

**CECÍLIA FONSÊCA CARVALHO**

**Caracterização Funcional e Estrutural  
de uma enzima Lipolítica encontrada na  
Biblioteca Metagenômica de Solo de  
Terra Preta de Índio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Microbiologia

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo  
Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica  
encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB  
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações  
da USP (BDTD).

São Paulo  
2015

## RESUMO

CARVALHO, C. F. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma enzima Lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio**. 2015. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O solo é um habitat com elevada diversidade bacteriana e com alto potencial biotecnológico pouco explorado na busca por enzimas de interesse industrial. Devido à incapacidade de muitos micro-organismos crescerem em meios de cultivo tradicionais, técnicas que possibilitam o acesso a essas informações, por meio da extração do DNA total das amostras ambientais e construção de bibliotecas metagenômicas foram desenvolvidas. As enzimas são catalisadores naturais produzidas por seres vivos, e dentre estas, as hidrolases, grupo que inclui as lipases e as esterases, possuem posição proeminente por promoverem a hidrólise de matérias-primas de alto valor agregado. As enzimas lipolíticas consistem do terceiro maior grupo entre as enzimas de importância industrial, e o crescimento exponencial da sua utilização, na fabricação de biopolímeros, biodiesel, e nas indústrias de alimentos, laticínios, roupas e de medicamentos são indicadores da crescente demanda pela necessidade de isolar novos genes com diferentes características bioquímicas. Os genes codificadores das lipases microbianas são mais estáveis e de fácil manipulação genética do que os correspondentes em plantas e animais, e podem ser encontrados em uma variedade de habitats, incluindo solos e sedimentos. Dentro deste cenário, a busca por novas lipases/esterases e seu estudo bioquímico podem gerar novos produtos de interesse industrial.

Neste trabalho, uma triagem funcional da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio revelou 4 clones com atividade triacil-hidrolásica, designados Fos1, Fos2, Fos3 e Fos4. O gene lipolítico *lip4*, proveniente do clone fosmidial Fos4, apresentou o maior halo de degradação em meio ágar tributirina, e foi selecionado para estudos mais detalhados, para isto o gene foi sequenciado e apresentou similaridade com um domínio conservado da enzima  $\beta$ -ceto adipato enol-lactona hidrolase, participante na via  $\beta$ -ceto adipato de degradação de ésteres aromáticos. A enzima Lip4 possui uma cadeia polipeptídica de 268 aminoácidos e massa molecular de 29 kDa, e foi identificada como membro da família V das lipases bacterianas, da subfamília V.2. O gene *lip4* foi clonado em vetor de expressão

pET28a, super-expresso na cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) RP e a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, e submetidos a ensaios de cristalização.

Cristais de Lip4 difrataram até 2.3 Å de resolução, pertencendo ao grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, com 4 moléculas na unidade assimétrica, ensaios de cromatografia de exclusão por tamanho mostrou que Lip4 é um monômero. A estrutura tridimensional da Lip4 identificou a presença do dobramento conservado das  $\alpha/\beta$  hidrolases e de uma sequência de  $\alpha$ -hélices na porção mais flexível da molécula, possivelmente sendo o domínio CAP, além da localização da tríade catalítica, Ser<sup>94</sup>-Asp<sup>217</sup>-His<sup>245</sup>. Dois mutantes foram construídos mudando a serina do sítio ativo por uma alanina Lip4<sub>S94A</sub>, e por uma cisteína, Lip4<sub>S94C</sub>. Estes mutantes foram analisados por ensaios de dicroísmo circular e atividade hidrolítica em placa, e foi observado a perda da atividade enzimática, entretanto a conformação da estrutura secundária manteve-se inalterada.

Testes cinéticos preliminares usando como substrato ésteres *p*-nitrofenila octanoato (pNPC8) indicaram que Lip4 tem preferência por pHs alcalinos, com melhor atividade entre os pHs 8 e 9. Estes resultados apresentados sugerem que Lip4 é uma nova esterase e a segunda enol-lactona hidrolase cristalizada e caracterizada, possibilitando um melhor conhecimento sobre o mecanismo catalítico dessas enzimas cruciais na via  $\beta$ -cetoadipato

**Palavras-chave:** Esterase. Metagenômica. Tributirina. Cristalografia de raio-X

## ABSTRACT

CARVALHO, C. F. **Functional and Structural Characterization of lipolytic enzyme present in Soil Metagenomic Library of Terra Preta de Índio**. 2015. 161 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Soil environment has a big bacterial diversity and the biotechnological potential has been underexplored in the search for industrial interest enzymes. Due to the inability of many microorganisms grow in traditional culture medium, special techniques have been developed to give access to ecosystem information, one of those techniques is made based in extracting of total DNA from the environment without prior cultivation, and metagenomics libraries have been developed using this techniques. Enzymes are able to catalyse different biochemistry reaction as hydrolases, that includes lipases and esterases, and these class of enzymes have important position for promoting raw material hydrolysis with added values. Lipolytic enzymes comprises the third largest group among enzymes with industrial value, and the exponential growth in the biopolymers production, biofuels and in the dairy, food, clothing and medicines industry, indicate the need to discovery new genes that codes enzymes with different biochemical characteristics. Those genes encoding microbial lipases are more stable and easily manipulated than the corresponding genes in plants and animals, and can be found in a variety of habitats, including soil and sediments. In this overview, a search for new lipases/esterases and their biochemical understanding could promote new industrial interest products.

In this work, a functional screening of soil metagenomic library of Terra Preta de Índio revealed four clones with triacyl hydrolysis activity named as Fos1, Fos2, Fos3 and Fos4. The lipolytic gene *lip4*, isolated from fosmidial clone Fos4, showed the major hydrolysis degradation halo in tributyrin agar, and was selected to further studies. This gene was sequenced and showed similarity with a conserved domain of 3-oxoadipate enol-lactone hydrolase, integrant in the  $\beta$ -keto adipate pathway in the aromatic esters degradation. The Lip4 enzyme has a polypeptide chain with 268 residues and molecular weight of 29 kDa. Analysis of the sequence of Lip4 showed that it belongs to family V of bacterial lipases, subfamily V.2. The *lip4* gene was

cloned into expression vector pET28a, the enzyme was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) RP cells, purified by nickel affinity column chromatography and subjected to crystallization trials.

Lip4 crystals diffracted to 2.3 Å resolution, belonging to spacial group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, with 4 molecules in the asymmetric unit, exclusion chromatography analysis demonstrated that Lip4 is a monomer in solution. Three dimensional structure of Lip4 identified a conserved  $\alpha/\beta$  hydrolase backbone and a  $\alpha$ -helices sequence in the most flexible portion of the protein suggesting to be the CAP domain. The catalytic triad Ser<sup>94</sup>-Asp<sup>217</sup>-His<sup>245</sup> was identified. Two mutants were built by changing the serine residue of active site to an alanine (Lip4<sub>S94A</sub>) and to a cysteine (Lip4<sub>S94C</sub>). Circular dichroism and hydrolytic activities were performed using the mutants and showed a loss of enzymatic activities, despite the secondary structure remained the same than the wild type protein.

Preliminary kinetic tests using p-nitrophenyl octanoate esters as substrate (pNPC8) indicated that Lip4 acts preferentially in alkaline pH, with better activity between pH 8 and 9. In conclusion, Lip4 is a new esterase and it is the second enol-lactone hydrolase with the three dimensional structure solved. The biochemistry assays together with the three dimensional structure will give us the better understanding of enzymatic catalytic mechanism that belongs to the  $\beta$ -ketoacid pathway.

**Keywords: Esterase. Metagenomic. Tributyrin. X-ray Crystallography**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Solo como fonte de diversidade de Micro-organismos

A fertilidade dos solos foi associada, na última década, a existência de uma alta diversidade de micro-organismos nesse habitat (ZILLI et al., 2003). Os solos constituem um dos principais ecossistemas com uma extensa variedade microbiana, principalmente de procaríotos, que ainda não foi bem caracterizada (WARD, 2003). É sabido que um grama de solo pode conter mais de dez mil espécies de bactérias, arqueias, vírus e micro-organismos eucarióticos (TORVISK; OVREAS, 2002), entretanto, apenas 1% do total, é conhecido e cultivado em meio de cultura por técnicas tradicionais de cultivo (CURTIS; SLOAN, 2005). O avanço na área molecular com desenvolvimento de novos mecanismos de rastreamento por genes ainda não descritos, vem reduzindo essas limitações e difundindo uma nova compreensão sobre a diversidade microbiana, indicando que a caracterização da microbiota não-cultivável, utilizando-se de métodos de biologia molecular é uma importante ferramenta para a identificação e conhecimento da distribuição e funções destes no meio ambiente (RONDON et al., 1999). Recentemente foi descoberto um novo composto antibiótico, a partir de bactérias não-cultiváveis de solo, nomeado teixobacina, empregando uma nova técnica que permite a recuperação de até 50% das bactérias crescidas em uma câmara de difusão *in situ*, do que em comparação com o 1% do crescido em meio rico (LING et al., 2015).

Os micro-organismos presentes nos solos, estão sujeitos a estresses bióticos (competição, parasitismo) e abióticos (flutuações de temperatura, níveis de umidade), levando a um ecossistema dinâmico, promovendo uma variedade de interações e funções microbianas (KAKIRDE et al., 2010). Estão envolvidos em muitos processos no ecossistema, incluindo biodegradação, decomposição e mineralização, ciclagem de nutrientes inorgânicos e remoção de poluentes (BROSSI et al., 2014). A existência de um enorme conjunto genético e biológico presente nos solos ainda a ser explorado para a descoberta de novos genes, vias metabólicas inteiras e seus produtos funcionais (COWAN, 2000), e devido principalmente ao seu histórico como fonte de moléculas comercialmente importantes nas áreas químicas, farmacêuticas e biotecnológicas, tornaram esse habitat alvo de estudos metagenômicos (DANIEL, 2005; MACNEIL et al., 2001). Os solos são um dos

principais focos da era biotecnológica na busca de soluções nos setores alimentícios, de saúde e industrial, levando a uma necessidade de aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos.

As condições ambientais da Amazônia favorecem altas atividades metabólicas e o elevado crescimento microbiano, o que é útil para encontrar novos e bons recursos enzimáticos. Setenta e cinco clones positivos para atividade lipolítica, foram isoladas de solos Amazônicos, demonstrando o grande potencial do recurso microbiano nesta área (WILLERDING et al., 2011), indicando ser uma rica fonte de diversidade genética ainda não totalmente caracterizada e com um enorme potencial a ser desvendado sobre enzimas e compostos bioativos úteis à sociedade humana.

## **1.2 Solo de Terra Preta de Índio (TPI)**

Os solos de Terra Preta Antropogênica (TPA), localmente conhecida como Terra Preta de Índio (TPI), apresentam ampla distribuição na região Amazônica (FIGURA 1), ocorrendo principalmente na periferia de áreas não inundáveis, representados pelas florestas de terra-firme (LIMA, 2002). São encontrados sob a forma de manchas espessas não contínuas de coloração pretas ou marrom escuras, ao longo das margens do rio Amazonas, com elevado teor de nutrientes, destacando-se os íons cálcio e fósforo, e com vegetação formada por latossolo amarelo (TEIXEIRA; MARTINS, 2003). Possuem uma alta fertilidade quando comparado aos solos adjacentes, devido ao elevado teor de matéria orgânica depositada e da intensa atividade biológica presente nesse habitat (LEHMANN et al., 2003). A matéria orgânica do solo compreende componentes vivos e não-vivos. Os vivos são as raízes de plantas e os organismos do solo, constituindo aproximadamente 4% do total. Os componentes não-vivos, que correspondem a grande maioria, representam a matéria macroorgânica, constituída de resíduos de plantas em decomposição, e substâncias de coloração escura, apresentando alto teor de carbono formado principalmente por estruturas aromáticas, denominado de material húmico (PRIMO et al., 2011). A formação dos solos de TPI ocorreu pelo depósito progressivo de materiais e compostos orgânicos, como carvão vegetal, ossos e cerâmicas, que gradualmente modificaram as propriedades físicas e químicas desses solos, tendo como resultado, uma conversão de solos Amazônicos





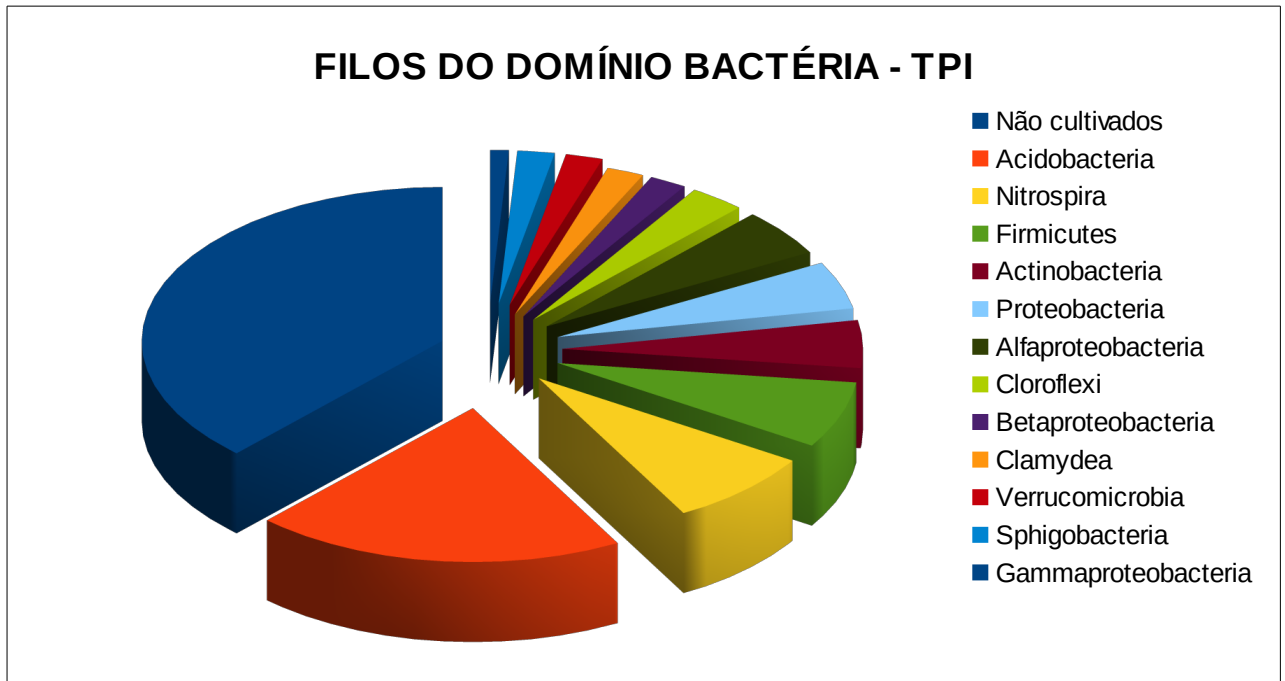
Caracterizam-se por serem solos ácidos com pH em torno de 5,2 a 6,4. A coloração escura é resultante de uma intensa decomposição de material orgânico depositado pelo homem. Vestígios de ocupação humana, primeiramente indígena, devido facilidade de colher tudo o que foi plantado, e posteriormente pela ocupação colonialista, podem-se ser confirmados pela presença de restos de materiais, como cerâmicas, carvão e artefatos líticos encontrados nessas áreas (GLASER et al., 2001). Resíduos de origem vegetal (folhas, sementes, cascas de frutos e talos de árvores) e animal (ossos, carapaças de quelônios, detritos humanos e gordura animal), além de grande quantidade de carvão vegetal (cinzas e restos de fogueiras) contribuíram enormemente para tornar o solo de TPI fértil (MADARI et al., 2010).

