



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DE BOTUCATU



ESTUDOS DE INIBIÇÃO DE β -GLICOSIDASES BACTERIANAS POR FENÓIS SOLÚVEIS

Mariana de Almeida Barbosa Radicchi

**Botucatu- SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Radicchi, Mariana de Almeida Barbosa.

Estudos de inibição de β -glicosidases bacterianas por fenóis solúveis / Mariana de Almeida Barbosa Radicchi. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mario Oliveira Neto

Capes: 20901003

1. Taninos. 2. Glicosídeos. 3. Lignocelulose. 4. Fenóis. 5. Inibidores enzimáticos.

Palavras-chave: Ácido tânico; β -glicosidases bacterianas; Biomassa lignocelulósica ; Compostos fenólicos; Inibição/desativação enzimática.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

ESTUDOS DE INIBIÇÃO DE β -GLICOSIDASES BACTERIANAS
POR FENÓIS SOLÚVEIS

Doutoranda: Mariana de Almeida Barbosa Radicchi
Orientador: Profº. Dr. Mario de Oliveira Neto

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Botucatu- SP
2019

É a nebulosidade do mistério que dá encanto à busca.

Antoine Rivarol.

Dedico à minha filha, Maria Clara.....

Agradecimentos

À Deus pela vida,

Ao meu orientador Mario pelos ensinamentos, convivência e amizade durante esses anos.

Aos colegas de curso e laboratório, principalmente Antoniel, Viviam, Thiago, Camila e Mariana, pela amizade, companheirismo e colaborações diárias.

Aos Professores Marcos Fontes e Wanius Garcia por colaborarem efetivamente no desenvolvimento e conclusão desta tese.

Ao Alex e funcionários da pós-graduação pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Quinteto, que mesmo distante, torce e vibra pelas minhas conquistas.

Imensamente ao meu marido pelo amor e incentivo sem fim.

Aos meus avós, pais, irmãs, sogros e cunhados por serem minha base e me ajudarem nos desafios enfrentados.

Especialmente à minha filha, por me fazer acreditar e lutar por dias melhores.

À Capes pela bolsa concedida durante o doutorado.

Sumário

Lista de Ilustrações	9
Lista de Tabelas	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Biomassa Lignocelulósica	18
2.2 Composição da parede celular vegetal	19
2.3 Conversão da biomassa lignocelulósica	24
2.4. Glicosídeo hidrolases; β -glicosidases e TpBgl1 e TpBgl3	28
2.4. Compostos Inibidores	33
2. OBJETIVO	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Expressão e extração de proteína heteróloga de β -glicosidases de <i>Thermotoga petrophila</i> em <i>Escherichia coli</i>	36
4.2 Purificação por Cromatografia por afinidade	37
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	37
4.4 Medidas de atividade enzimática padrão de TpBgl1 e TpBgl3.	38
4.5 Inibição e desativação enzimática de TpBgl1 e TpBgl3	38
4.6 Modelagem por Homologia de TpBgl1 e TpBgl3	39
4.7 Acoplamento Molecular (“molecular docking”)	39
4.8 Simulações de Dinâmica Molecular	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes TpBgl1 e TpBgl3	41
5.2 Modelos por homologia TpBgl1 e TpBgl3	41
5.3 Ensaio enzimáticos de inibição e desativação	42
5.4 Acoplamento Molecular	44
5.5 Simulações de Dinâmica Molecular	46
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS	58

