

GABRIEL STEPHANI DE OLIVEIRA

**Clonagem e caracterização da enzima
epóxido hidrolase de *Trichoderma reesei***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2018

GABRIEL STEPHANI DE OLIVEIRA

**Clonagem e caracterização da enzima epóxido
hidrolase de *Trichoderma reesei***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação

RESUMO

DE OLIVEIRA, G.S. **Clonagem e caracterização da enzima epóxido hidrolase de *Trichoderma reesei*. 2018. 119 f.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Epóxido hidrolases (EHs) são enzimas que catalisam a hidrólise de epóxidos a seus correspondentes dióis, apresentam potencial aplicação biotecnológica (separação de enantiômeros na produção de fármacos), estão envolvidas no metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados e inibidores de EHs estão sendo estudados para possível utilização no tratamento de doenças. Uma enzima epóxido hidrolase (TrEH) do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* QM9414 foi clonada, expressa, purificada e caracterizada funcionalmente e estruturalmente. A atividade de TrEH foi determinada com o substrato óxido de estireno (racêmico), demonstrando maior atividade nas temperaturas de 23 a 50 °C, no pH 7,2 a 37 °C, e as constantes catalíticas $K_m = 4,6$ mM e $k_{cat} = 336$ s⁻¹. A enzima recombinante mostrou ser enantiosseletiva, pois hidrolisa preferencialmente (S)-(-)-óxido de estireno, (R)-(-)-epicloridrina e (S)-(-)-1,2-epoxibutano. Moléculas inibidoras da atividade de TrEH foram identificadas e algumas delas inibem até 60% o crescimento de *T. reesei*. A estrutura terciária de TrEH (1,7 Å) foi determinada por cristalografia, apresenta dobramento α/β -hidrolase e não tem alta homologia com nenhuma outra estrutura de EH. TrEH é uma nova enzima epóxido hidrolase solúvel cujas propriedades mostram seu potencial de utilização em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Enantiosseletividade. Époxido hidrolase. Fungo. Inibidor. *Trichoderma reesei*.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, G.S. **Cloning and characterization of the enzyme epoxide hydrolase of the *Trichoderma reesei*. 2018. 119 p.** Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Epoxide hydrolases (EHs) are enzymes that catalyze the hydrolysis of epoxides to their corresponding diols, present a potential biotechnological application (separation of enantiomers for the production of drugs), they are involved in the metabolism of polyunsaturated fatty acids and EH inhibitors are being studied for possible use in the treatment of diseases. An epoxide hydrolase enzyme (TrEH) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM9414 was cloned, expressed, purified and functionally and structurally characterized. The activity of TrEH was determined with the substrate styrene oxide (racemic), showing higher activity at temperatures of 23 to 50 °C, at pH 7.2 at 37 °C, and the catalytic constants $K_m = 4.6$ mM and $k_{cat} = 336$ s⁻¹. The recombinant enzyme has been shown to be enantioselective, because it preferably hydrolyzes (S)-(-)-styrene oxide, (R)-(-)-epichlorohydrin and (S)-(-)-1,2-epoxybutane. TrEH inhibitors have been identified and some of them inhibit up to 60% growth of *T. reesei*. The tertiary structure of TrEH (1.7 Å) was determined by crystallography, showing α/β -hydrolase folding and low homology with any other EH structure. TrEH is a new soluble epoxide hydrolase enzyme whose properties show its potential for use in biotechnological applications.

Keywords: Enantioselectivity. Epoxide hydrolase. Fungus. Inhibitor. *Trichoderma reesei*

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a estudar, elaborar e aprimorar modelos de produção menos poluidores e com o foco na preservação do meio ambiente. Pode-se citar, como exemplo, os estudos que visam à utilização de biocatalisadores; isto é, enzimas que catalisam reações em larga escala, pois estas possuem diversas vantagens em relação ao uso de catalisadores químicos, dentre elas: catalise de compostos em temperaturas inferiores a 100 °C, pH próximos do neutro, atividade específica sobre o substrato (VOET; VOET; PRATT, 2000) e redução da produção de poluentes ambientais (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Todas essas vantagens trazem impactos econômicos positivos, principalmente por reduzirem os gastos com o tratamento de resíduos, a descontaminação e o pagamento de indenizações (PRADO, 2003).

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam e são divididas em seis classes principais de acordo com a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB):

- EC 1 Oxidorredutases: reações de óxido-redução.
- EC 2 Transferases: reações de transferência de grupos funcionais.
- EC 3 Hidrolases: reações de hidrólise.
- EC 4 Liases: reações de eliminação de grupos para formar ligações duplas.
- EC 5 Isomerases: reações de isomerização.
- EC 6 Ligases: reações de formação de ligação acoplada à hidrólise de ATP.

Todas essas reações podem ser utilizadas em diferentes setores econômicos, o que aumenta o interesse no estudo destas moléculas.

O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular (incluindo DNA recombinante, engenharia de proteínas e evolução dirigida) somado ao uso de culturas com cepas selecionadas permitiu o aperfeiçoamento da produção de enzimas (até mesmo em larga escala) para aplicações biotecnológicas em diversos setores econômicos. Exemplos desse desenvolvimento são: o uso de amilases, catalases e lacases na indústria têxtil; o uso de proteases, lactases, lipases e transglutaminases na indústria alimentícia; e o uso de protease, amilase, lipase e celulase na indústria de detergentes (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Dessa forma, estudos envolvendo a caracterização de novas enzimas e/ou o aumento da eficiência de enzimas conhecidas são fundamentais para o desenvolvimento de novas

tecnologias que tenham menor custo e gerem menos impacto ambiental. Nesse aspecto, as enzimas da família das epóxido hidrolases apresentam propriedades interessantes para aplicação em diversos setores e, por isso, são o principal tema deste trabalho.

1.1 Enzimas epóxido hidrolases

Epóxidos são moléculas que contém, no mínimo, um éter cíclico com três membros (dois carbonos e um oxigênio), que é altamente reativo devido às ligações polarizadas de oxigênio-carbono. Alguns epóxidos são responsáveis por reações com alvos biológicos, como DNA e proteínas, tornando-os possíveis agentes mutagênicos e carcinogênicos (SZELIGA; DIPPLE, 1998).

As epóxido hidrolases (EHs) são enzimas que têm como função catalisar a hidrólise de epóxidos a seus correspondentes dióis vicinais (moléculas com dois grupos hidroxila ligados a carbonos vizinhos) (ARAND et al., 2005; HOPMANN; HIMO, 2006) (figura 1).

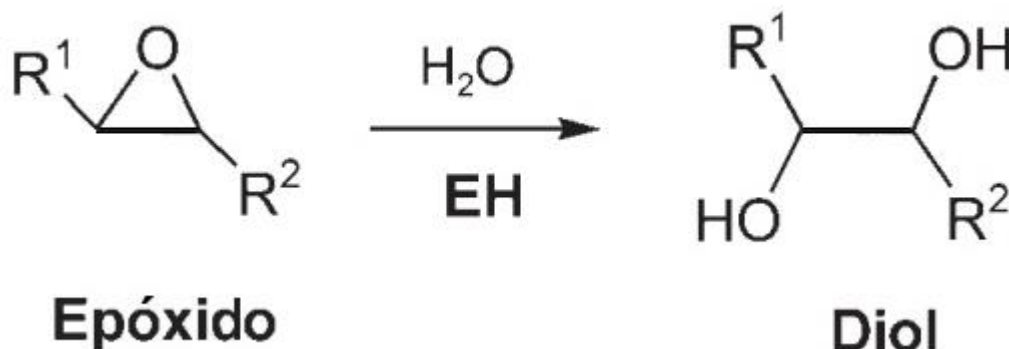


Figura 1. Reação das enzimas epóxido hidrolases. Representação da reação de hidrólise que abre o éter cíclico (epóxido) e forma o correspondente produto diol vicinal (molécula com dois grupos hidroxila ligados a carbonos vizinhos) (adaptado de Hopmann e Himo, 2006). EH: Enzima Epóxido Hidrolase.

Estruturalmente, as EHs são classificadas em duas famílias: as EHs com dobramento α/β hidrolase e as Limoneno epóxido hidrolases (LEHs).

1) EHs com dobramento α/β hidrolase: As EHs α/β hidrolase podem ser ainda classificadas em: epóxido hidrolases solúveis (sEHs, EC 3.3.2.10) e em epóxido hidrolases microsossomais (mEHs, EC 3.3.2.9), pois estão localizadas no citoplasma ou nas membranas (predominantemente nos retículos endoplasmáticos), respectivamente (SAITO et al., 2001). Tanto as sEHs quanto as mEHs apresentam o mesmo dobramento constituído por dois domínios: o domínio da hidrolase, composto por uma folha β central, muito conservada e cercada por α -hélices e um domínio menos conservado chamado de cap, que está posicionado

no topo da cavidade catalítica e geralmente é formado por α -hélices (NARDINI et al., 1999) (figura 2). O sítio ativo dessas EHs possui cinco aminoácidos participantes do mecanismo catalítico, que são dois aspartatos, duas tirosinas e uma histidina (ARGIRIADI et al., 1999). Diversos membros dessa família de enzimas já possuem sua estrutura tridimensional caracterizada em diferentes espécies, como *Aspergillus niger* (PDB: 1QO7) (ZOU et al., 2000), *Agrobacterium radiobacter* (PDB: 1EHY) (NARDINI et al., 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2E3J) (BISWAL et al., 2008), *Solanum tuberosum* (PDB: 2CJP) (MOWBRAY et al., 2006) e *Homo sapiens* (PDB: 1S8O) (GOMEZ et al., 2004).