A presença de um solo que sofreu diversas ações antropogênicas durante os anos, pode ter permitido o surgimento de bactérias transitórias, ou seja, não pertencem normalmente ao solo, mas apareceram no habitat devido às condições favoráveis e a formação de substratos específicos, e assim, tornaram o solo mais útil para a agricultura (DROZDOWICZ, 1997; HANDELSMAN et al., 1998). Provavelmente, os solos de Terras Pretas constituem micro-ecossistemas próprios, que não se exaurem rapidamente, mesmo sob constante exposição das condições climáticas tropicais ou uso na agricultura, garantindo com isso, o desenvolvimento de pesquisas sobre a diversidade microbiana presente no solo de TPI.

Entretanto estudos de diversidade do solo de TPI utilizando o marcador filogenético 16S rRNA, permitiram averiguar os micro-organismos do Domínio Bactéria presentes nesse tipo de solo (FIGURA 2), onde pode-se observar que a maioria apresentada foi de bactérias não cultivadas, seguido de bactérias do gênero *Acidobacteria*, que englobam as bactérias ácido-tolerantes, o que corrobora com o fato de solo de TPI ter pH ácido (BATISTA, 2009).

Em solos com origem antropogênica, é previsível que comunidades microbianas distintas possam apresentar funções únicas e especializadas, com a capacidade de reter carbono altamente instável. Com base nisso, genes codificando importantes passos no ciclo do carbono, continuam escassos. A biodegradação por meio da atividade bacteriana é um dos mais importantes processos ocorrendo nos solos em relação a reciclagem de matéria orgânica, envolvendo genes que atuam em passos chaves no ciclo do carbono, bem como a degradação de poluentes no

ecossistema (Iwai et al., 2010). Esses resultados promovem bases para investigação de novas enzimas com potencial uso na biodegradação e biotecnologia industrial.



**FIGURA 2** – Diversidade bacteriana dos solos de TPI.

Análises dos clones obtidos de uma biblioteca genômica de 16S rRNA nos solos de TP.

FORTE: Adaptado BATISTA (2009).

### 1.3 Compostos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos são estruturalmente diversos e são uma abundante fonte de carbono e energia para crescimento de micro-organismos que os utilizam como substratos, sendo encontrado em todos organismos na forma de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Representam cerca de 20% da biomassa de plantas terrestre devido a uma grande variedade de produtos secundários que estas produzem, e também pela presença do polímero aromático lignina, que é formada por unidades de fenilpropano, cuja a transformação incompleta resulta na formação de húmus, tornando o solo fértil. Embora sejam as plantas as principais produtoras dos compostos aromáticos, estas não possuem vias de degradação para reciclagem do carbono, necessitando do auxílio de bactérias degradadoras aeróbias e anaeróbias, que possuem um papel central na reciclagem

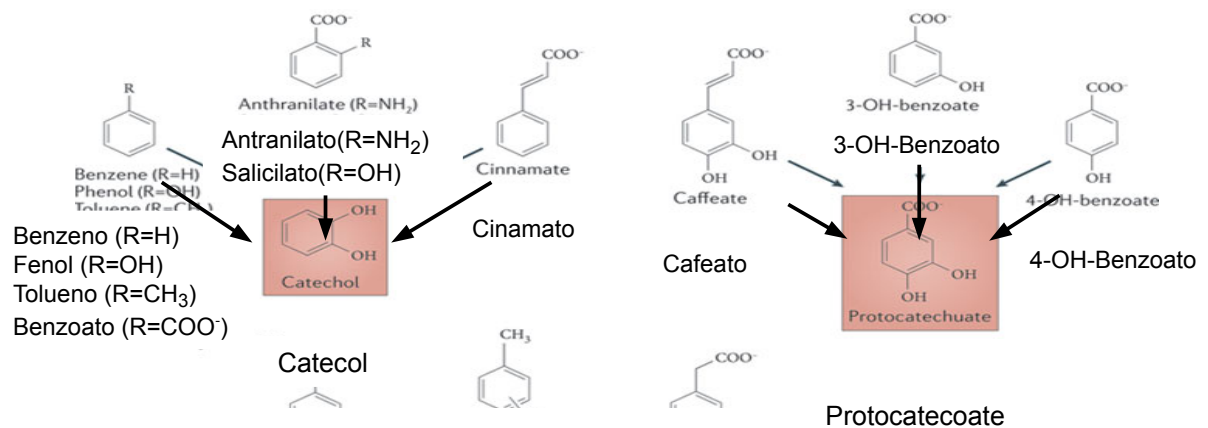
do carbono a partir de compostos que contém em sua fórmula anéis aromáticos (FUCHS et al., 2011).

A degradação microbiológica de compostos aromáticos tem sido extensivamente estudada devido à sua importância no ciclo do carbono bioquímico. Uma vez que muitos compostos aromáticos estão entre os principais poluentes ambientais derivados do petróleo (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), a sua detecção e remoção de locais contaminados são de grande interesse biotecnológico (DÍAZ et al., 2013). Primeiro ocorre a conversão dos compostos cíclicos estáveis e insaturados em intermediários capazes de entrar na via metabólica central. Entretanto, a estabilidade química dos hidrocarbonetos torna difícil sua metabolização pelos micro-organismos, a não ser que eles possuam vias de biodegradação alternativas especializadas envolvendo enzimas que catalisam reações químicas, ativando os anéis aromáticos e fragmentando-os em produtos mais facilmente metabolizados (HADDOCK, 2010). As estratégias usadas pelas bactérias para ativar e clivar os anéis aromáticos, dependem primeiramente da biodisponibilidade de oxigênio, onde na ausência de O<sub>2</sub>, ocorrem reações de redução, e no catabolismo aeróbio, o átomo de oxigênio atua tanto quanto acceptor final quanto co-substrato para alguns processos específicos (FUCHS et al., 2011).

### 1.3.1 Degradação de compostos aromáticos

A degradação de compostos aromáticos por bactérias aeróbias encontradas no ambiente geralmente demandam de uma transformação inicial de vias periféricas convergindo de diferentes compostos iniciais para um número limitado de substratos derivados de dihidroxi-benzeno como, catecol ou protocatecoate, como pré-requisito para clivagem do anel (FIGURA 3) (SCHLÖMANN et al., 1994).

A desassimilação aeróbia para reciclagem do carbono ocorre em 3 etapas como pode ser observado na FIGURA 4. No primeiro estágio, o substrato sofre mudanças no grupo substituinte pela introdução de grupos hidroxilas por uma mono ou dioxigenase, para produzir um metabólito diidroxiaromático. Esses metabólitos, geralmente catecóis ou protocatecoates, estão presentes no catabolismo aeróbico de todos os substratos aromáticos (WILLIAMS; SAYERS, 1994).

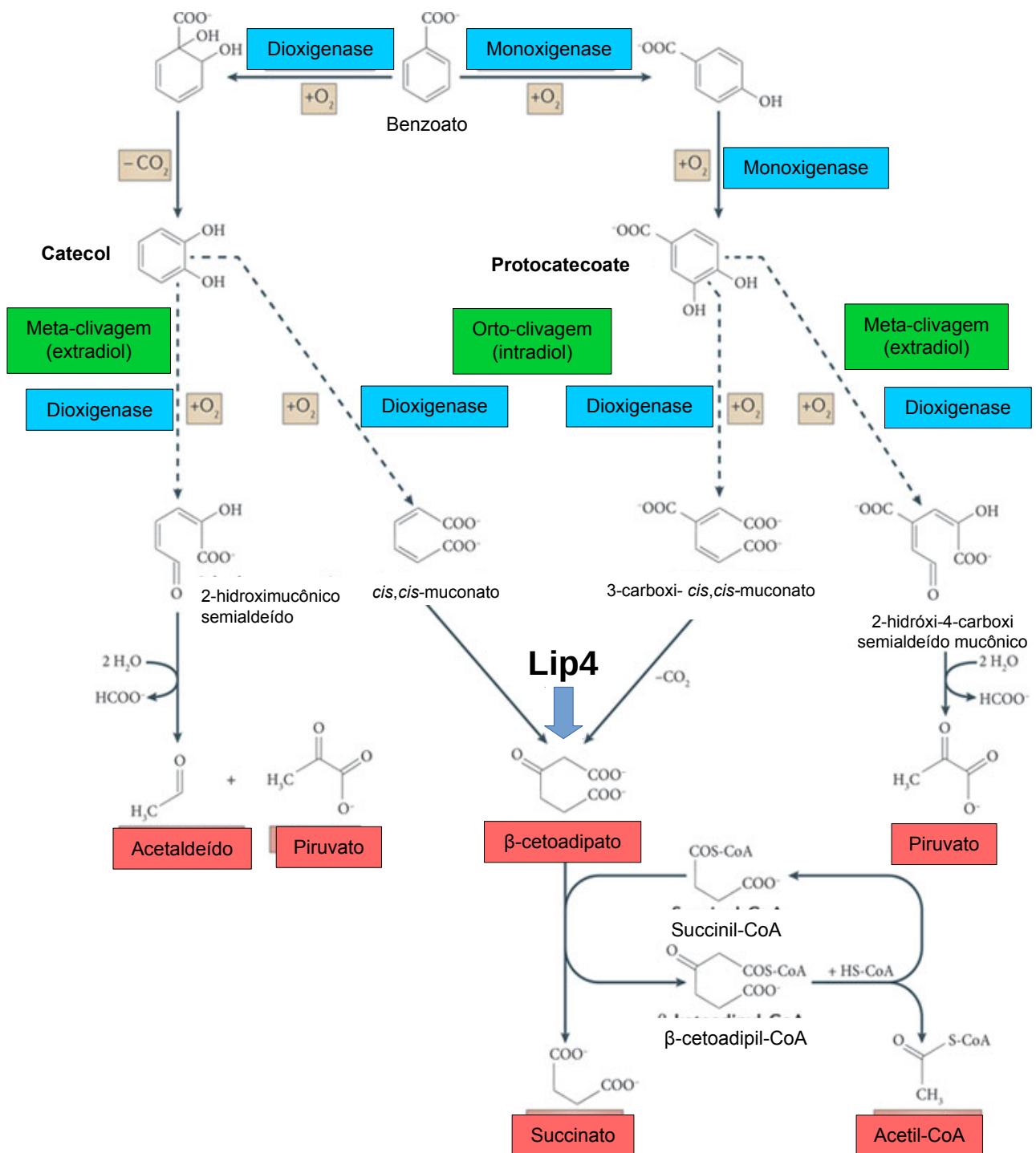


**FIGURA 3** – Vias periféricas na degradação de compostos aromáticos.

Algumas vias aeróbias produzem catecol e protocatecoate como intermediários centrais, utilizados como substratos pelas dioxigenases para clivagem do anel. FONTE: Adaptado Fuchs; Boll; Heider (2011).

Os catecóis são substratos do segundo estágio do catabolismo, a abertura do anel, que ocorre pela quebra de um dos esqueletos carbono-carbono do anel pela adição de uma molécula de oxigênio, produzindo um ácido alifático insaturado. A clivagem do anel catalisada por dioxigenases é conhecida como orto-clivagem quando ocorre entre grupos hidroxilas (clivagem intradiol) e meta-clivagem quando ocorre adjacente a um dos anéis hidroxila (extradiol clivagem). O terceiro estágio consiste na conversão do produto do anel clivado em pequenos compostos alifáticos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, que são direcionados para o metabolismo central. Essa descircularização do anel aromático permite ao produto ser canalizado nas vias do metabolismo central celular e apoiar crescimento microbiano (WILLIAMS; SAYERS, 1994).

O interesse em estudar o metabolismo microbiano de compostos aromáticos decorre de seu importante papel no ciclo global do carbono e seu impacto direto na biorremediação de ecossistemas poluídos. Além disso, muitas das enzimas envolvidas nas vias de degradação são catalisadores chave em biotecnologia industrial (ISMAIL; GESCHER, 2012).



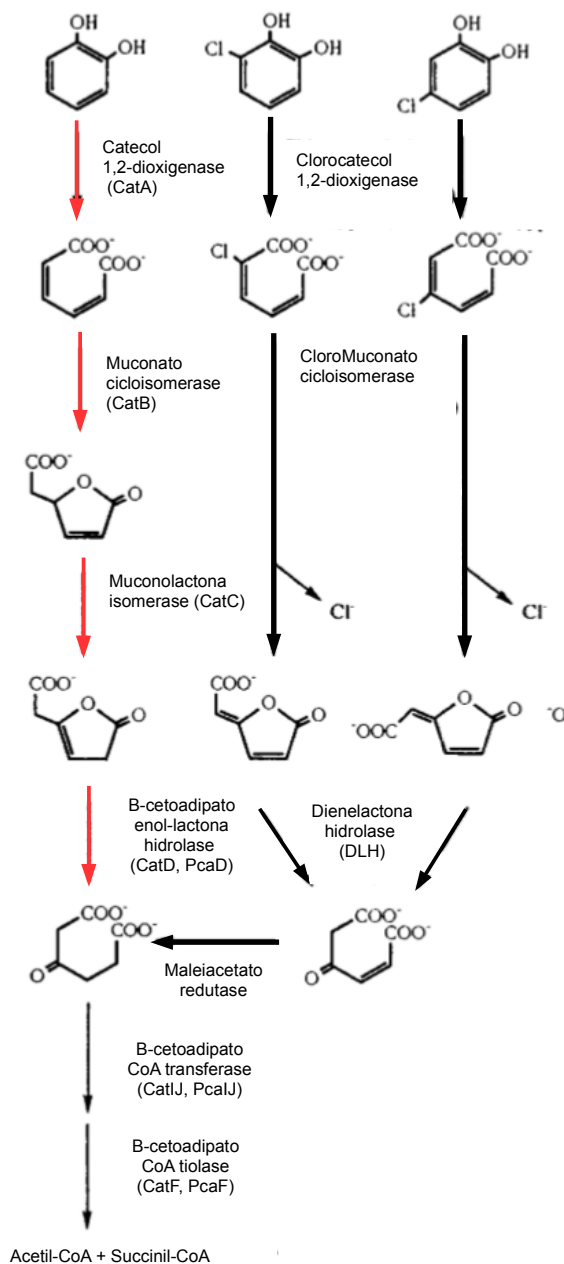
**FIGURA 4** – Degradação aeróbica do benzoato em bactérias e fungos como exemplo de uma clivagem do anel aromático.