Lista de Ilustrações

Figura 1. O principal componente da biomassa vegetal é a celulose, formada por cadeias de glicose com ligações β (1–4). A hemiceluloses, o segundo componente mais abundante, é composta de diversos açúcares com 5 ou 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, xilose e manose. A lignina é composta de três grandes componentes fenólicos, nomeados álcool cumarílico (H), o álcool coniferílico (G) e o álcool sinapílico (S). Fonte: Rubin, E. Genomics of cellulosic biofuels. Nature 454, 841–845 (2008).....	18
Figura 2. Modelo da estrutura da parede celular vegetal. LM = lamela média; P = parede primária; S1 e S2 = paredes secundárias e S3 = parede terciária. Fonte: Adaptada de Fengel e Wegener (1989).....	20
Figura 3. Estrutura da celulose. Adaptada de Quiroz-castañeda e Mallo, 2013.....	21
Figura 4. Unidades de fenilpropano precursores da lignina.....	23
Figura 5. Hidrólise da celulose por ação sinergicamente diferentes características classes de celulases. Figura adaptada Andlar e at., 2018.....	28
Figura 6. Esquema representativo clivagem da ligação glicosídica.....	29
Figura 7. Atividade de hidrolise da <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> para monossacarídeos e polissacarídeos específicos. Figura adaptada Cota et al., 2015.....	31
Figura 8. Efeitos de inibição/ativação de 6 monossacarídeos em 12 concentrações (até 1 M) na atividade de <i>TpBgl1</i> (A) e <i>TpBgl3</i> (B). Os monossacáridos analisados foram glicose (preto), galactose (amarelo escuro), arabinose (laranja), manose (verde), frutose (azul) e xilose (vermelho). Figura adaptada Cota et al., 2015.....	32
Figura 9. Esquema de compostos inibidores formados durante os diversos pré-tratamentos. Figura adaptada Fillat et al., 2017.....	33

Figura 10.	Foto gel purificação da <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i>	41
Figura 11.	Gráficos de Ramachandran que validam e confirmam a qualidade dos modelos gerados para <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i>	42
Figura 12.	Ensaio enzimático de inibição e desativação das enzimas <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> com os oito compostos fenólicos (hidroquinona, ácido benzóico, vanilina, ácido p-coumarico, ácido cafeico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido sinapínico e ácido tânico).....	43
Figura 13.	Modelos tridimensionais das enzimas <i>TpBgl1</i> (A, B) e <i>TpBgl3</i> (C, D) complexadas com os ligantes, compostos fenólicos (ácido p-coumarico, siringaldeído, ácido sinapínico e ácido tânico) no sítio ativo.....	45
Figura 14.	Trajatórias de desvio de RMSD dos C α das enzimas <i>TpBgl1</i> (esquerda) e <i>TpBgl3</i> (direita) nativas e complexadas com compostos fenólicos durante simulações de dinâmica molecular.....	47
Figura 15.	Sítio ativo das enzimas <i>TpBgl1</i> (esquerda) e <i>TpBgl3</i> (direita) complexadas com o ácido p-coumarico (A e B); ácido sinapínico (C e D); siringaldeído (E e F) e o ácido tânico (G e H). As enzimas são apresentadas de forma esquemática na figura em verde. Em destaque são os resíduos que interagem com os compostos fenólicos ($\leq 3,6$ Å). Os compostos fenólicos são apresentados em esquemas azul claro.....	48
Figura 16.	Distância média entre o ácido tânico e os átomos do anel Tyr295 e Trp324 da enzima <i>TpBgl1</i> durante a simulação de dinâmica molecular.....	49
Figura 17.	Padrão de ligação de hidrogênio do ácido tânico com base no número de contatos com os resíduos do sítio ativo ou com a proteína total durante simulações de dinâmica molecular.....	50
Figura 18.	RMSF de <i>TpBgl1</i> (esquerda) e <i>TpBgl3</i> (direita) nativo e complexado com compostos fenólicos durante simulações de dinâmica molecular.....	50
Figura 19.	RMSF de <i>TpBgl3</i> nativo (preto) e complexado com ácido tânico (verde) e celobiose (vermelho) durante simulações de dinâmica molecular.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais processos de pré-tratamento.....	25
Tabela 2. Parâmetros cinéticos para <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> . Figura adaptada Cota et al., 2015....	31
Tabela 3. Atividade de hidrolise da <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> para derivado de pNP específicos. Figura adaptada Cota et al., 2015.....	32
Tabela 4. Os melhores valores de GoldScores do resultado do molecular docking de <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> com os quatros compostos fenólicos. Todos os resíduos que mostraram interação ($\leq 3,6$ Å) são apresentados. Os resíduos em destaque são considerados importantes para o sítio ativo de <i>TpBgl1</i> (Manara et al., 2006) e <i>TpBgl3</i> (Pozzo et al., 2010), de acordo com a literatura.....	46

