

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LUISA MARQUES PIMENTEL

Análise estrutural de Proteínas Termofílicas envolvidas na biodegradação de plásticos

São Carlos  
2025

# Análise estrutural de Proteínas Termofílicas envolvidas na biodegradação de plásticos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz - IFSC

São Carlos  
2025

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.

## RESUMO

O acúmulo de plásticos sintéticos de origem fóssil em ambientes terrestres e marinhos representa um dos maiores desafios ambientais e socioeconômicos da atualidade. Métodos convencionais de reciclagem mecânica e química possuem limitações significativas, tornando essencial o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas para a degradação eficiente desses polímeros. Este trabalho visa contribuir para essa área por meio da caracterização estrutural de hidrolases envolvidas na degradação de plásticos. Para isso, foram selecionadas três enzimas: a hidrolase de dienolactona (selvagem e mutante) de *Hydrogenobacter thermophilus*, uma hidrolase de *Thermotogaceae bacterium* e uma hidrolase de *Carbonactinospora thermoautotrophica*. Essas proteínas foram submetidas à análise estrutural por difração de raios X em monocristais, permitindo a elucidação de suas estruturas tridimensionais e a investigação de seus mecanismos catalíticos e estabilidade térmica. A compreensão detalhada dessas hidrolases poderá fornecer subsídios para a engenharia racional de variantes mais eficientes e termoestáveis, visando sua aplicação na bioconversão de plásticos. Espera-se que este estudo não apenas preencha lacunas sobre os mecanismos moleculares envolvidos na biodegradação de polímeros sintéticos, mas também forneça bases para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis voltadas à mitigação da poluição plástica.

**Palavras-chave:** Biodegradação; hidrolases; estrutura tridimensional; difração de raios X; plásticos.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
2.1. Procedimentos gerais de obtenção, cristalização e coleta de dados.....	6
2.1.2 Considerações específicas para cada proteína.....	7
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>8</b>
3.1 E1 mutante.....	8
3.2 W3.....	12
3.3 E3.....	15
<b>4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>19</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No século XX, a síntese de uma nova classe de materiais impulsionou uma revolução industrial significativa: os polímeros sintéticos. Embora apresentem baixa toxicidade inerentes, decorrente principalmente de sua insolubilidade em água e de sua elevada massa molecular, os monômeros utilizados em sua produção podem ser tóxicos e potencialmente carcinogênicos. Durante décadas, a liberação desses materiais no meio ambiente foi considerada inofensiva, o que resultou no descarte desenfreado. Projeções indicam que, caso as tendências atuais de produção e consumo sejam mantidas, até 2050 cerca de 33.000 Mt terão sido geradas [1]. Os microplásticos também vêm se consolidando como uma preocupação ambiental, à sua ampla dispersão em diversos locais, bem como à sua capacidade de transferência ao longo da cadeia alimentar, representam um risco potencial à saúde humana e à integridade dos ecossistemas.

As abordagens convencionais de reciclagem do politereftalato de etileno (PET) baseiam-se em métodos mecânicos e químicos que apresentam limitações, como o elevado consumo energético, a geração de subprodutos tóxicos e a baixa eficiência na recuperação dos monômeros constituintes. Nesse cenário, a degradação enzimática surge como uma alternativa promissora, uma vez que ocorre sob condições brandas de temperatura e pH, reduzindo impactos ambientais e viabilizando a conversão do PET em seus monômeros originais, os quais podem ser reutilizados na síntese de novos materiais.

As pesquisas com enzimas capazes de atuar sobre plásticos, denominadas PAZymes (Plastic-Active Enzymes), vêm se expandindo [2], com a caracterização de esterases, lipases, cutinases e carboxilesterases [3]. Elas são capazes de catalisar reações de hidrólise no PET e outros poliésteres. Um marco relevante foi a descoberta, em 2016, no Japão, de um consórcio microbiano que permitiu o isolamento da *Ideonella sakaiensis*, uma bactéria com a capacidade singular de degradar e metabolizar PET como fonte de carbono [4]. Essa espécie expressa duas enzimas hidrolíticas fundamentais, a PETase, que converte o PET em MHET (ácido mono(2-hidroxietil) tereftálico), e a MHETase, que transforma o MHET em ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), os quais são completamente assimilados pela bactéria (Figura 1).

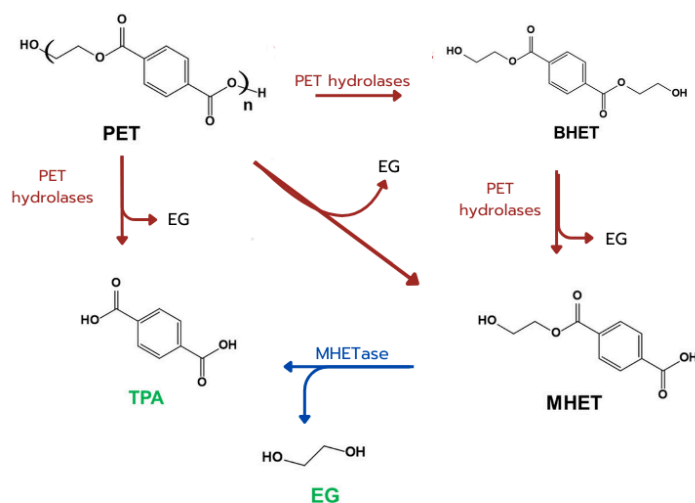


Fig. 1. Mecanismo de degradação do PET por hidrolases. Elas catalisam a clivagem hidrolítica do PET gerando BHET (ácido bis(2-hidroxi-etil) tereftálico), MHET (ácido mono(2-hidroxi-etil) tereftálico), TPA (ácido tereftálico) e EG (etilenoglicol). Imagem adaptada de Wei et al. (2021), *Polymer Degradation and Stability*, v. 183, p. 109457.

A PETase é uma enzima da superfamília das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, cuja estrutura é caracterizada por um núcleo central formado por folhas  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$  (Figura 2). Essa conformação confere ao sítio ativo uma disposição que favorece o acesso do substrato, influenciando diretamente sua função catalítica. Em comparação com outras enzimas da mesma família, como cutinases e lipases, a PETase se destaca por apresentar uma abertura mais ampla no sítio ativo e por conter ligações dissulfeto adicionais, fatores que impactam positivamente sua eficiência na degradação do PET [5].

