade de emulsificação da enzima foi realizada segundo Cooper e Goldenberg⁸², utilizando diferentes concentrações proteicas (50, 100, 300 e 500 ppm) e dois diferentes substratos (óleo de girassol e azeite de oliva). O experimento foi realizado adicionando 2 mL de substrato e 2 mL de solução proteica em um tubo de vidro, agitando vigorosamente por 2 min e deixando em repouso por 24 horas à temperatura ambiente. O índice de emulsificação foi calculado usando a equação:

$$E24 = \frac{he}{hT} \times 100;$$

Onde he (mm) é a altura da camada de emulsão, e hT (mm) é a altura total do líquido.

Análise em biofilme bacteriano:

Todo estudo da atividade enzimática em biofilmes bacterianos foi realizado em parceria com Dra. Kate Blanco, Dra. Natalia Inada do grupo de Ótica – FCM/GO.

3.15 Biossíntese do biofilme:

Para realizar a síntese do biofilme foi feito um pré inóculo utilizando um mL do glicerinado de *S. aureus* em 9 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion Broth) pH 7,0 por 18 horas a 37°C. Em placa de cultivo celular de 24 poços foi adicionado 500 µL de pré inóculo de *S. aureus* e 500 µL de meio BHI pH 7,0 e deixado por 24 horas a 37°C em meio estático. Após 24 horas foi realizado troca do meio. Foi deixado por mais 24 horas em estufa a 37°C. Após essas 48 horas o meio de cultura foi descartado, foi realizado lavagem (3 vezes) com água MilliQ pelo canto e com a pipeta para evitar o descolamento do biofilme, e a placa foi vertida sobre um papel e deixada por 15 min para secar.

3.16 Quantificação da biomassa do biofilme:

A quantificação do biofilme formado foi realizada por cristal violeta como descrito em outros estudos.^{36,83} Para isso foi adicionado ao biofilme formado 500 µL solução cristal violeta (1 %) e incubado a temperatura ambiente por 15 min. Foi realizado 3 lavagens do o biofilme com água MilliQ para remover corante não ligado. Para descorar foi realizada uma lavagem com ácido acético 30% durante 15 minutos para solubilizar o cristal violeta. O sobrenadante foi transferido para placa de leitura onde foi lida sua absorbância a 595 nm.

3.17 Atividade enzimática em biofilme já formado:

A atividade enzimática nos biofilmes já formados foi realizada no tampão Tris pH 8,0 (50 mM final) de cada uma das enzimas e a temperatura ambiente. Foram feitas análises de quatro diferentes tempos (1/2, 1, 2 e 4 horas) e três diferentes concentrações enzimáticas (0,01; 0,03 e 0,1 mg/mL). Após os tempos, o meio líquido foi descartado e o biofilme deixado secar para ser realizado a sua quantificação por cristal violeta. Foi realizado um controle sem enzima para cada um dos tempos além de um controle negativo com ambas as esterases desnaturadas (90 °C por 30 min) em reação de 4 horas com três diferentes concentrações enzimáticas (0,01; 0,03 e 0,1 mg/mL). Após o tratamento foi realizada a quantificação por cristal violeta seguido de leitura de absorbância a 595 nm.

3.18 Atividade enzimática na prevenção do biofilme:

A atividade enzimática na prevenção dos biofilmes foi realizada adicionando a uma concentração final de 0,1 mg/mL as enzimas *B/EstA* e *B/EstB* durante a etapa de formação do biofilme. Após o crescimento do pré inóculo, em placa de cultivo celular de 24 poços foi adicionado 500 µL de pé inóculo de *S. aureus*, 500 µL de meio BHI pH 7,0 e cada uma das respectivas enzimas. Após 24 horas a 37 °C e em

meio estático foi realizado a troca do meio. Foi deixado por mais 24 horas em estufa a 37°C. Após essas 48 horas o meio de cultura foi descartado, foi realizado lavagem (3 vezes) com água MilliQ pelo canto e com a pipeta para evitar o descolamento do biofilme, e a placa foi vertida sobre um papel e deixada por 15 min para secar. Após esse tempo foi realizada quantificação do biofilme formado por cristal violeta seguido de leitura de absorbância a 595 nm.

3.19 Análise da hidrofobicidade do biofilme:

Foi realizado crescimento do biofilme de *S. aureus* de 48 horas como descrito anteriormente. Esse crescimento foi realizado em lamínulas de vidro colocadas cada uma dentro de um poço da placa de 6 poços. Após o crescimento foi realizado o tratamento desse biofilme com ambas esterases em reação de 4 horas e uma concentração enzimática de 0,1 mg/mL. Após o tratamento foi descartada a reação, a lamínula retirada do poço e adicionado a cada um dos biofilmes uma gota de 4 µL de H₂O para cálculo do ângulo de contato. O ângulo de contato foi medido através da ferramenta “angle tool” do programa ImageJ.⁸⁴

3.20 Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana foi realizada com o intuito de analisar se a atividade enzimática ocorria apenas no biofilme e não no crescimento da bactéria, já que elas atuam na prevenção desse biofilme. Para isso, foi realizada uma análise do crescimento bacteriano através das leituras de densidade ótica (D.O. 600 nm) comparando o crescimento das bactérias na ausência e na presença de cada uma das esterases *B/EstA* e *B/EstB*. A análise foi realizada em tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 16, 24 e 30 horas.

3.21 Atividade das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* em biofilme:

Para a análise de uma possível atividade das esterases no processo de adesão do biofilme e verificação de uma possível diminuição no número de bactérias ali presente, foi realizado o crescimento do filme bacteriano conforme descrito anteriormente seguido de reação enzimática de 4 horas e 0,1 mg/ml. Após esse tempo foi realizado descarte da reação seguido da raspagem do biofilme bacteriano restante. Foi adicionado 1 mL de água MilliQ para resuspender as bactérias ali presente e em seguida essas bactérias foram semeadas em meio BHI ágar com crescimento a 37 °C por 16 horas. Após o crescimento foi realizado contagem de colônias.

3.22 Ação do antibiótico em biofilme tratado:

Os ensaios com antibióticos foram realizados utilizando o tempo de 4 horas e a maior concentração enzimática, 0,1 mg/mL. O antibiótico utilizado foi gentamicina em diferentes concentrações (0,01; 0,03; 0,06; 0,12 e 0,25 mg/mL). Ao biofilme já formado e tratado com as esterases, foi adicionado o antibiótico em diferentes concentrações em uma reação de uma hora. Foi realizado um controle no biofilme formado sem a adição das enzimas, apenas com o antibiótico e outro nas bactérias planctônicas. Após o tempo da reação, o meio líquido foi descartado, foi adicionado 1 mL de tampão PBS 5X, raspado com uma ponteira o biofilme com a finalidade de liberar as bactérias que estão sob esse filme. Foi feita uma diluição de 1000x desse material coletado de cada um dos poços e feita semeadura em meio BHI ágar para crescimento em meio estático a 37 °C por 24 horas. Após esse tempo foi realizado contagem das colônias.

3.23 Microscopia confocal de fluorescência:

As amostras foram analisadas após a hidrólise enzimática em diferentes intervalos de reação. Para isto foi removido o meio contendo as enzimas, assim como o meio controle. As amostras foram mantidas sob a mesma lâmina de

crescimento do biofilme para a obtenção de suas imagens em um microscópio confocal Zeiss LSM 780 logo após o descarte da reação. O total de pixels (pontos) por imagem foi de 1024 x 1024. A área de cada pixel está associada a resolução ótica da objetiva (20x). Todas as medidas foram realizadas após a inserção de tampão PBS em cada placa de cultivo, seguido pelo corante essa adição foi realizada logo antes da análise do confocal. Procurou-se fazer o ajuste focal de maneira a se obter informação da superfície das amostras, pois este critério pode ser igualmente aplicado a todas as outras amostras estudadas.

Os corantes aplicados foram a curcumina na concentração de 5 mg/mL, respectivamente. A excitação por dois fótons foi feita com um laser pulsado (100 fs, com repetição de 80 MHz) em 800 nm e potência média de 15 mW. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Francisco Guimarães (IFSC-USP), no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal.

3.24 Análise estatística:

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (total $n = 3$). Os desvios padrão são mostrados como barras de erro. Em alguns casos, devido ao pequeno tamanho, a barra não é perceptível nas Figuras. O teste t de Student avaliou os resultados onde p-valor $<0,05$ foi considerado significativo.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Análise sequencial das proteínas:

Através da utilização do ProtParam foram obtidas informações como a massa molecular e o coeficiente de extinção molar de cada uma das proteínas estudadas. Para a enzima *B/EstA* foi obtido uma massa molecular de 24,122 KDa e um coeficiente de extinção de 30144 mol/cm em 280 nm. Já para a enzima *B/EstB* foi obtido uma massa molecular de 30,416 KDa e um coeficiente de extinção de 46995 mol/cm em 280 nm. Esses valores foram utilizados durante a etapa de purificação e para obtenção do rendimento dessas purificações. Com o CD search foram descobertos os domínios conservados em cada uma das proteínas, qual a porcentagem da sequência que ele continha e seu grau de confiabilidade. Para a enzima *B/EstA* foi descoberto que do resíduo 4 até o resíduo 202 encontra-se um domínio conservado da superfamília SGNH/ GDSL hidrolase (Figura 9A) e E-value obtido para essa análise foi de 6,03e-37, o que torna a análise confiável e com difícil falso positivo.^{61,85} As enzimas pertencentes a essa superfamília apresentam um enovelamento semelhante à das flavoproteínas, uma estrutura alfa / beta / alfa de três camadas, em que as folhas betas são compostas por cinco filamentos paralelos. Elas possuem atividade como lipases e esterases, porém suas sequências possuem baixa similaridade com as verdadeiras lipases. Estruturas terciárias dessas enzimas são substancialmente diferentes das alfa-beta hidrolases e única entre todas as hidrolases conhecidas.^{11,61,86} Para a enzima *B/EstB* foi descoberto que do resíduo 29 ao 212 é pertencente à família acetil esterase/ lipase (Figura 9B) e um E-value obtido para essa análise foi de 1,32e-32, o que também torna a análise confiável e com difícil falso positivo. Essa família apresenta o enovelamento α - β -hidrolase que é mais frequentemente encontrado em lipases e esterases. O sítio catalítico delas é composto pela tradicional tríade Ser-Asp-His e geralmente também uma sequência consenso de Gly-X-Ser-X-Gly é encontrada em torno do sítio ativo da serina.¹⁰

Figura 9 - Esquema representativo dos domínios conservados para cada uma das proteínas. A) domínio conservado da enzima *B/EstA*, superfamília SGNH hidrolase. B) domínio conservado da enzima *B/EstB* acetil esterase/lipase.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do programa MUSCLE e UniProt foi realizado um alinhamento entre as duas enzimas, *B/EstA* e *B/EstB*, mostrando que, além de serem de diferentes famílias, elas apresentam baixa similaridade entre elas sendo esse valor de 12,628%, como mostra a Figura 10.

```

B1EstB      MRGFIKWAGLA-ILCIGLFACTSNRNAENVHYAKDDRQTLDIYTPQSNEGEKHPVLIYL
B1EstA      --MTLQYTALGDSLTVGVGAGLFEPGFVQ-RYKRKMEEDLN-----EEVSLIVFA
              : : : : * . * : : * : . : . * . . : * :          * : : : :

B1EstB      GGGWTSGDKSRAASKPAFFTDNGYVFVSVNYRLHPDVQYDEMADDAKAVKWMDHADE
B1EstA      -SGLETSEILAMLEP-----FIMEQVKKADVITITGCGNDLLQSLEIYEKEDDE
              . * : : :      . : *          * : : . : :      . : * : : : : . **

B1EstB      QIDPSKINVMGHSAGGHLAAGLIAADSTYLNRVGLTPAALNSIVVLDGPLDMKRFIEAIF
B1EstA      VF-----LEASSHCQKNYSGM-----LEKIREIKGEKDTRYLVRLLM
              :                   * * : . * * :          * : * : : * : : : :

B1EstB      YKEVFGTDEKVTWKASPLSYINNSKLPPAYLVTRWED--PAVYKFAETANKAKATEF--
B1EstA      Y-----NPFPSIELADKWISGFNHLKQLESAPQIKVIDTYA
              *                   . : * . * . * .          * * : * : * : :

B1EstB      YQVNSLSHSDLNKMFGPSDA-PAEAQNLTKAVMAFLEKENK
B1EstA      FKGREKEYLSIDRVHPSSRGYEAMSEKLRAAGYGRLEG---
              : : . . : : : : : * . . * : : * * . * *

```

Figura 10 - Resultado alinhamento das enzima *B/EstA* e *B/EstB*.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Expressão e purificação:

Após a expressão, a purificação das enzimas foi realizada inicialmente em coluna de afinidade de níquel, na qual foram eluídas entre 50 e 150 mM de imidazol, seguido da clivagem *overnight* com a TEV. Foi realizada uma nova purificação utilizando a resina de níquel, coletando a fração não ligada, seguindo para uma cromatografia de exclusão molecular para purificação total da proteína. Durante todas as etapas foi verificada a pureza da enzima por meio de SDS-PAGE 12% onde ambas as enzimas se encontraram com alto grau de pureza conforme indicado na Figura 11. Nas Tabelas 3 e 4 observa-se os passos da purificação com seu respectivo rendimento.