2) Limoneno epóxido hidrolase (LEHs, EC 3.3.2.8): Essas enzimas são chamadas dessa forma, pois o primeiro membro a ter sua estrutura tridimensional determinada foi a enzima LEH de *Rhodococcus erythropolis* DCL14 (PDB: 1NWW) (ARAND et al., 2003), que catalisa a reação de hidrólise de limoneno-1,2-epóxido a limoneno-1,2-diol (BARBIRATO et al., 1998; VAN DER WERF; OVERKAMP; BONT, 1998; ARAND et al., 2003). Em geral, essa classe de EHs tem apenas o domínio hidrolase constituído por três α -hélices e seis folhas β em formato de um cone e o sítio ativo, formado por dois aspartatos e uma arginina, localizado no ponto mais profundo (ARAND et al., 2003). Diferentemente das EHs α/β hidrolases, a catálise de LEHs envolve um mecanismo de apenas uma etapa e sem a formação de intermediários de enzima ligados covalentemente ao substrato (ARAND et al., 2003). Embora o primeiro membro dessa família tenha sido encontrado em *R. erythropolis*, já foram caracterizadas estruturas de algumas LEHs de diferentes organismos, incluindo aqueles encontrados em *M. tuberculosis* (PDB: 2BNG) (JOHANSSON et al., 2005) e outras envolvidas na biossíntese de antibióticos, como as LEHs de *Streptomyces lasaliensis* (PDB: 3RGA) (HOTTA et al., 2012) e *Streptomyces cinnamomensis* (PDB: 3WMD) (MINAMI et al., 2013).

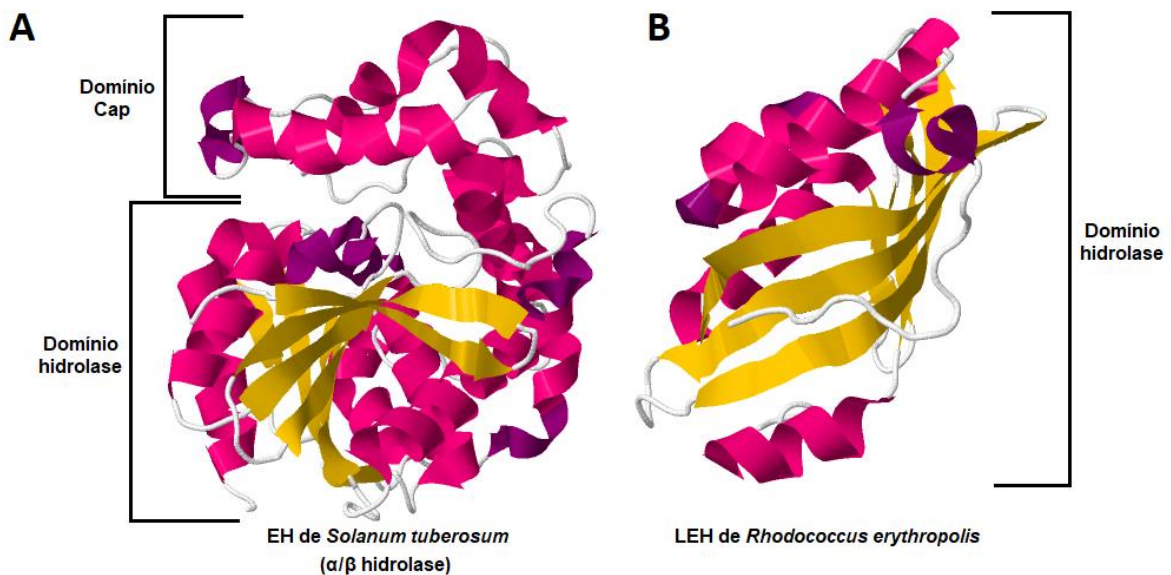


Figura 2. Estruturas tridimensionais de enzimas EH com dobramento α/β hidrolase e Limoneno epóxido hidrolase (LEHs). (A) Estrutura da enzima com dobramento α/β hidrolase de *Solanum tuberosum* (batata, PDB ID: 2cjp), (B) Estrutura da enzima LEH de *Rhodococcus erythropolis* (PDB: 1NWW). Os domínios cap e hidrolase estão destacados (WIDERSTEN; GURELL; LINDBERG, 2010; ARAND et al., 2003).

O mecanismo de ação das enzimas EHs com dobramento α/β hidrolase envolve a polarização do substrato epóxido por dois resíduos de tirosina (ligações dos hidrogênios com o átomo de oxigênio do epóxido), para o ataque nucleofílico do aspartato em um dos dois carbonos do epóxido (geralmente, o carbono com menor impedimento estereoquímico), o que produz a abertura do anel epóxido e a formação de um éster intermediário (enzima-substrato). O ciclo catalítico é, posteriormente, finalizado com a hidrólise do éster intermediário, facilitada por uma histidina e um aspartato, para que ocorra a formação e liberação do produto diol (HOPMANN; HIMO, 2006; LEE; SHULER, 2007; WIDERSTEN; GURELL; LINDBERGEL, 2010; NESTL et al., 2014) (figura 3).

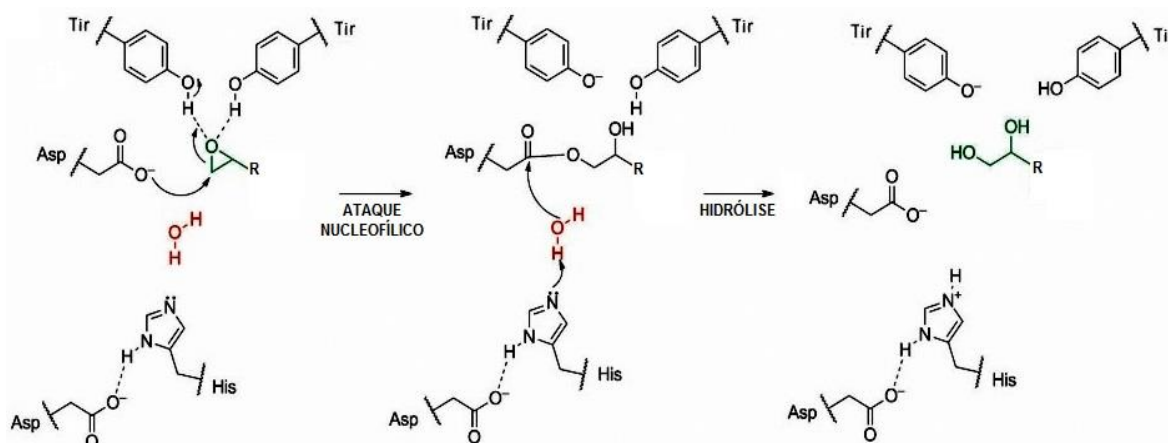


Figura 3. Mecanismo catalítico da enzima epóxido hidrolase. No primeiro passo, ocorre o ataque nucleofílico do aspartato (Asp) a um dos carbonos do epóxido, que conduz à abertura do anel e à formação do éster intermediário (enzima-substrato). No segundo passo, o intermediário é hidrolisado com a adição de uma molécula de água e, conseqüentemente, ocorre a formação e liberação do produto diol. As tirosinas (Tir) têm a função de polarizar o epóxido para facilitar o ataque nucleofílico pelo aspartato e formar o primeiro grupo hidroxila com o átomo de oxigênio do epóxido (adaptado de Nestl et al., 2014).

A primeira epóxido hidrolase caracterizada foi a microsossomal de porquinho da índia (*Cavia porcellus*) (OESCH; JERINA; DALY, 1971) e as epóxido hidrolases solúveis foram primeiramente caracterizadas em camundongos (HAMMOCK et al., 1976). Em mamíferos, as EHs têm três funções principais: degradação de xenobióticos, catabolismo e regulação de moléculas de sinalização de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (MORISSEAU; HAMMOCK, 2005; MORISSEAU; HAMMOCK, 2013).

As EHs também estão presentes em outros organismos como, por exemplo, na membrana de células de insetos, como *Bombyx mori* (bicho da seda), envolvida na degradação do hormônio juvenil, que regula o crescimento e desenvolvimento de insetos (ZHANG et al., 2005) e, em plantas, como: *Solanum tuberosum* (batata), que estão relacionadas à síntese de um composto de defesa antifúngica (STAPLETON et al., 1994).

As enzimas EHs de bactérias e fungos têm se destacado em estudos recentes, pois participam das vias do metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), uma característica importante para possível utilização em processos de biorremediação (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; HARITASH; KAUSHIK, 2009). A enzima EH do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, por exemplo, demonstrou atividade de degradação de hidrocarboneto aromático policíclico em reator biológico rotativo (ZHENG; OBBARD, 2002). Além disso, enzimas EHs podem ser utilizadas em processos de síntese de compostos (ver item 1.2), principalmente devido à sua enantiosseletividade e regioseletividade, o que as torna candidatas a serem utilizadas na preparação de epóxidos e dióis enantiopuros, de forma

econômica e ambientalmente correta (CARLSSON et al., 2012; LEE; SHULER, 2007; WIDERSTEN et al., 2010).

Dessa forma, as enzimas EHs demonstram grande potencial biotecnológico de aplicação em processos biotecnológicos, justificando o esforço para a caracterização dessas proteínas em organismos ainda não estudados, a fim de aprofundar o entendimento de suas características e aperfeiçoar seus usos.

1.2 Epóxido hidrolase e indústria: atividade enantiosseletiva e regiosseletiva

Isômeros são moléculas com diferenças estruturais (diferentes arranjos entre os átomos), mas com a mesma forma molecular. Esses compostos podem ser divididos em: isômeros constitucionais, que têm seus átomos ligados em ordens diferentes e estereoisômeros, que se diferem apenas na disposição de seus átomos no espaço (SOLOMONS, 1996).