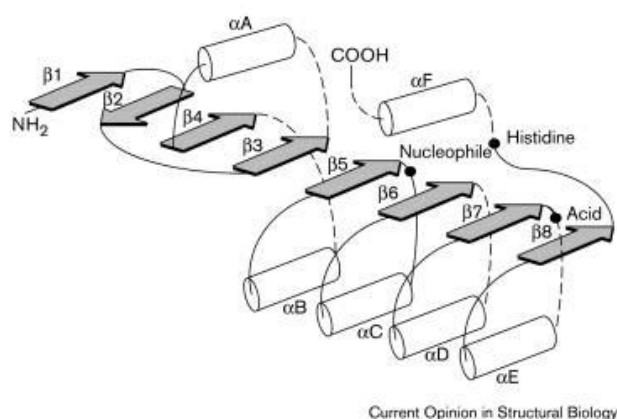


Fig 2. Esquema da arquitetura secundária típica da dobra  $\alpha/\beta$  de hidrolases. As hélices alfa são representadas por cilindros brancos, enquanto as fitas beta aparecem como setas em cinza. Os pontos pretos marcam a posição da tríade catalítica. As linhas tracejadas indicam possíveis regiões de inserção estrutural. Fonte: Ollis, D. L. *et al.* (1992)

Estudos de engenharia enzimática têm revelado a existência de variantes estruturais com características catalíticas distintas. Como exemplo, a enzima HtDLH, cuja tríade catalítica é composta por Cys121, Asp170 e His202, em contraste com a tríade clássica Ser–Asp–His presente em muitas  $\alpha/\beta$ -hidrolases. Essa variação ressalta a diversidade funcional entre enzimas com arquitetura semelhante. [6;7].

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo a caracterização estrutural e funcional de três hidrolases inéditas: E1 mutante, W3 e E3. A análise combinada dessas proteínas, aliando abordagens de bioquímica enzimática e cristalografia de raios X, visa ampliar o entendimento sobre suas atividades hidrolíticas e potencial aplicação biotecnológica. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para o aprimoramento de sistemas enzimáticos voltados à reciclagem e biotransformação do PET, com implicações diretas para a mitigação de resíduos plásticos em escala industrial e ambiental.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1. Procedimentos gerais de obtenção, cristalização e coleta de dados**

As proteínas analisadas foram fornecidas em colaboração com o Prof. Dr. Fabio Squina (UNICAMP) e o Prof. Dr. Wânus Garcia (UFABC), que disponibilizaram amostras previamente purificadas e caracterizadas por ensaios enzimáticos, permitindo a investigação estrutural. A expressão foi realizada em sistema heterólogo, com *Escherichia coli* BL21 como hospedeira, utilizando códons otimizados e o vetor pET28a(+). A purificação foi conduzida por cromatografia de afinidade.

Os ensaios de cristalização foram automatizados com o robô Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments®), utilizando placas Intelli-Plate 96-well low profile. Diversas condições comerciais foram testadas, com proporções de proteína e solução precipitante de 1:1, 1:2 e 2:1 (0,45  $\mu$ L + 0,45  $\mu$ L; 0,3  $\mu$ L + 0,6  $\mu$ L; 0,6  $\mu$ L + 0,3  $\mu$ L). As placas foram seladas com filme adesivo transparente e incubadas a 20 °C. A formação dos cristais foi monitorada semanalmente, sendo selecionados aqueles com tamanho adequado, forma definida e bem isolados. A manipulação foi realizada com MicroLoops (MiTeGen) compatíveis com o tamanho dos cristais.

Cristais obtidos em condições sem crioprotetores foram transferidos para soluções contendo etileno glicol (ETG), preparadas a partir da própria solução de cristalização, com concentrações

ajustadas conforme o teor de água da gota, visando prevenir a formação de gelo durante o resfriamento. Após a crioproteção, os cristais foram rapidamente resfriados e armazenados em nitrogênio líquido até a coleta.

A coleta de dados de difração por raios X foi realizada na linha de luz MANACA do síncrotron Sirius (LNLS – Campinas, SP), com uso do detector PILATUS 2M. Os cristais foram mantidos a 100 K sob fluxo de nitrogênio gasoso, garantindo estabilidade térmica e preservação estrutural. O alinhamento ao feixe foi feito com precisão para assegurar uma exposição homogênea. As imagens geradas pelo detector foram transferidas automaticamente para a estação gráfica de controle, permitindo o monitoramento em tempo real da coleta e o início do processamento computacional.

O processamento inicial incluiu a indexação, integração, avaliação da resolução e determinação do grupo espacial, conduzido pelo pacote autoPROC (baseado no XDS). A redução, o escalonamento e a fusão dos dados foram realizados com o programa AIMLESS. A estimativa do número de moléculas por unidade assimétrica e da fração de solvente cristalino foi obtida por meio do coeficiente de Matthews. As fases cristalográficas foram determinadas por substituição molecular utilizando o programa PHASER, com modelos estruturais homólogos selecionados a partir de buscas no banco de dados PDB, com base no grau de identidade de sequência identificado por meio de análises via BLAST. O refinamento dos modelos foi conduzido por ciclos alternados entre refinamento automatizado no REFMAC, com aplicação de correções TLS e refinamento dos fatores B individuais, e ajustes manuais em espaço real realizados no programa COOT. A validação final da qualidade estrutural foi feita com o software PDB Validation, enquanto as representações tridimensionais das estruturas foram geradas com o PyMOL Molecular Graphics System.

### **2.1.2 Considerações específicas para cada proteína**

Apesar da padronização nos procedimentos experimentais, cada proteína apresentou especificidades relacionadas ao organismo de origem, condições de cristalização, crioproteção e modelo estrutural empregado na substituição molecular.

## **E1 mutante**

Derivada de *Hydrogenobacter thermophilus*, a E1 é uma dienolactona hidrolase (DLH), enzima que participa da quebra de ésteres e da degradação de compostos aromáticos. A forma selvagem contém uma tríade catalítica incomum (Cys121, Asp170, His202), característica de DLHs e hidrolases  $\alpha/\beta$ . Para aproximar sua configuração da tríade típica de PAZymes (Ser-Asp-His), foi realizada uma mutação sítio-dirigida substituindo Cys121 por Ser (CS121S), utilizando o sistema KLD (New England Biolabs) e expressão em *E. coli* DH5 $\alpha$ . A modificação buscou avaliar o impacto funcional dessa troca, considerando estudos que destacam a importância da tríade na interação com o substrato. Os ensaios de cristalização utilizaram os kits Salt Rx™, BCS Screen MD®, PACT++™ e SG1 MD®, com concentrações de ETG entre 10% e 30%. A estrutura da enzima nativa (PDB ID: 9BLE) serviu como modelo para substituição molecular.