RESUMO

A biomassa lignocelulósica pode ser usada para a produção de energia ou de novos bioprodutos potenciais substitutos de químicos convencionais. Porém a conversão dos polissacarídeos estruturais presentes na parede celular vegetal das células que compõe a biomassa não é simples. Isto se deve principalmente pela presença da lignina, que juntamente com a hemiceluloses, formam uma estrutura coesa de microfibrilas que entrelaçam a celulose. Compostos que inibem as enzimas celulolíticas, incluindo fenólicos solúveis (derivados da lignina), açúcares solúveis, aldeídos de furânicos e ácidos fracos são gerados durante os diversos pré-tratamentos utilizados atualmente. Neste estudo, observamos como os fenólicos solúveis interagem com β -glicosidases. Para isso, combinamos simulações de ensaio enzimático, acoplamento molecular e dinâmica molecular para descrever o processo de ligação. Notavelmente, o ácido tânico, um dos fenólicos solúveis estudados, foi a molécula com maior poder inibitório em comparação com todos os demais fenólicos. Possivelmente devido ao seu comprimento e suas substituições de grupos químicos. A alta presença de anéis aromáticos e grupos hidroxilas no ácido tânico, leva a maior interação entre as moléculas e consequente inibição/desativação das β -glicosidases bacterianas, enquanto os grupos carboxílicos presentes nos demais fenólicos alteram os efeitos físico-químicos aumentando a hidrofobicidade; criando cargas eletrostáticas e aumentando a ligação de hidrogênio, afetando assim interações com as β -glicosidases. Observamos também que os diferentes mecanismos enzimáticos apresentados pelas β -glicosidases influenciam no modo de interação dessas moléculas com os fenólicos. Esses dados podem fornecer uma base útil para futuras aplicações biotecnológicas de β -glicosidases microbianas, especialmente no campo da produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; inibição enzimática; β -glicosidases bacterianas; compostos fenólicos; ácido tânico.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass can be transformed to chemicals or energy products. However converting polysaccharides present on the cell wall can be limited due to the high recalcitrance caused by the presence of lignin. Compounds that inhibit enzymes, including lignin-derived phenolics, soluble sugars, furan aldehydes, and weak acids, are generated during the various pre-treatments currently used. In this study was observed how the soluble phenolics generated significantly impede the enzymatic hydrolysis of cellulose. For this were combine enzymatic assay, molecular docking and molecular dynamics simulations to describe the binding process between soluble phenolics and bacterial β -glycosidases. Notably, tannic acid, one of the soluble phenolics generated, was the strongest inhibitory molecule in comparison with all phenolics studied. Possibly because of its length and its substitutions of chemical groups. The high presence of aromatic rings and hydroxyl groups in tannic acid leads to greater interaction between the molecules and consequent inhibition / deactivation of bacterial β -glycosidases. Taken together, our studies of the interaction suggest that there is a high correlation between exposed hydrophobic surface areas and the number of binding sites on the inhibition of β -glucosidases. These data may provide a useful basis for future biotechnological applications of microbial β -glucosidases, especially in the field of biofuel production.

Key words: Lignocellulosic biomass; inhibit enzymes; bacterial β -glucosidases; phenolic compounds; tannic acid.

1. INTRODUÇÃO

A biorrefinaria tem como foco o desenvolvimento de sistemas integrados para produzir combustíveis, produtos químicos e outros materiais em larga escala, a partir de matérias-primas renováveis e/ou resíduos industriais, utilizando tecnologias de conversão baseadas em bioprocessos. Sendo vista como uma resposta consequente aos desafios globais enfrentados pela humanidade e pelo nosso meio ambiente: recursos fósseis limitados e sua crescente escassez de fornecimento seguro de energia, mudança climática global e poluição ambiental (Zheng, 2019).

Há, portanto, a perspectiva de significativo aumento na demanda por bioetanol. No Brasil, aumentar a produção do combustível por área de cana-de-açúcar plantada seria possível pela conversão de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal dos subprodutos (palha e bagaço) do processamento tradicional de primeira geração (Zhou et al., 2014).

Com um alto teor de carboidratos, a biomassa lignocelulósica representa uma fonte promissora. Estes polissacarídeos podem ser solubilizados e usados em bioprocessos integrados, intitulados biorrefinarias. Esta oferece a possibilidade de obter biocombustíveis e bioprodutos (álcoois, ácidos orgânicos, alcenos, lipídios e outros produtos químicos) via variados processos, incluindo fermentação (Zheng, 2019).