Enantiômeros são estereoisômeros, cujas moléculas podem ser representadas como a imagem especular uma da outra, mas que não são superponíveis (figura 4). Essa característica só ocorre em compostos quirais, ou seja, aqueles que apresentam um ou mais átomos de carbono que se ligam a quatro ligantes diferentes. Os enantiômeros têm propriedades físicas e químicas idênticas, como, por exemplo: ponto de fusão, ponto de ebulição e espectro de absorção do infravermelho; porém, podem apresentar atividade biológica diferente e também comportamento distinto frente a um plano de luz polarizado, pois cada um dos enantiômeros causará o mesmo desvio angular no plano de polarização, mas em sentidos opostos (SOLOMONS, 1996).

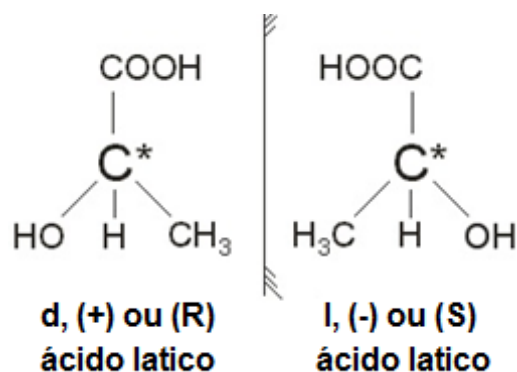


Figura 4. Representação dos enantiômeros do ácido láctico e possíveis nomenclaturas das moléculas. O carbono quiral é destacado com “*”.

Os enantiômeros podem ser classificados de acordo com dois principais sistemas de nomenclatura: o primeiro é baseado no sentido em que os enantiômeros giram o plano de luz

polarizado. Quando giram no sentido horário, recebem o nome de destrógiro e têm o prefixo “(+)” ou “d”; já quando giram no sentido anti-horário, recebem o nome de levógiro e têm o prefixo “(-)” ou “l”. O segundo sistema de nomenclatura é chamado de Cahn-Ingold-Prelog e fornece informações sobre a configuração absoluta dos enantiômeros, pois considera a massa molar dos ligantes do carbono quiral. Nesse sistema, são chamados *rectus* (R) e *sinister* (S), palavras latinas que significam direito e esquerdo, respectivamente. Existem algumas regras para nomeação dos compostos, mas, em termos gerais, leva-se em conta a ordem decrescente de peso molar dos ligantes e, quando essa ordem está no sentido horário, a molécula recebe o prefixo “(R)”. Já quando está no sentido anti-horário, a molécula recebe o prefixo “(S)” (SOLOMONS, 1996). Compostos que apresentam mistura dos dois enantiômeros são denominados compostos racêmicos e enantiopuros são compostos com apenas um enantiômero.

A separação dos enantiômeros presentes nos compostos racêmicos é largamente utilizada pela indústria farmacêutica para a produção de fármacos enantiopuros e químicos finos (ZHANG et al., 2012), já que, quando os fármacos apresentam enantiômeros com atividades biológicas diferentes, sendo um deles tóxico aos organismos vivos, o uso terapêutico da mistura racêmica fica inviável. Pode-se citar, como exemplo clássico da necessidade de separação dos enantiômeros, o caso do fármaco Talidomida, que era vendido na forma racêmica (50% (S)-talidomida/50% (R)-talidomida) como sedativo para gestantes. A molécula (R)-talidomida não causa efeitos adversos em humanos, porém a molécula (S)-talidomida causou um grande número de malformações e morte de fetos, devido às suas propriedades teratogênicas (OLIVEIRA; BERMUDEZ; SOUZA, 1999). Esses danos poderiam ter sido evitados com a separação dos enantiômeros e a comercialização apenas da molécula (R)-talidomida.

As atividades enantiosseletiva e regioseletiva das enzimas EHs permitem que a enzima ataque, com maior eficiência, um dos enantiômeros (figura 5A) e um dos dois carbonos do grupo epóxido (figura 5B), respectivamente. Essas características são interessantes para a Química Orgânica Sintética, pois favorecem a preparação de epóxidos e dióis enantiopuros, que podem ser utilizados pela indústria em diferentes funções (LEE; SHULER, 2007; WIDERSTEN et al., 2010; CARLSSON et al., 2012).

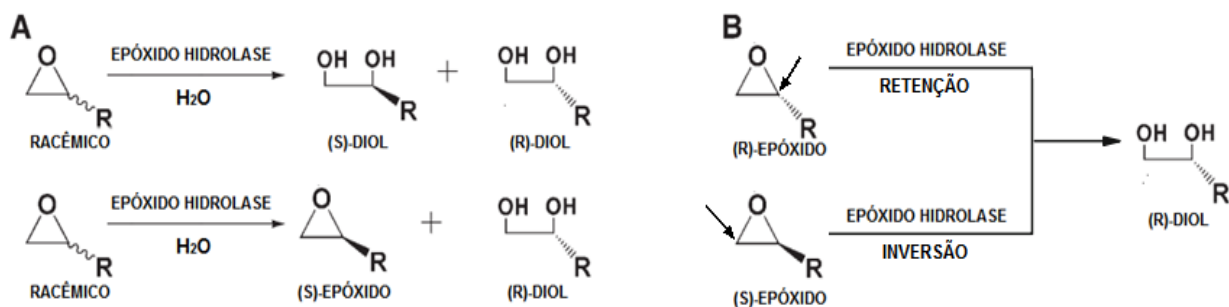


Figura 5. Esquema das reações de atividade enantiosseletiva e regioseletiva da enzima epóxido hidrolase.

(A) Enantiosseletividade: Na reação superior, demonstra-se a ação de uma enzima EH não enantiosseletiva, na qual os dois enantiômeros são atacados e ocorre a formação dos produtos (R)-diol e (S)-diol; já na reação inferior, demonstra-se a ação de uma enzima EH enantiosseletiva, que ataca, preferencialmente, o (R)-epóxido e ocorre a apenas formação do produto (R)-diol. (B) Regioseletividade: as setas indicam qual carbono foi atacado nos substratos. No (R)-epóxido, a enzima EH ataca o carbono mais próximo do radical e forma o enantiômero (R)-diol (reação de retenção); no substrato (S)-epóxido, a enzima ataca o carbono final (mais distante do radical) e também forma o enantiômero (R)-diol (adaptado de Lee e Shuler, 2007).

A EH solúvel enantiosseletiva do fungo *Phanerochaete chrysosporium* ataca, preferencialmente, o enantiômero (R) dos substratos óxido de estireno e epicloridrina e o enantiômero (S) dos substratos 1,2-epoxibutano e glicidil tosilato (LI et al., 2009). Já a EH solúvel do fungo *Aspergillus niger* ataca, preferencialmente, o enantiômero (S)-t-butil-glicidil-éter em reação com substrato racêmico (KOTIK et al., 2005). A EH de *Solanum tuberosum* (batata) apresenta interessante regioseletividade sobre o substrato óxido de estireno; isso porque o (S)-enantiômero é atacado, preferencialmente, no carbono mais próximo do radical e o (R)-enantiômero é atacado, principalmente, no carbono terminal (MONTERDE et al., 2004).

Esses bioprocessos catalisados por EHs estão sendo estudados para a utilização industrial e, como exemplos, podem ser citadas as enzimas das bactérias dos gêneros *Nocardia*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* que, tendo como substrato o epoxisuccinato, são responsáveis pela produção enantiosseletiva de L(+)-ácido tartárico, um acidulante utilizado na indústria alimentícia (ROSENBERG; MIKOVA; KRISTOFIKOVA, 1999; VASU et al., 2012). A enzima de *A. niger*, tendo como substrato 4-isobutil-R-metil óxido de estireno racêmico, ataca, preferencialmente, o indesejado enantiômero (R), permitindo a utilização do enantiômero (S) como intermediário na produção do fármaco Ibuprofeno (anti-inflamatório) (CLEIJ; ARCHELAS; FURSTOSS, 1999). E as enzimas de *A. niger* e *S. tuberosum*, que utilizando o substrato para-óxido de cloroestireno formam seu (R)-diol, um intermediário para a produção do fármaco (R)-Eliprodil (agente neuroprotetor, ainda em teste) (MANOJ et al., 2001).

1.3 Epóxido hidrolases, ácidos graxos e inibidores

Pesquisas envolvendo EHs revelaram que polimorfismos, os quais causam maior atividade dessas enzimas, estão associados à ocorrência de câncer e outras doenças em humanos como, por exemplo, o aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (MCGLYNN et al., 1995); câncer de ovário (ZHONG et al., 2013); adenoma colorretal, principalmente entre fumantes (HUANG et al., 2005); maior suscetibilidade à enfisema pulmonar (KUKKONEN et al., 2011) e doença arterial coronariana em caucasianos (LEE et al., 2006). Esses dados podem ser explicados pela ação das EHs sobre ácidos graxos, que ocorre da seguinte forma: os epóxidos derivados de ácidos graxos (EAGs) são sintetizados pela reação catalisada pelo sistema citocromo P450, na qual é adicionado um oxigênio ao ácido graxo (AG), formando um grupo epóxido. Os EAGs são moléculas com função vasodilatadora e anti-inflamatória (MORISSEAU; HAMMOCK, 2013). Com a hidrólise das EHs sobre os EAGs, ocorre a formação de dióis derivados de ácido graxos (DAGs), os quais são menos ativos que os EAGs. Sendo assim, é mais vantajoso que a ação da EH não ocorra e que sejam mantidos os EAGs, pois a ação dessas moléculas causará maior ação vasodilatadora e anti-inflamatória do que os DAGs (MORISSEAU; HAMMOCK, 2005). Sendo assim, nos casos de polimorfismo em que as EHs têm maior atividade, haverá maior formação de DAGs, e, conseqüentemente, menor ação anti-inflamatória e aumento da pressão arterial, devido à menor vasodilatação e, com isso, os polimorfismos das EHs podem trazer maior suscetibilidade às doenças citadas acima.