## **W3**

Isolada de *Thermotogaceae bacterium*, W3 é uma hidrolase  $\alpha/\beta$  que promove a clivagem de ligações químicas por hidrólise. Foram empregados os kits JCSG™, Salt Rx™, Crystal Screen™, Morpheus II®, PACT++™ e SG1 MD®, com ETG variando de 10% a 30%. O modelo utilizado na substituição molecular foi uma lipase termoestável de monoacilglicerol (PDB ID: 8B9S), com 33,06% de identidade de sequência.

## **E3**

Originária de *Carbonactinospira thermoautotrophica*, E3 também integra a classe das  $\alpha/\beta$  hidrolases. A triagem cristalográfica envolveu os kits Crystal Screen™, Morpheus I®, Morpheus II®, PACT++™, Index HT™ e JCSG™, com ETG entre 5% e 25%. O modelo estrutural adotado foi o de uma esterase de ácido ferúlico (PDB ID: 7Z2U), com 27,35% de identidade de sequência.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 E1 mutante**

A estrutura foi resolvida a partir de cristais formados na condição F2b do kit de cristalização PACT++™, contendo 20% (w/v) polietilenoglicol 3.350, 100 mM Bis-Tris propano (pH 6,5) e 200 mM brometo de sódio. O cristal pertence ao sistema ortorrômbico, grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, com parâmetros de célula unitária de 76,524 Å, 86,193 Å e 141,568 Å. A estrutura contém quatro

unidades assimétricas, cada uma com 234 resíduos. Inicialmente, os dados apresentaram resolução de 2,0 Å, contudo, visando melhorar a qualidade dos mapas de densidade e as estatísticas globais, foi adotado um corte de resolução para 2,25 Å, valor definido com base nos critérios de qualidade,  $R_{pim} \leq 0,6$  (indicador de precisão nas intensidades medidas),  $\langle I/\sigma(I) \rangle \geq 2,0$  (relação sinal/ruído das intensidades) e  $CC(1/2) \geq 0,3$  (correlação entre conjuntos independentes de dados). A coleta exibiu excelente qualidade, com completude de 99,6%. Os valores de R-work e R-free conquistados foram de 20,64% e 25,80%, respectivamente, vale ressaltar também que 97,18% dos resíduos foram posicionados em regiões favorecidas do diagrama de Ramachandran.

A caracterização bioquímica da enzima mutante revelou uma atividade específica inferior à da proteína selvagem, indicando a importância funcional do resíduo de cisteína na catálise, na figura 3 temos a comparação entre os sítios ativos das proteínas.

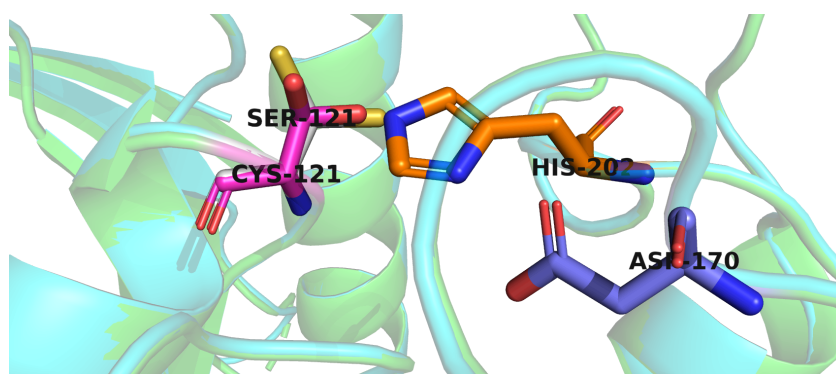


Fig 3. Comparação dos sítios ativos da proteína E1 selvagem (ciano) e da mutante C121S (verde). A mutação da cisteína 121 (em branco) por uma serina (em rosa) substitui o grupo funcional sulfidrílico (-SH), altamente nucleofílico, por um grupo hidroxila (-OH), menos reativo e mais polar. Essa substituição altera o microambiente do sítio ativo. A tríade catalítica (His–Asp–Cys/Ser) está destacada em cores contrastantes para facilitar a visualização.

Considerando que a única modificação introduzida na proteína corresponde a uma substituição pontual de resíduo, observou-se a conservação do enovelamento tridimensional em relação à enzima selvagem, a sobreposição estrutural entre as duas resultou em um desvio estrutural (RMSD) de 0,199 Å, confirmando a altíssima similaridade estrutural. Ambas as isoformas mantêm a dobra canônica característica das  $\alpha/\beta$ -hidrolases. Como ilustrado na Figura 4, a estrutura da E1 mutante é composta por oito fitas  $\beta$  organizadas em uma longa folha  $\beta$  central que constitui o núcleo da proteína, circundada por sete hélices  $\alpha$ , sendo uma parcialmente enterrada e as demais expostas ao solvente. Embora a mutação tenha provocado uma redução na atividade catalítica, a enzima mutante mantém a capacidade de atuar sobre o BHET. Essa propriedade é de particular

interesse, dado que intermediários como BHET e MHET são gerados durante a degradação do PET por PETases.

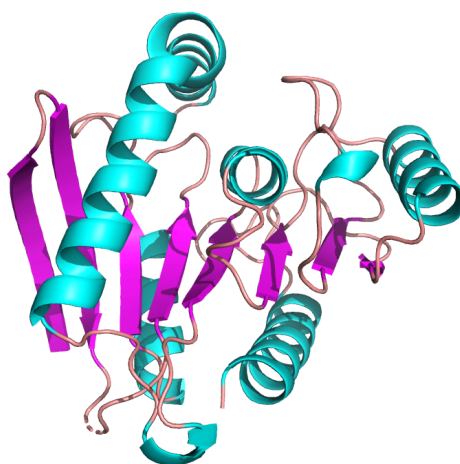


Fig 4. Representação tridimensional da enzima E1 mutante, evidenciando a manutenção da dobra típica de  $\alpha/\beta$ -hidrolase, em magenta temos as fitas  $\beta$  envoltas pelas hélices  $\alpha$  (ciano) e a alças em rosa claro. A estrutura global permanece conservada em relação à isoforma selvagem, demonstrando que a mutação pontual não comprometeu o enovelamento da proteína.