A clássica estratégia da clivagem do anel aromático na presença de  $\text{O}_2$ , onde o benzoato é convertido a protocatecoate por mono ou dioxigenases, enquanto a grande maioria forma catecol. A clivagem do anel pela dioxigenase na via central pode ser entre dois grupos hidroxilas (orto-clivagem ou via  $\beta$ -cetoadipato) ou próximo a um dos grupos hidroxilas (meta-clivagem). FONTE: Adaptado Fuchs; Boll; Heider (2011).

### 1.3.2 Via $\beta$ -cetoadipato

A via  $\beta$ -cetoadipato é uma via codificada cromossomalmente tanto em micro-organismos aeróbios quanto anaeróbios degradadores de compostos aromáticos, amplamente distribuída entre espécies de eubactérias e fungos, não sendo descrita entre membros das arqueias. A rota catabólica aeróbia é bem melhor estabelecida e conhecida por ser um intermediário chave entre as duas vias distintas na degradação de compostos aromáticos, o protocatecoate e o catecol. Na orto-clivagem, um ramo converte o substrato protocatecoate, que é um produto derivado de compostos fenólicos. A clivagem inicia-se pela ação da enzima 3,4-dioxigenase (E.C. 1.13.11.3) (gene *pcaA*), seguida de cinco enzimas adicionais, como a 3-carboxi-*cis,cis*-muconato cicloisomerase (E.C. 5.5.1.2) (gene *pcaB*), 4-carboximuconolactona decarboxilase (E.C. 4.1.1.44) (gene *pcaC*),  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona hidrolase (E.C. 3.1.1.24) (gene *pcaD*), succinil-CoA:  $\beta$ -cetoadipato CoA-transferase (E.C. 2.8.3.6) (gene *pcaI/J*), e 3-oxoadipil-CoA-tiolase (gene *pcaF*), que convertem a clivagem do anel em produtos intermediários do ciclo do ácido carboxílico (FIGURA 4) (EULBERG et al., 1998). O outro ramo converte o substrato catecol, gerado a partir de vários hidrocarbonetos aromáticos, compostos aromáticos aminados, e monômeros de lignina. A clivagem do anel começa pela ação da enzima 1,2-dioxigenase (E.C. 1.13.11.1) (codificada pelo gene *catA*), seguida das enzimas *cis,cis*-muconato cicloisomerase (E.C. 5.5.1.1) (gene *catB*) e Mucolactona isomerase (E.C. 5.3.3.4) (gene *catC*), e então a abertura do anel lactona pela  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona hidrolase (E.C. 3.1.1.24) e formação do produto  $\beta$ -cetoadipato (FIGURA 5) (HARWOOD; PARALES, 1996; ISMAIL; GESCHER, 2012).

Essa via foi identificada quase que exclusivamente em micro-organismos de solo, como forte representação em grupos de bactérias que estão associadas com plantas, tendo em vista o grande número de compostos fenólicos sintetizados por estas durante o crescimento, como por exemplo a lignina, que é um polímero encontrado na madeira (HARWOOD; PARALES, 1996).



**FIGURA 5** – Comparação entre as vias orto-clivagem  $\beta$ -cetoadipato e orto-clivagem modificada codificada em plasmídeos. Vias paralelas para degradação do catecol (seta vermelha) e alguns clorocatecóis (seta preta). FONTE: Adaptado Harwood e Parales (1996).

### 1.3.3 Via orto-clivagem modificada e a enzima Dienelactona hidrolase (DLH)

O ramo catecol da via  $\beta$ -cetoadipato é precursor evolutivo de partes de uma terceira via de degradação de compostos aromáticos, conhecida como a via do clorocatecol, que catalisa a quebra de hidrocarbonetos aromáticos metilados como tolueno e xileno. É chamada também de via orto-clivagem modificada, e sua transmissão entre micro-organismos, ocorre por plasmídeos. A dienelactona hidrolase (DLH) é a terceira enzima participante do ramo do clorocatecol e catalisa a hidrólise de do substrato dienelactona entre as formas enantiômeras (*E*) e (*Z*) (KIM et al., 2005). Na fase inicial de preparação do anel para as subseqüentes clivagens, ocorre a decloração do anel e formação de uma dienelactona, enzima correspondente a  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona formada na via  $\beta$ -cetoadipato. As enzimas que catalisam o passo de hidrólise do anel lactona demonstram diferenças significativas. Embora a dienelactona hidrolase da via orto-clivagem modificada e a  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona hidrolase da via  $\beta$ -cetoadipato sejam relacionadas, dados de seqüência mostram que ambos grupos de enzimas não compartilham de uma identidade na seqüência de aminoácidos (HARWOOD; PARALES, 1996), apesar de ambas apresentarem características do dobramento das  $\alpha/\beta$  hidrolases (OLLIS et al., 1992).

A DLH foi primeiramente identificada na espécie bacteriana *Pseudomonas* sp. B13 com uma massa molecular de 25,5 kDa e a tríade catalítica consistindo de uma cisteína nucleofílica (C<sup>123</sup>), aspartato (D<sup>171</sup>) e histidina (H<sup>202</sup>) (OLLIS; NGAI, 1985). Mutações no resíduo catalítico para uma serina (DLH<sub>C123S</sub>) tornaram a enzima pouco ativa para catálise do anel lactona do substrato dienelactona, mas capaz de interconverter entre as formas isoméricas (*E*) e (*Z*) (WALKER; EASTON; OLLIS, 2000). Embora haja uma semelhança estrutural da  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona e dienelactona, a enol-lactona hidrolase (ELH) não foi aparentemente adaptada para converter dienelactonas da via clorocatecol durante a evolução das proteobactérias (SCHLÖMANN et al., 1990).

Uma comparação entre uma  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona hidrolase, obtida a partir de uma *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDBID: 2XUA), conhecida como PcaD, e uma dienelactona hidrolase (DLH) permitiu observar diferenças significativas na composição e estrutura do domínio CAP entre essas duas enzimas.



Essas regiões divergentes são intrigantes, pois o ramo catecol foi precursor evolucionário de partes da via clorocatecol (HARWOOD; PARALES, 1996). A PcaD possui um sítio ativo mais ocluso, onde a tríade catalítica está numa conformação mais torcida e menos exposta a solventes, permitindo apenas o acesso de um substrato pequeno e naturalmente torcido, oposto da DLH que possui um sítio ativo mais raso, favorecendo a ligação de um substrato linear como a diene lactona (BAINS et al., 2011).

É importante salientar que a degradação do clorocatecol para utilização como fonte de carbono e energia pelas células bacterianas, requer duas enzimas da via  $\beta$ -cetoadipato, que não são codificadas em plasmídeos na via da orto-clivagem modificada, sendo necessário que a via  $\beta$ -cetoadipato esteja presente e ativa na célula hospedeira (FIGURA 48) (HARWOOD; PARALES, 1996).

#### 1.3.4 Aplicações favoráveis da via $\beta$ -cetoadipato

Uma compreensão melhorada dos efeitos dos poluentes ambientais causados por compostos aromáticos originados por resíduos industriais, agrícolas, médicos e municipais tem estimulado pesquisas a respeito de um efetivo tratamento desses contaminantes e elaboração de estratégias de biorremediação. Micro-organismos capazes de degradar o anel aromático pela via  $\beta$ -cetoadipato estão tendo suas rotas catabólicas estudadas com objetivo de conhecer o processo de degradação microbiana e a subsequente conversão desses produtos em metabólitos favoráveis e com valor agregado (OLANIRAN; IGBINOSA, 2011).

Aplicações recentes discutiram a incorporação da via  $\beta$ -cetoadipato como meio para converter resíduos aromáticos de lignocelulose da parede celular de plantas em lipídios apropriados usados como combustível renovável e biodegradável, o biodiesel (WELLS; RAGAUSKAS, 2012). Os lipídios acumulados durante o processo de biossíntese metabólica dos ácidos graxos podem ser transesterificados com álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) em ácidos graxos etil ou metil ésteres que são convenientes para aplicações como alternativas de energia sustentável (KOSA; RAGAUSKAS, 2011).

O potencial uso da via  $\beta$ -cetoadipato para produção de bioenergia a partir de uma plataforma suplementar sustentável pode suprir a crescente demanda por

energia primária que tende a crescer aproximadamente 35% até 2040 (EXXONMOBIL, 2015). As modernas técnicas denominadas “ômicas” possibilitaram investigar o potencial catabólico dos micro-organismos sem a necessidade de cultivá-los por técnicas tradicionais de cultivo, e assim resgatar atividades enzimáticas que são relevantes para degradação de poluentes no ecossistema (oxigenases, hidrolases, esterases), por meio da extração do DNA total do ambiente de estudo e construção de uma biblioteca de genes capazes de serem rastreados para as mais diversas funções.

#### **1.4 Metagenômica**

As limitações impostas pelas técnicas de cultivo propiciam uma elevada taxa de redescoberta de compostos e enzimas já relatados. Visando descrever os micro-organismos que não foram cultivados e seus bioprodutos, foi desenvolvida uma técnica baseada na extração total do DNA a partir da coleção dos genomas da microbiota total de um habitat (HALEY et al., 1995), sendo mais tarde o termo cunhado de metagenômica (HANDELSMAN et al., 1998). Essa estratégia permite um maior acesso às informações genéticas dos micro-organismos, sendo considerada uma poderosa ferramenta com o objetivo de explorar a vasta biodiversidade das comunidades microbianas e possibilitar uma avaliação detalhada sobre a fisiologia e função de bactérias ainda não cultivadas (DANIEL, 2005; RIESENFELD et al., 2004; STEELE; STREIT, 2005)

##### **1.4.1 Bibliotecas Metagenômicas**

A construção de bibliotecas metagenômicas baseadas no cultivo independente das comunidades microbianas, tem sido de fundamental importância para descoberta de novos bioativos a partir de fontes procarióticas (VOGET et al., 2003). A exploração de diferentes fontes de biocatalisadores, permitiram acessar um grande número de genes codificando novas enzimas ou até, outras mais eficientes do ponto de vista biotecnológico (DANIEL, 2004; LORENZ et al., 2002;)

O emprego da metagenômica associado com a construção de bibliotecas mostraram alguns resultados positivos ao longo dos anos, como no estudo de genes específicos (STREIT et al., 2004; VOGET et al., 2003), determinação de vias

biossintéticas complexas (COURTOIS et al., 2003; GILLESPIE et al., 2002) ou para descoberta de novas enzimas hidrolíticas, como as amilases (YUN et al., 2004), lipases (HENNE et al., 2000) ou proteases (GUPTA et al., 2002).

#### 1.4.2 Técnicas de Análise do Metagenoma

Uma vez construída, as bibliotecas metagenômicas podem ser rastreadas para uma ampla variedade de fenótipos de interesse tanto ecológico quanto biotecnológico. Existem duas estratégias utilizadas para prospectar novos genes a partir das bibliotecas: o método baseado em função, e o baseado em sequências (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

A estratégia funcional seleciona os clones pela atividade onde mudanças causadas por reações enzimáticas são detectadas, sendo considerada uma técnica simples, barata e rápida, empregada nas áreas médicas, agrícolas e industriais, pois permite maior rapidez na obtenção de clones (RONDON et al., 2000; VOGET et al., 2003). Podem ser realizadas de 3 maneiras: **a.** cada clone é testado individualmente por detecção visual na função desejada (inibição do crescimento, resistência aos antibióticos ou vias bioquímicas complementares), permitindo encontrar um número limitado de clones; **b.** seleção de alta quantidade de clones, utilizando um método rápido e automatizado para separar candidatos desejados de outros clones por triagem de células fluorescentes, técnica denominada por Uchiyama et al. (2005) de SIGEX (Seleção por Expressão Gênica Substrato-Induzida); e **c.** por seleção por função, onde somente um clone raro cresce entre centenas de milhares de clones analisados, em grande parte devido a falta de eficiência de expressão dos genes nas linhagens hospedeiras (HANDELSMAN, 2005). Porém esta estratégia tem potencial para identificar novas classes de genes codificadores tanto para funções conhecidas como para novas funções (KENNEDY et al., 2011).

Já a metodologia baseada em sequências não depende da expressão dos genes clonados (DANIEL, 2004), e sim do desenho de iniciadores para a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) ou sondas de hibridização de genes alvos que são derivados a partir de regiões conservadas das famílias de genes conhecidos (ROH et al., 2007), podendo ser uma desvantagem, pois não é uma técnica seletiva para genes de grande comprimento (KNIETSCH et al., 2003), e isto pode limitar as novas

descobertas, uma vez que necessita de um amplo banco de dados para as análises (DANIEL, 2005; RIESENFELD et al., 2004; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003; YUN; RYU, 2005). Buscando contornar essa desvantagem, foi utilizada a abordagem de sequenciamento do DNA clonado, ou a partir das extremidades pela técnica de metagenoma “walking”, ou pelo sequenciamento de todo o DNA metagenômico de uma determinada amostra por meio de sequenciamento de nova geração (BRAGG; TYSON, 2014; MORIMOTO; FUJII, 2009; VENTER et al., 2004).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de genoma “walking”, para sequenciar o fragmento com atividade hidrolítica, obtido a partir da construção da sub-biblioteca proveniente do clone fosmidial Fos4, e encontrar a sequência de nucleotídeos correspondente ao gene da esterase *lip4*.

#### 1.4.3 Importância da Metagenômica na descoberta de novos biocatalisadores

Substâncias que aumentam a velocidade da reação química sem serem consumidos durante o processo, são conhecidos como catalisadores. A exploração da biodiversidade na busca por novos catalisadores biológicos a partir de micro-organismos está levando a descoberta de novas enzimas (CARVALHO et al., 2005). Os genomas de espécies de procariotos não cultivados codificam uma enorme reserva de novas enzimas com capacidades metabólicas ainda inexploradas (SIMON; DANIEL, 2011).

As enzimas apresentam uma função catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Possuem alto grau de especificidade por seus substratos, acelerando reações químicas de uma maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH e estas são conhecidas por serem biocatalisadores naturais (SANGEETHA et al., 2011).

O aprimoramento da moderna técnica metagenômica permitiu descobrir a partir de micro-organismos, novas enzimas hidrolíticas, como as lipases (HENNE et al., 2000; MEILLEUR et al., 2009), esterases (CHU et al., 2008; KIM et al., 2006), xilanases (HU et al., 2009), celulases (DUAN, et al. 2009; HEALY et al., 1995;), amilases (RONDON et al., 2000; VOGET et al., 2003), quitinases (COTTRELL et al., 1999) provenientes de diversas fontes de cultivo. Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse biotecnológico, estão as lipases e esterases, que são

biocatalisadores versáteis capazes de atuar em diferentes reações, tanto na presença de água, quanto em meio restrito ou insolúvel.