Os ácidos graxos poliinsaturados ácido araquidônico (*arachidonic acid*, ARA, ômega 6), ácido linolênico (*linoleic acid*, LA, ômega 6), ácido eicosapentaenoico (*eicosapentaenoic acid*, EPA, ômega 3), ácido docosa-hexaenóico (*Docosahexaenoic acid*, DHA, ômega 3), tem sido amplamente estudados por estarem envolvidos na via do sistema P450 e, portanto, estão relacionados com ação anti-inflamatória e vasodilatadora (ZHANG; KODANI; HAMMOCK, 2014). A ação do sistema citocromo P450 sobre esses AGs poliinsaturados, forma os EAGs através da quebra de uma das insaturações e formação de um grupo epóxido no mesmo local. Desta forma, os AGs poliinsaturados podem formar mais de um EAG, pois o grupo epóxido pode ser formado com a quebra de qualquer uma das insaturações, e com isso serão formados diferentes regioisômeros. Os EAGs, por sua vez, serão utilizados pelas EHs como substrato, para abertura do grupo epóxido e formação do grupo diol dos DAGs. Os regioisômeros de EAGs e DAGs são nomeados de acordo com os números dos carbonos que ocorre a formação do grupo epóxido ou diol (figura 6).

Com o objetivo de causar a diminuição da atividade de EHs, existem diversos grupos de pesquisa investindo no estudo de inibidores eficientes, os quais têm mostrado que, além de terem potentes efeitos anti-inflamatórios (SCHMELZER et al., 2005; MORIN et al., 2010; NORWOOD et al., 2010), são ótimos candidatos à produção de drogas para tratamento de diversas doenças, como: hipertensão; aterosclerose e hipertrofia cardíaca (IMIG, 2012; AI et al., 2009; YU et al., 2000); asma e fibrose cística (WANG et al., 2012); normalização de estados glicêmicos desregulados em alguns modelos de diabetes (LUO et al., 2010); inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares, que também pode ser um tratamento para aterosclerose (DAVIS et al., 2002); neuropatia diabética, em modelos de roedores (INCEOGLU et al., 2012) e laminitite equina, uma doença complexa e, muitas vezes, fatal, a qual envolve inflamação, hipertensão e dor neuropática grave (GUEDES et al., 2013).

Inibidores de EH também podem ser importantes no controle de patógenos. O desenvolvimento de inibidores de EH de *Mycobacterium tuberculosis* (patógeno que é o agente causador da tuberculose humana) também foi estudado por Biswal e colaboradores (2008). Essa pesquisa contribuiu para compreender a patogenicidade de tal bactéria e ajudou no desenvolvimento de inibidores contra uma das EHs encontradas no genoma da *M. tuberculosis*, além de responsável pela desintoxicação do organismo, sendo, então, relacionada à sobrevivência desse microrganismo. Tal estudo sugere que os inibidores de EH de *M. tuberculosis* podem ser importantes ferramentas ao desenvolvimento de fármacos contra tuberculose.

O estudo de Spillman e colaboradores (2016) mostra que duas enzimas EHs de *Plasmodium falciparum* (protozoário parasita causador de malária em humanos) participam da sinalização com EAGs no momento da invasão do hospedeiro e, por isso, têm um importante papel no processo de infecção de humanos. Desta forma, os autores sugerem que o estudo de inibidores dessas enzimas pode contribuir para o combate a essa doença potencialmente fatal.

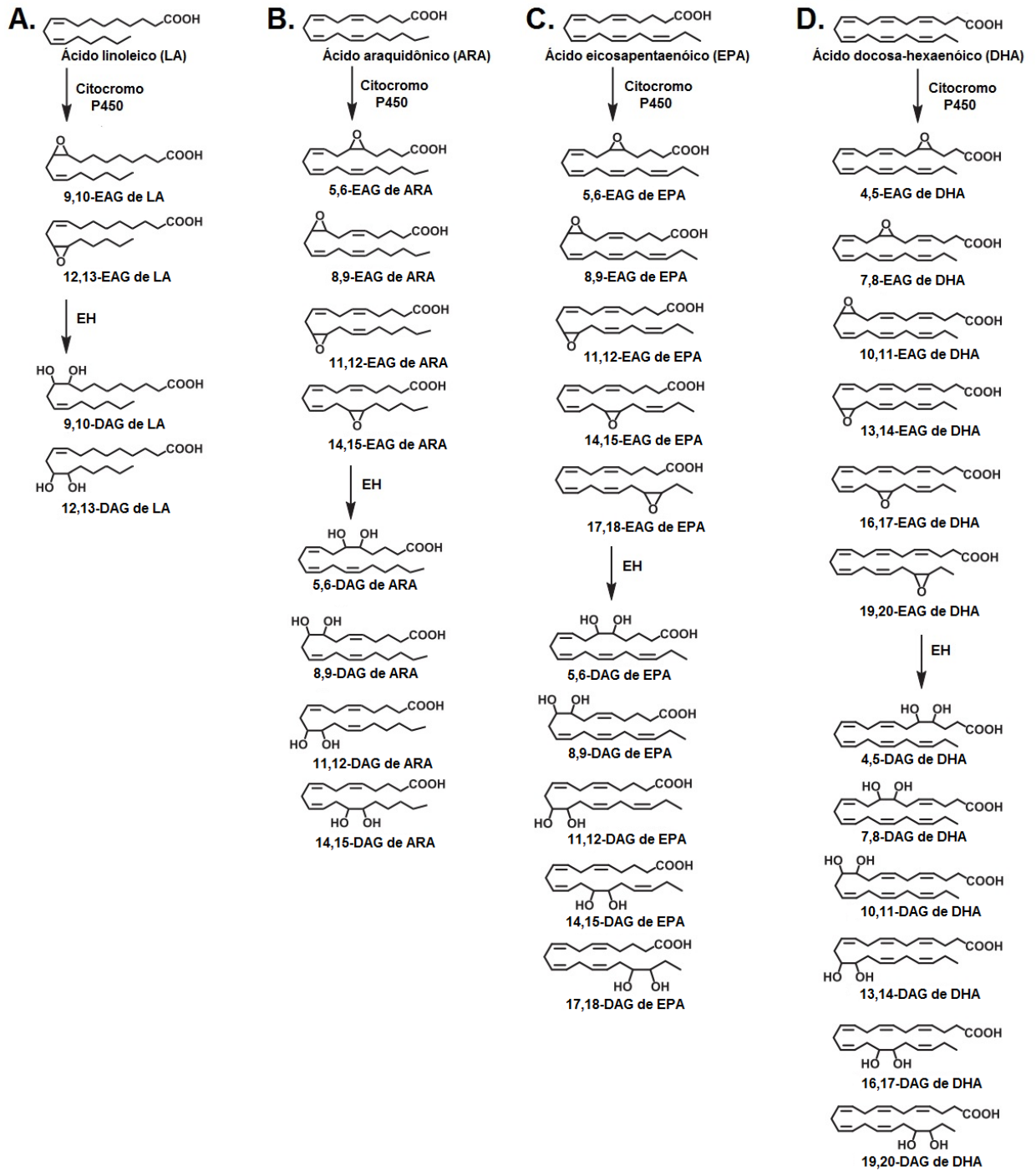


Figura 6. Ação do sistema citocromo P450 e EHs sobre ácidos graxos poliinsaturados. O sistema citocromo P450 age sobre os ácidos graxos: ácido linolênico, LA (A), ácido araquidônico, ARA (B), ácido eicosapentaenico, EPA (C) e ácido docosa-hexaenico, DHA (D), formando os epóxidos derivados de ácidos graxos (EAGs), que serão utilizados pelas EHs como substrato, para formação dos dióis derivados de ácido graxos (DAGs). Os regioisômeros de EAGs e DAGs são nomeados de acordo com os números dos carbonos que ocorre a formação do grupo epóxido ou diol (adaptado de ZHANG; KODANI; HAMMOCK, 2014).

1.4 Métodos de determinação da atividade de epóxido hidrolases

Devido à importância dos estudos sobre a atividade de EH, diversos métodos de detecção da atividade dessa enzima têm sido desenvolvidos e estes têm se mostrado eficazes e altamente sensíveis.

1.4.1 Cromatografia

Diversos ensaios utilizando cromatografia líquida (GIULIANO et al., 1980; WESTKAEMPER; HANZLIK, 1980), gasosa (PEDRAGOSA-MOREAU; ARCHELAS; FURSTOSS, 1993; BELOTI et al., 2013) e acoplada com espectrometria de massa (BELOTI et al., 2013; MORISSEAU et al., 2014) têm sido descritos na literatura. Nesses estudos, são separados epóxidos e dióis, com a finalidade de se determinar a atividade de enzimas EHs sobre diversos substratos. A enantiosseletividade também pode ser determinada através de cromatografia (LIU et al., 2006; VAN LOO et al., 2004; MONTERDE et al., 2004; SPELBERG et al., 1998; YILDIRIM et al., 2011), quando se utilizam colunas quirais (que separam os enantiômeros), o que permite calcular a concentração de cada enantiômero de epóxido ou diol e se determinar se a enzima é enantiosseletiva.

1.4.2 Ensaio colorimétrico baseado em adrenalina (ensaio vermelho)

O ensaio de adrenalina para a determinação da atividade da enzima EH, descrito por Cedrone e colaboradores (2005), é baseado na reação entre adrenalina e periodato de sódio (NaIO_4), que tem como resultado a formação do adrenocromo vermelho e, conseqüentemente, de uma solução avermelhada. Em contrapartida, na presença de diol (produto da reação enzimática de EH), ocorrerá a oxidação do diol pelo periodato de sódio, resultando na formação de iodato de sódio (NaIO_3), o que impede a formação do adrenocromo vermelho e causa a diminuição da intensidade da cor vermelha resultante. Portanto, a intensidade da coloração avermelhada será inversamente proporcional à formação de dióis pela reação com a enzima EH, ou seja, quanto mais dióis forem formados, menor será a intensidade do vermelho. A absorvância da reação pode ser medida na DO_{490} e é considerada uma medida indireta da atividade enzimática (figura 7).