Figura 11 - SDS-PAGE 12% A) *B/EstA* 1- frações eluídas com 50, 100 e 150 mM imidazol; 2- após clivagem com TEV antes da segunda purificação na coluna de níquel; 3- após segunda purificação na coluna de níquel; 4- após cromatografia de exclusão molecular b) *B/EstB* 1- frações eluídas com 50, 100 e 150 mM imidazol; 2- após clivagem com TEV antes da segunda purificação na coluna de níquel; 3- após segunda purificação na coluna de níquel; 4- após cromatografia de exclusão molecular..

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Tabela de purificação da enzima *B/EstA*.

Procedimento ou etapa	Volume	Total Proteína	Atividade	Atividade específica	Rendimento (%)
Fração solúvel	25 mL	254.5 mg	0.081 nMol pNP/ min	0.00031 nMol pNP/ min/mg	-
1° Ni²⁺	45 mL	183.6 mg	0.166 nMol pNP/ min	0.0009 nMol pNP/ min/mg	100
2° Ni²⁺	25 mL	91.50 mg	0.1628 nMol pNP/ min	0.0017 nMol pNP/ min/mg	97
Exclusão Molecular	13 mL	47.72 mg	0.1117 nMol pNP/ min	0.00234 nMol pNP/ min/mg	66

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 4 - Tabela de purificação da enzima *B/EstB*.

Procedimento ou etapa	Volume	Total Proteína	Atividade	Atividade específica	Rendimento (%)
Fração solúvel	25 mL	497.6 mg	10.625 nMol/pNP/min	0.020 nMol/pNP/min/mg	-
1° Ni²⁺	45 mL	195.7 mg	90.34 nMol/pNP/min	0.46 nMol/pNP/min/mg	100
2° Ni²⁺	25 mL	90.7 mg	50.61 nMol/pNP/min	0.56 nMol/pNP/min/mg	56.2
Exclusão Molecular	10 mL	41.8 mg	33.66 nMol/pNP/min	0.80 nMol/pNP/min/mg	33.52

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Caracterização enzimática: temperatura e pH ótimo e substrato específico:

A enzima *B/EstA* apresentou uma atividade ótima em pH 9,0 (Figura 12A), o que está de acordo com estudos anteriores de esterases de *B. licheniformis*, que mostraram as melhores atividades enzimáticas em pHs alcalinos.⁸⁷⁻⁸⁸ Nos pHs 8,0 e 10,0, a enzima preserva 70% de sua atividade ótima e tem atividade muito menor em pH ácido (pH 2,0 a pH 5,0). A temperatura ideal da *B/EstA* é de 30 °C (Figura

12B), um pouco abaixo das enzimas já caracterizadas encontradas na literatura, onde temos uma temperatura média de 40 a 45 °C.^{86,89} Para determinar a especificidade do substrato, a atividade enzimática da *B/EstA* foi avaliada por incubação com os substratos com diferentes cadeias acíclicas. Os resultados revelam maior atividade enzimática da *B/EstA* para o *p*-nitrofenil octanoato (Figura 12C). O segundo melhor substrato foi o pNP-butirato contra o qual a *B/EstA* demonstrou cerca de 40% de sua atividade ótima, sendo então classificada como uma esterase pois apresenta melhor atividade em cadeias de ácidos graxos menores do que 10 carbonos.

Com relação a enzima *B/EstB*, ela mostra uma atividade ótima em pH 7,0, sem atividade a baixos pHs (2,0 a 4,0), um aumento acentuado da atividade em pH 8,0 com 80% de atividade relativa como mostra a Figura 13A, um pH semelhante ao encontrado em outras esterases de *Bacillus*, onde essa faixa de pH ideal costuma variar entre 6,0 e 8,0.⁹⁰⁻⁹² Com relação a temperatura a *B/EstB* apresenta uma melhor atividade a 50 °C, atividade relativa próximo a 20% a 40 °C, com queda abrupta a 60 °C como mostra a Figura 13B. Essa temperatura é semelhante à das esterases termoestáveis de *Bacillus* já mencionadas na literatura.⁹³⁻⁹⁴ O substrato ideal para essa enzima foi o pNP-butirato e o segundo melhor substrato o pNP-acetato com atividade relativa superior a 40%, caracterizando essa enzima também como uma esterase como mostra a Figura 13C. O mecanismo de ação das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* em seus respectivos substratos pode ser observada nas Figura 12 e 13 D, respectivamente.

Figura 12 - Caracterização bioquímica *B/EstA* a) atividade relativa da enzima em diferentes pHs b) atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) atividade relativa da enzima em diferentes substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Caracterização bioquímica *B/EstB* a) atividade relativa da enzima em diferentes pHs b) atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) atividade relativa da enzima em diferentes substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Efeito da adição de íons e *ThermoFluor*:

Com o objetivo de ampliar a caracterização bioquímica das enzimas, testamos o efeito de diferentes íons metálicos em sua atividade enzimática como mostra a Tabela 5. O SrCl_2 e MgCl_2 aumentaram a atividade da enzima *B/EstA* em 66% e 55%, respectivamente. Pelo contrário, a adição de CuCl_2 e FeCl_3 leva a uma perda de 15 e 25% da atividade *B/EstA*, respectivamente. Isso é compatível com relatos anteriores demonstrando que os íons Mg^{2+} contribuem para um aumento da atividade da esterase, enquanto os íons Fe^{3+} prejudicam.^{88,95} Já a enzima *B/EstB* não apresenta aumento de atividade na presença do íon Mg^{2+} como a enzima *B/EstA* e esterases já estudadas. A enzima *B/EstB* tem sua melhor atividade para CoCl_2 com aumento de 22%, porém ainda inferior a melhora que este íon causa na *B/EstA*. Com relação ao Fe^{3+} , ocorreu perda total da atividade mostrando que realmente o íon ferro não apresenta uma boa atuação quando relacionado com esterases, como mencionado na literatura^{88,95}. Os íons divalentes podem ter impactos consideráveis na estabilidade e atividade das enzimas. Foi demonstrado que determinados metais divalentes podem ser benéficos para a atividade esterase (como Ca^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+}), e alguns têm efeito negativo (por exemplo, Cu^{2+} e Fe^{3+}), embora isso seja fortemente dependente da enzima,⁹⁶⁻⁹⁸ como é possível observar com as enzimas aqui estudadas, onde os íons Ca^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} aumentam a atividade relativa da esterase *B/EstA*, porém diminui a da *B/EstB*.

Tabela 5 - Atividade relativa das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* na presença de diferentes íons metálicos.

Metal	Atividade Relativa <i>B/EstA</i>	Atividade Relativa <i>B/EstB</i>
Controle	100 ± 17	100 ± 4,37
LiCl	126 ± 12	87.5 ± 30
CaCl_2	136 ± 09	70.62 ± 35
CoCl_2	142 ± 10	122.5 ± 31
CsCl_2	142 ± 02	85.37 ± 32
CuCl_2	085 ± 20	100 ± 2,6
MgCl_2	155 ± 15	75 ± 13
MnCl_2	134 ± 12	78.75 ±
NiSO_4	147 ± 10	112.5 ± 6
SrCl_2	166 ± 05	83.125 ± 5,1
ZnSO_4	126 ± 03	108.12 5 ± 29,4
FeCl_3	75 ± 07	0

Fonte: Elaborada pela autora

A técnica de *ThermoFluor* foi realizada com intuito de verificarmos a termo estabilidade das esterases *B/EstA* e *B/EstB*. Essa análise foi realizada em diferentes tampões com diferentes faixas de pH e concentrações de NaCl como mostra a Tabela 6. Através dela é possível observar em qual tampão e em qual pH a enzima apresenta maior estabilidade através da análise da sua temperatura de *Melting*. Analisado as temperaturas de *Melting* obtidas para a enzima *B/EstA* podemos dizer que ela apresenta uma maior T_m , ou seja, melhor estabilidade nos tampões com faixa de pH entre 5,5 e 6,7. Para a enzima *B/EstB* essa faixa de pH varia entre os valores de 6,5 e 7,3. Nenhuma das enzimas apresenta boa estabilidade em pHs muito ácidos (abaixo de 3,0) ou pHs muito básicos (acima de 10,0). Quando analisamos as T_m nos tampões contendo 300 mM de NaCl, observamos que, para ambas as enzimas, ocorre um aumento nessa temperatura. Tendo em vista esse aumento da estabilidade, foram realizados testes de atividade enzimática e da análise da temperatura de *Melting* em diferentes concentrações de NaCl para verificar se a *B/EstA* e a *B/EstB* são sal dependentes.^{89,99}

Tabela 6 - Temperatura de *Melting* das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* em diferentes tampões.

Tampão	pH	NaCl (mM)	T_m <i>B/EstA</i>	T_m <i>B/EstB</i>
Água	-	-	47.0	33.0
HCl	1.2	-	32.0	-
HCl	2	-	48.0	32.0
Ácido Cítrico	3	-	37.0	32.0
Citrato De Sódio	4	-	50.0	33.0
Acetato De Sódio	4,5	-	53.0	35.0
Citrato De Sódio	4,7	-	55.0	42.0
Acetato De Sódio	5	-	57.0	38.0
Fosfato De Sódio	5	-	57.0	49.0
Citrato De Sódio	5,5	-	58.0	49.0
Fosfato De Sódio	5,5	-	58.0	49.0
Fosfato De Sódio	6	-	58.0	49.0
Bis-Tris	6,2	-	-	41.0
MES	6,2	-	-	47.0
Fosfato De Sódio	6,5	-	-	50.0
Cacodilato De Sódio	6,5	-	-	50.0
Bis-Tris	6,5	-	57.0	47.0
Bis-Tris	6,7	-	59.0	50.0
Fosfato De Potássio	7	-	57.0	54.0

Continua

<i>Continuação</i>					
Hepes	7	-	55.0	49.0	
Bis-Tris	7	-	55.0	50.0	
Tris	7,5	-	53.0	50.0	
Imidazol	8	-	53.0	45.0	
Bicina	8	-	53.0	46.0	
Tris	8,5	-	53.0	45.0	
Bicina	9	-	50.0	44.0	
Carbonato De Sódio	9,5	-	49.0	42.0	
Carbonato De Sódio	10	-	43.0	39.0	
Ácido Cítrico	3	300	43.0	26.0	
Acetato De Sódio	4,5	300	49.0	32.0	
Fosfato De Potássio	5	300	59.0	49.0	
Fosfato De Sódio	5,5	300	59.0	54.0	
Citrato De Sódio	5,5	300	59.0	64.0	
MES	5,8	300	58.0	52.0	
Bis-Tris	6	300	58.0	52.0	
Fosfato De Sódio	6,5	300	59.0	55.0	
Bis-Tris	7	300	54.0	51.0	
Hepes	7	300	59.0	54.0	
Tris	7,5	300	55.0	51.0	

Fonte: Elaborada pela autora

Como os resultados de *ThermoFluor* revelaram um aumento na temperatura de *Melting* das enzimas de aproximadamente 4°C promovida pela adição de NaCl, foi realizada nas condições ideais para cada enzima, teste de atividade enzimática em diferentes concentrações de NaCl. Este experimento mostrou que as atividades enzimáticas tanto da *B/EstA* como da *B/EstB* aumentaram na presença de sal, atingindo um máximo em 2 M e 2,5 M de NaCl, respectivamente. Esse ganho da atividade pode ser observado nas Figuras 14A e 15A.

Os experimentos com *ThermoFluor* com diferentes concentrações de NaCl demonstraram que a estabilidade das enzimas aumenta de forma constante na presença de concentrações crescentes de sal, atingindo a mais alta concentração de NaCl de 3 M conforme relatado pelo aumento nas suas temperaturas de *Melting* para a *B/EstA* (Figura 14B) e um máximo de 2,5 M de NaCl para a *B/EstB* (Figura 15B). Este resultado revela que ambas as enzimas são halotolerantes, para as quais o sal desempenha um papel essencial tanto para a atividade como para a

estabilidade.