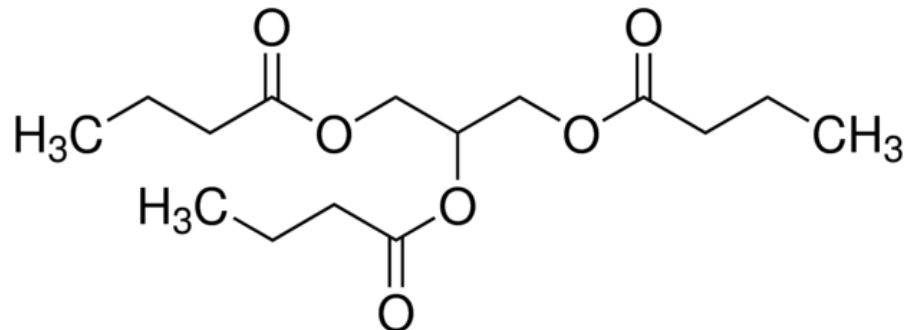
As lipases e esterases possuem uma gama de aplicações biotecnológicas, que vão desde indústria de alimentos até a produção de perfumes e desenvolvimento de fármacos. Por meio da ferramenta metagenômica mais de 80 novas enzimas lipolíticas foram identificadas, porém poucas foram caracterizadas, o que é de fundamental interesse para as aplicações em processos biotecnológicos (SHARMA et al., 2001). A busca novas enzimas lipolíticas com características diferenciadas para as diversas aplicações industriais, como por exemplo, a produção de energia renovável, vem crescendo ao longo dos anos, devido principalmente a modernização das técnicas moleculares (WELLS; RAGAUSKAS, 2012).

#### 1.4.4 Tributirina como substrato

A demanda industrial por novas fontes de lipase continua a estimular o isolamento e rastreio de novos micro-organismos lipolíticos. Diferentes métodos de detecção e determinação da atividade lipolítica são empregados, e um dos mais práticos e de fácil acesso são os substratos naturais como a tributirina e a trioleína, que permitem a visualização do halo hidrolítico ao redor da colônia. A tributirina é um substrato oleoso composto de uma molécula resultado da condensação do glicerol e três moléculas de ácido butírico (FIGURA 6) (ALDRICH, 2015). Entretanto, devido a sua facilidade de dispersão em água, é mais conveniente que a trioleína, uma vez que este é insolúvel em água e sua estabilidade depende de um emulsificador uniforme (LIMA, 1991).

Portanto, o uso de tributirina é adequada para rastreios preliminares de um grande número de diferentes micro-organismos, uma vez que esse método oferece algumas vantagens como: medição fácil com surgimento de uma zona clara bem definida no meio opaco que pode ser percebida num curto período de incubação; medição da atividade durante o crescimento do cultivo; re-isolamento dos clones após ensaio; além de ser um método sensível pela detecção da hidrólise em baixas atividades (LIMA, 1991). Entretanto, como esse substrato detecta a hidrólise tanto de esterases, quanto de lipases, novos ensaios com meio de cultura suplementado

com óleo de oliva tem sido empregados na busca por colônias lipases-positivas (HUBE et al., 2000; KIM et al., 2001).



**FIGURA 6** – Fórmula estrutural da tributirina.  
Substrato lipídico derivado de uma molécula de glicerol e três ácidos butíricos (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>).

### 1.5 Enzimas

Enzimas são catalisadores naturais, possuindo propriedades únicas que as tornam altamente desejáveis na natureza para aplicações em processos industriais. Isto deve-se a sua biodegradabilidade, alta especificidade e alta eficiência catalítica. As lipases encontram-se numa posição proeminente com biocatalisadores industriais (SANGEETHA et al., 2011).

Mais de 3700 enzimas foram catalogadas até hoje e estão divididas em 6 grupos, classificados de acordo com o substrato e a reação de catálise específica pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) (1992). (TABELA 1).

**TABELA 1** – Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

GRUPO DE ENZIMAS	TIPO DE REAÇÃO	Nº ENZIMAS LISTADAS NO NC-IUBMB*
OXIRREDUTASES	Catalisam reações de oxidação-redução, envolvendo oxigenação ou remoção de hidrogênio.	1011
TRANSFERASES	Mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e aldeído ou porções de cetonas de uma molécula para outra.	1057
HIDROLASES	Promovem hidrólise e formação de ésteres, glicosídeos, amidas, éteres, peptídeos e outros grupos de contêmham C-N.	1041
LIASES	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, as duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.	312
ISOMERASES	Efetuem várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.	157
LIGASES	Mediam a formação ou clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C, e ligações ésteres fosfato, por meio de reações acopladas a quebra de ATP.	129

\*Atualização Maio-2015

As hidrolases, recebem esse nome pois catalisam a clivagem de ligações numa reação com a água. Compreendem um grande grupo de enzimas, que engloba as proteases, amilases, xilanases, oxirredutases, ligases, esterases e lipases.

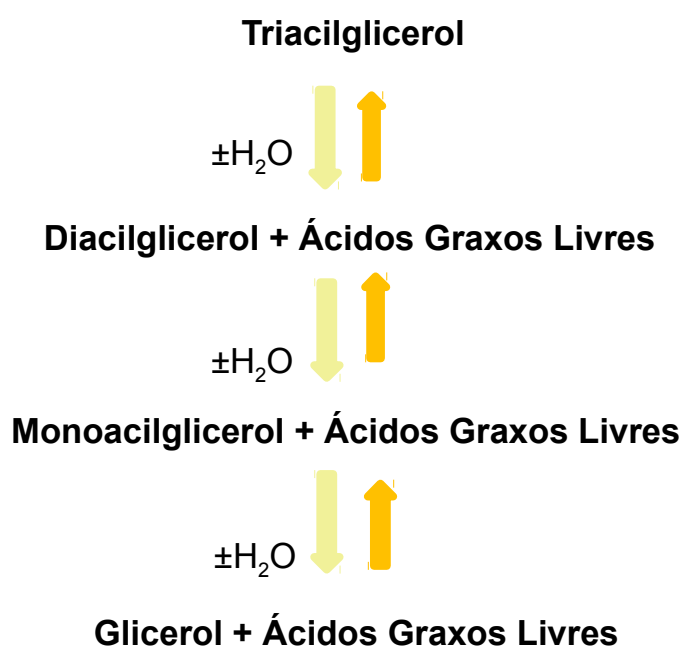
### 1.6 Lipases e esterases

O termo “enzimas lipolíticas” é usado para englobar lipases (EC\* 3.1.1.3) e esterases (EC 3.1.1.1), enzimas quem atuam catalisando tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres formados de glicerol e ácidos graxos (FIGURA 7) (ARPINGY; JAEGER, 1999)

\* EC = Número da Comissão de Enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

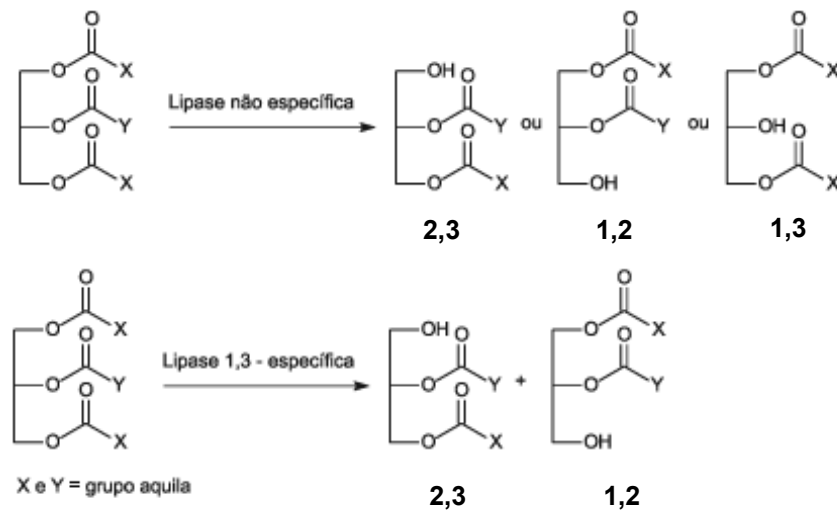






**FIGURA 8** – Esquema das reações catalisadas pelas enzimas lipolíticas. O sentido direto (reações de hidrólise – seta amarela) ou sentido inverso (reações de síntese – seta laranja) são controlados pela quantidade de água presente no meio reacional. As reações hidrolíticas ocorrem em meio aquoso, enquanto as reações de esterificação e transesterificação, ocorrem em baixa quantidade de água. FONTE: Adaptada de Macrae e Hammond (1985).

A especificidade das lipases é geralmente crucial para sua aplicação para fins analíticos ou industriais. De acordo com Macrae e Hammond (1985), elas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a regioespecificidade exibida com o substrato, ou seja, é a capacidade da enzima de selecionar a posição da ligação éster numa molécula. Lipases não específicas – catalisam a quebra completa do triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, possuem intermediários de di- e monoacilgliceróis. Não mostram especificidade em relação à posição da ligação éster na molécula de glicerol, ou na natureza do ácido graxo; Lipases 1,3 específicas – catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 dos acilgliceróis (FIGURA 9). Considerando que 1,2 (2,3) diacilglicerol e 2 monoacilglicerol são quimicamente instáveis podem ser isomerizados espontaneamente, ocorrendo hidrólise total caso a reação seja por tempo prolongado.

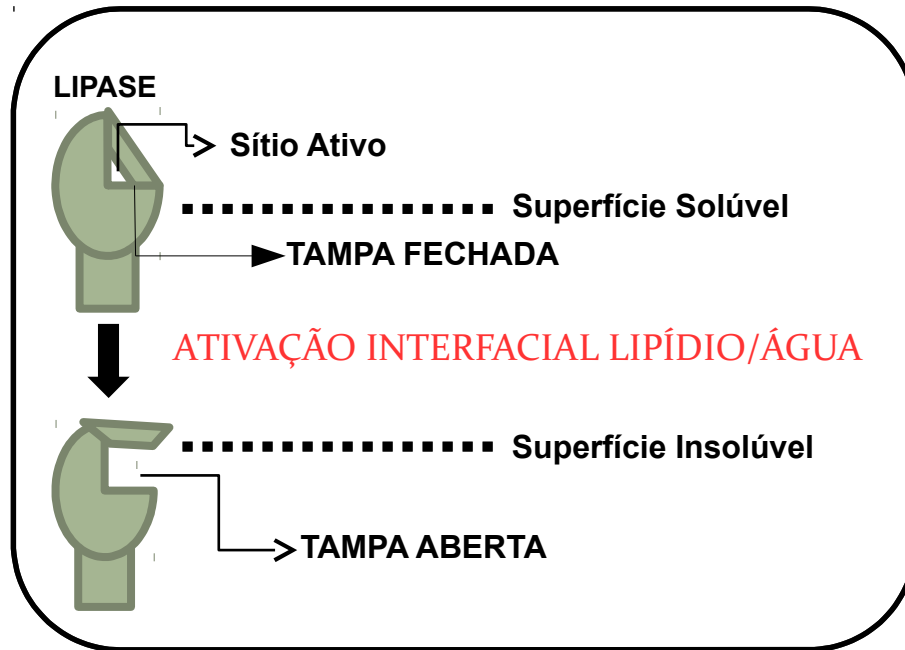


**FIGURA 9** – Reações de regioespecificidade catalisadas por lipases.

**(A)** Tipo não-específica, que hidrolisam ésteres primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2; **(B)** Tipo 1,3 específica, que hidrolisam apenas ésteres primários, ou seja, nas posições 1 ou 3. FONTE: Retirado manuscrito de Paques e Macedo (2006)

As lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise ou síntese de cadeias de acilgliceróis longas, ou seja, com  $\geq 10$  átomos de carbono, insolúveis em meio aquoso, já as esterases atuam hidrolisando ésteres de cadeia  $< 10$  carbonos solúveis em água. Entretanto, a maioria das lipases são perfeitamente capazes de hidrolisar os substratos de cadeia de carbono pequena (JAEGER; DJKSTRA; REETZ, 1999).

A catálise das lipases por ocorrer numa interface lipídio-água, possibilita a maioria das lipases realizarem um fenômeno conhecido como **ativação interfacial**, no qual ocorre um aumento da atividade catalítica, observada apenas na presença de superfícies insolúveis, o que as difere das esterases. Na ativação interfacial, um laço peptídico anfífilo cobre o sítio ativo da enzima na solução, como uma tampa, tornando-o inacessível ao solvente. Quando ocorre contato da lipase com a interface lipídio/água, há um rearranjo conformacional promovendo a abertura da tampa e o acesso ao sítio ativo que contém a tríade catalítica (FIGURA 10) (WONG; SCHOTZ, 2002). Entretanto, nem todas as lipases apresentam o fenômeno da ativação interfacial, permanecendo a primeira definição como a mais abrangente.



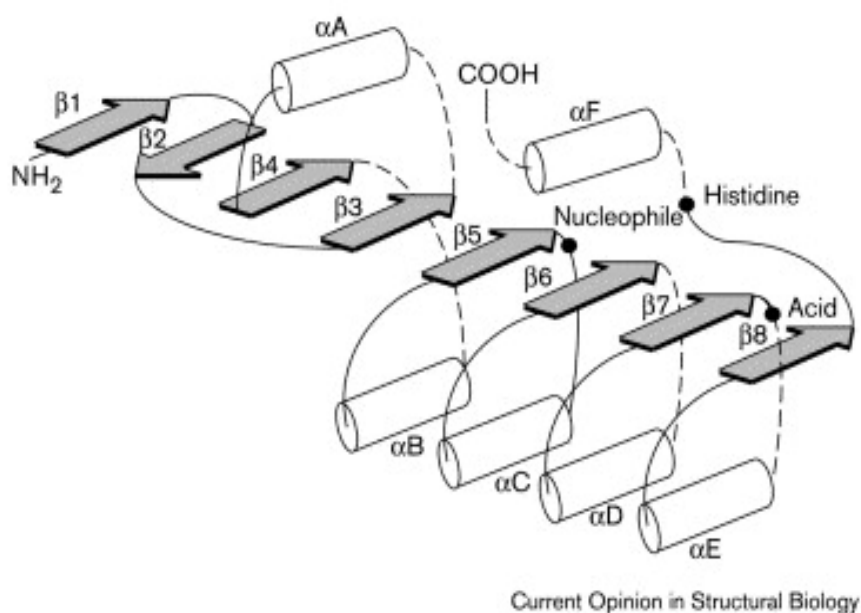
**FIGURA 10** – Esquema do fenômeno da ativação interfacial nas lipases. Esse fenômeno presente apenas nas lipases, possibilita a exposição do sítio ativo da enzima na presença de uma superfície hidrofóbica. FONTE: Adaptado Maruyama et al. (2000).