Análises complementares da cavidade catalítica da enzima revelaram aspectos estruturais relevantes para a compreensão de sua função e especificidade. A representação da cavidade utilizando superfície de volume (Figura 5) evidencia uma topologia bem definida, com formato alongado e ligeiramente afunilado na região correspondente ao sítio ativo, o que sugere uma acomodação favorável para moléculas lineares, como o BHET. A cavidade está envolvida por diversos resíduos polares e hidrofóbicos que contribuem para o reconhecimento e posicionamento do substrato.

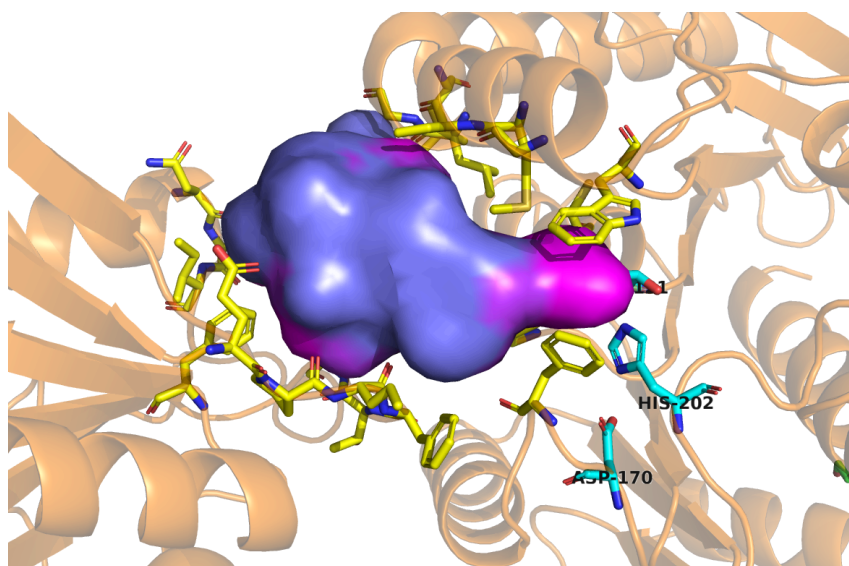




Fig 5. Caverna catalítica da enzima E1 mutante representada em superfície de volume, destacando sua forma alongada e afunilada, o sítio ativo está em ciano e os resíduos ao redor da caverna em rosa.

Além disso, a análise do potencial eletrostático (Figura 6) revelou uma distribuição de cargas que contribui para a compreensão do reconhecimento molecular do ligante. Observa-se que a região de entrada da caverna apresenta um potencial levemente negativo, enquanto o interior mantém uma predominância de zonas neutras, com ausência de áreas fortemente carregadas. Essa configuração favorece a entrada e o posicionamento de substratos neutros ou fracamente apolares, facilitando a orientação inicial da molécula no sítio ativo. A ausência de campos eletrostáticos intensos no interior da caverna sugere também um ambiente quimicamente permissivo, que não impõe barreiras eletrostáticas significativas à aproximação do substrato, compatível com a catálise de ésteres aromáticos, que dependem mais de interações hidrofóbicas e de reconhecimento estérico do que de complementaridade eletrostática.

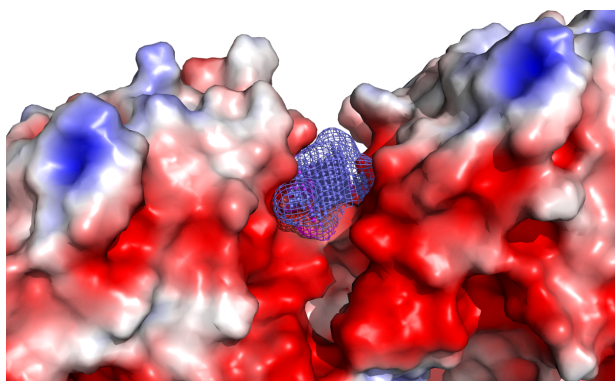


Fig 6. Potencial eletrostático da caverna da E1 mutante, com destaque para regiões de carga negativa em vermelho, positiva em azul e neutra em branco. A distribuição observada indica um ambiente favorável à entrada de substratos neutros ou levemente apolares.

A visualização tridimensional do sítio ativo, com destaque para a caverna, confirma que a substituição pontual não comprometeu significativamente a arquitetura catalítica. O sítio permanece acessível, com volume suficiente para acomodar o substrato, e a tríade catalítica (composta por Ser, Asp e His) mantém o posicionamento adequado para a catálise, sustentando a hipótese de que a redução da atividade está relacionada a outros fatores estruturais, mais sutis, como o reposicionamento de elementos periféricos ao núcleo catalítico. Entre esses fatores, destaca-se a presença de uma estrutura que atua como uma espécie de “tampa” parcial sobre a entrada da caverna catalítica, conforme evidenciado na Figura 7. Esta tampa é formada por resíduos como Trp 35, Met 77, Leu 147 e Phe 172, localizados em regiões de loop e hélices adjacentes ao sítio ativo. A natureza majoritariamente hidrofóbica e aromática desses resíduos sugere que a tampa

desempenha um papel crucial na modulação do acesso ao sítio catalítico, estabelecendo uma barreira estérica seletiva que condiciona a entrada e o correto posicionamento de substratos.

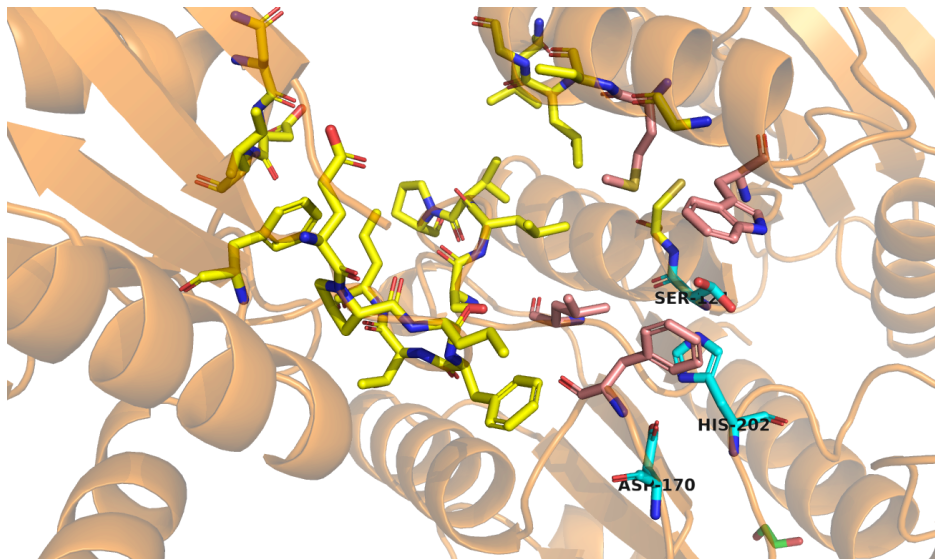


Fig 7. Visualização da entrada da cavidade catalítica da E1 mutante, evidenciando a estrutura tipo “tampa”, com destaque para os resíduos próximos (em rosa) ao sítio ativo formada pela Trp35, Met77, Leu147 e Phe172, que restringe parcialmente o acesso ao sítio ativo.