Figura 14 - a) Atividade relativa da enzima *B/EstA* em diferentes concentrações de sal. b) Temperatura de Melting da *B/EstA* em diferentes concentrações de sal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - a) Atividade relativa da enzima *B/EstB* em diferentes concentrações de sal. b) Temperatura de Melting da *B/EstB* em diferentes concentrações de sal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, a termo estabilidade da *B/EstA* e da *B/EstB* foi avaliada com e sem adição de NaCl 2 M. A estabilidade térmica da enzima *B/EstA* foi fortemente aumentada com a adição de NaCl 2 M (Figura 16A). Na presença de NaCl 2 M, a enzima manteve aproximadamente 30% de sua atividade ótima após 72 horas a 30 °C, enquanto sem o sal, a enzima perdeu completamente sua atividade em 2 horas. Com relação a enzima *B/EstB* tanto na ausência quanto na presença de NaCl, após

incubada a 50 °C a sua atividade aumenta mais de 2 vezes quando comparada a enzima sem aquecimento, como mostrado na Figura 16B. Esse comportamento já foi anteriormente observado em enzimas da classe da lacase dos organismos *B. clausii* e *B. subtilis* nos quais, incubações por período inferior a 5 horas resultavam em aumento na atividade para as temperaturas de 50 e 70 °C.¹⁰⁰ Esta ativação térmica (termo geralmente se refere a enzimas que são ativadas a 40 °C e acima)¹⁰¹ foi observada também para algumas enzimas como para uma esterase de *Sulfolobus shibatae* onde essa ativação ocorreu a uma temperatura de 90 °C por um período de 20 minutos, e para uma lipase de *Pseudomonas* sp. por 6 horas também a uma temperatura de 90°C,¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁻¹⁰² para uma glutamato desidrogenase de *Pyrococcus furiosus*,¹⁰³ uma endoglucanase de *Thermomonospora curvata*¹⁰⁴ e uma β -galactosidase de *Thermotoga naphthophila*.¹⁰⁵ Esse resultado usualmente está relacionado ao conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos na proteína,¹⁰¹ nesse caso, a esterase *B/EstB* apresenta 48% dos seus aminoácidos sendo hidrofóbicos.

Figura 16 - Termo estabilidade das esterases a) atividade relativa da enzima *B/EstA* ao longo do tempo a temperatura de 30°C b) atividade relativa da enzima *B/EstB* ao longo do tempo a temperatura de 50°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade das enzimas de atuarem em elevadas concentrações de sal é de considerável importância biotecnológica. Uma série de lipases e esterases

apresentem esse caráter halotolerante, incluindo algumas de *Bacillus*.^{106–109} A teoria mais aceita para essa adaptação é o modelo de solvatação-estabilização,¹¹⁰ que é baseado na ideia de que a interação de íons hidratados com a superfície da ácida da proteína resulta em um enovelamento adequado sob condições de elevadas de sal. Quando a superfície eletrostática das enzimas adaptadas a concentrações elevadas de sal é comparada às enzimas não halotolerantes, cadeias laterais carregadas negativamente na superfície são normalmente mais frequentes em halotolerantes do que em não halotolerantes.¹¹¹ Da mesma forma, os resíduos de superfície carregados positivamente tendem a ser menos frequentes em halófilos.¹¹¹ De fato as enzimas *B/EstA* e *B/EstB* apresentam uma porcentagem maior de resíduos de aminoácidos ácidos do que os básicos, sendo essa porcentagem de 15,5 e 13,2% respectivamente para a enzima *B/EstA* e 12% e 10% respectivamente para a enzima *B/EstB*, o que é comparável com outras esterases halotolerantes.¹¹² A inspeção do modelo de homologia das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* demonstraram que a maioria dos resíduos de aminoácidos ácidos dessas esterases estão localizados na superfície, formando aglomerados carregados negativamente como pode ser observado na Figura 17A e 17B respectivamente. Esta característica provavelmente favorece a formação de uma camada de solvatação e ajuda a preservar a enzima do desdobramento e agregação sob condições de sal elevado, aumentando sua estabilidade.

Figura 17 - Potencial eletrostático de superfície do modelo de homologia da enzima *B/EstA* (A) e da enzima *B/EstB* (B) gerado pelo plug-in PyMOL e APBS (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8 Schrödinger, LLC.). A escala de cores para o potencial eletrostático de superfície foi ajustada de -1 kT / e (vermelho) a 1 kT / e (azul).

Fonte: Elaborada e cedida por Dr. Lorenzo Briganti

4.4 Caracterização bioquímica e especificidade do substrato na presença de NaCl:

Uma nova caracterização enzimática foi realizada para ambas as enzimas na presença de suas melhores concentrações de NaCl para ver se havia mudança em seus padrões. Para a enzima *B/EstA* foi realizada uma nova caracterização na

presença de 2,0 M de NaCl e para a enzima *B/EstB* na presença de 2,5 M de NaCl. Esses resultados são mostrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Através da análise desses resultados podemos observar que a presença de NaCl, apesar de melhorar a atividade enzimática das esterases aqui estudadas, não resultou em mudanças em sua especificidade de substrato, pH ou temperatura. Para a enzima *B/EstA* o pH ideal continua sendo 9,0, sua temperatura de 30 °C e seu substrato específico pNP-octanoato. Observa-se na Figura 18B que houve um aumento da atividade da enzima a 40 °C onde a atividade está superior a 85%, mostrando novamente que ocorre um aumento da estabilidade dessa enzima na presença de sal. Houve também um aumento na atividade da sua especificidade pelos substratos. A atividade com o pNP-butirato aumentou de aproximadamente 40% para mais de 60%, além de um aumento significativo na atividade com o pNP-acetato e com o pNP-decanoato como mostra a Figura 18C.

Já para a enzima *B/EstB* o pH ideal continuou sendo 7,0, e ocorreu uma maior atividade relativa para o pH 9,0 na qual apresenta uma atividade relativa superior aos 60% como mostra a Figura 19A indicando que a presença de sal melhora a atividade da enzima em diferentes pH's. A sua temperatura de 50 °C com uma maior atividade para as temperaturas de 30, 40 e 60°C como na Figura 19B. O seu substrato específico continuou sendo pNP-butirato, mas foi observado aumento da atividade relativa para o pNP-acetato para mais de 60%, como mostra a Figura 19C. Esses resultados mostram que, assim como para a enzima *B/EstA*, NaCl melhora a estabilidade e atividade dessa enzima.

Figura 18 - Caracterização bioquímica da enzima *B/EstA* na presença de NaCl. a) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's b) Atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Caracterização bioquímica da enzima *B/EstB* na presença de NaCl. a) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's b) Atividade relativa da enzima em diferentes temperaturas c) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Caracterização bioquímica e especificidade do substrato da enzima *BEstB* após aquecimento:

Com a verificação de um aumento na atividade da esterase *BEstB* ao ser aquecida foi analisada, novamente, a variação da sua atividade em diferentes tempos de incubação como mostra a Figura 20A. a partir dessa análise verificamos que de fato, a atividade da enzima aumentou quando incubada a 50 °C por 24 horas. A partir desse resultado foi feita uma nova caracterização da enzima *BEstB* após esse período de incubação. O pH específico para essa enzima continuou sendo 7,0 como podemos observar na Figura 20B, a temperatura específica dessa enzima passou de 50°C para 60 °C com atividade relativas superiores a 80% nas temperaturas de 50 e 70°C como indicado na Figura 20C. Já com relação a especificidade do substrato, o principal continuou sendo o pNP-butirato, porém, ela apresentou atividade em todos os outros substratos testados, como mostra a Figura 20D.

Figura 20 - Caracterização bioquímica da enzima *BEstB* após aquecida a 50°C por 24 horas. a) Atividade relativa da enzima em diferentes tempos de incubação b) Atividade relativa da enzima em diferentes pH's c) Atividade Relativa das enzimas em diferentes temperaturas d) Atividade relativa da enzima em diferentes substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Efeito de solventes orgânicos na atividade das enzimas:

Foi realizado também os efeitos de diferentes solventes orgânicos na atividade enzimática da *B/EstA* e *B/EstB* como encontrado na Tabela 7 e 8 respectivamente. Surpreendentemente, a atividade enzimática de *B/EstA* foi significativamente melhorada na presença de etanol, metanol e DMSO. A atividade relativa da enzima aumenta até 2,7 vezes na presença de 20% (v / v) de etanol e 2,6 vezes na presença de 30% (v / v) de metanol. O DMSO a 50% (v / v) causou um aumento de 2,1 vezes na atividade de *B/EstA*. Com relação a enzima *B/EstB* observamos que o etanol em qualquer uma das concentrações analisadas prejudicou a atividade enzimática. Já o metanol e o DMSO eles aumentam a atividade enzimática em 1,2 vezes na presença de 10% (v/v) de metanol e em 1,28 vezes na presença de 20% (v/v) de DMSO. Nossos resultados são comparáveis aos encontrados na literatura, embora os ganhos de atividade da enzima *B/EstA* sejam superiores aos reportados anteriormente.^{113–115} Os possíveis fatores relacionados a esse ganho de atividade na presença de solventes orgânicos são: maior solubilidade de compostos hidrofóbicos como o substrato, a ausência de água deixar a enzima menos flexível, porém mais estável, uma possível diminuição da atividade catalítica na presença de água, entre outros.¹¹⁶⁻¹¹⁷

Tabela 7 - Atividade relativa da enzima *B/EstA* na presença de diferentes concentrações de diferentes solventes orgânicos.

	Controle	10% (v/v)	20% (v/v)	30% (v/v)	40% (v/v)	50% (v/v)
Etanol	100±18	119±20	274±8	159±5	154.76±2	66.6±2
Metanol	100±15	111.9±25	171.42±5	257.14±31	192.85±22	71.42±19
DMSO	100±5	119.56±8.8	130.43±11	145.65±2.3	204.34±6.5	210.86±10

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 8 - Atividade relativa da enzima *B/EstB* na presença de diferentes concentrações de diferentes solventes orgânicos.

	Controle	10%	20%	30%	40%	50%
Etanol	100±5	98.27±14	43.1±5	8.62±3	0	0
Metanol	100±10	120.25±7.3	100.86±10	12.06±1.3	1.29±5	0
DMSO	100±8	121.98±8.2	128.01±5	45.25±12	31.03±7	12.93±15

Fonte: Elaborada pela autora

4.7 Análise filogenética:

As esterases *B/EstA* e *B/EstB* apresentam parâmetros bioquímicos semelhantes aos das esterases encontradas durante a análise filogenética. Para a enzima *B/EstA* (Figura 21 e Tabela 9) temos que a esterase de *Geobacillus thermoleovorans* tem a mesma especificidade de substrato, enquanto a de *Bacillus cereus* e *G. thermoleovorans* têm o mesmo pH ótimo em 9,0. As esterases de *Bacillus subtilis* e *B. cereus* mostram um ganho de 40% em suas atividades além de $MgCl_2$. Os solventes orgânicos, como o etanol, aumentam a atividade da hidrolase do éster *Streptomyces rimosus* e o DMSO aumenta a atividade do *Geobacillus thermoleovorans*, o que também é observado na *B/EstA*. Já para a enzima *B/EstB* (Figura 22 e Tabela 10) temos que as esterases de *Archaeoglobus fulgidus*, *Rhodococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. apresentam a mesma especificidade por substrato, enquanto somente a de *Archaeoglobus fulgidus* tem o mesmo pH ótimo em 7,0. A esterase de *Rhodococcus* sp. apresenta um aumento na atividade na presença de íons metálicos tendo um aumento de 24,7 % com $CoCl_2$, bastante similar ao da *B/EstB*. Solventes orgânicos, assim como ocorre com a *B/EstB*, também aumentam a atividade de algumas esterases como as de *Alicyclobacillus acidocaldarius* e de *Rhodococcus* sp. A esterase de *Rhodococcus* sp., além de apresentar a mesma especificidade por substrato e melhora na atividade na presença de solventes orgânicos, ela apresenta também características de halotolerância onde se mantém com 100% de atividade com 10 M de NaCl, 4 vezes mais do que a enzima *B/EstB*.

Figura 21 - Árvore filogenética da enzima *BIEstA* construída no MegaX aplicando Maximum Likelihood usando 1000 bootstraps.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Propriedades bioquímicas de esterases de diferentes microrganismos encontrados durante a análise filogenética da esterase *BIEstA*.

Origem enzima	Substrato	pH	Temperatura (°C)	Íon	Solventes	Referencias
<i>B. licheniformis</i> (<i>BIEstA</i>)	pNP-octanoato	9	30	55% (MgCl ₂)	Metanol, etanol e DMSO	TS
<i>B. subtilis</i>	pNP-butirato	10	50	40% (MgCl ₂)	NR	118
<i>G. thermoleovorans</i>	pNP-octanoato	9-9.5	70	NR	DMSO	119
<i>B. cereus</i>	NR	8-9	60	46.66% (MgCl ₂)	NR	120
<i>S. rimosus</i>	C ₈ -C ₁₂	9-10	50-60	NR	Etanol	121

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Árvore filogenética da enzima *B/EstB* construída no MegaX aplicando Maximum-Likelihood usando 1000 bootstraps.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10 - Propriedades bioquímicas de esterases de diferentes microrganismos encontrados durante a análise filogenética da esterase *B/EstB*.