### 1.6.1 Estrutura das enzimas lipolíticas

As “enzimas lipolíticas” possuem uma estrutura conservada composta por dobramento  $\alpha/\beta$ , onde o núcleo hidrofóbico é composto por 8  $\beta$ -fitas para formar uma folha- $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 8$ , onde somente a segunda  $\beta$  é antiparalela em relação as demais  $\beta$ -fitas), conectada por seis  $\alpha$ -hélices (SCHRAG; CYGLER, 1997). Esses dobramentos admitem grandes inserções na sua estrutura, seja desde poucos resíduos de aminoácidos ou a adição de domínios extras completos, sem prejudicar a maquinaria catalítica, concedendo aos membros dessa família, uma alta habilidade evolutiva e de adaptabilidade (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

Apesar da similaridade estrutural, essas enzimas não compartilham qualquer semelhança de sequência ou não operam sob substratos parecidos, ou então não usam o mesmo sítio nucleofílico. Entretanto, elas preservam o arranjo estrutural dos resíduos presentes no sítio ativo, sugerindo uma possível evolução, a partir de um ancestral comum (OLLIS et al., 1992). Os resíduos catalíticos que compõem a tríade altamente conservada são: um resíduo nucleofílico (Ser, Cys ou Asp), posicionado logo após a  $\beta 5$ , um resíduo ácido catalítico (Asp ou Glu), que é quase sempre

posicionado depois da fita  $\beta 7$ , um resíduo de histidina, que é o único altamente conservado, embora o formato e comprimento do laço onde está localizado possa diferir consideravelmente entre os vários membros da família (FIGURA 11). Os dobramentos das  $\alpha/\beta$  hidrolases formam uma espécie de abrigo estável para o sítio ativo da enzima. (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).



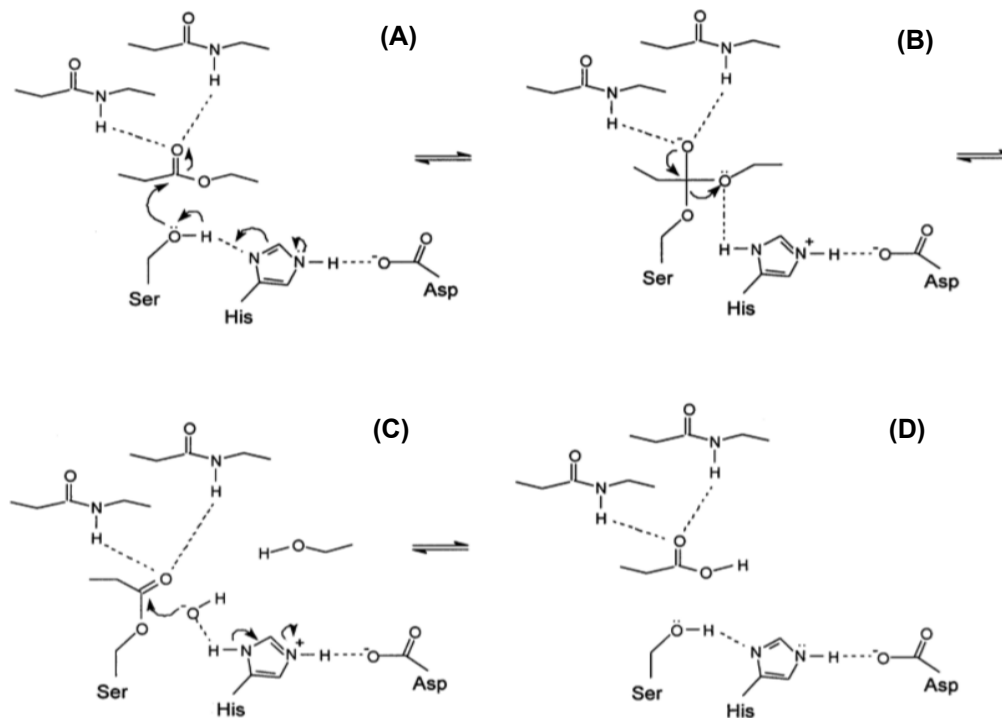
**FIGURA 11** – Diagrama da estrutura secundária do dobramento canônico das  $\alpha/\beta$  hidrolases.

As  $\alpha$ -hélices estão representadas por cilindros brancos e as  $\beta$ -fitas por setas cinzas. A tríade catalítica está indicada por pontos pretos. As linhas rachadas indicam localização de possíveis inserções. FONTE: Adaptada de Nardini e Dijkstra (1999).

O resíduo nucleofílico está localizado numa curvatura acentuada da molécula, onde pode ser facilmente abordado pelo substrato. Essa curva é conhecida como curva nucleofílica e abriga o pentapeptídeo conservado, formado pelos aminoácidos Gly-X-Ser-X-Gly, presente nas serina hidrolases, que abrange umas das maiores e amplamente distribuídas classes de enzimas, incluindo as lipases, esterases, peptidases e amidases, na qual utilizam um resíduo conservado de serina nucleofílica para hidrolisar substratos (JAEGER et al., 1999; SIMON; CRAVATT,

2010). A geometria da curva nucleofílica contribui para formação de uma fenda oxaniônica, que é necessário na estabilização do estado de transição da carga negativa que ocorre durante a hidrólise. A reação de hidrólise ocorre em quatro etapas: na primeira, um átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina ataca o carbono carbonila do éster lipídico (FIGURA 12-A). Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, caracterizado por uma carga negativa no átomo de oxigênio carbonila na ligação éster e quatro átomos ligados no carbono carbonila (FIGURA 12-B). As ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio de carbonilo carregado negativamente e dois átomos de NH da cadeia principal, conhecida como fenda oxianiônica, é responsável pela estabilização na distribuição de cargas e redução da energia (JAEGER et al., 1999). Essa fenda é geralmente formado por dois átomos de nitrogênio da cadeia principal, onde o primeiro é sempre um resíduo imediatamente a seguir ao nucleofílico, já o segundo é geralmente localizado entre a fita  $\beta 3$  e a hélice  $\alpha 1$ . (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

No terceiro passo da hidrólise, o componente ácido do substrato é esterificado pelo resíduo de serina (formando intermediário acil-enzima). (FIGURA 12-C). O passo de desacilação, um nucleófilo, geralmente molécula de água, ataca a enzima acetilada. O resíduo de histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de serina, a ligação éster entre serina e grupo acil é quebrada, levando a liberação do produto e regeneração do sítio catalítico (FIGURA 12-D) (JAEGER et al., 1999).



**FIGURA 12**– Mecanismo de catálise das lipases.

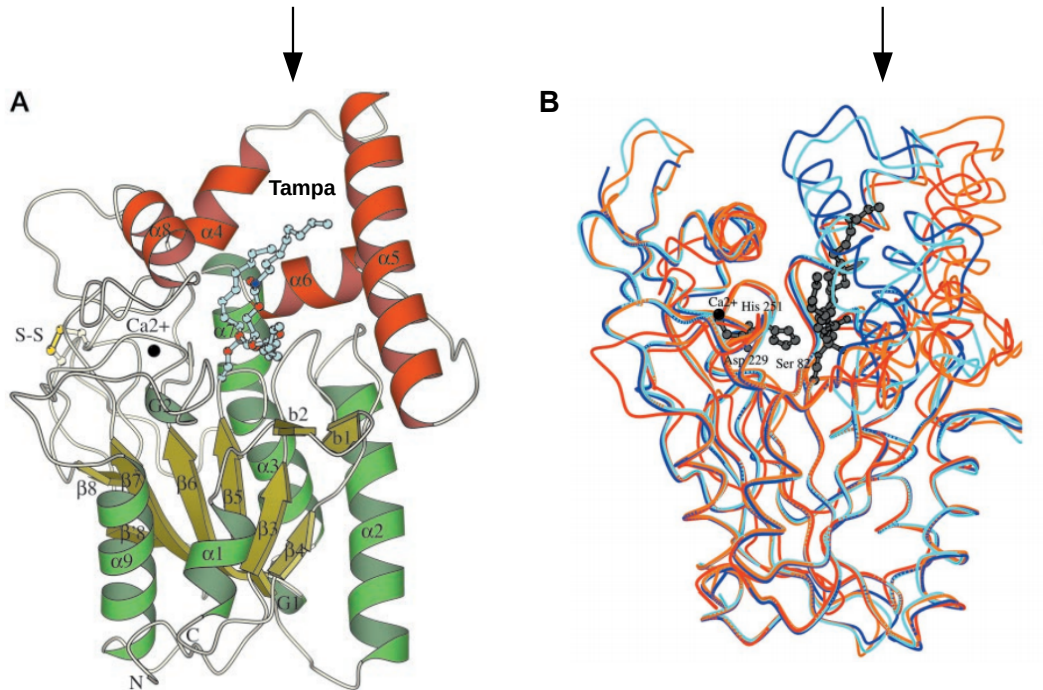
(A) Ligação do lipídio e ativação do resíduo serina nucleofílico. (B) Formação do intermediário tetraédrico, com estabilização do O- pela interação com dois grupos NH peptídicos. (C) O intermediário acil-enzima é formado e sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água. (D) Liberação do produto e sítio catalítico é restituído. FONTE: Retirado manuscrito Jaeger et al., 1999.

### 1.6.2 Classificação das lipases e esterases bacterianas

A arquitetura de domínios compartilhada pelas enzimas lipolíticas permitiu sua classificação em oito diferentes famílias baseado em suas sequências de aminoácidos conservadas e nas propriedades catalíticas de cada enzima (ARPINGY; JAEGER, 1999). Com a descoberta de novas lipases e esterases e a resolução de estruturas tridimensionais por cristalografia, Hausmann e Jaeger (2010) reformularam algumas características dos membros das famílias das lipases microbianas.

A família I está subdividida em 8 subfamílias e compreende todas as lipases consideradas verdadeiras, ou seja, aquelas enzimas ativadas em uma interface lipídio-água e que contem uma tampa cobrindo o sítio ativo, movendo-se quando em

contato com a interface (FIGURA 13) (WANG et al., 2010). A tabela a seguir evidenciam características de cada subdivisão da Família I (TABELA 2).



**FIGURA 13** – Visão da estrutura de uma lipase verdadeira com a tampa cobrindo sítio ativo. Lipases verdadeiras da família I das lipases bacterianas mostrando a estrutura da tampa. **(A)** Visão esquemática da estrutura secundária de *Pseudomonas aeruginosa* (PAL), onde as  $\alpha$ -hélices pertencentes a tampa envolvida na ligação do substrato estão destacadas em vermelho. **(B)** Estrutura 3D da superimposição da lipase PAL com as lipases de *Burkholderia cepacia* (BCL), *Burkholderia glumae* (BGL) e *Chromobacterium viscosum* (CVL), onde PAL (vermelho) e BCL (laranja), estão na conformação aberta, e BGL (azul) e CVL (ciano) estão na conformação fechada. Sítio catalítico com o substrato ligado estão destacados em cinza. FONTE: Retirado manuscrito Nardini et al. (2000).

**TABELA 2** – Subdivisão da Família (Subf.) I das Lipases Bacterianas (ARPINGY; JAEGER, 1999; HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Subf.	Grupo	Descrição	Exemplos
I.1		Englobam lipases de bactérias com sistema de secreção do tipo II e a presença de dois resíduos de ácido aspártico que coordenam o cátion $Ca^{+2}$ . Alta similaridade de sequência com as lipases de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> e MM em torno de 30 a 32 kDa. Possui	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas wisconsinsis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
I.2	<b>Gram-Negativas</b>	Características iguais membros I.1, porém seus membros possuem significativa similaridade com lipases de <i>Burkholderia glumae</i> e apresentam maior MM devido à presença de uma fita- $\beta$ antiparalela adicional.	<i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>B. cepacia</i>
I.3		Possuem massa molecular de 50-60kDa e são exportadas pelo sistema de secreção Tipo I. Uma comparação entre estruturas terciárias revelou que essa enzima é mais evolutivamente relacionada às lipases eucarióticas do que lipases bacterianas.	<i>P. fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i>
I.4		Compreende muitas lipases do gênero <i>Bacillus</i> , e possui um resíduo de alanina no pentapeptídeo conservado (Ala-X-Ser-X-Gly). Consiste das menores lipases identificadas (MM de 20 kDa) e máxima atividade em pH 10-11.5.	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>
I.5	<b>Gram-Positivas</b>	Lipases do gênero <i>Bacillus</i> tem apenas 15% de similaridade com as da subfam. I.4. Possuem uma grande inserção no esqueleto canônico das $\alpha\beta$ -hidrolases, formado por um sítio de ligação ao $Zn^{+2}$ , que promove uma estabilidade contra inativação térmica. MM de 46 kDa e pH 7.5 a 9.5.	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Geobacillus sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i>
I.6		MM de 75 kDa e carregando um domínio N-terminal com 200 aminoácidos que são necessários para uma eficiente translocação e possivelmente atuam como uma chaperona. Ampla gama de substratos e estabilidade entre pH 4 a 9.	Compreende as lipases das espécies de <i>Staphylococcus</i>
I.7	<b>Novas inclusões</b>	Caracterizam-se por atuarem em uma ampla gama de substratos ( $C_2$ - $C_{16}$ ), o que possibilita exercerem funções como fatores de virulência, mediando a liberação de compostos inflamatórios	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>
I.8		Possui apenas um membro descrito com uma MM de 51 kDa e está associado a membrana externa de bactérias, com atividade aumentada frente ésteres com cadeia acil longas.	<i>Pseudoalteromona haloplankytis</i>

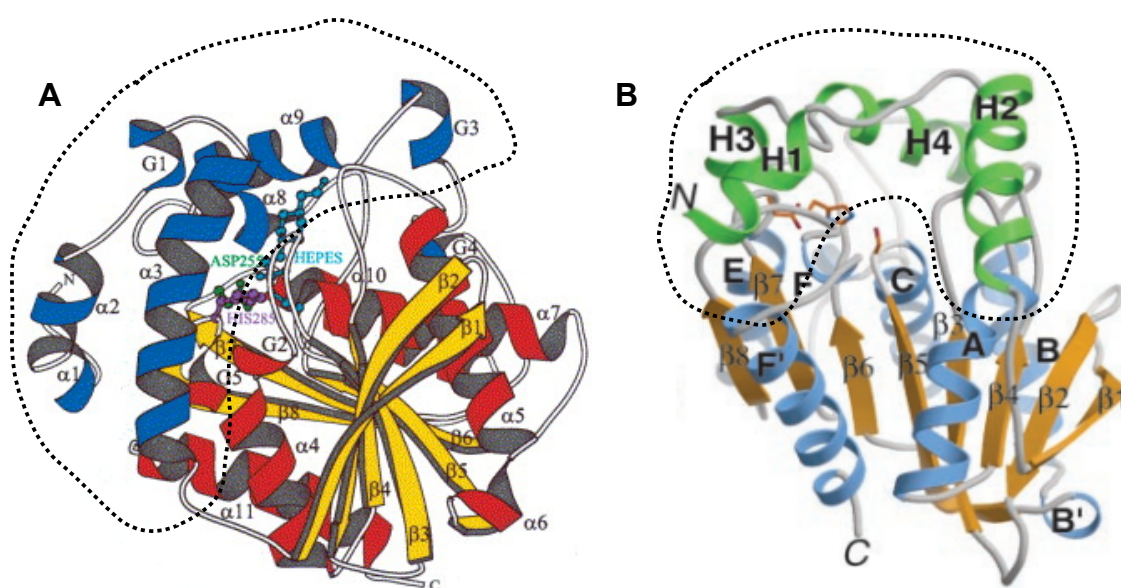


As carboxilesterases foram agrupadas nas outras sete famílias (II-VIII), onde recentemente, a família VIII foi identificada por não apresenta a estrutura típica das  $\alpha/\beta$  hidrolases, e sim uma estrutura de  $\beta$ -lactamases. A TABELA 3 apresenta uma descrição das Famílias II a VIII, baseada na classificação de Arpingy & Jaeger (1999).