Um desafio fundamental para a comercialização do bioetanol é a presença de inibidores secundários formados durante os variados pré-tratamentos, que impedem reações bioquímicas (Martins et al., 2015; Schneiderman et al., 2015; Jönsson e Martín, 2016) e a baixa eficiência da fermentação que resulta volume de produção de bioetanol (Erdei et al., 2010; Xu et al., 2016).

Existem várias limitações associadas ao pré-tratamento (físico e/ou químico), afetando o desenvolvimento de processos eficientes de bioconversão. Em geral, são necessárias altas pressões, temperaturas e/ou a adição de produtos químicos e solventes (Fillat et al., 2017). Essas severas condições levam à solubilização da biomassa lignocelulósica, porém frequentemente envolvem reações secundárias que acarretam na geração de diferentes inibidores enzimáticos (principalmente compostos fenólicos) e microbianos (ácidos fracos, derivados de furanos e fenóis), o que limitam os passos subsequentes de sacarificação e fermentação (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Fillat et al., 2017).

A natureza e concentração de todos esses produtos inibidores é fortemente dependente da matéria-prima, bem como do tipo de pré-tratamento (Fillat et al., 2017). Sabe-se que os grupos hidroxila fenólicos associados a taninos e partículas de lignina podem ser adsorvidos a proteínas e desativar celulasas, como as β -glicosidases, durante a hidrólise da celulose (Kim et al., 2011).

A necessidade de alto volume de produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica está gerando um forte impacto na economia, vários esforços têm-se concentrado na redução dos custos de produção e consequentemente da quantidade de enzimas necessárias para este bioprocessos (Klein-Marcuschamer et al., 2012), logo, compreender os efeitos dos inibidores e seus mecanismos de ação nas celulasas é de suma importância.

Alguns pesquisadores comprovaram os efeitos inibitórios e/ou desativadores de fenóis poliméricos, como o ácido tânico, e monoméricos, como ácidos ferúlico, p -cumárico, sinápico, ácido benzóico, vanilina e siringaldeído, em celulasas e β -glicosidases (Tejirian e Xu, 2011; Ximenes et al., 2011). O ácido tânico, mesmo em concentrações micro ou milimolares, é um importante inibidor e desativador das celulasas, principalmente das β -glucosidases (Tejirian e Xu, 2011; Ximenes et al., 2011). Assim, embora o papel inibitório dos compostos fenólicos na hidrólise enzimática da celulose tenha sido reconhecido, o mecanismo de interação entre celulasas e compostos fenólicos não foi descrito com precisão.

Neste estudo, a atividade enzimática, acoplamento molecular e simulações de dinâmica molecular foram empregadas para descrever o processo de ligação molecular entre as β -glicosidases GH1 e GH3 de *Thermotoga petrophila* e compostos fenólicos solúveis (hidroquinona, ácido benzóico, vanilina, ácido p -cumárico, ácido caféico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido tânico) destacando as principais diferenças de interações químicas entre a inibição e a desativação das β -glucosidases e os resíduos que o ácido tânico se liga impedindo a hidrólise do substrato.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Biomassa Lignocelulósica*

Biomassa pode ser definida como qualquer tipo de matéria orgânica proveniente de fontes vegetais ou animais. São recursos renováveis, formados periodicamente, e não tem o tempo como fator limitante à produção, como acontece com os combustíveis fósseis, e podem ser transformados em energia mecânica, térmica e elétrica (Emerick, 2006).

Biomassa lignocelulósica é o composto orgânico mais abundante na biosfera e participa com aproximadamente 50% da biosfera terrestre. A estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma sua parede celular. Trata-se de estrutura fibrosa que confere maior rigidez à planta, protegendo-a contra choques osmóticos e mecânicos. É composta de celulose, hemiceluloses, lignina, e outros materiais presentes em menor quantidade que correspondem aos ácidos graxos, proteínas e cinzas inorgânicas. A proporção de cada um destes componentes varia de acordo com a espécie, disposição e sazonalidade da planta (Fengel e Wegener, 1989).