A presença dessa tampa pode desempenhar um papel determinante na modulação da atividade enzimática, influenciando tanto a especificidade quanto a eficiência catalítica. Por um lado, sua configuração pode restringir o acesso a determinados substratos, a presença de resíduos volumosos como Triptofano e Fenilalanina podem favorecer interações específicas de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com porções aromáticas, promovendo uma seletividade estrutural mais rigorosa. Por outro, a limitação física imposta pode também reduzir a taxa de entrada do PET no sítio ativo, o que explicaria, ao menos em parte, a redução observada na atividade hidrolítica da E1 mutante. Além disso, alterações na flexibilidade ou dinâmica dessa tampa, potencialmente afetadas pela mutação, podem impactar o equilíbrio entre estados conformacionais abertos e fechados da enzima, interferindo diretamente no seu desempenho catalítico.

### 3.2 W3

A resolução estrutural da W3 foi viabilizada por meio de cristais obtidos na condição G4a do kit JCSG<sup>TM</sup>, composta por 20% (w/v) polietilenoglicol 2.000, 0,1 M Tris (pH 8,5) e 0,2 M N-óxido de trimetilamina. A proteína cristalizou no sistema ortorrômbico, grupo espacial  $P2_12_12_1$ , com parâmetros de célula unitária de 57,504 Å, 86,874 Å e 99,538 Å. O modelo resultante é um

dímero, com 249 resíduos de aminoácidos por cadeia. Os dados brutos indicaram resolução de 1,30 Å, que foi ajustada para 1,50 Å após reprocessamento, considerando os mesmos critérios de qualidade já descritos. O refinamento apresentou valores de R-work e R-free de 16,62% e 18,69%, respectivamente, e 97,57% dos resíduos localizados em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran.

Apesar da identidade de sequência moderada com a proteína utilizada para substituição molecular, uma lipase recentemente caracterizada (~33%, PDB ID: 8B9S), observou-se uma conservação significativa no enovelamento global entre as duas estruturas, com um RMSD de 1,016 Å, o qual permitiu extrapolar informações funcionais a partir da proteína modelo. A 8B9S é uma lipase, cuja atividade hidrolítica depende de uma tríade catalítica do tipo Glu43–Ser113–Tyr154 e de um túnel hidrofóbico formado por um domínio de tampa mínimo com topologia  $\alpha$ -hélice- $\beta$ -grampo- $\alpha$ -hélice (HBH). Na estrutura da W3, os resíduos equivalentes à tríade da 8B9S são Val44–Ser113–Tyr150 (figura 8).

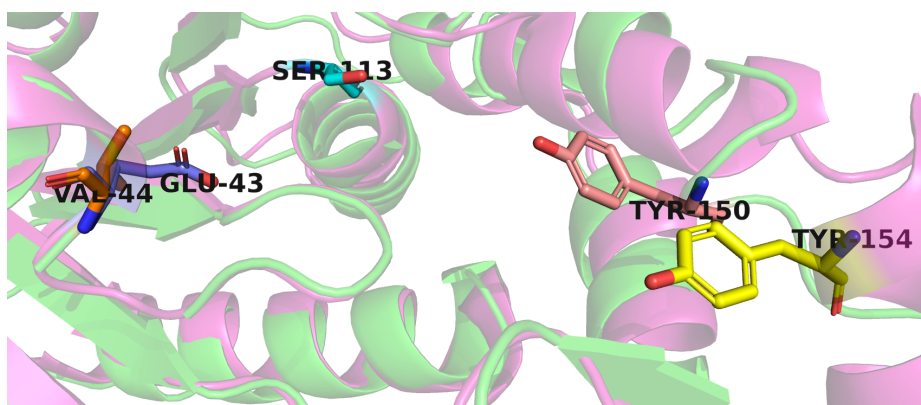


Fig 8. Comparação da tríade catalítica entre a proteína W3 (verde) e a lipase modelo 8B9S (magenta). Os resíduos da tríade catalítica estão representados como bastões: Glu43, Ser113 e Tyr154 na 8B9S; Val44, Ser113 e Tyr150 na W3. Observa-se que, apesar das substituições de resíduos entre as proteínas, os resíduos homólogos ocupam posições espaciais semelhantes na estrutura tridimensional, sugerindo conservação parcial da arquitetura catalítica.

Embora a serina catalítica esteja conservada tanto em identidade quanto em posição espacial, as substituições de Glu por Val e a leve mudança de posição da tirosina sugerem modificações no mecanismo catalítico de hidrólise da W3, possivelmente menos dependente de uma rede clássica de transferência de prótons e mais ajustado à clivagem de ésteres curtos, como o BHET, um intermediário da degradação de PET. A valina, por ser um resíduo apolar e estrutural, não participa da catálise, ao contrário do glutamato, ácido presente na 8B9S, uma vez que ela atua sobre substratos lipídicos.

Outro aspecto relevante é a presença de ligantes cristalizados nas duas estruturas. A proteína modelo 8B9S apresenta um monoacilglicerol C18 endógeno posicionado diretamente no sítio ativo, o que permitiu sua caracterização funcional como lipase. Já a proteína W3 apresenta um ligante quimicamente distinto e localizado distante da tríade catalítica, com uma estrutura aromática simples com uma carbonila e um enxofre, provavelmente um solvente orgânico ou composto cristalizante, conforme observado em visualizações estruturais (figura 9).