Origem enzima	Substrato	pH	Temperatura (°C)	Íon	Solventes	Referencias
<i>B. licheniformis</i> (<i>B/EstB</i>)	pNP-butirato	7	50	22,5% (CoCl ₂)	Metanol e DMSO	TS
<i>A. fulgidus</i>	pNP-butirato	7-8	80	NR	NR	122
<i>A. acidocaldarius</i>	pNP-hexanoato	5-6	70	NR	Metanol	123
<i>Rhodococcus sp.</i>	pNP-acetato e butirato	10-12	70	73,3% (MgCl ₂)	Metanol, etanol, acetona e DMSO	124
<i>Pseudomonas sp.</i>	pNP-butirato	9	30-40	Mantém a atividade (MgCl ₂)	NR	125

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Análise de espalhamento de raios-X de baixo ângulo e envelope molecular de baixa resolução de *B/EstA*

Experimentos de SAXS foram conduzidos para obter um modelo de baixa resolução de *B/EstA* em solução. A análise de Guinier foi realizada usando os dados experimentais de espalhamento de raios-X para obter informações sobre os parâmetros estruturais gerais da enzima. As aproximações de Guinier para amostras a 1 mg / mL e 6 mg / mL exibiram comportamentos lineares na região q das baixas intensidades SAXS (inserido na Figura 23). O gráfico na inserção é característico de sistemas monodispersos e não mostra interações interpartículas ou efeitos de dano por radiação. Além disso, a massa molecular estimada a partir das intensidades SAXS (ambas em concentrações de 1 mg / mL e 6 mg / mL), usando o limite de $q_{\max} = 8 / R_g = 0,37 \text{ \AA}^{-1}$,⁷² foi de 25,8 KDa. A discrepância entre a massa molecular obtida a partir da sequência de aminoácidos da enzima (24,1 KDa) e sua estimativa experimental derivada das intensidades SAXS foi de apenas 7,2%, indicando a forma monomérica da enzima em solução.

Figura 23- A curva experimental de espalhamento de raios-X *B/EstA* (círculos pretos abertos) foi comparada com a curva de espalhamento calculada a partir do modelo de baixa resolução restaurado (linha vermelha). Na inserção, o gráfico de Guinier para *B/EstA* nas concentrações 1 mg / mL e 6 mg / mL.

Fonte: Elaborada e cedida por Dr. Lorenzo Briganti

Em seguida, o R_g de 2,04 nm foi calculado com base no gráfico de Guinier⁷³ dentro do limite $q.R_g \geq 1,3$ para cada curva de espalhamento. Da mesma forma, o R_g derivado da função de distribuição de distâncias de par, $P(r)$, foi 1,97 nm. O resumo desses resultados e a coleta de dados SAXS podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 - Dados da coleta, análise e processamento de SAXS da enzima *B/EstA*.

Parâmetros de coleta de dados			
Instrumento		LNLS D02A-SAXS2	
Comprimento de onda λ (nm)		0.1541	
q-range (nm ⁻¹)		0.133–3.7653	
Concentração proteica		1 e 6 mg/mL	
Parâmetros estruturais			
<i>B/EstA</i>		Modelo por	Estrutura raio-X (PDB id: 4OAP)
Rg (nm) (from Guinier)	2,04	1,67	1,68
Rg (nm) (from p(r))	1,97	-	-
Dmax (nm)	6,20	-	-
Rg (nm) (from Guinier)	2,04	1,67	1,68
Determinação da massa molecular			
MW determinada por SAXS utilizando SAXSMoW2.0	25,8 KDa		
MW teórica calculada pela sequência de aminoácidos	24,1 KDa		

Fonte: Elaborada e cedida por Dr. Lorenzo Briganti

O $P(r)$ tem um perfil quase simétrico com um pico centrado em $r = 2,33$ nm e distância máxima de 6,2 nm (Figura 24A). Embora o $P(r)$ seja característico de uma proteína globular, seu perfil tem uma forma assimétrica ligeiramente deslocada para valores de r baixos. Na verdade, o gráfico de Kratky adimensional da *B/EstA* tem um máximo em forma de sino com o pico ligeiramente deslocado do

valor ideal de $q \cdot R_g \approx 1,73$ (no eixo x) e $(qR_g)^2 I(q) / I(0) \approx 1,104$ (no eixo y), (Figura 24B). Além disso, a linha de base não é elevada para altos valores de q (Figura 24B), sugerindo baixo grau de flexibilidade da enzima. A análise de Kratky adimensional mostra que para proteína globular os limites $q \cdot R_g$ tendem a $\sqrt{3}$ (no eixo x) enquanto $(qR_g)^2 I(q) / I(0)$ tende a 1,104 (no eixo y).¹²⁶ Desvios desses limites indicam flexibilidade ou assimetria da proteína em solução.

Figura 24 - Análise de dados SAXS. a) função $P(r)$ calculada pelo GNOM (linha preta), mostrando um perfil quase simétrico. b) Gráfico de Kratky adimensional, mostrando perfis de espalhamento de raios-X em duas concentrações de enzima diferentes: 1 mg / mL (nos círculos vermelhos) e 6 mg / mL (nos círculos azuis).

Fonte: Elaborada e Cedida por Dr. Lorenzo Briganti.

O envelope SAXS 3D de baixa resolução de *B/EstA* foi reconstruído a partir da curva de espalhamento mesclada por meio de modelagem *ab initio* usando o conjunto em cadeia de abordagem de resíduos falsos (DRs) no programa GASBOR. Dez modelos DRs calculados pela DAMAVER foram usados para restaurar a estrutura 3D de baixa resolução. A *B/EstA* possui um envelope levemente alongado, corroborando os dados obtidos nas análises de $P(r)$ e Kratky adimensional (Figura 25). O modelo da *B/EstA* reconstruído mostra uma sobreposição próxima com seu modelo de homologia de alta resolução (Figura 25).

Figura 25- Superposição do envelope SAXS com modelo por homologia da enzima. Superior esquerdo: orientação inicial da enzima. Superior direito: girado 90° sobre o eixo x. Centro inferior: girado 90° em torno do eixo y.

Fonte: Elaborada e cedida por Dr. Lorenzo Briganti.

4.9 Ensaio de cristalização:

Nos ensaios de cristalização realizados inicialmente em kits comerciais, para a enzima *B/EstA* houve a formação cristais em duas condições distintas, 20% PEG 1500 e tampão MES pH 6,0 e com 25% PEG 3350 e tampão MES pH 6,5 como mostrado na Figura 26.

Figura 26 - Cristais da proteína *B/EstA* nas condições 20% PEG 1500 e tampão MES pH 6,0 e 25% PEG 3350 e tampão MES pH 6,5.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizadas otimizações manuais com variação na porcentagem dos dois PEG de 10 a 25% e nos pH dos tampões de 5,5 a 7,5 conforme mostrado anteriormente. Após 5 dias observou-se a formação de cristais em 3 condições diferentes como 25% PEG 3350 em tampão MES pH 6,5; 25% PEG 1500 em tampão MES pH 6,0 e 25% PEG 1500 em tampão MES pH 5,5, como podemos observar na Figura 27 respectivamente. A partir desses novos cristais formados, foi realizado coleta dos dados de difração no LNLS – Campinas-SP.

Figura 27 - Cristais da proteína *B/EstA* após a otimização das condições iniciais. sendo as condições 25% PEG 3350 em tampão MES pH 6,5; 25% PEG 1500 em tampão MES pH 6,0 E 25% PEG 1500 em tampão MES pH 5,5.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a enzima *B/EstB* houve inicialmente a formação de pequenos cristais em formato de ouriço em duas condições distintas, 25% PEG 3K e 0.1 M MES pH 6,5 e 25% PEG MME 2K e 0.1 M HEPES pH 7,5 como podemos observar na Figura 28. Foram realizadas otimizações dessas duas condições manualmente onde foram variadas as porcentagens dos respectivos PEGs e o pH dos respectivos tampões, no entanto, não houve a formação de nenhum cristal, apenas a presença de precipitados, não sendo assim possível realizar a resolução da estrutura da proteína *B/EstB*.

Figura 28 - Pequenos cristais em formato de ouriço da proteína *B/EstB* nas condições 25% PEG 3K 0,1 M MES pH 6,5 E 25% PEG MME 2K E 0,1 M HEPES pH 7,5.

Fonte: Elaborada pela autora

Com a utilização de pequenas agulhas os cristais agrupados da enzima *B/EstA* foram separados e todos eles se referiam a cristais de proteína apresentando padrão de difração com resoluções acima de 3 Å. O cristal inicial formado na condição de 20% PEG 1500 e tampão MES pH 6,0, foi o que apresentou melhor difração e através dele coletamos um conjunto de dados com resolução próxima de 2,2 Å.

A partir desses dados de difração coletados, tentou-se a resolução de sua estrutura pelo processo de substituição molecular, porém, essa proteína apresenta baixa similaridade (21%) com uma acetil-esterase de *Geobacillus stearmophilus* (PDB id: 4OAP, resultado não publicado). Essa baixa similaridade pode estar relacionada ao fato de a *B/EstA* pertencer a superfamília SGNH/ GDSL hidrolase que, como dito anteriormente, apresentam estruturas terciárias substancialmente diferentes das alfa-beta hidrolases e únicas entre todas as hidrolases conhecidas.

A partir da formação de novos cristais foram feitos testes de *soaking* com iodo ou mercúrio, porém, apesar dos dados terem sido coletados, não foi possível detectar a presença de sinal anômalo para resolver essa estrutura.

Capítulo 5

Resultados e discussão - Aplicações

5.1 Emulsificações:

5.1.1 Teste de emulsificação E24:

Além da caracterização enzimática, foi realizada análise das propriedades de emulsificação da enzima. Uma emulsificação adequada é de extrema importância para diferentes aplicações biotecnológicas e industriais, como na indústria de petróleo e a fabricação de sabão, por exemplo. Um dos métodos utilizados para caracterização proteica envolve avaliação da taxa de emulsificação após 24 horas (E24).⁸² A taxa de emulsificação deve chegar a pelo menos 50% para ser industrialmente interessante.¹²⁷⁻¹²⁸ Os testes de emulsificação foram realizados utilizando dois substratos diferentes (óleo de girassol e azeite), que diferem em número de ligações insaturadas, e os seus respectivos índices de emulsificação E24 foram calculados (Tabela 12). *B/EstA* emulsionou o óleo de girassol, mas só atingiu 50% de emulsificação em concentrações relativamente altas de enzima (500 ppm). Pelo contrário, 50% da emulsificação do azeite foi obtida após 24 h com apenas 50 ppm de *B/EstA*, mostrando-se muito melhor para esse substrato conforme mostra a Figura 29.

Para a enzima *B/EstB* observamos na Tabela 13 que para o óleo de girassol, mesmo em altas concentrações enzimáticas a taxa mínima de emulsificação necessária (50%) foi atingida. Já para o azeite de oliva a enzima apresentou esse mínimo já em uma concentração de 100 ppm, atingindo uma emulsificação de 95% a 500 ppm de concentração mostrando que, assim como a *B/EstA*, ela também se apresenta melhor para esse substrato como indicado na Figura 30.

Figura 29 - Teste de emulsificação E24 para a enzima *B/EstA* a) Emulsificação formada em azeite de oliva com diferentes concentrações enzimáticas b) Emulsificação formada em óleo de girassol com diferentes concentrações enzimáticas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 30 - Teste de emulsificação E24 para a enzima *B/EstB* a) Emulsificação formada em azeite de oliva com diferentes concentrações enzimáticas b) Emulsificação formada em óleo de girassol com diferentes concentrações enzimáticas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Teste de emulsificação E24 da enzima *B/EstA* em dois diferentes substratos.

Concentrações de proteína (ppm)	Emulsificação do óleo de girassol	Emulsificação do azeite
50	4 %	50 %
100	24 %	60.7 %
300	40 %	86.2 %
500	52 %	89.2 %

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 13 - Teste de emulsificação E24 da enzima *B/EstB* em dois diferentes substratos.