Devido ao seu caráter renovável, abundante e de baixo custo, os materiais lignocelulósicos são matérias-primas potenciais para a produção de etanol, e de outros produtos utilizados em diversos segmentos industriais (Renó et al., 2014). A biomassa lignocelulósica disponível para a geração de etanol inclui gramíneas, resíduos agrícolas e resíduos da silvicultura. No mundo são produzidos em média $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas de substratos lignocelulósicos (Singhania et al., 2010). Estima-se que, em cada 1 milhão de toneladas de biomassa seca gerada, 227 milhões de litros de etanol poderiam ser produzidos considerando o uso apenas da parte celulósica (Soccol et al., 2010).

As fontes de energia oriundas da biomassa representam 8,9% do total da matriz energética brasileira, dos quais 76,8% são provenientes do bagaço da cana-de-açúcar (Análises e Indicadores do Agronegócio, 2017). A alta produtividade alcançada pela lavoura canavieira disponibiliza enorme quantidade de matéria orgânica sob a forma de palha e bagaço nas usinas e destilarias de cana-de-açúcar. Além disso, o período de colheita da cana-de-açúcar coincide com o de estiagem das principais bacias hidrográficas do parque hidrelétrico brasileiro, tornando a opção ainda mais vantajosa (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008). No Brasil na safra 2015/16, a produção de bagaço foi de 166,40 milhões de toneladas. O Estado de São Paulo respondeu por 55,2% dessa produção (Análises e Indicadores do Agronegócio, 2017).

2.2 Composição da parede celular vegetal

A arquitetura da parede celular é determinada, principalmente, pela celulose que forma um sistema de fibrilas entrelaçadas, embebidas por uma matriz amorfa, formada de hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas e substâncias incrustantes, tais como a lignina e a suberina, presentes em certos tecidos, são depositadas nesta matriz (Figura 1) (Raven et al., 1992).