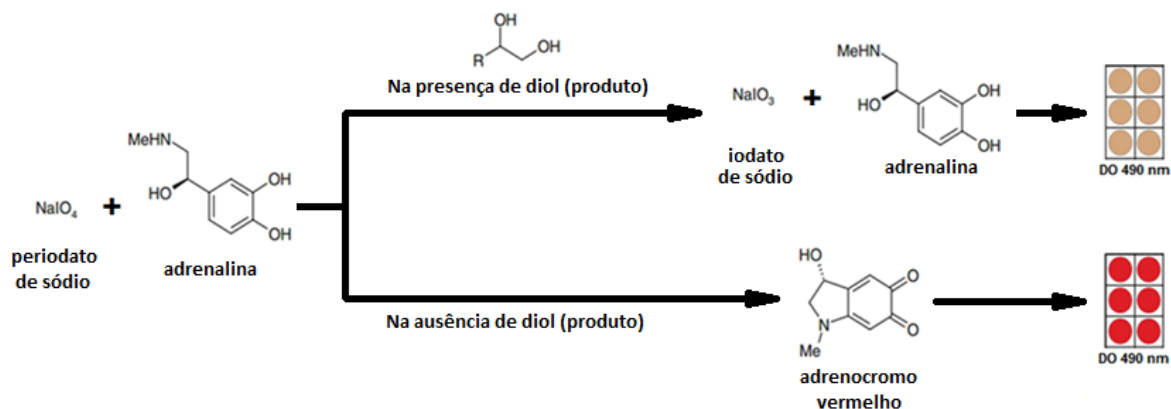


Figura 7. Esquema do teste de atividade enzimática baseado em adrenalina. O adrenocromo de cor vermelha é formado pela reação entre o periodato de sódio (NaIO₄) com a adrenalina. Na presença de um substrato epóxido, a enzima EH formará o produto diol que será oxidado pelo NaIO₄, formando iodato de sódio (NaIO₃) que, por sua vez, não reage com a adrenalina e, portanto, não forma o adrenocromo vermelho, deixando a reação incolor. Dessa forma, a intensidade do vermelho pode ser determinada na DO₄₉₀ e será uma medida da formação do diol (produto da reação de EH) e uma medida indireta da atividade de EH.

1.4.3 Ensaio colorimétrico baseado em 4-(p-nitrobenzil)-piridina (ensaio azul)

O ensaio azul baseia-se na reação de alquilação entre o 4-(p-nitrobenzil)-piridina (NBP) com o substrato epóxido remanescente da reação enzimática (HAMMOCK; HAMMOCK, 1974). Após um determinado período de reação entre o NBP e o epóxido a 80 °C, adiciona-se carbonato de potássio, que reage liberando o cromóforo azul p-nitrofenol. A intensidade do azul pode ser mensurada na DO₅₇₀, oferecendo uma medição indireta da atividade enzimática, ou seja, quanto mais intensa a coloração azul, maior a quantidade de epóxido remanescente (não hidrolisado) e, conseqüentemente, menor a atividade enzimática (CEDRONE et al., 2005; ZOCHER et al., 1999; ZOCHER et al., 2000).

1.4.4 Ensaio baseado em substratos fluorescentes

Os ensaios realizados com substrato fluorescente são baseados no mecanismo de formação do fluoróforo dos α -cianoésteres, que ocorre da seguinte forma: com a abertura do grupo epóxido do substrato pela enzima EH, ocorre a desacilação (decomposição do grupo acila) e liberação do intermediário de cianidrina. Em condições básicas, a cianidrina rapidamente se decompõe em um íon de cianeto e 6-metoxi-2-naftaldeído, que é fluorescente (SHAN; HAMMOCK, 2001; WOLF et al., 2006) (figura 8). Esses substratos fluorescentes permitiram o desenvolvimento de vários ensaios cinéticos sensíveis e contínuos para a avaliação da atividade de EH.

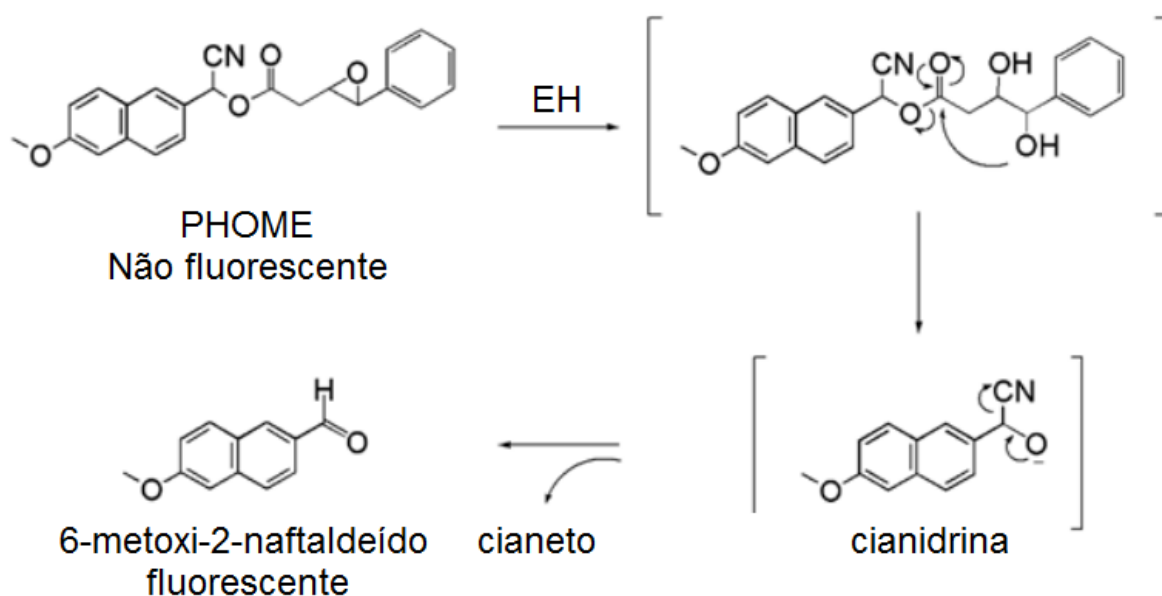


Figura 8. Mecanismo de formação do fluoróforo 6-metoxi-2-naftaldeído utilizado para detecção da atividade da enzima EH. A reação é baseada na hidrólise do grupo epóxido (do substrato PHOME) pela enzima, seguido de uma desacilação que resulta na liberação de uma cianidrina. Em condições básicas, a cianidrina rapidamente se decompõe em um íon de cianeto e 6-metoxi-2-naftaldeído (altamente fluorescente).

1.4.5 Ensaio baseado em substratos radioativos

A atividade de EH pode ser mensurada em reações com substratos radioativos marcados com trítio. Após determinado tempo, a reação enzimática deve ser interrompida com isooctano, para extração dos epóxidos presentes na fase aquosa. Em seguida, a quantidade de diol radioativo formado na fase aquosa é mensurada, utilizando-se um contador de cintilação líquida (BORHAN et al., 1995)

1.5 Gênero *Trichoderma*

Os fungos filamentosos têm grande importância nos estudos de Biotecnologia, pois apresentam vias metabólicas que sintetizam diversas moléculas, as quais podem ser empregadas em processos biotecnológicos, como: genes, peptídeos, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos e outros compostos com relevância para as indústrias: farmacêutica, química e de alimentação animal e humana (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota, e tem mais de cem espécies identificadas. Geralmente, esses fungos são encontrados em solos do mundo inteiro, em raízes das plantas e outros materiais orgânicos (DRUZHININA; KOPCHINSKIY; KUBICEK, 2006). As espécies de *Trichoderma* são economicamente utilizadas para a produção comercial de

enzimas (celulases, glucanases, pectinases, xilanases, dentre outras), como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos, e em processos industriais (KLEIN; EVELEIGH, 1998; ZAFRA et al., 2015). No entanto, espécies desse gênero também causam efeitos negativos, como a contaminação de cultivos de cogumelos comerciais (SAMUELS et al., 2002, KOMON-ZELAZOWSKA et al., 2007), e podem ser patógenos oportunistas de mamíferos imunocomprometidos, incluindo humanos, podendo até causar a morte do hospedeiro. Já existem relatos de infecções fatais e tratáveis pelas espécies *Trichoderma longibrachiatum* (KUHLIS et al., 1999, PAREDES et al., 2016, MYOKEN et al., 2002, DRUZHININA et al., 2008), *Trichoderma viride* (LOEPPKY et al., 1983, DE MIGUEL et al., 2005), *Trichoderma harzianum* (GUISERIX et al., 1996; GUARRO et al., 1999), *Trichoderma pseudokoningii* (ROTA et al., 2000, GAUTHERET et al., 1995), *Trichoderma citrinoviride* (KUHLIS et al., 1999) e *Trichoderma koningii* (CAMPOS-HERRERO et al., 1996, RAGNAUD et al., 1984). Dessa forma, fica evidente a importância de estudos relacionados à identificação e caracterização de novos agentes antifúngicos.

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* têm grande participação em estudos sobre a produção de enzimas hidrolíticas, que incluem celulases, hemicelulases e quitinases (KLEIN; EVELEIGH, 1998). Muitas espécies desse gênero, com destaque para o mesofílico *Trichoderma reesei*, têm sido utilizadas na produção comercial de enzimas celulases e hemicelulases, utilizadas nas indústrias: têxtil e de alimentos. O sistema de celulases de *T. reesei* (MONTENECOURT et al., 1983) é, provavelmente, um dos mais extensivamente estudados em seus vários aspectos, tais como o mecanismo de ação das celulases (IRWIN et al., 1993; HENRISSAT, 1994) e regulação da expressão de seus genes (EL-GOGARY et al., 1989; ABRAHÃO-NETO et al., 1995; HENRIQUE-SILVA et al., 1996; CARLE-URIOSTE et al., 1997).