Concentrações de proteína (ppm)	Emulsificação do óleo de girassol	Emulsificação do azeite
50	5 %	15 %
100	15 %	55 %
300	15 %	90 %
500	25 %	95 %

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma abordagem alternativa para analisar as propriedades de emulsificação é por meio de estudos de estabilidade. Como as emulsões são formadas por dois ou mais líquidos imiscíveis, elas podem ter tamanhos de gotas diferentes que podem ser mais ou menos estáveis.¹²⁹ O tamanho das gotículas nas emulsões está relacionado à estabilidade dessa emulsão particular. Quanto menor o tamanho da gota, mais estável é a emulsão.¹³⁰ Imagens de microscopia óptica das emulsões formadas com a concentração enzimática de 300 ppm usando óleo de girassol e azeite, respectivamente, são mostradas na Figura 31. É perceptível que as gotas formadas na emulsificação do óleo de girassol são maiores do que as formadas na emulsificação do azeite, o que implica que a emulsificação do azeite é mais estável do que o óleo de girassol. Estes resultados demonstram claramente que *B/EstA* tem um potencial de emulsificação interessante, onde emulsifica melhor os óleos, como o azeite, que possui menos ligações insaturadas, de forma semelhante ao que já foi estudado por outra enzima relatado na literatura.¹³¹ Para a enzima *B/EstB*, apesar

dela apresentar uma melhor emulsificação para o azeite assim como a *B/EstA*, não foi possível observar suas gotículas de emulsão pois elas desmancharam.

Figura 31 - Imagens de microscopia óptica das emulsões formadas com a concentração enzimática de 300 ppm da enzima *B/EstB* em a) Óleo de girassol b) Azeite de oliva.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Biofilmes bacterianos:

5.2.1 Síntese do biofilme:

Devido ao potencial de bioemulsificação das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* resolvemos estudar sua possível aplicação em biofilmes bacterianos devido a possível ação de bioemulsificantes na fixação e não fixação de microrganismos a superfícies.³²

Após o descarte do meio de cultura e lavagem com água MilliQ para eliminação das bactérias não ligadas ao biofilme pode-se observar a formação dele no fundo dos poços através de uma película esbranquiçada como mostrado na Figura 32.

Figura 32 - Visualização do biofilme bacteriano de *S. aureus* após 48 horas de crescimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Atividade em biofilme já formado:

Após a síntese dos biofilmes foram adicionadas as diferentes enzimas em três concentrações diferentes; 0,1; 0,03 e 0,01 mg/mL (final), além de um controle sem enzima. Após o tempo de incubação (1/2; 1; 2 e 4 horas), foi descartado o meio líquido e realizado a quantificação do biofilme por cristal violeta.

Na figura 33 podemos observar os resultados obtidos para as enzimas *B/EstA*, *B/EstB* e o controle negativo. Para a enzima *B/EstA* podemos observar na Figura 32 A, que a medida que aumentamos o tempo de reação assim como a concentração enzimática ocorre um aumento na remoção do biofilme, mostrando que ele é dependente do tempo e da concentração enzimática. Com tempo de 4 horas nota-se uma maior remoção, sendo esse máximo de 76,83%, sem considerar o erro experimental. Para a enzima *B/EstB*, encontrada na Figura 32 B, ocorre algo bem semelhante onde observamos que com maiores tempos e concentrações enzimáticas ocorre uma maior remoção no biofilme bacteriano. Assim como a *B/EstA*, a maior ação desta enzima também ocorre com o tempo de 4 horas,

também para a concentração de 0,1 mg/mL, sendo esse máximo de 83,58 %, também sem considerar o erro experimental.

A atividade da esterase no biofilme pode estar ocorrendo pela ação sobre os lipídios, que como citado anteriormente, geralmente estão localizados na matriz do biofilme, e envolvidos na sua fixação, resultando em perda da integridade do componente lipídico dos biofilmes e, conseqüentemente, em efeitos sobre o desenvolvimento e manutenção desses biofilmes.¹³² A remoção de grupos éster pode causar mudanças nas propriedades físicas dos exopolissacarídeos bacterianos, bem como nas interações em cadeia.¹³³ Os lipídios também podem estar relacionados à atividade de superfície, fixação e desprendimento bacteriano, a substâncias hidrofóbicas e propriedades hidrofóbicas.¹³⁴⁻¹³⁵ Essa atividade anti biofilme pode estar relacionada também a alterações na hidrofobicidade dos biofilmes, tornando-os mais sujeitos a lavagens ou outras ações no ambiente.^{38,132,136} Estudos mostram que a diminuição da hidrofobicidade de fibras pode ser realizada através da utilização de cutinase, mostrando um possível enfraquecimento de interações hidrofóbicas.¹³⁷ Cutinases são enzimas α - β -hidrolases que apresentam alguns benefícios em relação as esterases normalmente utilizadas, como a de ser uma esterase não específica capaz de atuar em ésteres solúveis e insolúveis.¹³⁷ Enzimas tolerantes a solventes orgânicos como algumas esterases estudadas também são capazes de enfraquecer interações hidrofóbicas.¹³⁸ Biosurfactantes também estão relacionados a essa propriedade de perda de hidrofobicidade pois a utilização deles pode causar um aumento da solubilidade em compostos hidrofóbicos. Além disso a adsorção de um biosurfactante na superfície muda sua hidrofobicidade podendo interferir no processo de adesão.³¹

Será que os efeitos observados são resultado da ação enzimática no biofilme e não da interferência indireta das proteínas aplicadas nas células de *S. aureus*? Para responder a essa pergunta, projetamos e realizamos os experimentos de controle negativo aplicando BSA e também esterases desnaturadas por temperatura aos biofilmes pré-formados (Figura 32 C e 32 D, respectivamente). O BSA foi aplicado nas mesmas condições experimentais utilizadas para as esterases. Independentemente do tempo de reação e / ou da concentração de proteína, nenhuma remoção do biofilme bacteriano usando BSA foi observada. Para testar se

esterases privadas da estrutura terciária original (como polipeptídeos desdobrados) poderiam promover a remoção do biofilme bacteriano, desnaturamos as esterases a 95 ° C por 30 minutos para anular qualquer atividade enzimática e as aplicamos em concentrações crescentes em biofilmes maduros para um máximo estudado tempo de reação de 4 horas. As enzimas *B/EstA* e *B/EstB* desnaturadas não mostraram atividade no biofilme pré-formado na mesma concentração em que as enzimas não desnaturadas demonstraram uma remoção de biofilme significativa. Esses resultados confirmam que a remoção do biofilme é decorrente da atividade enzimática das esterases e não de sua sequência polipeptídica.

Figura 33 - Atividade enzimática em biofilme pré-formado com diferentes enzimas em diferentes concentrações enzimáticas e diferentes tempos. a) *B/EstA* b) *B/EstB* c) Esterases desnaturadas. ** sem diferença significativa (p-valor >0,05) * com diferença significativa (p-valor <0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando esses resultados obtidos com o de outras enzimas que atuam sobre biofilme de *S. aureus*, pode-se dizer que as esterases apresentam uma taxa de remoção igual a protease e a r Quimotripsina, melhor do que a α -amilase e inferior a Lisostafina conforme o indicado na Tabela 14.

Tabela 14 - Biofilme bacteriano de *S. aureus* degradado por diferentes enzimas em diferentes concentrações.

Biofilme Degradado (%)	Concentração enzimática	Enzima	Fonte
77% $\pm$ 3	100 μ g/mL	<i>B/EstA</i>	
69% $\pm$ 6	30 μ g/mL		
56% $\pm$ 4	10 μ g/mL		
84% $\pm$ 11	100 μ g/mL	<i>B/EstB</i>	
63% $\pm$ 3	30 μ g/mL		
32% $\pm$ 4	10 μ g/mL		
11 %	1 μ g/mL	r Quimotripsina	65
51 %	10 μ g/mL		
82 %	100000 μ g/mL	α -Amilase	66
81 %	20000 μ g/mL		
80 %	10000 μ g/mL		
68 %	2000 μ g/mL		
64 %	1000 μ g/mL		
62 %	10 μ g/mL	Protease	67
82,85 %	6.25 μ g/mL	Lisostafina	68

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Atividade enzimática na prevenção na formação do biofilme:

Afim de verificar se as enzimas não apenas removiam os biofilmes mas também atuavam na prevenção deles como algumas enzimas já estudadas foram realizados ensaios com as mesmas 3 concentrações enzimáticas anteriores (0,01;

0,03 e 0,1 mg/mL), onde essas enzimas foram adicionadas na etapa de crescimento do biofilme em placa de cultivo de 24 poços. Após o tempo de cultivo de 48 horas foi realizado o descarte dos meios de cultura, seguido por lavagem e quantificação por cristal violeta. O resultado dessa prevenção enzimática pode ser encontrado na Figura 34.

Figura 34 - Atividade enzimática na prevenção do biofilme de *S. aureus* em diferentes concentrações enzimáticas para as enzimas B/EstA e B/EstB. * com diferença significativa (p -valor<0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 34, podemos observar que a enzima B/EstA, além de atuar na remoção do biofilme, também atua na prevenção do crescimento do mesmo sendo que essa prevenção também é dependente da concentração enzimática utilizada sendo que a maior prevenção ocorreu a 0,1 mg/mL e foi de aproximadamente 60%. Para a B/EstB podemos observar, também na Figura 34 que na menor concentração enzimática não houve a prevenção na formação do biofilme. Nas outras duas concentrações estudadas foram observadas que essa enzima também é capaz de atuar na prevenção do biofilme, e que ela também é dependente da concentração enzimática utilizada, tendo atingindo seu máximo com aproximadamente 55% de

biofilme a menos que o controle. Esses resultados de prevenção na formação do biofilme já foram observados anteriormente com xilanases e celulasas, onde essa prevenção também era dependente da concentração enzimática utilizada,^{36,139} e podem estar ligados a uma interferência na etapa inicial da colonização da superfície por microrganismos pela clivagem de ligações éster de polissacarídeos, que são os principais constituintes adesivos da microbiota.¹⁰¹ Uma outra possível causa para essa prevenção na formação do biofilme pode estar relacionada ao fato de que, como essas esterases *B/EstA* e *B/EstB* apresentam propriedades de bioemulsificantes, pode estar ocorrendo uma prévia adesão dos surfactantes na superfície sólida, causando uma mudança na hidrofobicidade e interferindo assim no processo de adesão dos microrganismos, podendo constituir um novo modo de combate a colonização por microrganismos patogênicos.³⁰⁻³¹ O fato da enzima *B/EstA* apresentar uma melhor capacidade de emulsificação do que a enzima *B/EstB* está de acordo com esse resultado da prevenção do biofilme onde temos uma maior prevenção para a enzima *B/EstA* mesmo em menores concentrações enzimáticas.

5.2.4 Atividade antimicrobiana:

Como foi observado que as enzimas *B/EstA* e *B/EstB* preveniram a formação do biofilme, foi realizado o teste de atividade antimicrobiana para verificar se elas interferiam no crescimento bacteriano ou somente na formação do biofilme. Para isso foi adicionado, a uma concentração de 0,1 mg/mL final, cada uma dessas enzimas a um inóculo de *S. aureus* em meio BHI. Foram realizadas medidas de densidade ótica (D.O.) em diferentes tempos com o intuito de acompanhar o crescimento dessa bactéria na ausência ou presença de enzimas. Na Figura 35 podemos que as duas enzimas testadas não interferem no crescimento da bactéria já que a curva de crescimento apresentada pelo controle, segue o mesmo padrão do que a curva de crescimento de cada uma das enzimas. Isso significa que essas enzimas elas apresentam somente atividade anti-biofilme e não atividade antimicrobiana.

Figura 35 - Atividade antimicrobiana calculada pela densidade ótica com e sem as enzimas *B/EstA* e *B/EstB* em diferentes tempos. Curva controle e *B/EstA* ficaram sobrepostas mostrando-se praticamente idênticas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Atividade de anti-adesão das enzimas *B/EstA* e *B/EstB*:

Com o intuito de verificar se a ação dessas esterases estão sendo sobre os lipídios presentes na matriz do biofilme, foi realizada contagem das células bacterianas presentes no biofilme após o tratamento com as esterases *B/EstA* e *B/EstB*. Na Figura 36 podemos observar que com o tratamento ocorre uma diminuição no número de colônias formadas. No controle tivemos uma média de 850 colônias contra 403 do tratamento com a esterase *B/EstA* e 416 do tratamento com a esterase *B/EstB*. Como através da atividade antimicrobiana foi visto que as enzimas não causam morte bacteriana, essa diminuição do número de colônias está relacionado ao descolamento do biofilme pela ação das enzimas nas ligações ésteres dos polissacarídeos (constituintes adesivos da microbiota)¹⁰¹ e dos lipídeos relacionados a fixação e desprendimento bacteriano.¹³⁴⁻¹³⁵

Figura 36 - Análise da atividade anti-adesão das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* através da análise do número de colônias presentes após o tratamento dos biofilmes. Na inserção, contagem das colônias após o tratamento, com diluição de 5000x.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.6 Análise da hidrofobicidade do biofilme:

Tendo em vista que a utilização dessas enzimas não interfere no crescimento bacteriano ou na viabilidade celular, a hidrofobicidade do biofilme foi analisada para verificar a possível ação da *B/EstA* e da *B/EstB*.