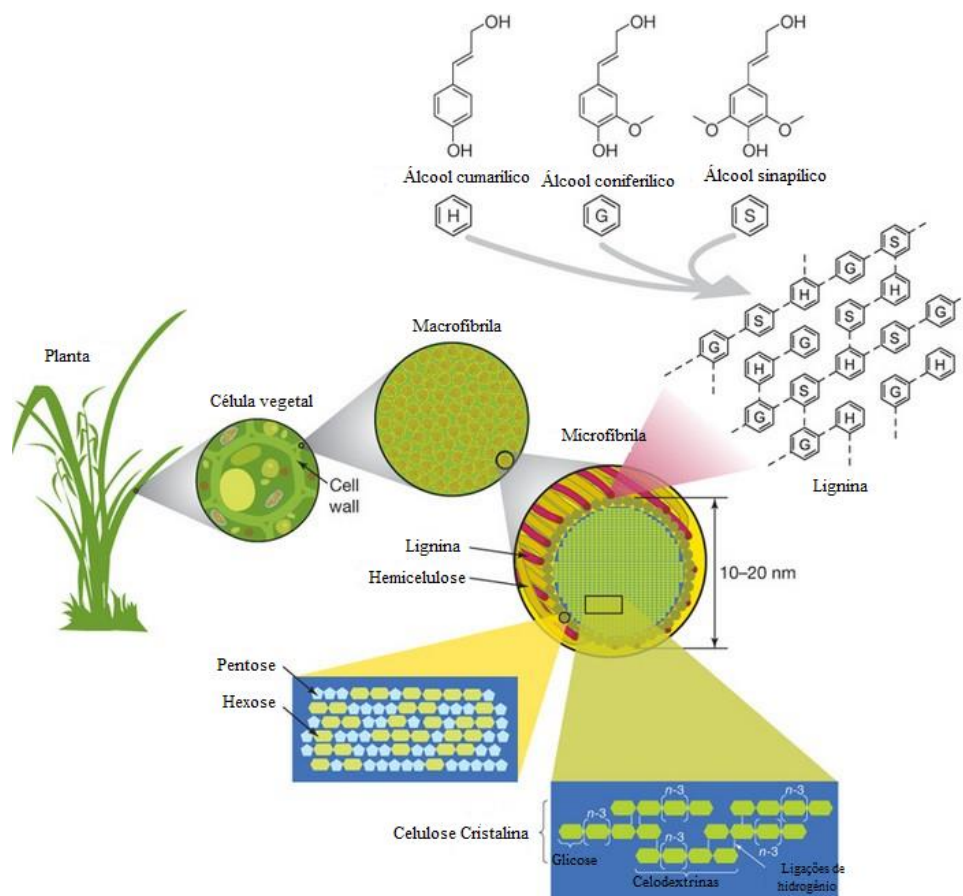


Figura 1- O principal componente da biomassa vegetal é a celulose, formada por cadeias de glicose com ligações β (1–4). A hemiceluloses, o segundo componente mais abundante, é composta de diversos açúcares com 5 ou 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, xilose e manose. A lignina é composta de três grandes componentes fenólicos, nomeados álcool cumarílico (H), o álcool coniferílico (G) e o álcool sinapílico (S). Fonte: Adaptado de Rubin 2008.

A biomassa lignocelulósica apresenta uma estrutura lamelar, complexa e compacta, em que a celulose e a hemiceluloses predominam na região da parede celular e a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. Geralmente, a estrutura da parede celular vegetal é subdividida em lamela média, parede primária, parede

secundária S1, S2 e S3. A distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina varia consideravelmente entre essas camadas (Figura 2) (Fengel e Wegener, 1989).

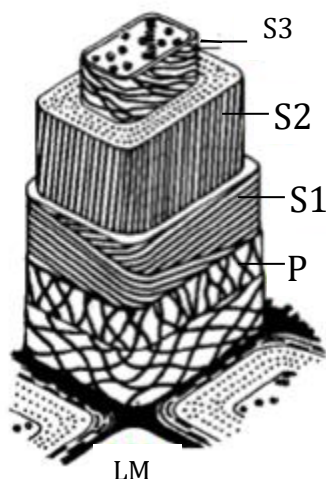


Figura 2- Modelo da estrutura da parede celular vegetal. LM = lamela média; P = parede primária; S1 e S2 = paredes secundárias e S3 = parede terciária. Fonte: Adaptada de Fengel e Wegener 1989.

A cana-de-açúcar é composta aproximadamente de 43% de celulose, 25% de hemiceluloses e 23 % de lignina. Esta última leva a alta resistência à hidrólise enzimática e ao ataque microbiano (Rodrigues e Guirardello, 2008). No entanto, a riqueza em celulose desse resíduo, faz dele um importante recurso para a produção de glicose via processo de sacarificação (Lima *et al.*, 2009).

A celulose é um dos principais componentes estruturais da parede celular, e fornece resistência mecânica e estabilidade química das plantas, sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante do mundo (Raven *et al.*, 1992). Este polímero pertence a função química dos carboidratos, mais corretamente a dos glicídeos, sendo constantemente renovado através do processo de fotossíntese, com uma biossíntese anual estimada em 1011 toneladas (Sun *et al.*, 2004). É um polímero linear de celobiose, dissacarídeo formado por unidades de anidroglicose, conectadas por ligação $\beta(1-4)$ glicosídicas resultando em macromoléculas de alta massa molar. As cadeias de celulose possuem terminações diferentes em sua cadeia, apresentando uma terminação redutora, na qual o carbono C1 é apresentado em uma estrutura hemiacetal, e outra terminação não redutora, na qual o carbono C4 possui sua hidroxila original (Figura 3) (Klemm *et al.*, 2005; Gurgel *et al.*, 2007).

Nos vegetais, a molécula de celulose é arranjada em fibrilas formadas por várias moléculas de celulose paralelas e ligadas entre si por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, as quais ocorrem ligadas à lignina e à hemiceluloses (Matulova *et al.*, 2005). As

fibrilas de celulose possuem regiões ordenadas e desordenadas, denominadas cristalinas e amorfas, respectivamente (Figura 3) (Kosaric et al., 1983). As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente a hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Converse e Ware, 1994; Wood e Saddler, 1998). A celulose é sintetizada por complexos sintase-celulose localizados na membrana plasmática (Mc Farlane *et al.*, 2014).