Devido à importância das espécies do gênero *Trichoderma*, o sequenciamento do genoma de *T. reesei* QM9414 (MARTINEZ et al., 2008) foi publicado pelo *Joint Genome Institute* (JGI, USA), financiado pelo Departamento de Energia norte-americano (DOE – USA). *T. reesei* QM9414 é uma cepa com capacidade de secretar grandes quantidades de celulases e hemicelulases que podem ser empregadas para conversão de biomassa em bioprodutos de utilidade industrial, como açúcar e etanol.

T. reesei é um organismo modelo, usado para produção de proteínas homólogas e heterólogas. Porém, a partir de 2008, após o sequenciamento do seu genoma, diversos grupos de pesquisa têm investido no estudo da Biologia, Bioquímica, Fisiologia celular, manipulação

gênica e enzimologia desse organismo, com a finalidade de explorar as possíveis utilizações biotecnológicas de tal espécie.

A análise do genoma de *T. reesei* QM9414 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>) permite identificar, computacionalmente, supostos genes codificadores de enzimas epóxido hidrolases solúveis, as quais apresentam alta similaridade e identidade com proteínas epóxido hidrolases, já caracterizadas de outros organismos.

Na presente dissertação, são descritas as etapas de identificação, clonagem, expressão e purificação da enzima epóxido hidrolase (TrEH) do fungo *Trichoderma reesei*, bem como os ensaios de caracterização da atividade enzimática e enantiosseletividade, a identificação de inibidores de TrEH e as determinações das estruturas secundária e terciária. Os resultados obtidos mostram a caracterização desta enzima e suas potenciais aplicações biotecnológicas.

CONCLUSÕES

A utilização de enzimas para a obtenção de processos industriais mais sustentáveis é crescente e promissora; porém, muitas vezes, esse processo esbarra na viabilidade econômica da produção dessas proteínas. Por esse motivo, são fundamentais estudos para prospecção de novas enzimas e melhoramento da eficiência delas. Na presente dissertação, foram descritas as etapas de clonagem, expressão em *E. coli*, purificação e caracterização estrutural e funcional de uma enzima epóxido hidrolase do fungo filamentosso *Trichoderma reesei*, denominada TrEH. Tal enzima possui 32%, 26%, 24%, 24% e 21% de identidade com as enzimas EH de *Homo sapiens* (PDB: 1S8O), *Solanum tuberosum* (PDB: 2CJP), *Aspergillus niger* (PDB: 1QO7), *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 2E3J) e *Agrobacterium radiobacter* (PDB: 1EHY), respectivamente. TrEH apresentou atividade máxima no pH 7,2, mostrou-se altamente ativa nas temperaturas entre 23 a 50°C, e se mantém ativa após 20 minutos a 70°C; porém, apresenta, aproximadamente, 10% de atividade residual. O estudo da cinética enzimática de TrEH mostrou que a enzima é enantiosseletiva e hidrolisa, preferencialmente, o (S)-(-) óxido de estireno, (R)-(-)-epicloridrina e (S)-(-)-1,2-epoxibutano, demonstrando que a enzima tem potencial para utilização em processos biotecnológicos relacionados à produção de produtos quirais.

Os estudos da estabilidade conformacional de TrEH, realizados em dicróismos circular, a diferentes temperaturas, sugeriram um mecanismo de desnaturação irreversível de dois estados. Por outro lado, os resultados dos estudos de atividade biológica mostraram uma atividade residual para temperaturas até 70°C, apontando à existência de um núcleo nativo residual que coexiste com formas desdobradas e, até mesmo, parcialmente dobradas. Além disso, os estudos conformacionais em diferentes valores de pH mostraram que TrEH é capaz de reter uma quantidade considerável de estrutura secundária ordenada em todas as faixas de pH, ácido, neutro e básico, que foi constituída, principalmente, por formas beta. Embora a atividade biológica não possa ser testada em todos os intervalos, uma atividade residual (aproximadamente 25%) permanece em pH 5, sugerindo que, pelo menos a esse pH, um núcleo nativo residual é preservado.

Neste estudo, descrevemos, também, a caracterização da atividade da enzima TrEH sobre substratos radioativos. A enzima TrEH se mostrou ativa sobre todos os substratos testados; porém, apresentou maior atividade específica sobre o substrato **1** (óxido de trans-difenilpropano, t-DPPO). Também realizamos o *screening* da biblioteca de substratos fluorescentes com o objetivo de encontrar o melhor substrato a ser utilizado na identificação de bons inibidores para a enzima TrEH. Dentre eles, o substrato PHOME (**6**) apresentou a maior

atividade específica e foi escolhido para ser utilizado nas etapas posteriores. O *screening* do inibidor foi realizado, utilizando o substrato **6**, e foram identificados os 90 melhores inibidores de TrEH, os quais foram testados novamente e identificou-se as 7 melhores moléculas inibidoras. Dentre elas, seis que possuem, em suas estruturas, ureia (1318, Tk32, SDK-B4, Tk30, SHH6098 e T-AUCB) e um que possui amida (Cm-27.7).

Os ensaios de inibição do crescimento fúngico mostraram que, dentre os inibidores testados, o inibidor Tk32 apresentou o menor IC₅₀ e também foi a molécula que mais inibiu (> 60%) o crescimento do fungo *T. reesei*. Esses dados podem contribuir substancialmente para o desenvolvimento de antifúngicos, uma vez que o gênero *Trichoderma* apresenta algumas espécies patogênicas. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, a fim de melhorar a caracterização da atividade inibitória destas moléculas. Além disso, estudos de inativação do gene de TrEH devem ser realizados para determinação da relação entre a inibição da atividade da enzima e a inibição do crescimento fúngico.

A cromatografia líquida acoplada com a análise de espectrometria de massa (LC-MS/MS) da atividade de TrEH sobre epóxidos derivados de ácidos graxos mostrou que essas moléculas são substratos para TrEH, a qual apresentou melhor atividade sobre os regioisômeros 8,9 EAG de ARA; 8,9 EAG de EPA; 14,15 EAG de EPA; 17,18 EAG de EPA; e sobre todos os regioisômeros de EAG de DHA. Esses dados podem trazer informações importantes sobre o metabolismo fúngico de lipídios e o mecanismo enzimático de EHs, podendo ser ferramentas úteis para se estudar as funções de ácido graxos em fungos.

O conhecimento sobre a enantiosseletividade de TrEH, seus inibidores e sua atividade sobre epóxidos derivados de ácidos graxos tornam essa enzima bastante atraente para futuros estudos sobre metabolismo fúngico e aplicações em processos biotecnológicos relacionados à produção de produtos quirais e desenvolvimento de antifúngicos.

Os dados obtidos da caracterização da atividade enzimática e estudo da estabilidade conformacional da enzima TrEH foram publicados no artigo intitulado: “Epoxide hydrolase of *Trichoderma reesei*: Biochemical properties and conformational characterization” (DE OLIVEIRA et al., 2016a; anexo A). Otimizações do ensaio colorimétrico vermelho para a análise dos parâmetros cinéticos foram publicadas no artigo intitulado: “Data set of optimal parameters for colorimetric red assay of epoxide hydrolase activity” (DE OLIVEIRA et al., 2016b; anexo B). E a determinação da estrutura cristalográfica da enzima TrEH (na resolução de 1.7 Å) gerou uma terceira publicação intitulada “Structure of a soluble epoxide hydrolase identified in *Trichoderma reesei*”, (WILSON et al., 2017a; anexo D).

REFERÊNCIAS*

ABRAHAO-NETO, J. et al. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*, **Biochemistry**, v. 34, n. 33, p. 10456-62, Aug 1995.

AFONINE, P.V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352-367, Apr 2012.

AI, D. et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 564-569, Jan 2009.

ARAND, M. et al. Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1, 2-epoxide hydrolase reveals a novel active site. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2583-2592, Jun 2003.

ARAND, Michael et al. Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay. **Methods in enzymology**, v. 400, p. 569-588, Jun 2005.

ARGIRIADI, Maria A. et al. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 19, p. 10637-10642, Sep 1999.

BARBIRATO, F. et al. The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1, 2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases. **FEBS letters**, v. 438, n. 3, p. 293-296, Nov 1998.

BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, Apr 2005.

BELOTI, L. L. et al. A novel and enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435: Purification and characterization. **Protein expression and purification**, v. 91, n. 2, p. 175-183, Oct 2013.

BELLEVIK, S; ZHANG, J.; MEIJER, J. Brassica napus soluble epoxide hydrolase (BNSEH1). **The FEBS Journal**, v. 269, n. 21, p. 5295-5302, Nov 2002.

BISWAL, B. K. et al. The molecular structure of epoxide hydrolase B from *Mycobacterium tuberculosis* and its complex with a urea-based inhibitor. **Journal of molecular biology**, v. 381, n. 4, p. 897-912, 2008.

¹BORHAN, B. et al. Improved radiolabeled substrates for soluble epoxide hydrolase. **Analytical biochemistry**, v. 231, n. 1, p. 188-200, Oct 1995.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BRANDEN, Carl Ivar et al. Introduction to protein structure. Garland Science, 1999.

CAMPOS-HERRERO, M. I. et al. Trichoderma koningii peritonitis in a patient undergoing peritoneal dialysis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 18, n. 19, p. 150-152, Oct 1996.

CARLE-URIOSTE, J. C. et al. Cellulase induction in Trichoderma reesei by cellulose requires its own basal expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 10169-10174, Apr 1997.

CARLSSON, A. J. et al. Obtaining optical purity for product diols in enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis: Contributions from changes in both enantio- and regioselectivity. **Biochemistry**, v. 51, n. 38, p. 7627-7637, Sep 2012.

CEDRONE, F.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C. Colorimetric assays for quantitative analysis and screening of epoxide hydrolase activity. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 23-24, p. 1921-1927, Dec 2005.

CHAMBERGO, Felipe S.; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, Mar 2016.