A hidrofobicidade do biofilme, assim como a da superfície celular, está associada ao fator de virulência, a adesão dos microrganismos a superfícies ou a outras células hospedeiras, assim como a resistência a antibióticos, biocidas e solventes.^{46,140–142} Fatores ou tratamentos que causam diminuição da hidrofobicidade são de extrema importância no controle desses biofilmes.

A hidrofobicidade foi analisada através do ângulo de contato, que é o ângulo que forma a superfície de um líquido ao entrar em contacto com um sólido. O valor

do ângulo de contato depende principalmente da relação que existe entre as forças adesivas entre o líquido e o sólido e as forças coesivas do líquido e está ligado ao índice de molhabilidade de uma superfície, como mostra a Figura 37.¹⁴³

Figura 37 - Esquema indicativo do ângulo de contato formado e sua relação com o grau de molhabilidade da superfície

Fonte: Adaptada de Conceitos Básicos¹⁵³

Na Figura 38 observa-se a diminuição do ângulo de contato entre o controle (Figura 38A) e os biofilmes tratados com 0,1 mg/mL das enzimas *B/EstA* (Figura 38B) e *B/EstB* (Figura 38C). Através do programa ImageJ foi calculado o ângulo de contato para cada uma dessas imagens, como pode ser observado na Tabela 15.

Figura 38 - Ângulo de contato da água em biofilmes com e sem tratamento. A) Sem tratamento, biofilme controle B) Tratamento com a enzima *B/EstA* 0,1 mg/mL por 4 horas C) Tratamento com a enzima *B/EstB* 0,1 mg/mL por 4 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 15 - Valores dos ângulos de contato da água para os biofilmes controle e tratados com as diferentes enzimas.

	Controle	<i>B/EstA</i>	<i>B/EstB</i>
Ângulo (°)	64	28	33

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar com esse experimento que houve uma diminuição do ângulo de contato da água sobre os biofilmes tratados e não tratados. Inicialmente no biofilme controle o ângulo de contato da água estava em 64°, similar ao ângulo de contato encontrado para *S. epidermidis*, que fica na faixa de 29 a 107°,¹⁴⁴ diminuindo para 28° com o tratamento com a enzima *B/EstA* e para 33° com a enzima *B/EstB*. Essa mudança nos ângulos de contato também pode ser observada nas diminuições da hidrofobicidade da superfície das fibras de poliéster causadas pela ação da cutinase.¹³⁷

5.2.7 Ação de antibiótico em biofilme tratado:

A presença de biofilmes bacterianos interfere na ação de diversos agentes antimicrobianos, como antibióticos, por diferentes razões. Podem prejudicar a sua difusão no meio, o estado fisiológico dos organismos no biofilme ou ainda subpopulações com fenótipos diferentes.³⁹⁻⁴⁰ Devido a atividade que essas enzimas apresentaram nos biofilmes, foi realizada uma reação com o antibiótico gentamicina para verificar se ocorria uma melhor ação desse antibiótico no biofilme tratado. A concentração enzimática utilizada foi de 0,1 mg/mL, em um tempo de reação de 4 horas. Foi realizado um controle somente com antibiótico e um das bactérias planctônicas. Após esse tempo foi realizada raspagem de todo o biofilme e as bactérias foram semeadas em BHI ágar para verificação da atividade do antibiótico. Podemos observar esses resultados na Figura 39. Estes resultados mostram uma diminuição significativa no número de colônias que cresceram na placa BHI. Quando compara-se as quatro curvas obtidas do número de colônia formado em função da concentração de antibiótico utilizada, observa-se que ocorre uma maior e mais

rápida morte celular das bactérias planctônicas, mostrando que o biofilme protege as bactérias que estão sob ele. Quando são comparadas as curvas do biofilme sem tratamento com a do biofilme tratado pelas esterase *B/EstA* e *B/EstB*, observa-se que nas curvas tratadas com as enzimas está ocorrendo uma maior diminuição na formação das colônias, o que indica que a diminuição nesse biofilme pela ação das esterases faz com que as bactérias sob eles fiquem mais suscetíveis a ação dos antibióticos.

Figura 39 - Ação diferentes concentrações de antibiótico no biofilme tratado com as enzimas *B/EstA* e *B/EstB*, no biofilme sem tratamento e em células planctônicas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outras enzimas utilizadas para degradação de biofilmes bacterianos também causam aumento na eficiência do antibiótico, como é o caso de algumas xilanases.³⁶ Essa melhora na ação dos antibióticos é inevitável porque as bactérias associadas ao biofilme são menos sensíveis aos antibióticos do que as bactérias de vida livre, tornando-o mais difícil de combater. Além disso, as variações nas concentrações de antibióticos em todo o biofilme fazem com que as células sejam frequentemente expostas a concentrações menores do que as inibitórias e podem, assim,

desenvolver resistência aos antibióticos.¹⁴⁵

5.2.8 Microscopia confocal de fluorescência:

A microscopia confocal baseia-se na iluminação por varredura a laser, ponto-a-ponto, de um espécime biológico tratado ou naturalmente presente com compostos fluorescentes. O princípio de geração de imagens confocais tem sido amplamente aplicado em diversas áreas, como na medicina, biologia e ciência dos alimentos.¹⁴⁶ A microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) é uma ferramenta valiosa para o estudo de biofilmes e, em particular, da matriz do biofilme, pois permite a visualização em tempo real de espécimes vivos totalmente hidratados.¹⁴⁷

A CLSM foi realizada para investigar os efeitos do *B/EstA* e do *B/EstB* na estrutura do biofilme de *S. aureus*. Para monitorar a atividade das enzimas ao longo do tempo, foi aplicado o corante curcumina na concentração de 5 mg/mL. A curcumina é um corante amplamente utilizado devido à sua baixa toxicidade e boa estabilidade. Além disso, a curcumina exibe boas propriedades ópticas e elétricas.^{148–150}

A ação enzimática monitorada ao longo do tempo (Ctrl, 1/2, 1 H, 4 horas) das enzimas *B/EstA* e *B/EstB* pode ser vista nas Figuras 40 e Figura 41, respectivamente. É possível perceber através dessas figuras que a matriz do biofilme é interrompida devido à ação enzimática e que essa interrupção é dependente do tempo, conforme mostrado pelos experimentos acima da atividade enzimática em biofilme pré-formado de *S. aureus* em diferentes tempos quantificados pelo cristal violeta.

Ações enzimáticas em biofilmes monitoradas por CLSM também foram previamente estudadas pela ação de outras enzimas, como xilanases industriais, lipase de *Oceanobacillus sp.*, proteases, proteinase K e DNase I. Esses estudos mostram que, assim como com as esterases, há diminuição do biofilme, facilmente observada em imagens confocais.^{36,132,151-152}

Figura 40 - Imagem confocal do biofilme de *S. aureus* na presença de corante curcumina a) Controle b) após 1/2 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstA (0,1 mg / mL) c) após 1 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstA (0,1 mg / mL) d) após 4 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstA (0,1 mg / mL).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 - Imagem confocal do biofilme de *S. aureus* na presença de corante curcumina a) Controle b) após 1/2 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstB (0,1 mg / mL) c) após 1 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstB (0,1 mg / mL) d) após 4 h de hidrólise enzimática da esterase B/EstB (0,1 mg / mL).

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do programa ImageJ foi calculada uma média, a soma de todos os pixels da seção dividida pelo número de pixels, onde ocorre uma diminuição nesse valor indicando que, assim como mostrado nas imagens de confocal, ocorre uma redução no biofilme bacteriano. Na Tabela 16 podemos observar esses valores, assim como os valores da contagem de colônias. Quando comparamos esses valores podemos observar que eles são bastante similares, mostrando uma conexão entre os resultados obtidos nos experimentos.

Tabela 16 - Tabela comparativa entre os valores médios de pixels presentes nos biofilmes controle e tratados (0,1 mg/mL de enzima por 4 horas) e a formação de colônias do experimento de anti-adesão do controle e do tratado (0,1 mg/mL de enzima por 4 horas).

	Média pixels	Porcentagem média pixels	Média número de colônias	Porcentagem número de colônias
Controle	24,726	100%	876,66	100%
<i>B/EstA</i>	11,801	47,72%	413,33	47,14%
<i>B/EstB</i>	11,625	47,01%	416,66	47,52%

Fonte: Elaborada pela autora

Capítulo 6

Conclusão:

Ao longo desse estudo foi realizada caracterização das esterases *B/EstA* e *B/EstB* com técnicas bioquímicas e biofísicas. Essas caracterizações revelaram características relevantes de ambas as enzimas, como a capacidade de trabalhar em solventes orgânicos e em altas concentrações de sal, que são de extrema importância para a indústria biotecnológica. Ambas as enzimas apresentaram boa capacidade de emulsificação que, aliada a resistência ao sal tornam elas boas candidatas para aplicação em indústrias petrolíferas e no processo de “oil-recovery”. A capacidade de emulsificação juntamente com os diversos trabalhos com aplicação enzimática na degradação de biofilmes bacterianos abriu a possibilidade de uma nova aplicação para as esterases *B/EstA* e *B/EstB*. Ambas as enzimas apresentaram atividade de prevenção e de remoção dos biofilmes de *S. aureus*. A ação dessas enzimas causou uma redução na hidrofobicidade da superfície do biofilme e aumentou a ação do antibiótico.

Esses resultados aqui obtidos fornecem evidências que as enzimas *B/EstA* e *B/EstB* são esterases que apresentam bom potencial para aplicação como enzimas industriais e na área da saúde, como prevenção e tratamento de biofilmes de *S. aureus*, que estão relacionados a diversas infecções e doenças.

Referências

- 1 KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology.*, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002. DOI: 10.1016/s0958-1669(02)00328-2.
- 2 UHLIG, H. *Industrial enzymes and their applications*. New York:Wiley, 1998.
- 3 GLOBAL industrial enzymes market to flourish due to increasing investment in food and beverages industry. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/industrialenzymes-market.htm>, Acesso em: 23 jan. 2020.
- 4 ADRIO, J.; DEMAİN, A. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, v.4, n.1, p.117-139, 2014. DOI: 10.3390/biom4010117.
- 5 LAI, O.; LEEB, Y. Y.; PHUAHC, E. T.; C. AKOH, C. Lipase/esterase: properties and industrial applications. *Encyclopedia of Food Chemistry*, v. 10, n.2, p. 158–167, 2019. DOI :10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5.
- 6 ENZYMES market outlook to 2024: key product categories (carbohydrases, lipases, polymerases & nucleases, proteases), application (paper & pulp, textiles, food & beverages, personal care, animal feed, nutraceutical, biocatalyst), regional segmentation. Disponível em: <https://www.ameriresearch.com/product/global-enzymes-market-size/>. Acesso em: 23 jan. 2020.
- 7 KIRK, O. ; BORCHERT, T. V. ; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, n.1, p.345–351, 2002. DOI: 10.1016/s0958-1669(02)00328-2.
- 8 EC 3: hydrolase nomenclature. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/>. Acesso em: 12 fev. 2021.
- 9 ENZYME C: hydrolase introduction. Disponível em: https://www.creative-enzymes.com/resource/hydrolase-introduction_21.htm. Acesso em: 14 fev. 2021.
- 10 BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*. v.26, n.1, p.73–81 2002. DOI: 10.1016/S0168-6445(01)00075-4.
- 11 AKOH, C. C.; LEE, G. C.; LIAW, Y. C.; HUANG, T. H.; SHAW, J. F. GDSE family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, v.43, n.6, p.534–552, 2004. DOI: 10.1016/j.plipres.2004.09.002.
- 12 NTHANGENI, M. B.; PATTERTON, H. G.; VAN TONDER, A.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, n.7, p.705–712, 2001. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00316-7.

13 SUHAS, V. P.; SUHAS, V. P. Lipases: an overview. *Computation of Conduction and Duct Flow Heat Transfer*, v.12, n.8, p.1-8,2018. DOI:10.1201/9781315139951-1.

14 PANDEY, A. *et al.* The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.29, n.1, p.119–131, 1999. DOI:10.1111/j.1470-8744.1999.tb00541.x

15 WAKELIN, N. G.; FORSTER, C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresource Technology*, v.59, n.1, p.37–43, 1997. DOI: 10.1016/s0960-8524(96)00134-4

16 PANDA, T; GOWRISHANKAR, B. Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, n.2, p.160–169, 2005. DOI: 10.1007/s00253-004-1840-y.

17 SHARMA, R.; CHISTI, Y. ; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v.19, n.8, p. 627–662, 2001. DOI: 10.1016/s0734-9750(01)00086-6.

18 BENOIT, I.; VRIES, E.; BLEICHRODT, R. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnoogy Letter*, v.30, n.1, p.387–396 2008. DOI: 10.1007/s10529-007-9564-6

19 TOPAKAS, E.; VAFIADI, P. C. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*. v.42, n.4, p.497–509 2007. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.01.007.

20 CHAPPAT, M. Some applications of emulsions. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*. v.91, n.3, p.57–77, 1994. DOI: 10.1016/0927-7757(94)02976-8.