**TABELA 3** – Classificação das Famílias II a VIII das Lipases Bacterianas (ARPINGY; JAEGER, 1999; HAUSMANN; JAEGER, 2010).

Família		Descrição	Exemplos
II	<b>GDSL</b>	Apresenta um motivo conservado tetrapetídico (Gly-Asp-Ser-Leu) localizado na porção N-terminal das proteínas, ao invés do pentapetídeo convencional (Gly-X-Ser-X-Gly). A família GDSL possui 5 blocos de aminoácidos conservados, com o tetrapeptídeo posicionado no bloco 1.	Membros relacionados com virulência, como: <i>S. Typhimurium</i>
	<b>SGNH</b>	Proposta com base na arquitetura dos quatro blocos da GDSL na estrutura primária, e a apenas a serina catalítica conservada no tetrapeptídeo do bloco 1 (Ser-Gly-Asn-His).	<i>Photobacterium luminescens</i>
III		Engloba enzimas extracelulares com MM de 32-35 kDa e estão associadas a fatores acetilhidrolases de ativação de plaquetas.	<i>Streptomyces sp.</i> , <i>Moraxella sp.</i>
IV	<b>Lipases Hormônio Sensíveis (HSL)</b>	Similaridade com a família de lipases hormônio sensíveis de mamíferos, no qual, três blocos conservados foram identificados, sendo os blocos 2 e 3 contendo resíduos da tríade catalítica, mas o bloco 1 possui um motivo conservado His-Gly-Gly-Gly que envolve uma interação de hidrogênio que estabiliza a fenda oxaniônica e promove a catálise. Algumas estruturas já resolvidas dessa família identificaram a presença de um domínio CAP que difere da tampa encontrada nas lipases verdadeiras (FIGURA 14).	<i>A. acidocaldarius</i> , <i>E.coli</i> , <i>Archeoglobus fulgidus</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i>
V		Diferentes gêneros de organismos psicrófilos (vivem em temperatura baixa), mesófilos (média) e termófilos (altas). Compartilham homologia com outras enzimas bacterianas, como epóxido hidrolases, dehalogenases e haloperoxidases. Aminoácidos conservados localizados em três distintos blocos.	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Moraxella sp.</i>
VI		Classificadas como pequenas proteínas (23-26 kDa), possuem similaridade de 40 % com lisofosfolipases eucarióticas. Apresentam-se como dímeros.	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

VII	Esta família inclui acetilcolina esterases e carboxilesterases similares com as do intestino/fígado de eucariotos, possuem MM de 55 kDa.	<i>Arthrobacter oxydans</i>
VIII	Difere significativamente da estrutura típica das hidrolases, mostrando similaridade com $\beta$ -lactamases. A Ser nucleofílica não faz parte da tríade catalítica, onde uma Tyr foi identificada como essencial para atividade.	<i>P. marginata</i> <i>Burkholderia gladioli</i>



**FIGURA 14** – Estruturas tridimensionais de membros da família IV.

Estruturas 3D resolvidas de membros da família VI permitiram identificar a presença do domínio CAP (destacado pelas linhas pontilhadas). **(A)** Carboxiesterase cristalizada de uma arqueia *Archaeoglobus fulgidus*, onde fitas- $\beta$  estão em amarelo e  $\alpha$ -hélices em vermelho, enquanto domínio CAP está em azul. **(B)** Uma acetil-esterase (HerE), com domínio CAP destacado em verde acima do dobramento  $\alpha\beta$ , onde as fitas- $\beta$  estão coloridas em amarelo e  $\alpha$ -hélices em azul. FONTE: De Simone et al. (2001); Zhu et al. (2003).

Com a abordagem da metagenômica funcional, novas famílias e subfamílias de lipases microbianas que não agrupam em nenhuma das famílias acima, foram descritas na literatura. Um resumo das características das novas famílias descobertas estão apresentadas na TABELA 4.

**TABELA 4** – Descrição das novas Famílias das Lipases Bacterianas descobertas pela metagenômica funcional.

<b>Família</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
<b>LipG</b>	Isolada em sedimentos de planícies, se caracteriza por apresentar uma sequência de Arg—Gly na fenda oxaniônica, uma assinatura presente nas lipases de fungos filamentosos.	LEE et al., 2006
<b>EstA</b>	Descoberta na superfície da água salgada, se assemelha a membros da família III descrita por Arpingy e Jaeger (1999), mas difere na sequência de aminoácidos que compõe o pentapeptídeo conservado, nesta nova família descritos como Gly-His-Ser-Met-Gly.	CHU et al., 2008
<b>LipEH166</b>	Compreende novas lipases encontradas em habitat com baixas temperaturas (origem psicrófila) e com três possíveis ORFs, proveniente de sedimentos de planície entre marés.	(KIM et al., 2009
<b>EstY</b>	Isolada de rios, é derivada de bactérias patogênicas, sendo possivelmente consideradas fatores de virulência lipolíticos que não pertencem a família GDSL.	WU; SUN, 2009
<b>EstF</b>	Isolada de sedimentos aquáticos, está relacionada a família V das lipases com uma modificação no pentapeptídeo Gly-Thr-Ser-X-Gly e em regiões que flanqueiam o motivo HG e seus motivos conservados de sequência.	FU et al., 2011

### 1.6.3 Aplicações Industriais das enzimas lipolíticas

As enzimas são catalisadores favoráveis para desenvolvimento de processos industriais biodegradáveis. Sendo as enzimas de origem microbiana as industrialmente mais relevantes, além de tornarem o processo baseado em enzimas, de baixo custo no tratamento de resíduos (UCHIYAMA; MIYAZAKI, 2009). O uso sistemático industrial das enzimas microbianas, remonta bem mais de 100 anos. A primeira aplicação em processos comerciais de enzimas isoladas em foi a introdução da protease pancreática no tratamento de couro em 1908, e três anos depois, em 1911, Wallterstein, utilizou-as no resfriamento da cerveja (HANSAN et al., 2006).

Dentre as enzimas listadas na TABELA 1, apenas 200 enzimas conhecidas tem uso comercial, sendo a maioria de origem microbiana, onde 75% desse total são de enzimas hidrolíticas, incluindo as lipases e esterases. Esse papel de destaque,

deve-se ao fato das hidrolases degradarem várias substâncias naturais, atuando como biocatalisadoras (SHARMA et al., 2001). Segundo Li e colaboradores (2012), estima-se que mercado global para enzimas industriais alcance em 2015 o valor de 1,5 bilhões de dólares.

As enzimas lipolíticas são atualmente usadas numa grande variedade de aplicações industriais devido sua excelente enantioselectividade, não dependência de co-fatores, estabilidade em solventes orgânicos, disponibilidade comercial e atuação sobre uma ampla gama de substratos específicos para diferentes estruturas de ésteres naturais ou não-naturais (JAEGER; REETZ, 1998). As aplicações biotecnológicas das enzimas lipolíticas vão desde a indústria de alimentos, produção de perfume, desenvolvimento de fármacos até a produção de biodiesel (DAHIAYA; PURKAYASTHA, 2011). Algumas das aplicações das enzimas lipolíticas estão listadas na TABELA 5.

Enzimas microbianas são mais úteis que enzimas derivadas a partir de plantas ou animais devido a sua melhor estabilidade, rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular e crescimento rápido em meios não tão caros, além do que suas lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações de hidrólise e síntese (HANSAN et al., 2006). Micro-organismos produtores de lipase tem sido encontrados em uma variedade de habitats, incluindo lixos industriais, unidades de processamento de óleo vegetal, solo contaminado com óleo, laticínios, oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem, minas de carvão e termais (DAHIAYA; PURKAYASTHA, 2011).

**TABELA 5** – Exemplos de aplicações industriais das enzimas lipolíticas (ISO et al., 2001; SHARMA et al., 2001; HANSAN et al., 2006).

INDÚSTRIA	APLICAÇÃO
Têxtil	Ajuda na remoção de goma, promovendo melhor absorbância de manchas e rachaduras, fabricar poliéster com fibras sintéticas para uso na produção de fios, tecidos, têxtil, tapetes e outros.
Papel e celulose	Usado em larga escala no processo de produção do papel. Destintagem do papel usado, aumentando sua brancura e intensidade, assim como maior vida útil do equipamento, economia de energética e redução da poluição. Remoção dos componentes hidrofóbicos da madeira, ou seja, triglicerídeos e ceras, que causam problemas severos na fabricação de celulose e papel.
Detergente	Mais importante comercialmente. Transforma gorduras em substâncias hidrolíticas. Atua removendo manchas de gordura em tecidos, decompondo contaminantes lipídicos em lavagem a seco, na limpeza de couro, lentes de contato, canos entupidos, desengorduramento.
Biopolímeros	Usada como biocatalisadores na produção de componentes biodegradáveis. Poliésteres aromáticos são exemplo de produto sintetizado
Alimentos	Modificação de óleos e gorduras. Modificação do sabor, refinamento do arroz, leite de soja. Aroma e fermentação do vinho de maçã. Produção de carne magra (bovina ou de peixe) -(biolipólise) e fermentação da salsicha.
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite. Aprimoramento do sabor, maturação e fabricação de produtos dos queijos, e na lipólise da manteiga e creme de leite.
Cosméticos	Emoliente em cremes e óleos de banho. Ésteres de cera estão sendo manufaturados enzimaticamente.
Aplicações Médicas	Ação bactericida contra <i>M. tuberculosis</i> . Utilizado como auxiliar digestivo, no tratamento de distúrbios gastro-intestinais e alergias digestivas. No tratamento de tumores malignos e inflamações cutâneas.
Biodegradação de óleo	Presença de atividade lipídica microbiana em solo recém-contaminado com óleo diesel, e em águas residuais contaminadas com hidrocarbonos e polímeros orgânicos, mostram resposta positiva na limpeza usando enzimas hidrolíticas.
Saneamento	Degradação e reciclagem do lodo de esgoto e matéria orgânica pela solubilização e hidrólise de complexos de estruturas poliméricas orgânicas de carbono.
Biosensor	Utilizado para diagnóstico em amostras clínicas, determinação de ácidos graxos essenciais em indústrias de alimentos e bebidas, análise de poluentes, contaminação por pesticidas e na indústria farmacêutica
Biodiesel	Transesterificação de óleos naturais (soja, ricínio, láurico e coco) para produção de biodiesel. Processo vantajoso pois não ocorre a geração de óxidos de enxofre e de particulados.

As lipases microbianas são na maioria, extracelular na natureza, o que facilita sua extração, isolamento e purificação (CARVALHO et al., 2003). Hoje se conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipase (BROOKS; ASAMUDO, 2011; RUIZ et al., 2005;). Entretanto esse número de micro-organismos conhecidos atinge apenas um percentual muito baixo da biodiversidade estimada de micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas, sendo cerca de 0,2% a 0,6% para bactérias e 5% para fungos ainda não caracterizados. Esta grande abundância de micro-organismos existentes na natureza torna importante o rastreio e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas (HASAN et al., 2006).

#### 1.6.4 Enzimas lipolíticas obtidas pela abordagem metagenômica

A construção de bibliotecas metagenômicas tem sido de fundamental importância para descoberta de novos bioativos a partir de fontes procarióticas, o que vem possibilitando o acesso a um grande número de enzimas ou mesmo de vias metabólicas completas (VOEGET et al., 2003). Desde a descrição da primeira enzima lipolítica descoberta, no ano 2000 (HENNE et al., 2000), presente em clones de biblioteca metagenômica, houve um crescimento nas publicações reportando clones positivos de esterases ou lipases. Desse total, apenas poucas enzimas foram superexpressas, purificadas e sujeitadas a uma detalhada caracterização bioquímica. Isso deve-se ao elevado número de novas enzimas facilmente detectadas por rastreio funcional simples, em oposição ao tempo gasto para uma completa caracterização enzimática (STEELE et al., 2009). Esses novos genes são provenientes das mais diversas amostras ambientais, como solo (HENNE et al., 2000; KIM et al., 2006; LEE et al., 2004), água (CHU et al., 2008; WU; SU, 2009), biofilmes (GOMEZ-ALVAREZ et al., 2012; MCLEAN; KAKIRDE, 2013) rúmen e intestino de bois (FERRER et al., 2005; LIU et al., 2009), adubo orgânico (KIM et al., 2010; LÄMMLE et al., 2007), entre outras.

As abordagens para obtenção e isolamento desses novos genes lipolíticos diferem entre si, Henne e colaboradores (2000) isolaram genes com atividade lipolítica, provenientes de amostras de solo temperado, onde dos 730.000 clones analisados em ágar trioleína, apenas um teve atividade, enquanto 3 dos 286.000

testados em ágar tributirina, hidrolisaram o meio. Como alternativa de abordagem, Bell e colaboradores (2002) utilizaram a metodologia de PCR para isolamento direto de novos genes lipolíticos a partir do metagenoma a fim de evitar possíveis dificuldades em conseguir a expressão de uma lipase num hospedeiro heterólogo. Na última década, um maior número de bibliotecas metagenômicas tem sido construídas a partir de habitats extremos, onde a maioria dessas bibliotecas tem culminado em lipases/esterases (BELL et al., 2002).

Uma biblioteca metagenômica de amostras de fontes termais vulcânicas na Indonésia possibilitou o isolamento por função de uma nova esterase classificada como novo membro da família HSL (família VI), possivelmente pertencente à uma arqueia. Tendo sua melhor atividade em ésteres de cadeia curta (C6) (RHEE et al., 2005). Numa comparação entre biofilme de água potável e solo contaminado, foram detectados por sequenciamento, 21 genes parciais de lipase, porém no rastreamento funcional, apenas 6 clones eram ativos, sendo o EstA3 (do biofilme) e EstC1 (solo) caracterizados como esterases da família VIII por apresentarem similaridade de estrutura com  $\beta$ -lactamases. Essa diferença entre os dois métodos pode acontecer devido à limitações na expressão heteróloga (ELENDE et al., 2006). Em 2009, pesquisando amostras de solo, Kim e colaboradores isolaram uma esterase de 38.3 kDa, com atividade ótima em cadeias com menos de 8 carbonos. Uma lipase ativa em baixas temperaturas e hidrolisando agrupamentos acila de cadeia longa (C<sub>14</sub>) foi isolada a partir de sedimento marinho (HARDMAN; SJÖLING, 2007). Duas lipases, denominadas, *RlipE1* (nova família) e *RlipE2* (família V) foram encontradas em bibliotecas da microbiota do rúmen bovino, ambas lipases são instáveis termicamente e hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa (C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>) (LIU et al., 2009). Em metagenoma de solo, foram descobertas duas lipases por rastreamento funcional, SMLipB e SMLipD, como membros da família I e com sítios ativos de ligação para íon Ca<sup>2+</sup> (KHAN et al., 2013).