CLEIJ, M.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Microbiological transformations 43. Epoxide hydrolases as tools for the synthesis of enantiopure α -methylstyrene oxides: A new and efficient synthesis of (S)-ibuprofen. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 5029-5035, Mai 1999.

DAVIS, B. B. et al. Inhibitors of soluble epoxide hydrolase attenuate vascular smooth muscle cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2222-2227, Feb 2002.

DE OLIVEIRA, G. S. et al. Epoxide hydrolase of Trichoderma reesei: biochemical properties and conformational characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 569-574, Aug 2016a.

DE OLIVEIRA, G. S. et al. Data set of optimal parameters for colorimetric red assay of epoxide hydrolase activity. **Data in brief**, v. 8, p. 436-440, Jun 2016b.

DE MIGUEL, D. et al. Nonfatal pulmonary Trichoderma viride infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 53, n. 1, p. 33-37, Sep 2005.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, n. 2, p. 55-64, Oct 2006.

DRUZHININA, I. S. et al. Alternative reproductive strategies of Hypocrea orientalis and genetically close but clonal Trichoderma longibrachiatum, both capable of causing invasive mycoses of humans. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3447-3459, Nov 2008.

EL-GOGARY, S. et al. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in Trichoderma reesei. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6138-6141, Aug 1989.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of trichoderma. *Trichoderma and gliocladium*, v. 1, p. 57-74, 1998.

GAUTHERET, A. et al. *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient. **Clinical infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 1063-1064, Apr 1995.

GAVRILESCU, M; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 7, p. 471-499, Nov 2005.

GIULIANO, K. A.; LAU, E. P.; FALL, R. R. Simplified liquid chromatographic assay for epoxide hydrolase. **Journal of Chromatography A**, v. 202, n. 3, p. 447-452, Dec 1980.

GOMEZ, G. A. et al. Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. **Biochemistry**, v. 43, n. 16, p. 4716-4723, Apr 2004.

GOMEZ, G. A. et al. Human soluble epoxide hydrolase: Structural basis of inhibition by 4-(3-cyclohexylureido)-carboxylic acids. **Protein science**, v. 15, n. 1, p. 58-64, Jan 2006.

GUARRO, J. et al. Fatal Case of *Trichoderma harzianum* Infection in a Renal Transplant Recipient. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3751-3755, Nov 1999.

GUEDES, A. G. P. et al. Use of a soluble epoxide hydrolase inhibitor as an adjunctive analgesic in a horse with laminitis. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 40, n. 4, p. 440-448, Jul 2013.

GUISEIX, J. et al. *Trichoderma harzianum* peritonitis in peritoneal dialysis. **Nephron**, v. 74, n. 2, p. 473-474, Jun 1996.

GUTIÉRREZ R.; MARTIN DEL VALLE E. M.; GALÁN, M. A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends, **Separation & Purification Reviews**, v. 36, n. 1, p. 71-111, 2007.

HAMMOCK, L. G.; HAMMOCK, B. D.; CASIDA, J. E. Detection and analysis of epoxides with 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 12, n. 6, p. 759-764, Dec 1974.

HAMMOCK, B. D. et al. Soluble mammalian epoxide hydratase: action on juvenile hormone and other terpenoid epoxides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 53, n. 2, p. 263-265, Oct 1976.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1, p. 1-15, Sep 2009.

HARRIS, T. R. et al. The cloning and characterization of a soluble epoxide hydrolase in chicken. **Poultry science**, v. 85, n. 2, p. 278-287, Feb 2006.

HARRIS, T. R. et al. Identification of two epoxide hydrolases in *Caenorhabditis elegans* that metabolize mammalian lipid signaling molecules. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 472, n. 2, p. 139-149, Apr 2008.

HENRIQUE-SILVA, F. et al. Two Regulatory Regions Controlling Basal and Cellulose-Induced Expression of the Gene Encoding Cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* Are Adjacent to Its TATA Box. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 228, n. 2, p. 229-237, Nov 1996.

HENRISSAT, B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose**, v. 1, n. 3, p. 169-196, Jul 1994.

HOPMANN, K. H.; HIMO, F. Theoretical study of the full reaction mechanism of human soluble epoxide hydrolase. **Chemistry—A European Journal**, v. 12, n. 26, p. 6898-6909, Sep 2006.

HOTTA, K. et al. Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 355-358, Mar 2012.

HU, D. et al. Expression of a novel epoxide hydrolase of *Aspergillus usamii* E001 in *Escherichia coli* and its performance in resolution of racemic styrene oxide. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 671-680, May 2015.

HUANG, W. et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 1, p. 152-157, Jan 2005.

IKEBUCHI, M. et al. Primary structure and properties of Mn-superoxide dismutase from scallop adductor muscle. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 4, p. 521-532, Nov 2006.

IMIG, J. D. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. **Physiological reviews**, v. 92, n. 1, p. 101-130, Jan 2012.

INCEOGLU, A. B. et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits niacin-induced vasodilation in mice. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 70, Jul 2012.

IRWIN, D. C. et al. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnology and bioengineering**, v. 42, n. 8, p. 1002-1013, Oct 1993.

JONES, P. D. et al. Fluorescent substrates for soluble epoxide hydrolase and application to inhibition studies. **Analytical biochemistry**, v. 343, n. 1, p. 66-75, Aug 2005.

JOHANSSON, P. et al. Structure of an atypical epoxide hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* gives insights into its function. **Journal of molecular biology**, v. 351, n. 5, p. 1048-1056, Sep 2005.

KAMITA, S. G. et al. Cloning and characterization of a microsomal epoxide hydrolase from *Heliothis virescens*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 219-228, Mar 2013.

KANG, Ji-Hyun et al. A cold-adapted epoxide hydrolase from a strict marine bacterium, *Sphingophyxis alaskensis*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 1445-1452, Aug 2008.

KIRK, O; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, Feb 2002.

KOMON-ZELAZOWSKA, M. et al. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7415-7426, Sep 2007.

KOTIK, M.; BRICHAC, J.; KYSLÍK, P. Novel microbial epoxide hydrolases for biohydrolysis of glycidyl derivatives. **Journal of biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 364-375, Dec 2005.

KUKKONEN, M. K. et al. Genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes influence the risk of pulmonary emphysema. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 21, n. 12, p. 876-883, Dec 2011.

KUMAR, R. et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Cupriavidus metallidurans*-CH34. **Protein expression and purification**, v. 79, n. 1, p. 49-59, Sep 2011.

KUHLS, K. et al. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. **Medical mycology**, v. 37, n. 1, p. 25-33, Feb 1999.

LEE, C. R. et al. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 10, p. 1640-1649, Apr 2006.

LEE, Eun Yeol; SHULER, Michael L. Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 318-327, Oct 2007.

LI, N.; ZHANG, Y; FENG, H. Biochemical characterization and transcriptional analysis of the epoxide hydrolase from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 41, n. 8, p. 638-647, Aug 2009.

LIN, S.; HORSMAN, G. P.; SHEN, B. Characterization of the epoxide hydrolase NcsF2 from the neocarzinostatin biosynthetic gene cluster. **Organic letters**, v. 12, n. 17, p. 3816-3819, Sep 2010.

LINDBERG, D.; GOGOLL, A.; WIDERSTEN, M. Substrate-dependent hysteretic behavior in StEH1-catalyzed hydrolysis of styrene oxide derivatives. **The FEBS journal**, v. 275, n. 24, p. 6309-6320, Dec 2008.

LIU, Z. et al. Enantioselective hydrolysis of styrene oxide with the epoxide hydrolase of *Sphingomonas* sp. HXN-200. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 1, p. 47-52, Mar 2006.

LIU, Y. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* SQ-6. **Protein expression and purification**, v. 53, n. 2, p. 239-246, Jun 2007.

LIU, Z. et al. Characterization of a newly synthesized epoxide hydrolase and its application in racemic resolution of (R, S)-epichlorohydrin. **Catalysis Communications**, v. 16, n. 1, p. 133-139, Nov 2011.

LOEPPKY, C. B. et al. *Trichoderma viride* peritonitis. **Southern medical journal**, v. 76, n. 6, p. 798-799, Jun 1983.

LUO, P. et al. Inhibition or deletion of soluble epoxide hydrolase prevents hyperglycemia, promotes insulin secretion, and reduces islet apoptosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 430-438, Aug 2010.

MANOJ, K. M. et al. Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodil: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process. **Tetrahedron**, v. 57, n. 4, p. 695-701, Jan 2001.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553-560, May 2008.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of applied crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, Aug 2007.

MCGLYNN, K. A. et al. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 6, p. 2384-2387, Mar 1995.

MEIJER, J.; DEPIERRE, J. W. Properties of cytosolic epoxide hydrolase purified from the liver of untreated and clofibrate-treated mice. **The FEBS Journal**, v. 148, n. 3, p. 421-430, May 1985.

MINAMI, A. et al. Allosteric regulation of epoxide opening cascades by a pair of epoxide hydrolases in monensin biosynthesis. **ACS chemical biology**, v. 9, n. 2, p. 562-569, Dec 2013.

MONTERDE, M. I. et al. Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 18, p. 2801-2805, Sep 2004.

MONTENECOURT, B. S. et al. Regulatory controls in relation to overproduction of fungal cellulases. In: Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals. **Springer**, Boston, MA, 1981. p. 33-53.

MORIN, C. et al. 17, 18-Epoxyeicosatetraenoic Acid Targets PPAR γ and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase to Mediate Its Anti-inflammatory Effects in the Lung: Role of Soluble

Epoxide Hydrolase. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 43, n. 5, p. 564-575, Nov 2010.

MORISSEAU, C. et al. Cress and potato soluble epoxide hydrolases: purification, biochemical characterization, and comparison to mammalian enzymes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 378, n. 2, p. 321-332, Jun 2000.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 311-333, Jan 2005.