21 MOHYALDINN, M. E.; HASSAN, A. ; AYOUB, M. Application of emulsions and microemulsions in enhanced oil recovery and well stimulation. *In: MOHYALDINN, M. E.; HASSAN, A. ; AYOUB, M. Microemulsion :a chemical nanoreactor*.[S.l.], IntechOpen,2019. DOI:10.5772/intechopen.84538.

22 VIEILLE, C. ; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.65, n.1, p.1–43, 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.1.

23 ZHU, Y. *et al.* Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiological Research*, v.168, n.9, p.589–597, 2013. DOI: 10.1016/j.micres.2013.04.004.

24 NASIRI, H.; SPILDO, K. ; SKAUGE, A. Use of enzymes to improve waterflood performance. *Petroleum Science*, v.28, n.1, p.1–12, 2009.

25 KHUSAINOVA, A.; NIELSEN, S. M.; PEDERSEN, H. H.; WOODLEY, J. M. ; SHAPIRO, A. Study of wettability of calcite surfaces using oil-brine-enzyme systems for enhanced oil recovery applications. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v.127, n.1, p.53–64, 2015. DOI: 10.1016/j.petrol.2014.12.014.

- 26 AKBARI, S.; NOUR, A.; JAMARI, S.; RAJABI, A. Demulsification of water-in-crude oil emulsion via conventional heating and microwave heating technology in their optimum conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v.10, n.4, p.66–74, 2016. DOI: 1991-8178.
- 27 LOPEZ-MONTILLA, J. C.; HERRERA-MORALES, P. E.; PANDEY, S. ; SHAH, D. O. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v.23, n.3, p.219-268, 2002. DOI: 10.1081/DIS-120003317.
- 28 NITSCHKE, M. ; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v.25, n.5, p.772–776, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013
- 29 TAO, W.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H. ; LI, S. Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from *Bacillus subtilis* CICC 20034. *Microbial Cell Factories*, v.18, n.1, p.1–, 2019. DOI: 10.1186/s12934-019-1221-y.
- 30 SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, v.22, n.3, p.142–146, 2004. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.01.010.
- 31 LUNA, J. M. *et al.* Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Current Microbiology*, v.62, n.5, p.1527–1534, 2011. DOI: 10.1007/s00284-011-9889-1.
- 32 RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v.3, n.3, p.229–236, 2001. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x.
- 33 FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; GIOVANNA, M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – present status and future potentials. *Biomedical Science, Engineering and Technology*. v.14, n.1, p.1-49, 2012 DOI:10.5772/23821.
- 34 JAMAL, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, v.81, n.1, p.7–11, 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- 35 MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biology*, v.5, n.11, p.2458–2461, 2007. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307.
- 36 LEE, J.; KIM, Y.; LEE, J. Thermostable xylanase inhibits and disassembles *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, v. 7014, n.1, p.1–11, 2018. DOI: 10.1080/08927014.2018.1440551.
- 37 ERICKSON, B.; FANG, M.; WALLACE, J. M.; LIERS, C. Antimicrobial enzymes : an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology Journal*, v.8, n.1, p.1-8, 2013. DOI: 10.1002/biot.201200313.
- 38 SUTHERLAND, I. W; SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 222–222, 2001. DOI: 10.1016/s0966-842x(01)02012-1.

- 39 DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm : structure , function , and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, v. 22, n. 2, p. 2–16, 2012. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.
- 40 HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.
- 41 HEALTHCARE- Associated Infections. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/index.html>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- 42 OTTO, M. Staphylococcal biofilms. *Current Topics Microbiology Immunology*. v.322, n.2, p.207–228, 2009. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
- 43 STAPHYLOCOCCUS Epidermidis: o que é, sintomas e tratamento. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/staphylococcus-epidermidis/>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- 44 JONES, S. M.; MORGAN, M.; HUMPHREY, T. J.; LAPPIN-SCOTT, H. Effect of vancomycin and rifampicin on meticillin-resistant staphylococcus aureus biofilms. *Lancet*, v.357, n.9249, p.40-14, 2001. DOI:10.1016/S0140-6736(00)03572-8.
- 45 MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. Micro review staphylococcus aureus biofilm : a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, v.104, n.4, p.365–376, 2017. DOI: 10.1111/mmi.13634.
- 46 FALCÓN GARCÍA, C. *et al.* Metal ions weaken the hydrophobicity and antibiotic resistance of bacillus subtilis NCIB 3610 biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes*, v.6, n.1, p.1, 2020. DOI: 10.1038/s41522-019-0111-8.
- 47 BROWN, M. R. W.; GILBERT, P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, n.1, p.87S-97S, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb04345.x.
- 48 CHEN, X.; STEWART, P. S. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research*, v. 34, n.17, p.4229–4233, 2000. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00187-1.
- 49 PRASAD, R.; SHAH, A. H.; DHAMGAYE, S. *Antibiofilm agents from diagnosis to treatment and prevention*. New York: Springer Verlag, 2014. v.8. DOI:10.1007/978-3-642-53833-9.
- 50 GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Enzymatic catalytic properties and potential applications of bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 68, n.1, p.1–21, 2011. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.09.002.
- 51 HARWOOD, C. R.; CRANENBURGH, R. Bacillus protein secretion: an unfolding story. *Trends in Microbiology*, v.16, n.2, p.73–79, 2008. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.001.
- 52 VEITH, B. *et al.* The complete genome sequence of bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v.7, n. 4, p. 204–211, 2004. DOI: 10.1159/000079829.

- 53 TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. Disponível em: <http://europepmc.org/books/NBK441868>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- 54 GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J. ; WANG, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in staphylococcus aureus. *Cellular Infection Microbiology*, v.10, n.107, p.1-11, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.
- 55 HAM, J. S. *et al.* Powerful usage of phylogenetically diverse *Staphylococcus aureus* control strains for detecting multidrug resistance genes in transcriptomics studies. *Molecules and Cells*, v.30, n.1, p.71–76, 2010. DOI: 10.1007/s10059-010-0090-3.
- 56 GENTAMICIN(E). Mississauga: Baxter Corporation, 2017. Control n. 203910. Disponível em: https://www.baxter.ca/sites/g/files/ebysai1431/files/2018-11/Gentamicin_EN.. Acesso em: 20 maio 2021.
- 57 BLACK, F. O.; PESZNECKER, S.; STALLINGS, V. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otology and Neurotology*, v.25, n.4, p.559–569, 2004. DOI: 10.1097/00129492-200407000-00025.
- 58 MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.4, p.727–737, 1999. DOI: 10.1128/aac.43.4.727.
- 59 LU, S. *et al.* CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n.1, p.D265–D268, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz991.
- 60 GASTEIGER, E. *et al.* *The proteomics protocols handbook*. New Jersey: Humana Press, 2016. p.571–608. DOI:10.1385/1592598900.
- 61 CONSERVED Domains within a protein or coding nucleotide sequence. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. Acesso em: 14 nov. 2020.
- 62 PROTPARAM tool. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>. Acesso em: 14 nov. 2020.
- 63 EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. v.32, n.5, p.1792, 2004 . DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- 64 BATEMAN, A. *et al.* UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, v.43, n.1, p.D204–D212, 2015. DOI: 10.1093/nar/gku989.
- 65 CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). *Protein Expression and Purification*, v99, n.1, p.35–42, 2014. DOI: 10.1016/j.pep.2014.03.008.
- 66 MCCORKLE, G. Review work: molecular-cloning - a laboratory manual. *American Scientist*, v.71, n.4, p.418, 1983.
- 67 BALAN ,A. *et al.* Purification and characterization of a thermostable lipase from *geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme Research*. v.1, n.12, p.1–7, 2012.

DOI:10.1155/2012/987523.

68 KANMANI, P.; KUMARESAN, K. ;ARAVIND, J. Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.46, n.4, p.1235–1243, 2015. DOI: 10.1590/s1517-838246420141068.

69 BORATYN G.M.; SCHÄFFER, A..A.; AGARWALA, R.; ALTSCHUL ,S.F.; LIPMAN, D.J. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biology Direct*, v.7, n.12, p.1-8, 2012. DOI: 10.1186/1745-6150-7-12.

70 KUMAR S; STECHER G. T. K.; Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v.7, n.33, p.1870-1874 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

70 KUMAR, S.; STECHER, G, T. K. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. v.7, n.33, p.1870-1874, 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

71 HAMMERSLEY, A. FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program. *Journal of Applied Crystallography*, v.49, n.2, p.646–652 2016. DOI: 10.1107/S1600576716000455

72 GLATTER, O.; KRATKY, O. *Small angle x-ray scattering*. London: Academic Press,1982.· 4v.

73 GUINIER, A.;FOURNET, G. *Small-angle scattering of X-rays*. New York: John Wiley Sons, Inc,1955. DOI: 10.1002/pol.1956.120199326.

74 KONAREV, P. V.; SVERGUN, D. I. A posteriori determination of the useful data range for small-angle scattering experiments on dilute monodisperse systems. *Iucrj*. v.2, n.3, p.352–360,2015. DOI: 10.1107/s2052252515005163.

75 PIIADOV, V.; ARAUJO, E. A.; OLIVEIRA NETO, M.;CRAIEVICH, A. F.; POLIKARPOV, I. SAXSMoW 2.0: online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale. *Protein Science*. v. 28, n. 2, p.454–463, 2019. DOI: 10.1002/pro.3528.

76 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography* ,v.25, n.1, p.495–503, 1992. DOI: 10.1107/s0021889892001663.

77 SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical Journal*, v. 80, n.6, p.2946–2953, 2001. DOI: 10.1016/s0006-3495(01)76260-1.

78 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v.36, n.1, p.860–864, 2003. DOI: 10.1107/s0021889803000268.

79 KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, v.10, n.6, p.845-858, 2015.DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

80 KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography*, v.34, n.1, p.33–41 2001. DOI:

10.1107/s0021889800014126.

81 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; TAINER, J. A.; SALI, A. FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Research*, v.44, n. W1, p.W424–W429, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw389.

82 COOPER, D. G. Surface-active agents from two bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.2, p.224–229, 1986. DOI: 0099-2240/87/020224-06\$02.00/0

83 XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B. Crystal violet and xtt assays on staphylococcus aureus biofilm quantification. *Current Microbiology*, v.73, n.4, p.474–482, 2016. DOI: 10.1007/s00284-016-1081-1.

84 SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Historical commentary NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v.9, n.7, p.671–675, 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2089.

85 GENEPIO: genetica e bioinformatica. Disponível em: <http://www.genebio.ufba.br/blast/>. Acesso em: 20 maio 2021.

86 NTHANGENI, M.B.; PATTERTON, H.G.; VAN TONDER, A. Over-expression and properties of a purified recombinant Bacillus licheniformis lipase: a comparative report on Bacillus lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, n.7-8, p.705–712, 2001. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00316-7.

87 SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by bacillus licheniformis vsg1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.1, p.179–185, 2010. DOI: 10.1590/s1517-83822010000100026.

88 SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, n.1, p.1–17, 2004. DOI: 10.1139/w03-076.

89 NAKAMURA, A. M.; SEIKI KADOWAKI, M. A.; GODOY, A.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. Low-resolution envelope, biophysical analysis and biochemical characterization of a short-chain specific and halotolerant carboxylesterase from Bacillus licheniformis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.120, n.1, p.1893–1905, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.003.

90 METIN, K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic Bacillus sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, n.2, p.628–635, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.07.015.

91 LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168 , an extremely basic pH-tolerant enzyme, *European Journal of Biochemistry*, v.160, n.8, p.155–160, 1993. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18127.x.

92 KAISER, P. *et al.* A novel esterase from Bacillus subtilis (RRL 1789): purification and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification*, v.45, n.10, p.262–268, 2006. DOI: 10.1016/j.pep.2005.08.030.

- 93 ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; BARATTI, J. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology*, v.63, n.11, p.1865–1870, 1999. DOI: 10.1271/bbb.63.1865.
- 94 BARATTI, J. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.54, n.1, p.173–179, 2000. DOI: 10.1007/s002530000353.
- 95 SCHUCK, P.; PERUGINI, M. A.; GONZALES, N. R.; HOWLETT, G. J.; SCHUBERT, D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophysical Journal*, v.82, n.2, p.1096–1111, 2002. DOI: 10.1016/s0006-3495(02)75469-6.
- 96 SANDANA MALA, J. G.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases—an overview. *Analytical Chemistry: methods and applications*, v.3, n.9, p.114–135, 2011 DOI:10.1201/b12872-9.
- 97 KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUN, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, v.5, n.2, p.173–185, 1997. DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00177-9.
- 98 NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of *pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. the prototype for family I.1 of bacterial lipases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n.40, p.31219–31225, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M003903200.
- 99 BORA, L.; BORA, M. Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp isolated from Hotspring of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.43, n.1, p.30–42, 2012. DOI: 10.1590/s1517-83822012000100004.
- 100 BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D. ; KEPP, K. P. Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. *PLoS One*, v.9, n.6, p.1-2 ,2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099402.
- 101 RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, v.22, n.2, p.495–498, 2000. DOI: 10.1023/A:1005604617440.
- 102 HUDDLESTON, S.; YALLOP, C. A.; CHARALAMBOUS, M. The identification and partial characterisation of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.216, n.2, p.495–500, 1995. DOI: 0006-291X/95.
- 103 KLUMP, H. *et al.* Glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. thermal denaturation and activation. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.31, p.22681,1992. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)41725-5.
- 104 STUTZENBERGER, F.; LUPO, D.L. pH-dependent thermal activation of endo-1, 4- β -glucanase in *Thermomonospora curvata*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.8, n.1, p.205–208,1986. DOI: 0141-0229.