A partir de amostras de solo no Brasil, algumas enzimas lipolíticas também foram identificadas. Uma esterase, LipA, foi isolada de mangue, com massa molecular 32 kDa (COUTO et al., 2010). Lip018, encontrada em solo da Floresta Atlântica, foi sequenciado e 20 ORFs foram encontradas, sendo apenas a ORF16 ativa contra uma ampla gama de substratos. Essa enzima foi descrita como sendo

de uma nova família, pois possuía o pentapeptídeo conservado da família V, mas precisava de uma chaperona (ORF15) para ser ativa (FAORO et al., 2011). A lipase, LipC12, pertence a família I.1 das lipases bacterianas, tem dobramento independente de chaperona, coordena íon  $\text{Ca}^{+2}$  e não tem pontes dissulfeto, tendo sua atividade ótima em pHs alcalinos (GLOGAUER et al., 2011).

A biblioteca metagenômica construída de sedimento aquático, possibilitou isolar um enzima  $\beta$ -cetoacil-CoA enol-lactona hidrolase, com um gene de 804 pb, codificando 267 aa, e massa molecular de 28.952 kDa. Sua atividade foi melhor em baixas temperaturas e pH alcalino, hidrolisando ésteres de p-nitrofenol cadeia curta, perdendo a atividade com o aumento do tamanho do grupo acila (PARK et al., 2007b). Fica evidente que as lipases provindas de bibliotecas metagenômicas tem um amplo espectro de atividade e estabilidade, sendo portanto uma estratégia eficaz na busca de novas lipases com características bioquímicas diferentes.

### **1.7 Área de Estudo do Projeto**

O material explorado para análises dos clones lipolíticos foi a Biblioteca Metagenômica construída a partir de Terra Preta de Índio, proveniente do município de Presidente Figueiredo, localizado a 107 km da cidade de Manaus, no Estado do Amazonas (FIGURA 15).

A área de coleta está sob uma vegetação predominante de Florestas Tropicais e um clima tropical úmido, com variações de temperatura entre 20 °C a 40 °C. O solo é formado superficialmente por camadas arenosas que permitem uma boa aeração, e mais profundamente por camadas argilosas, que são caracterizadas por armazenarem água. Os solos de Terra Preta de Índio são classificados como Latossolo Amarelo e possui grande atividade biológica devido à ação antrópica neste território, proporcionada pela agricultura local praticada pelos povos ribeirinhos.





**FIGURA 15** – Dados da coleta do Solo de Terra Preta de Índio.  
**(A)** Mapa geográfico mostrando a localização do município de Presidente Figueiredo/AM.  
**(B)** Preparação do terreno para coleta das amostras de solo.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Um gene codificando uma nova esterase, nomeada Lip4, foi isolado a partir de uma Biblioteca metagenômica de solo Amazônico, por meio de rastreamento funcional em meio de cultivo contendo substrato tributirina. O solo de Terra Preta de Índio por ser rico no nutriente carbono proveniente em grande parte pela ação antrópica, pode ter possibilitado surgimento de bactérias transitórias, que se aproveitam de condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento metabólico e crescimento. Embora não se saiba exatamente qual o verdadeiro substrato ou a função fisiológica da enzima, é possível dizer que ela poderia potencialmente ser usada como um biocatalisador nas reações de hidrólise e síntese realizados dentro das indústrias farmacêuticas e de química fina. Muitas aplicações industriais são realizadas sob condições alcalinas, mais especificamente na indústria de detergentes.

As principais conclusões relacionadas ao trabalho e a algumas características de Lip4 foram:

- Os clones Fos1 e Fos4 foram confirmados positivamente para capacidade de hidrolisar tributirina após uma segunda transformação genética. O DNA fosmidial foi empregado na construção de sub-bibliotecas, permitiu obter um clone com fragmento gênico a partir do clone Fos4, de aproximadamente 2,3 kb com atividade hidrolítica;
- O gene denominado *lip4* foi sequenciado por técnica de “genome walking” até obtenção da sequência de nucleotídeos de 854 pb, codificante da enzima lipolítica Lip4 com 268 aminoácidos, com massa molecular de 29309.9 kDa com ponto isoelétrico teórico de 6,06;
- A enzima foi identificada como uma carboxilesterase, membro da família V das lipases bacterianas. Possui similaridade com domínio conservado de uma  $\beta$ -cetoacilato enol-lactona hidrolase, uma importante enzima na via  $\beta$ -cetoacilato. Essa via é codificada cromossomalmente em algumas espécies de bactérias e fungos encontrados nos solos, que atuam na degradação de compostos aromáticos, com objetivo de reciclar as moléculas de carbono para obtenção de energia para crescimento microbiano.

- Lip4 foi superexpressa em BL21 (DE3) RP, purificada em uma única etapa de cromatografia de afinidade
- Atua hidrolisando ésteres naturais de cadeia curta (tributirina) e ésteres artificiais de p-nitrofenila de cadeia média (pNPC8), mas não tem atividade hidrolítica em ésteres de cadeia longa. Tem atividade ótima em pH alcalino, especificamente entre a faixa de pH de 8 e 9.
- A presença de íons metálicos no tampão reacional não aumentou a estabilidade da enzima Lip4, mas o íon  $Zn^{+2}$  reduziu em mais de 50% a atividade enzimática, podendo-se inferir que essa enzima seja uma serina hidrolase (PRIVÉ et al., 2013).
- Os cristais obtidos pertencem ao grupo espacial  $P2_12_12_1$ , com 4 moléculas presentes na unidade assimétrica;
- A substituição molecular realizada a partir do mapa gerado para Lip4, permitiu observar a localização da tríade catalítica Ser<sup>94</sup>-Asp<sup>217</sup>-His<sup>245</sup>, no qual a Ser<sup>94</sup> está situada dentro do pentapeptídeo conservada G-X-S-X-G, e indicou a presença do domínio CAP na região mais flexível da enzima;
- Duas mutantes, Lip4<sub>S94A</sub> e Lip4<sub>S94C</sub>, foram construídas para testar atividade da enzima pela mudança de resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, demonstraram a perda de atividade pelos mutantes, mas ambos mantiveram sua conformação estrutural, observada por testes de dicroísmo circular.

Dentre as enzimas lipolíticas descritas, as de origem microbiana são comercialmente mais úteis, levando a um aumento na tendência do mercado na procura de novas fontes microbianas para produção dessas enzimas (WILLERDING et al., 2011). O desenvolvimento de novas e melhoradas enzimas será o elemento chave no reino emergente da biotecnologia (GUPTA et al., 2003). Uma avaliação preliminar do potencial biotecnológico da esterase Lip4 possibilitou sugerir que essa enzima tem potencial para aplicação na biocatálise, com destaque para produção de biodiesel por transesterificação em meio orgânico, uma vez que é uma enzima importante na via  $\beta$ -cetoadipato de degradação de compostos aromáticos.

### **Futuros experimentos:**

Em relação a atividade da enzima Lip4:

(a) Refazer ensaios de estabilidade com íons, testando a adição de EDTA ao tampão da enzima, pois este ácido é quelante de íons metálicos e permite avaliar a especificidade da enzima por algum íon;

(b) Repetir experimento de  $K_m$  e  $V_{máx}$  para obter uma melhor curva de Michaelis-Menten, diminuindo a concentração inicial de Lip4;

(c) Fazer testes de atividade enzimática com linhagens mutantes para confirmar a diminuição ou perda da atividade pela mutação do sítio ativo;

Em relação a estrutura e função da enzima Lip4:

(a) Realizar novas etapas de refinamento para diminuir fatores de  $R_{free}$  e  $R_{factor}$ , e reposicionar os aminoácidos que estão em posições não favoráveis dentro do Ramachandran plot, a fim de obter uma estrutura em alta resolução para depósito no PDB;

(b) Colocar um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol ou DTT) no tampão da enzima da linhagem mutante Lip4<sub>S94C</sub> e verificar se o rompimento da ponte dissulfeto torna a proteína ativa, uma vez que o resíduo Cisteína do sítio ativo fica livre para interagir nucleofilicamente com a Histidina.

(c) Redigir e submeter artigos científicos relacionados com resultados obtidos de caracterização e resolução da estrutura da Lip4.

## REFERÊNCIAS\*

ALDRICH. Sigma-Aldrich. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w222305?lang=pt&region=BR>>. Acessado em: 7 de Maio de 2015.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARPINGY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J.**, v. 343, p. 177-183, 1999.

BAINS, J.; KAUFMAN, L.; FARNELL, B.; BOULANGER, M. J. A product analog bound form of 3-oxodipate-enol-lactonase (PcaD) reveals a multifunctional role for the divergent cap domain. **J. Mol. Biol.**, v. 406, p. 649-658, 2011.

BARON, A. M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

BELL, P. J.; SUNNA, A.; GIBBS, M. D.; CURACH, N. C.; NEVALAINEN, H.; BERGQUIST, P. L. Prospecting for novel lipase genes using PCR. **Microbiol.**, v.148, p. 2283-2291, 2002.

BIANCO, R. A.; VICENTE, E. J.; ASTOLFI-FILHO, S.; SAKATA, S.; MIYAMOTO, M.; LEOMIL, L.; PEREIRA, J. O. Rastreamento de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de solo da Amazônia. In: **26. Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Anais. Foz do Iguaçu, 2011. n. 1963-2.

BLOW, D. More of catalytic triad. **Nature**, p. 694-695, 1990.

BRAGG, L.; TYSON, G. W. Metagenomics using next-generation sequencing. **Methods Mol. Biol.**, v. 1096, p. 183-201, 2014.

BROOKS, A.; ASUMODO, N. U. Lipase production by strains of *Aspergillus* species isolated from contaminated body creams. **J. Toxicol. Environ. Health Sci.**, v.3, p. 311-316, 2011.

BROSSI, M.J.L.; MENDES, L.W.; GERMANO, M.G.; LIMA, A.B.; TSAI, S.M. Assessment of bacterial *bph* gene in Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **PLOS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

CAI, J.; XIE, Y.; SONG, B.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; FENG, Y. *Fervidobacterium changbaicum* Lip1: Identification, cloning and characterization of the thermophilic lipase as a new member of bacterial lipase family V. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 89, p. 1463-1473, 2011.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrado de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Quim. Nova**, v. 28, p. 614-621, 2005.

CHEAH E.; AUSTIN C.; ASHLEY G. W.; OLLIS, D. Substrate-induced activation of diene lactone hydrolase: an enzyme with a naturally occurring Cys-His-Asp triad. **Protein. Eng.**, v. 6, p. 575-583, 1993.

---

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

CHU, X.; HE, H.; GUO, C.; SUN, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v.80, p. 615, 2008.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 50, p.760-763, 1994.

COTTRELL, M. T.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2553-2557, 1999.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C. M.; BALL, M.; FRANCOU, F.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S. J.; HOPKE, J.; OSBOURNE, M. S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUÉRINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drugs discovery from natural products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 49-55, 2003.

COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. E.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genet. Mol. Res.**, v. 9, p. 514-523, 2010.

COWAN, D. A. Microbial genomes – an untapped resource. **Tibtech.**, v. 18, 2000.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; CANELLAS, L. P.; RIBEIRO, L. P.; BENITES, V. M.; SANTOS, G. A. Soil organic matter and fertility of anthropogenic dark earths (Terra Preta de Índio) in the Brazilian Amazon basin. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, p. 85-93, 2009.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity-a vast below. **Science**, v. 309, p.1331–1133, 2005.

DAHIAYA, P.; PURKAYASTHA, S. Isolation, screening and production of extracellular alkaline lipase from a newly isolated *Bacillus* sp. PD-12. **J. Biol. Sci.**, v.11, p-381-387, 2011.

DANIEL, R. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Curr. Opin. Biotech.**, v.15, p. 199-204, 2004.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 470-478, 2005.

DE SIMONE, G.; MENCHISE, V.; MANCO, G.; MANDRICH, L.; SORRENTINO, N.; LANG, D.; ROSSI, M.; PEDONE, C. The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **J. Mol. Biol.**, v. 314, p. 507-518, 2001.

DELANO, W. L. The PyMol moleculargraphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>

DÍAZ, E.; JIMENEZ, J. I.; NOGALES, J. Aerobic degradation of aromatic compounds. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 24, p. 431-442, 2013.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 17-66.

DUAN, C. J.; XIAN, L.; ZHAO, G. C.; FENG, Y.; PANG, H.; BAI, X. L.; TANG, J. L.; MA, Q. S.; FENG, J. X. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, p. 245-256, 2009.

ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J. D.; STEELE, H. L.; REYMOND, J. L.; JAEGER, K. E.; STREIT, W. R. Isolation and Biochemical Characterization of two novel metagenome derived esterases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 3637-3645, 2006.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. COOT: model building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr. D**

**Biol Crystallogr.**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

EULBERG, D.; LAKNER, S.; GOLOVLEVA, L. A.; SCHLÖMANN, M. Characterization of a Protocatechuate Catabolic Gene Cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for a Merged Enzyme with 4-Carboxymuconolactone-Decarboxylating and 3-Oxoadipate Enol-Lactone-Hydrolyzing Activity. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1072-1081, 1998.

EXXONMOBIOL. The outlook for energy: a view to 2040, (available at [www.exxonmobil.com/en/energy/energy-outlook/global-landscape/overview](http://www.exxonmobil.com/en/energy/energy-outlook/global-landscape/overview)). 2015.

FAORO, H.; GLOGAUER, A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUS, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. Identifications of a new lipase family em the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **Environ. Microbiol. Reports.**, v. 3, p. 750-755, 2011.

FERRER, M.; REYES-DUARTE, D.; GOLYSHINA, O. V.; CHERNIKOVA, T. N.; KHACHANE, A. N.; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; STROMPL, C.; ELBOROUGH, K.; JARVIS, G.; NEEF, A.; YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environ. Microbiol.**, v. 7, p. 1996-2010, 2005.

FU, C.; HU, Y.; XIE, F.; GUO, H.; ASHFORTH, E. J.; POLYAK, S. W.; ZHU, B.; ZHANG, L. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 961-973, 2011.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 803-816, 2011.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**: Humana Press, 2005. p. 571-607.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R. CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4301-4306, 2002.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Ed.). **Sustainable management of soils organic matter**. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 190-194.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbiol. Cell Factories**, v. 10, p. 1-15, 2011.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; REVETTA, R. P.; DOMINGO, J. W. S. Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveals a complex microbiol system. **BMC Microbiol.**, v. 12, 2012. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/122>.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Aterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 763-781, 2004.