MORISSEAU, C. et al. Development of metabolically stable inhibitors of mammalian microsomal epoxide hydrolase. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 4, p. 951-957, Apr 2008.

MORISSEAU, C. et al. Development of fluorescent substrates for microsomal epoxide hydrolase and application to inhibition studies. **Analytical biochemistry**, v. 414, n. 1, p. 154-162, Aug 2011.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 53, p. 37-58, Sep 2013.

MORISSEAU, C. et al. Effect of soluble epoxide hydrolase polymorphism on substrate and inhibitor selectivity and dimer formation. **Journal of lipid research**, v. 55, n. 6, p. 1131-1138, Jun 2014.

MOWBRAY, S. L. et al. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes. **Protein Science**, v. 15, n. 7, p. 1628-1637, Jul 2006.

MURRAY, M. G; THOMPSON, W. Fm. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, Oct 1980.

MYOKEN, Y. et al. Fatal necrotizing stomatitis due to *Trichoderma longibrachiatum* in a neutropenic patient with malignant lymphoma: a case report. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 31, n. 6, p. 688-691, Dec 2002.

NARDINI, M. et al. The X-ray Structure of Epoxide Hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 an enzyme to detoxify harmful epoxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14579-14586, May 1999.

NAKAGAWA, Y. et al. 3-D QSAR analysis of inhibition of murine soluble epoxide hydrolase (MsEH) by benzoylureas, arylureas, and their analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 8, n. 11, p. 2663-2673, Nov 2000.

NESTL, Bettina M. et al. New generation of biocatalysts for organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 12, p. 3070-3095, Mar 2014.

NICHOLAS, K. B. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Embnew. news**, v. 4, p. 14, Apr 1997.

NORWOOD, S. et al. Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. **American journal of translational research**, v. 2, n. 4, p. 447, Jul 2010.

OESCH, F.; JERINA, D. M.; DALY, J. A radiometric assay for hepatic epoxide hydrolase activity with [7-3H] styrene oxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 227, n. 3, p. 685-691, Mar 1971.

OLIVEIRA, M. A.; BERMUDEZ, J. A. Z.; SOUZA, A. C. M. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 1, p. 99-112, Mar 1999.

PAREDES, K. et al. Virulence and experimental treatment of *Trichoderma longibrachiatum*, a fungus refractory to treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5029-5032, Aug 2016.

PEDRAGOSA-MOREAU, S.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Microbiological transformations. 28. Enantiocomplementary epoxide hydrolyses as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 5533-5536, Sep 1993.

PASTOR J., BÍSCARO H., CAMPAÑA P., CDPro for Windows 7, 2014 (accessed 12. 12.17) http://www.each.usp.br/aprender-ciencia/formulario_en.php.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, Mar 2003.

PROVENCHER, S. W.; GLOECKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 33-37, Jan 1981.

RAGNAUD, J. M. et al. Infection peritoneale a *Trichoderma koningii* sur dialyse peritoneale continue ambulatoire. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 14, n. 7-8, p. 402-405, Aug 1984.

RINK, R.; JANSSEN, D. B. Kinetic mechanism of the enantioselective conversion of styrene oxide by epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p. 18119-18127, Dec 1998.

ROTA, S. et al. *Trichoderma pseudokoningii* peritonitis in automated peritoneal dialysis patient successfully treated by early catheter removal. **Peritoneal Dialysis International**, v. 20, n. 1, p. 91-93, Feb 2000.

ROSENBERG, M. et al. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*. **Biotechnology letters**, v. 21, n. 6, p. 491-495, Jun 1999.

SAITO, S. et al. Seventy genetic variations in human microsomal and soluble epoxide hydrolase genes (EPHX1 and EPHX2) in the Japanese population. **Journal of human genetics**, v. 46, n. 6, p. 325-329, May 2001.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, p. 1546, 1989.

SAMUELS, G. J. et al. Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146-170, Jan 2002.

SCHMELZER, K. R. et al. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 28, p. 9772-9777, Apr 2005.

SHAN, Guomin; HAMMOCK, Bruce D. Development of sensitive esterase assays based on α -cyano-containing esters. **Analytical biochemistry**, v. 299, n. 1, p. 54-62, Dec 2001.

SHEN, H. C.; HAMMOCK, B. D. Discovery of inhibitors of soluble epoxide hydrolase: a target with multiple potential therapeutic indications. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1789-1808, Dec 2012.

SHEN, L. et al. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t-AUCB, modulates cholesterol balance and oxidized low density lipoprotein metabolism in adipocytes in vitro. **Biological chemistry**, v. 395, n. 4, p. 443-451, 2014.

SOLOMONS T.W.G., (1996) Estereoquímica: moéculas quirais. **In: Química orgânica**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC.

SPELBERG, J. H. L. et al. Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, n. 3, p. 459-466, Feb 1998.

SPILLMAN, N. J.; DALMIA, V. K.; GOLDBERG, D. E. Exported epoxide hydrolases modulate erythrocyte vasoactive lipids during *Plasmodium falciparum* infection. **MBio**, v. 7, n. 5, p. e01538-16, Oct 2016.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical biochemistry**, v. 209, n. 1, p. 32-44, Feb 1993.

SREERAMA, N; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, Dec 2000.

STAPLETON, A. et al. Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. **The Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 251-258, Aug 1994.

SZELIGA, J.; DIPPLE, A. DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. **Chemical research in toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, Jan 1998.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, Dec 1997.

VAN DER WERF, M. J.; OVERKAMP, K. M.; DE BONT, J. A. M. Limonene-1, 2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5052-5057, Jul 1998.

VAN LOO, B. et al. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. **Chemistry & biology**, v. 11, n. 7, p. 981-990, Jul 2004.

VASU, V. et al. Active site analysis of cis-epoxysuccinate hydrolase from *Nocardia tartaricans* using homology modeling and site-directed mutagenesis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2377-2386, Mar 2012.

VOET, D. Voet JG and Pratt, CW. **Fundamentos de Bioquímica**, Artmed Editora, Porto Alegre, RS, 2000.

WAECHTER, F. et al. Purification and characterization of a soluble epoxide hydrolase from rabbit liver. **The FEBS Journal**, v. 125, n. 2, p. 457-461, Jul 1982.

WENKER, M. A. M. et al. Metabolism of styrene-7, 8-oxide in human liver in vitro: interindividual variation and stereochemistry. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 169, n. 1, p. 52-58, Nov 2000.

WESTKAEMPER, R. B.; HANZLIK, R. P. A convenient reverse-phase liquid chromatographic assay for epoxide hydrase. **Analytical biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 63-67, Feb 1980.

WHITAKER, J. R.; GRANUM, P. E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. **Analytical biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 156-159, Nov 1980.

WIDERSTEN, M.; GURELL, A.; LINDBERG, D. Structure–function relationships of epoxide hydrolases and their potential use in biocatalysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1800, n. 3, p. 316-326, Mar 2010.

WILSON, Carolina et al. Structure of a soluble epoxide hydrolase identified in *Trichoderma reesei*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 8, p. 1039-1045, Aug 2017a.

WILSON, C. Determinação das estruturas cristalográficas de epóxido hidrolases de interesse biotecnológico e envolvidas na biossíntese de antibióticos ionóforos. **[Dissertação de doutorado em microbiologia]** - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2017b.

WOLF, N. M. et al. Development of a high-throughput screen for soluble epoxide hydrolase inhibition. **Analytical biochemistry**, v. 355, n. 1, p. 71-80, Aug 2006.

WOO, J. et al. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Novosphingobium aromaticivorans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 873-881, Nov 2009.

WOO, M. H.; KIM, H. S.; LEE, E. Y. Development and characterization of recombinant whole cells expressing the soluble epoxide hydrolase of *Danio rerio* and its variant for enantioselective resolution of racemic styrene oxides. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 384-391, Jan 2012.

WOODY, R. W. [4] Circular dichroism. **Methods in enzymology**, v. 246, p. 34-71, 1995.

XU, D. et al. A potent soluble epoxide hydrolase inhibitor, t-AUCB, acts through PPAR γ to modulate the function of endothelial progenitor cells from patients with acute myocardial infarction. **International journal of cardiology**, v. 167, n. 4, p. 1298-1304, Aug 2013.

YILDIRIM, D. et al. Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase. **Enzyme and microbial technology**, v. 49, n. 6, p. 555-559, Dec 2011.

YU, Z. et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. **Circulation research**, v. 87, n. 11, p. 992-998, Nov 2000.

YU, C. et al. Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides. **Journal of biotechnology**, v. 166, n. 1, p. 12-19, Jun 2013.

ZAFRA, G. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1034-1042, Aug 2015.

ZHANG, Q. et al. Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 2, p. 153-164, Feb 2005.

ZHANG, L.; WU, J.; FENG, H. Homology modelling and site-directed mutagenesis studies of the epoxide hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biochemistry**, v. 149, n. 6, p. 673-684, Feb 2011.

ZHANG, Y. et al. Chiral HPLC determination and stereoselective pharmacokinetics of tetrahydroberberine enantiomers in rats. **Chirality**, v. 24, n. 3, p. 239-244, Jan 2012.

ZHANG, G.; KODANI, S.; HAMMOCK, B. D. Stabilized epoxygenated fatty acids regulate inflammation, pain, angiogenesis and cancer. **Progress in lipid research**, v. 53, p. 108-123, Jan 2014.

ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. **Journal of biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 241-249, Jul 2002.

ZHONG, J.; ZHANG, Z.; LI, L. mEH Tyr113His polymorphism and the risk of ovarian cancer development. **Journal of ovarian research**, v. 6, n. 1, p. 40, Jun 2013.

ZOCHER, F. et al. A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 3, p. 345-351, Jun 1999.

ZOCHER, F. et al. Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains. **Journal of biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 287-292, Feb 2000.

ZOU, J. et al. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. **Structure**, v. 8, n. 2, p. 111-122, Feb 2000.