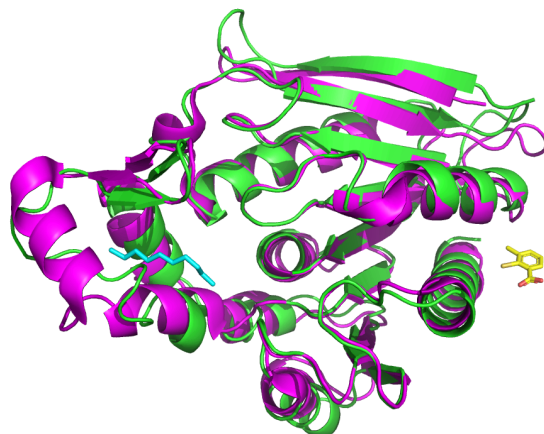


Fig 9. Comparação estrutural entre a proteína modelo, representada em magenta (PDB: 8B9S), e a proteína de estudo W3, em verde. Os ligantes das respectivas proteínas estão mostrados em ciano, próximos ao sítio catalítico, e em amarelo à direita da representação.

A análise estrutural do sítio ativo por meio de visualizações de superfície revelou uma cavidade bem definida e topologicamente organizada, com morfologia afunilada e continuidade com o interior da proteína, sugerindo ser um verdadeiro canal catalítico (figura 10). Essa cavidade acomoda de forma eficiente os resíduos da tríade catalítica proposta (Val44–Ser113–Tyr150), indicando que sua geometria e acessibilidade são compatíveis com o reconhecimento e processamento de substratos.

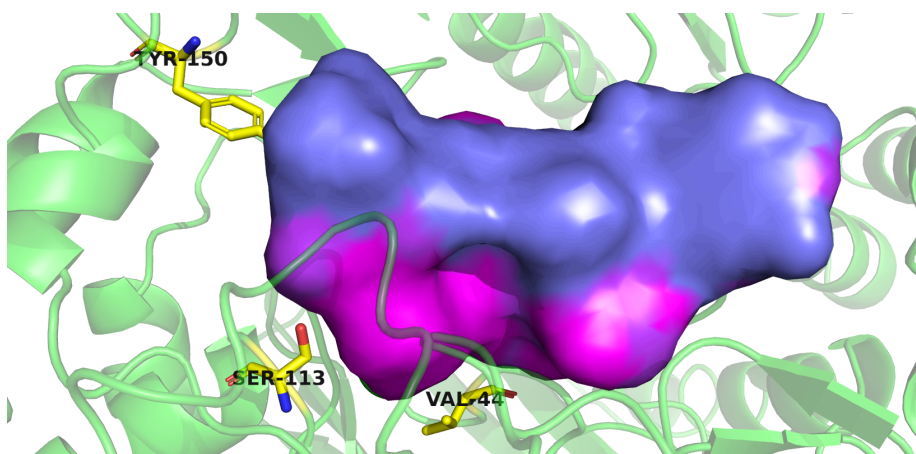


Fig 10. Visualização da cavidade catalítica da W3. A tríade catalítica proposta (Val44–Ser113–Tyr150) está localizada na base da cavidade e destacadas em amarelo. A morfologia da cavidade e sua acessibilidade sugerem função enzimática, potencialmente adaptada para atuar sobre ésteres aromáticos como o BHET.

Além da geometria, a caracterização eletrostática da superfície da proteína revelou uma distribuição de cargas altamente assimétrica, com uma região fortemente negativa coincidindo com a cavidade ativa (figura 11). Essa característica sugere uma função eletrostática no direcionamento e estabilização de ligantes polares ou parcialmente carregados, como é o caso de intermediários da degradação do PET. A presença desse espaço eletro-negativo pode favorecer a estabilização do estado de transição durante a hidrólise de ésteres, além de facilitar a entrada de moléculas hidrossolúveis por atração eletrostática. A região em torno da serina catalítica, por exemplo, apresenta um potencial negativo acentuado, que pode atuar juntamente a polaridade da carbonila do substrato, favorecendo a ativação nucleofílica do grupo hidroxila da serina.

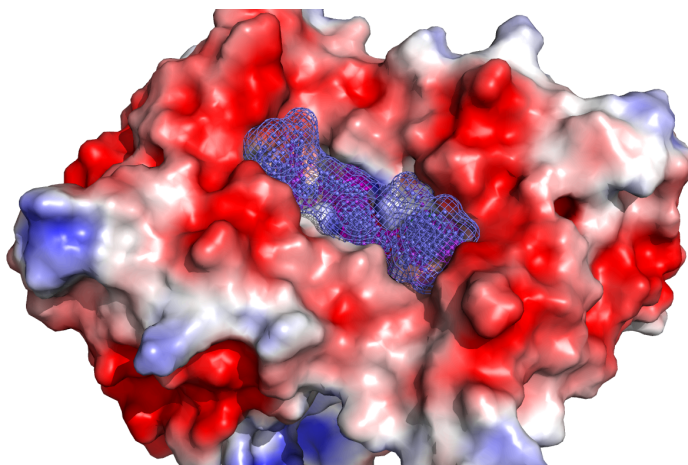


Fig 11. Representação do potencial eletrostático da superfície da proteína W3. A cavidade ativa está situada em uma depressão negativa, indicando possível função no reconhecimento de substratos polares ou parcialmente carregados.

A análise combinada do potencial eletrostático e da cavidade indica um possível mecanismo de reconhecimento molecular direcionado, enquanto a cavidade oferece seletividade espacial e compatibilidade estrutural, o campo eletrostático oferece especificidade adicional, facilitando o acoplamento de ligantes compatíveis com esse perfil. Isso pode representar uma adaptação da W3 para interagir com substratos sintéticos, como os derivados do PET, que apresentam grupos aromáticos e polares simultaneamente, hipótese reforçada pela ausência de um domínio de tampa clássico, o que sugere um acesso mais exposto e constante ao sítio ativo.



### 3.3 E3

A estrutura da proteína E3 foi elucidada a partir dos cristais gerados na condição H8b do kit Morpheus I®, contendo 12,5% (w/v) PEG 1000, 12,5% (w/v) PEG 3350, 12,5% (v/v) de uma mistura de aminoácidos (0,02 M MPD) e 0,1 M MOPS/HEPES-Na (pH 7,5). A proteína apresentou simetria monoclinica, grupo espacial P12<sub>1</sub>1, com parâmetros de célula unitária de 69,04 Å, 51,988 Å e 83,912 Å, formando um dímero com 282 resíduos por cadeia. Os dados de difração permitiram a construção de um modelo estrutural com resolução de 1,78 Å. Nas estatísticas de refinamento, valores de R-work e R-free de 22,28% e 24,35% foram alcançados, respectivamente. A validação estereoquímica revelou que 96,87% dos resíduos também estão em regiões favorecidas do diagrama de Ramachandran.