- 105 KONG, F.; WANG, Y.; CAO, S.; GAO, R.; GUIGUI, X. Cloning, purification and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10. *Process Biochemistry*, v.49, n.1, p.775–782, 2014. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.02.008.
- 106 ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHEÑO, J. M.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT - Food Science and Technology*, v.60, n.1, p.246–252, 2015. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.063.
- 107 BALAJI, L.; JAYARAMAN, G. Metal ion activated lipase from halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 displays broader operational range. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.67, n.1, p.380–386, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.050.
- 108 GHATI, A.; PAUL, G. Purification and characterization of a thermo-halophilic, alkali-stable and extremely benzene tolerant esterase from a thermo-halo tolerant *Bacillus cereus* strain AGP-03, isolated from 'Bakreshwar' hot spring, India. *Process Biochemistry*, v.50, n.5, p.771–781, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.01.026.
- 109 ZHANG, W. *et al.* A new cold-adapted, alkali-stable and highly salt-tolerant esterase from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.111, n.1, p.1183–1193, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.152.
- 110 MADERN, D.; EBEL, C.; ZACCAI, G. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, v.4, n.2, p.91–98, 2000. DOI: 10.1007/s007920050142.
- 111 SIGLIOCCOLO, A.; PAIARDINI, A.; PISCITELLI, M.; PASCARELLA, S. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*, v.11, n.1, p.1–2, 2011. DOI: 10.1186/1472-6807-11-50.
112. WANG, G. *et al.* A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. *Scientific Reports*, v.6, p.10, p.1–10, 2016. DOI: 10.1038/srep19494.
- 113 ADAN, A.; ARSLANOGLU, A. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from psychrotolerant *Pseudomonas fluorescens* KE38. *Turkish Journal of Biology*, v.37, n.5, p.538–546, 2013. DOI: 10.3906/biy-1211-10.
- 114 ALMEIDA, J. M. *et al.* Tailoring recombinant lipases: keeping the His-tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions. *Scientific Reports*, v.8, n.1, p.11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27579-8.
- 115 YAO, C. J.; CAO, Y.; WU, S. S.; LI, S.; HE, B. F. An organic solvent and thermally stable lipase from *Burkholderia ambifaria* YCJ01: purification, characteristics and application for chiral resolution of mandelic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v.85–86, n.1, p.105–110, 2013. DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.08.016.
- 116 SECUNDO, F.; CARREA, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v.19–20, n.5, p.93–102, 2002.

DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00155-8.

117 HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELA-TORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v.61, n.3-4, p.136–142, 2009. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.06.004.

118 HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH. *Acta Biologica Hungarica*, v.58, n.1, p.115-132, 2007. DOI: 10.1556/ABiol.58.2007.1.11.

119 SOLIMAN, N. A.; KNOLL, M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SCHMID, R. D.; LANGE, S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, v.42, n.7, p.1090–1100, 2007. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.05.005.

120 DUTTA, S.; RAY, L Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.159, n.1, p.142–154, 2009. DOI: 10.1007/s12010-009-8543-x.

121 ABRAMIĆ, M. *et al.* Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, n.6, p.522–529, 1999. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00077-0.

122 KIM, S. B.; LEE, W. ; RYU, Y. W. Cloning and characterization of thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Journal of Microbiology*, v.46, n.1, p.100–107, 2008. DOI: 10.1007/s12275-007-0185-5.

123 MANDRICH, L. *et al.* Functional and structural features of the oxyanion hole in a thermophilic esterase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Proteins: structure, function and genetics*, v.71, n.4, p.1721–1731, 2008. DOI: 10.1002/prot.21877.

124 KUMAR, L.; SINGH, B.; ADHIKARI, D. K.; MUKHERJEE, J. ; GHOSH, D. A thermoalkaliphilic halotolerant esterase from *Rhodococcus* sp. LKE-028 (MTCC 5562): enzyme purification and characterization. *Process Biochemistry*, v.47, n.6, p.983–991, 2012. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.03.020.

125 WICKA, M. *et al.* Cloning, expression, and biochemical characterization of a cold-active GDSE-esterase of a *Pseudomonas* sp. S9 isolated from Spitsbergen island soil. *Acta Biochimica Polonica*, v.63, n.1, p.117–125, 2016. DOI: 10.18388/abp.2015_1074.

126 RECEVEUR-BRECHOT, V.; DURAND, D. How random are intrinsically disordered proteins? a small angle scattering perspective. *Current Protein & Peptide Science*, v.13, n.1, p.55–75, 2012. DOI: 10.2174/138920312799277901.

127 MENDES LOPES, E. Emulsification properties of bioemulsifiers produced by wild-type and mutant *Bradyrhizobium elkanii* strains. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v.5, n.1, p.1–6, 2014. DOI: 10.4172/2155-6199.1000245.

128 WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v.7, n.5, p.415–423, 1997. DOI: 10.1007/bf00056425.

- 129 BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, n.5, p.495–508, 2000. DOI: 10.1007/s002530051648.
- 130 KOKAL, S. Crude-oil emulsions: a state-of-the-art review. *Spe Production & Facilities*, v.20, n.1, p.5–13, 2005. DOI: 10.2118/77497-pa.
- 131 KUMAGAI, P. S. *et al.* Characterization of esterase activity from an *Acetomicrobium hydrogeniformans* enzyme with high structural stability in extreme conditions. *Extremophiles*, v.22, n.5, p.781–793, 2018. DOI: 10.1007/s00792-018-1038-3.
- 132 KIRAN, G. S.; LIPTON, A. N.; KENNEDY, J.; DOBSON, A. D. W. ; SELVIN, J. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. *Bioengineered*, v.5, n.5, p.305–318, 2014. DOI: 10.4161/bioe.29898.
- 133 WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.C. *Microbial extracellular polymeric substances* : characterization, structure and function. Berlin: Springer Verlag, 1999. DOI:10.1007/978-3-642-60147-7.
- 134 BOGINO, P. C.; OLIVA, M.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, v.14, n.8, p.15838–15859, 2013. DOI: 10.3390/ijms140815838.
- 135 CONRAD, A. *et al.* Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, v.38, n.10, p.1093–1105, 2003. DOI: 10.1007/s11745-006-1165-y.
136. JONES, S. M.; MORGAN, M.; HUMPHREY, T. J. ; LAPPIN-SCOTT, H. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* , v.357, n. 9249 , p.40–41, 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03572-8.
- 137 WU, J.; CAI, G.; LIU, J.; GE, H. ; WANG, J. Eco-friendly surface modification on polyester fabrics by esterase treatment. *Applied Surface Science*, v.295, n.1, p.150–157, 2014. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.01.019.
138. DACHURI, V.; LEE, C.; JANG, S. H. Organic solvent-tolerant esterase from *sphingomonas glacialis* based on amino acid composition analysis: cloning and characterization of EstSP2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.28, n.9, p.1502–1510, 2018. DOI: 10.4014/jmb.1806.06032.
- 139 LOISELLE, M.; ANDERSON, K. W. The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants. *Biofouling*, v.19, n.2, p.77–85, 2003. DOI: 10.1080/0892701021000030142.
- 140 SILVA-DIAS, A. *et al.* Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, v.6, n.3, p.1-2, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00205.
- 141 PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N. B. ; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, v.44, n. 1-2, p.29–35, 2001. DOI: 10.1046/j.1439-

0507.2001.00611.x.

142 WERB, M. *et al.* Surface topology affects wetting behavior of bacillus subtilis biofilms. *npj Biofilms Microbiomes*, v.3, n.1, p.1-2, 2017. DOI: 10.1038/s41522-017-0018-1

143 ALFA Connection. *O que é a tensão superficial?* Disponível em: <https://www.alfaconnection.pro.br/fisica/fisicoquimica/tensao-superficial/conceitos-basicos/>. Acesso em: 12 abril 2021

144 VAN DER MEI, H. C.; BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids Surfaces B: biointerfaces*, v.11, n.4, p.213–221, 1998. DOI: 10.1016/S0927-7765(98)00037-X.

145 ALGBURI, A.; COMITO, N.; KASHTANOV, D.; DICKS, L. M. T. ; CHIKINDAS, M. L. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, v.83, n.3, p.1–16, 2017. DOI: 10.1128/AEM.02508-16.

146 COLETTA, V. C.; REZENDE, C. A.; CONCEICAO, F. R.; POLIKARPOV, I.; GUIMARAES, F. E. G. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for Biofuels*, v.6, n.1, p.10, 2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-43.

147 SCHLAFER, S.; MEYER, R. L. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*, v.138, n.1, p.50–59, 2017. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.03.002.

148 HONGZHAO, R. *et al.* Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits. *Journal of the American Chemical Society*, v.131, n.42, p.15257–15261, 2009. DOI: 10.1021/ja9047043.

149 XU, G. *et al.* Crystal structure, optical properties and biological imaging of two curcumin derivatives. *Dye Pigment*, v.101, n.1, p.312–317 2014. DOI: 10.1016/j.dyepig.2013.09.034.

150 XU, G. *et al.* Two-photon absorption and cell imaging of two multi-branched dyes based on curcumin. *Dye. Pigment*, v.123, n.1, p.267–273, 2015. DOI: 10.1016/j.dyepig.2015.07.041.

151 SAGGU, S.; JHA, G.; MISHRA, P. Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from microbacterium sp. SKS10. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v.7, n.8, p.1-13, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00192.

152 BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*, v.19, n.9, p.449–455, 2011. DOI: 10.1016/j.tim.2011.06.004.

153 Conceitos básicos - tensão superficial. Disponível em: <https://www.alfaconnection.pro.br/fisica/fisicoquimica/tensao-superficial/conceitos-basicos/>. Acesso em: 02 ago. 2021

Anexos:

- Artigos publicados em periódicos:

Low-resolution molecular shape, biochemical characterization and emulsification properties of a halotolerant esterase from *Bacillus licheniformis*

Leite, Ana Elisa T.; Briganti, Lorenzo; De Araújo, Evandro Ares; Pellegrini, Vanessa De Oliveira Arnoldi; Camilo, Cesar Moyses; Polikarpov, Igor

European Biophysics Journal With Biophysics Letters. Fator de Impacto (2019 JCR): 2,0940, v.49, p.435 - 447, 2020.

European Biophysics Journal (2020) 49:435–447
<https://doi.org/10.1007/s00249-020-01448-7>

ORIGINAL ARTICLE

Low-resolution molecular shape, biochemical characterization and emulsification properties of a halotolerant esterase from *Bacillus licheniformis*

Ana Elisa T. Leite¹ · Lorenzo Briganti¹ · Evandro Ares de Araújo¹ · Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini¹ · Cesar Moyses Camilo¹ · Igor Polikarpov¹

Received: 5 December 2019 / Revised: 28 June 2020 / Accepted: 8 July 2020 / Published online: 18 July 2020
 © European Biophysical Societies' Association 2020

Abstract

Bacterial esterases are highly versatile enzymes, currently widely used in detergents, biosurfactants, bioemulsifiers and as biocatalysts in paper and food industries. Present work describes heterologous expression, purification, and biophysical and biochemical characterization of a halotolerant esterase from *Bacillus licheniformis* (BIEstA). BIEstA preferentially cleaves *pNP*-octanoate and both activity and stability of the enzyme increased in the presence of 2 M NaCl, and also with several organic solvents (ethanol, methanol and DMSO). Furthermore, BIEstA has considerable emulsifying properties, particularly with olive oil as substrate. Our studies also show that the enzyme is monomeric in solution and its small-angle X-ray scattering low-resolution molecular envelope fits well its high-resolution homology model.

Keywords Esterases · *Bacillus licheniformis* · Biochemical characterization · Small-angle X-ray scattering

- Artigos em fase de preparação:

Bacillus licheniformis esterases exert Staphylococcus aureus antibiofilm activities

Ana Elisa T. Leite, Vanessa O. A. Pellegrini, Kate Blanco, Natalia Inada and Igor Polikarpov