- HADDOCK, J. D. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons: enzyme structure and catalytic mechanisms. In: TIMMIS, K.N. (Ed.) **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 1058-1069.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem. Biol.**, v. 5, p 245-249, 1998.
- HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature Biotech.**, v. 23, n. 1, 2005.
- HANSAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzym. Microb. Tech.**, v.39, p. 235-251, 2006.
- HARDMAN, F.; SJÖLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 524-534, 2007.
- HARTNETT, G. B.; ORNSTON, L. N. Acquisition of apparent DNA slippage structures duringb extensive evolutionary deivergence of *pcaD* and *catD* genes encoding identical catalytic activites in *Acetobacter calcoaceticus*. **Gene**, v. 142, p. 23-79, 1994.
- HARWOODS, C.S.; PARALES, R.E. The  $\beta$ -keto adipate pathway and biology of self-identity. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 553-590, 1996.
- HAUSMANN, S.; JAEGER, K. E. Lipolytic Enzymes from bacteria. TIMMIS, K.N. (Ed.) **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 1099-1126.
- HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 667-674, 1995.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.
- HU, Y.; ZHANG, G.; LI, A.; CHEN, J.; MA, L. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from soil-derived metagenomic library with na efficient approach. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 80, p. 823-830, 2008.
- HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHÄFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p.362–374, 2000.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY NOMENCLATURE. **Enzyme nomenclature 1992**. San Diego: IUBMB, 1992. 862 p.
- ISMAIL, W.; GESCHER, J. Epoxy Coenzyme A Thioester Pathways for Degradation of Aromatic Compounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 5043-5051, 2012.
- ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **J.Mol. Catal. B Enzym.**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.
- IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **ISME J.**, v. 4, p. 279-285, 2010.
- JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.15, p. 29-63, 1994.



JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; MANFRED, T.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotech**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: biology, tree-dimensional structures, and biotechnological applications. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JANSEN, R.G. Detection and determination of lipases (Acylglycerol Hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomic. **Soil Biol. Biochem.**, v. 42, p. 1911-1923, 2010.

KASHIMA, Y.; IJIMA, M.; OKAMOTO, A.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAHIDA, D. F. Purification and characterization of intracellular esterases related to ethylacetate formation in *Acetobacter pasteurianus*. **J. Ferment. Bioeng**, v. 85, p. 584-588, 1998.

KASHIMA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, T.; TAYAMA, K.; KOIZUMI, Y.; UDAKA, S.; YANAGIDA, F. Cloning and characterization of ethanol-regulated esterase genes in *Acetobacter pasteurianus*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, p. 9-27, 1999.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, p. 363-371, 2009.

KHAN, M.; JITHESH, K.; MOOKAMBIKAY, R. Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 59, p. 21-31, 2013.

KENNEDY, J.; OLEARY, N.D.; KIRAN, G.S.; MORRISEY, J.P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A.D.W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **J. Appl. Microbiol.** v. 111, p. 787-799, 2011.

KHELEBNOVIK, A.; RISA, Ø; SKAUG, T; CARRIER, T. A.; KEASILNG, J. D. Regulatable Arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. **J. Bacteriol**, v. 182, p. 7029-7094, 2000.

KIM, E. K.; JANG, W. H.; KO, J.H.; KANG, J. S.; NOH, M. J. Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818: Proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 5937-5941, 2001.

KIM, H. K.; LIU, J. W. CARR, P. D.; OLLIS, D. L. Following directed evolution with crystallography: structural changes observed in changing the substrate specificity of diene lactone hydrolase. **Biol. Cryst.**, v. 61, p. 920-931, 2005.

KIM, Y. J.; CHOI, G. S.; KIM, S. B.; YOON G. S.; Kim, Y. S.; RYU, Y. W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expres. Purif.** v. 45, p. 315-323, 2006.

KIM, E. Y.; OH, K. H.; LEE, M. H.; KANG, C. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. Novel Cold adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 257-260, 2009

KIM, Y. H.; KWON, E. J.; KIM, S. K.; JEONG, Y. S.; KIM, J.; YUN, H. D.; KIM, H. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 393, p. 45-49, 2010.

KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and screening of metagenomics libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for gene conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1408-1416, 2003.

KOSAS, M.; RAGAUSKAS, A.J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends Biotech.**, v. 29, p. 53-61, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Trends Genet.**, v. 22, p. 29-37, 1970.

LÄMMLER, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **J. Biotech.**, v. 127, p. 575-592, 2007

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LAWRENCE, R. C.; FRYER, T. F.; REITER, B. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. **Nature**, v. 213, p. 1264-1265, 1967.

LEE, S. W.; WON, K.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 65, p. 720-726, 2004.

LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p. 7406-7409, 2006.

LEE, M.H.; LEE, S. W. Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. **Genomic Inform.**, v. 11, p. 114-120, 2013.

LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GERMAN, L.A.; McCANN, J.; MARTINS, G. C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.105-124.

LENFANT, N.; HOTELIER, T.; VELLUET, E.; BOURNE, Y.; MARCHOT, P.; CHATONNET, A. ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 423-429, 2013.

LEOMIL, L.; REIS, A. M. M.; TAVARES, P.; ARAUJO, J. F.; KRUGER, R. H.; ASTOLFI-FILHO, S. A. Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. In: **24. Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Anais. Brasília, 2007. p. 56.

LESLIE, A. G. W. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, Joint CCP4 + ESF-EAMCB. **Newslett. Protein Crystallogr.**, v. 26, 1992.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Compt. Str. Biotech. J.**, v. 2, 2012.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEIL, B. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Org. Geochem.**, v. 11, p. 206-213, 2010.

LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Deep Agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. **J. Microbiol. Methods**, v. 14, p. 193-200, 1991.

LIMA, H. N.; SCHAEFER, C. E. R.; MELLO, J. W. V.; GILKES, R. J.; KER, J. C. Pedogenesis and pre-Colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, v. 110, p. 1-17, 2002.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHÄBERLE, T. F.; HUGHES, D.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, 2015. doi:10.1038/nature14098

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; McSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from metagenomi library of China Holstein cow rumen. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 35, p. 605-611, 2009.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Chem. Biotech.**, v. 13, p. 572-577, 2002.

MACNEIL, I. A.; TIONG, C. L.; MINOR, C.; AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B.A.; PHILLIPS, T.; NARULA, S.; SUNDARAMOORTHY, R.; TYLER, A.; ALDREDGE, T.; LONG, H.; GILMAN, M.; HOLT, D.; OSBURNE, M. S.; Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **J. Mol. Microbiol. Biotech.**, v. 3, p. 301-308, 2001.

MACOY, A. G.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **J. Appl. Cryst.**, v. 40, p. 658-674, 2007.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipase. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 3, p. 193-217, 1985.

MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B.; MARTIN-NETO, L.; BENITES, V. M.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): Suas Características e Papel na Sustentabilidade da Fertilidade do Solo. In: Eds. TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. (Eds). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Universidade Federal do Amazonas Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.p 172-188.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; ICHIKAWA, S.; NABETANI, H.; FURUSAKI, S.; SEKI, M. Oil—Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid. **JAOCs**, v. 77, p. 1121-1127, 2000.

MCLEAN, R. J. C.; KAKIRDE, K. S. Enhancing Metagenomics Investigations of Microbial Interactions with Biofilm Technology. **J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 22246-22257, 2013.

MEILLEUR, C.; HUPÉ, J. F.; JUTEAU, P.; SHARECK, F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 36, p. 853-861, 2009.

MORIMOTO, S.; FUJII, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 83, p. 389-396, 2009

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B.W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 9, p. 732-737, 1999.

NARDINI, M.; LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation: The prototype for family i.1 of bacterial lipases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 31219-31225, 2000.

NIESEN, F. H.; BERGLIND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 2212-2221, 2007.

OLANIRAN, A. O.; IGBINOSA, E. O. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern – properties, distribution and microbial degradation processes. **Chemosphere**, v. 83, p. 1297-1306, 2011.

OLLIS, D. L.; NGAI, K. L. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data of dienelactone hydrolase from *Pseudomonas* sp. B13. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9818-9819, 1985.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B. W.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; RAMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHARG, J. *et al.* The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng.**, v. 5, p. 197-211, 1992.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.

PARK, S.; KIM, S.; KANG, S. G.; WOO, J.; LEE, J.; CHOI, H.; KIM, S. A new esterase showing similarity to a putative dienelactone hydrolase from a strictmarine bacterium, *Vibrio* sp. GMD509. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, p. 107-115, 2007a.

PARK, H.; JEON, J. H.; KANG, S. G.; LEE, J.; LEE, S.; KIM, H. Functional expression and refolding of a new alkaline esterase, EML28 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Express. Purif.**, v. 52, p. 340-347, 2007b.

PATHAK, D.; NGAI, K. L.; OLLIS, D. X-ray crystallographic structure of dienelactone hydrolase at 2.8 Å. **J. Mol. Biol.** v. 204, p. 435-445, 1988.

PATHAK, D.; ASHLEY, G.; OLLIS, D. Thiol protease-like active site found in the enzyme dienelactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. **Proteins**, v. 9, p. 267-279, 1991.

PERRAKIS, S.; MORRIS, R.; LAMZIN, V.S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. **Nat. Struct. Biol.**, v. 6, p. 458-463, 1999.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE C.; SCHMID, R. D. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 10, p. 491–508, 2000.

PRIVÉ, F.; KADERBHAI, N. N.; GIRDWOOD, S.; WORGAN, H. J.; PINLOCHE, E.; COLLAN, N. D.; HUWS, S. A.; NEWBOLD, C. J. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. **Plos One**, v. 8, 2013.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv. Protein Chem.**, v. 23, p. 283-438; 1968.

RAMOS, J. L.; MARQUÉS, S.; DILLEWIJN, P.; URGEL, M. E.; SEGURA, A.; DUQUE, E.; KRELL, T. GONZÁLEZ, M. I. R.; BURSAKOV, S.; ROCA, A.; SOLANO, J.; FERNÁNDEZ, M. NIQUI, J. L.; TOBIAS, P. P.; WITTICH, R. M. Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. **Cell Press.**, v. 29, p. 641-647, 2012.

RIESENFELD, C. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 981-989, 2004.

- RHEE, J. K; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone sensitive lipase family, cloned from a metagenome library. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 817-825, 2005.
- ROH, C.; VILLATTE, F.; KIM, B. G.; SCHMID, R. D. Screening and purification for novel cytochrome b5 from uncultured environmental microorganisms. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 475-480, 2007.
- RONDON, M. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Tibtech October**, v.17, p. 403-409, 1999.
- RUIZ, C.; PASTOR, F. I.; DIAZ, P. Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.40, p. 218-227, 2005.
- RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; PASTOR, F. I.; SASO, I.; DIASZ, P. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning and characterization of the first lipase isolated from epsilon-proteobacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 2423-2431, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.
- SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Res. J. Microbiol.**, v. 6, p. 1-24, 2011.
- SCHLEIF, R. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. **FMES**, p. 1-18, 2010.
- SCHLÖMANN, M.; SCHMIDT, E.; KNACKMUSS, H. J. Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria. **J. Bacteriol.**, v.172, p. 5112-5118, 1990.
- SCHLÖMANN, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. **Biodegradation**, v. 5, p. 301-321, 1994.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Environ. Biotech.**, v. 14, p.303-310, 2003.
- SCHMIDT, E.; KNACKMUSS, H. J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. **Biochem. J.**, v. 192, p. 339-347, 1980.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Methods. Enzymol.**, v. 284, p. 85-107, 1997.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BENERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotech. Adv.**, v. 19, p.627-662, 2001.
- SIMON, G.; CRAVATT, B. F.; Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases as a Case Study. **J Biol Chem.**, v. 285, p. 11051-11055, 2010.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, p. 1153-1161, 2011.
- STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 247, p. 105-111, 2005.
- STEELE, H. L.; JAEGER, K. E.; DANIEL, R.; STREIT, W. R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. **J. Mol. Microbiol. Biotech.**, v. 16, p. 25-37, 2009.

STREIT, W. R.; DANIEL, R.; JAEGER, K. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Curr. Opin. Biotech.**, v.15, p. 285-290, 2004.

STUDIER, F. W.; MOFFATI, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, p. 113-30, 1986.

TAMURA, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 8, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, W. G.; MARTINS, G. C. Soil physical characterization. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.271-286.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p.4673-4680, 1994.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil, from genes to ecosystems. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 240-245, 2002.

UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene expression of environmental metagenoma libraries for isolation in catabolic genes. **Nature Biotech.**, v. 23, p. 88-93, 2005.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 20, p. 616-622, 2009.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFAN, J.; PARSONS, R.; BADENTILLSON, H.; PFANNKONCH, C.; ROGERS, Y-H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.

VITKUP, D.; MELAMUD, E.; MOULT, J.; SANDER, C. Completeness in structural genomics. *Nature Struc. Biol.*, v. 8, p. 559-566, 2001.

VOGET S.; LEGGEWIE C.; UESBECK A.; RAASCH C.; JAEGER K.E.; STREIT, W.R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 6235-6242, 2003.

WALKER, I.; EASTON, C.J.; OLLIS, D. L. Site-directed mutagenesis of diene lactone hydrolase produces diene lactone isomerase. **Chem. Comm.**, p. 671-672, 2000.

WANG, Y.; WEI, D. Q.; WANG, J. F. Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism. *Journal of Chemical Informatics Model*, vol. 50, p. 875-878, 2010.

WARD, B. B. How many species of prokaryotes are there? **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 10234-10236 2003.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1189-1191, 2009.

WEINER, M. P.; ANDERSON, C.; JERPSETH, B.; WELLS, S.; JOHNSON-BROWNE, B.; VAILLANCOURT, P. Studier pET system vectors and hosts. **Strateg. Mol. Biol.** v.7, n.2, p.41-43, 1994.

WELLS, T. J.; RAGAUSKAS, A. J. Biotechnological opportunities with the  $\beta$ -keto adipate pathway. **Cell Press**, v. 30, p. 627-637, 2012.

WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vector and genomic clones. **Genome Res.**, v. 12, p. 1434-1444, 2002.

WILLERDING, A. L.; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. W.; GERMANO, M. G.; CHAGAS, A. F. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian Soils. **Enzyme Res.**, v. 2011, 2011. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/720194>

WILLIAMS, P. A.; SAYERS, J. R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, v. 5, p. 195-217, 1994.

WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; FEOLO, M.; GEER, L. Y.; HELMBERG, W.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; MILLER, V.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SHUMWAY, M.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 13-21, 2008.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **J. Lipid Res.**, v. 43, p. 993-999, 2002.

WU, C.; SUN, B. Identification of a novel esterase from metagenomic library of Yangtze river. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 187-193, 2009.

YANG, H.; WONG, M. W. Oxyanion hole stabilization by C-H-O interaction in a transition state—a three-point interaction model for *Cinchona* Alkaloid-catalyzed asymmetric methanolysis of meso-cyclic anhydrides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, p. 5808-5818, 2013.

YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microb. Cell Fact.**, v. 4, 5 p., 2005.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo. **Cad. Ciên. Tecnol.**, v. 20, p. 391-411, 2003.

ZHU, X.; LARSEN, N. A.; BASRAN, A.; BRUCE, N. C.; WILSON, I. A. Observation of an Arsenic Adduct in an Acetyl Esterase Crystal Structure. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 2008-2014, 2003.