A enzima revela uma dobradura típica da superfamília das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, composta por um núcleo central formado por uma folha  $\beta$  torcida de oito fitas, predominantemente paralelas, intercaladas por hélices  $\alpha$  que formam três motivos clássicos do tipo  $\beta\alpha\beta$ . Essa organização estrutural suporta o arranjo funcional do sítio ativo, posicionado nas extremidades C-terminais das fitas  $\beta$  centrais, característica recorrente em hidrolases dessa classe.

A tríade catalítica da E3 é composta por Ser126, Asp219 e His248, posicionada de maneira equivalente aos resíduos catalíticos da proteína modelo 7Z2U (Ser114, Asp206, His233), uma esterase de ácido ferúlico, como é destacado na figura 12. Esses resíduos estão organizados de forma compatível com o mecanismo clássico das serina-hidrolases, no qual a serina atua como nucleófilo, estabilizada por interações com o histidina e o aspartato. A conservação dessa arquitetura sugere que a E3 mantém a função hidrolítica típica do grupo.

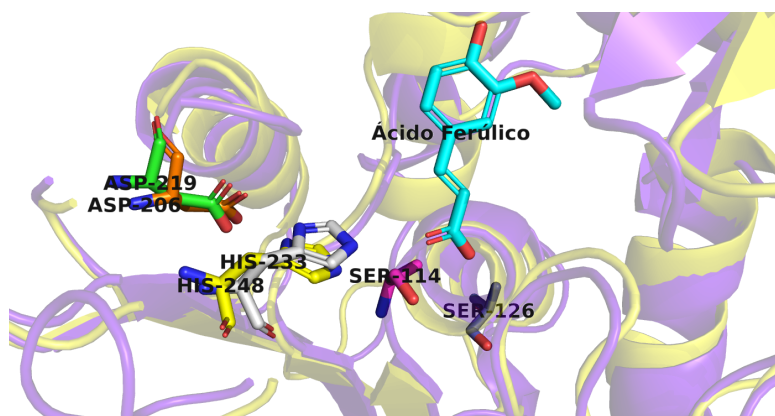


Fig 12. Comparação entre os sítios ativos da proteína E3 e da proteína modelo 7Z2U destacando os resíduos da tríade catalítica e, no caso da esterase, o ácido ferúlico presente no sítio ativo. A disposição espacial dos resíduos catalíticos é

altamente conservada, mas a ausência de ligante em E3 evidencia diferenças relevantes que poderão ser melhor exploradas em análises funcionais subsequentes.

A comparação estrutural entre a proteína e seu modelo revela um RMSD de 1,368 Å, indicando similaridade no enovelamento global, especialmente no núcleo  $\alpha/\beta$  hidrolase (Figura 13). Apesar dessa conservação, são observadas particularidades importantes na E3, principalmente na região do sítio ativo. Notam-se variações conformacionais nas alças que o circundam, além da presença de um domínio adicional entre a fita  $\beta 5$  e a hélice  $\alpha 5$ , formando uma estrutura do tipo “tampa”. Essa região, presente também na 7Z2U, está envolvida na modulação do acesso ao sítio catalítico.

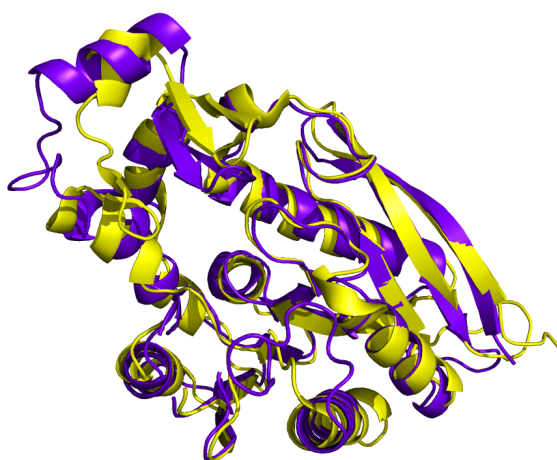


Fig 13. Sobreposição estrutural entre a proteína E3 (roxo) e a esterase de ácido ferúlico 7Z2U (amarelo). A imagem evidencia a conservação do núcleo da dobradura tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolase, especialmente nas regiões centrais de fitas  $\beta$  e hélices  $\alpha$ .

Do ponto de vista funcional, essas particularidades estruturais são compatíveis com a atividade descrita da E3 como uma BHETase. A presença de um sítio ativo mais aberto, em conjunto com possíveis rearranjos conformacionais na “tampa”, pode facilitar a entrada e o posicionamento do BHET, um diéster aromático de maiores dimensões. Além disso, a ausência de ácido ferúlico na estrutura, em contraste com a 7Z2U, onde esse ligante estabiliza a conformação ativa, reforça a hipótese de baixa afinidade por esse tipo de composto e uma especialização funcional voltada à hidrólise de substratos distintos. A substituição de resíduos vizinhos à tríade catalítica pode ainda alterar o microambiente local, modulando propriedades como polaridade e volume, com impacto direto na especificidade do substrato.

Complementando essas observações, a análise da superfície molecular da E3 evidencia uma cavidade catalítica proeminente, com geometria alongada e profundidade considerável,

características compatíveis com a acomodação de substratos volumosos como o BHET (Figura 14). Essa cavidade é delimitada por resíduos polares e aromáticos, que contribuem para interações hidrofóbicas e empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com o anel aromático do BHET. A modelagem de malha da superfície revela uma topografia irregular, com zonas internas mais estreitas e profundas, sugerindo um canal que guia o substrato até a tríade catalítica, e regiões externas mais acessíveis ao solvente, compatíveis com o início do reconhecimento molecular.

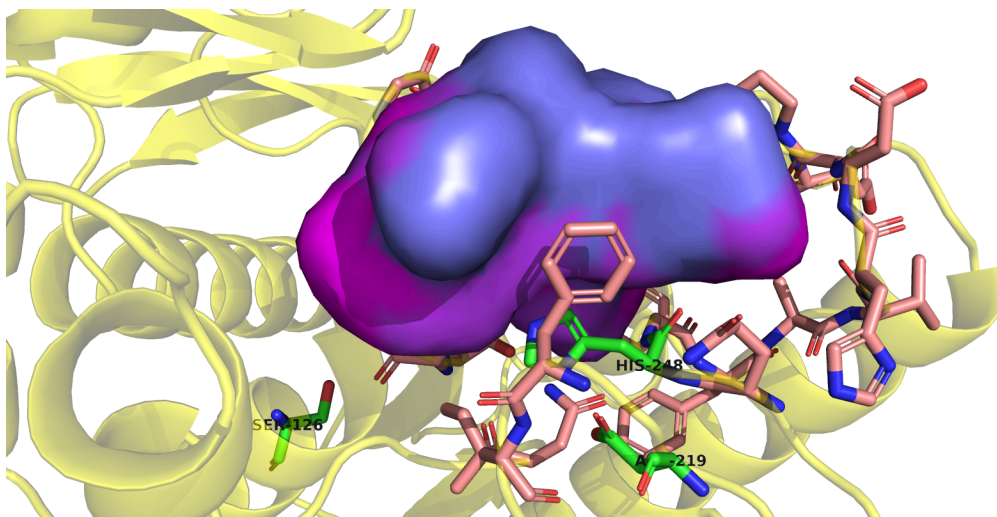


Fig 14. Representação tridimensional da cavidade ativa da E3 (malha roxa/rosa), inserida na estrutura da proteína com seus resíduos do sítio ativo destacados em verde. A cavidade apresenta um perfil alongado e profundo, cercado por resíduos catalíticos e aromáticos, sugerindo compatibilidade com substratos volumosos como o BHET.

A distribuição do potencial eletrostático na superfície da E3 também fornece informações importantes sobre a especificidade do sítio ativo (Figura 15).

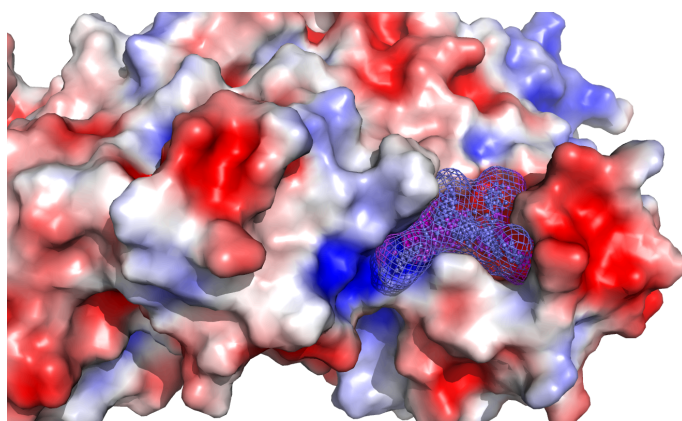


Fig 15. Mapeamento do potencial eletrostático da superfície molecular da E3. A cavidade ativa, destacada em malha roxa, está situada em uma região predominantemente negativa, favorecendo a entrada de substratos neutros ou levemente catiônicos.



Observa-se um predomínio de cargas negativas na entrada da cavidade, formando um ambiente desfavorável à entrada de moléculas altamente aniônicas, mas potencialmente atrativo para regiões polares ou levemente catiônicas do BHET. A porção interna da cavidade apresenta zonas neutras e hidrofóbicas, o que sugere que, uma vez orientado corretamente, o substrato pode interagir de forma estável com o entorno catalítico, favorecendo a catálise.

#### 4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural inédita de três enzimas termofílicas potencialmente envolvidas na biodegradação de plásticos: a E1 mutante, E3 e W3. A determinação e análise de suas estruturas tridimensionais permitiram identificar elementos centrais típicos da superfamília das  $\alpha/\beta$ -hidrolases, como o dobramento característico e a presença da região tipo “tampa”, além de revelar variações relevantes na composição e organização do sítio catalítico. Observou-se que modificações, mesmo sutis, nos resíduos ativos ou em suas posições podem impactar significativamente a atividade catalítica, influenciando a especificidade e a eficiência enzimática frente a substratos derivados do PET. Essas enzimas demonstraram potencial como BHETases, atuando sobre um intermediário crucial na degradação do PET, o que as torna promissoras para aplicações biotecnológicas.

As diferenças estruturais identificadas entre as três enzimas ilustram distintos graus de adaptação funcional, reforçando a importância das análises comparativas para a compreensão dos mecanismos moleculares que regem a biodegradação de plásticos. Nesse contexto, sugere-se a realização de mutações dirigidas, especialmente nas regiões adjacentes ao sítio ativo e na estrutura tipo “tampa”, com o objetivo de investigar sistematicamente os efeitos sobre a flexibilidade conformacional, a acessibilidade ao substrato e a eficiência catalítica. Tais abordagens poderão não apenas ampliar a compreensão dos determinantes estruturais da atividade enzimática, mas também possibilitar o desenvolvimento de variantes otimizadas, com maior potencial para aplicações em biotecnologia ambiental, contribuindo de forma efetiva para a mitigação da poluição plástica.

## 5. REFERÊNCIAS

1. WORM, B. et al. Plastic as a persistent marine pollutant. *Annual review of environment and resources*, v. 42, n. 1, p. 1–26, 2017.
2. GAO, R.; PAN, H.; LIAN, J. Recent advances in the discovery, characterization, and engineering of poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolases. *Enzyme and microbial technology*, v. 150, n. 109868, p. 109868, 2021.
3. BURGİN, T. et al. The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme. *Communications chemistry*, v. 7, n. 1, p. 65, 2024.
4. YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science (New York, N.Y.)*, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 2016.
5. BAUER, T. L.; BUCHHOLZ, P. C. F.; PLEISS, J. The modular structure of  $\alpha/\beta$ -hydrolases. *The FEBS journal*, v. 287, n. 5, p. 1035–1053, 2020.
6. AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 19, p. E4350–E4357, 2018.
7. PATHAK, D.; ASHLEY, G.; OLLIS, D. Thiol protease-like active site found in the enzyme diene lactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. *Proteins*, v. 9, n. 4, p. 267–279, 1991.
8. MÜLLER, R.-J. et al. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular rapid communications*, v. 26, n. 17, p. 1400–1405, 2005.
9. HAN, X. et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 2106, 2017.
10. CHEN, C.-C. et al. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS journal*, v. 285, n. 20, p. 3717–3723, 2018.
11. NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, v. 9, n. 6, p. 732–737, 1999.
12. ALMEIDA, D. V. et al. Unveiling the crystal structure of thermostable diene lactone hydrolase exhibiting activity on terephthalate esters. *Enzyme and microbial technology*, v. 180, n. 110498, p. 110498, 2024.
13. YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science (New York, N.Y.)*, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 2016.
14. BIJELIC, A.; ROMPEL, A. Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*, v. 4, n. 3, p. 10, 2018.