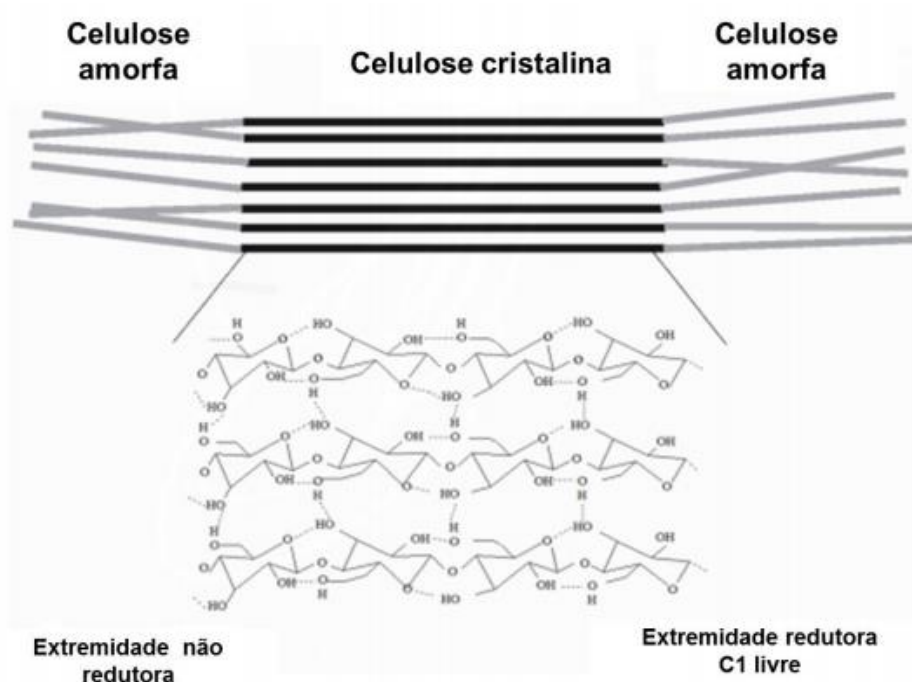


Figura 3 – Estrutura da celulose. Adaptada de Quiroz-castañeda e Mallo, 2013.

Hemiceluloses são polímeros ramificados compostos por unidades de monossacarídeos, contendo cinco ou seis carbonos. Os principais açúcares constituintes das hemiceluloses são a D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose, D-ácido glicurônico, 4-O-metil-D-ácido glicurônico, entre outros (Kulkarni et al., 2012). Moléculas de hemiceluloses se associam às moléculas de celulose formando microfibrilas e se entrecruzam com moléculas de lignina, resultando numa complexa e resistente rede.

No bagaço de cana-de-açúcar, a hemiceluloses mais abundante é a xilose (Lynd, et al. 1999). Ainda em gramíneas, há majoritariamente heteroxilanas acetiladas, classificadas com 4-O-metil-glucuronoxilanas (Sjöström, e Westermarck, 1999). A estrutura hemicelulósica, diferentemente da celulose, é bastante amorfa, sendo altamente ramificada, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais amenas (Pereira Junior, 2006).

A lignina é um componente chave da biomassa lignocelulósica. Trata-se de biopolímero (contendo unidades alifáticas e aromáticas) que ajuda na formação estrutural e confere rigidez às plantas vasculares. É hidrofóbica e inerte, formada por unidades de fenil-propano que preenchem os espaços na parede celular entre as moléculas de celulose e hemiceluloses (Kumar et al., 2018, Beauchet et al., 2012).

Existe uma grande diversidade na estrutura das ligninas de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo, dentro da mesma espécie. Essa diversidade de estruturas se dá principalmente pela natureza aleatória do acoplamento dos monômeros de lignina, via polimerização de unidades de p-hidroxifenil (H) (derivadas de álcool p-cumarílico), guaiacil (G) (derivado de álcool coniferílico) e siringil (S) (derivado de álcool sinapílico) que são compostos fenilpropanóides e diferem uns dos outros pela presença e quantidade de grupos metoxila ligados no anel aromático. A proporção da unidade G: S: H varia dependendo da matéria-prima de biomassa. A lignina de gminospemas é composta principalmente por unidades G com pequenas proporções de unidades H, enquanto a lignina de angiospermas contém principalmente unidades S e G. A lignina de plantas não lenhosas, como resíduos agrícolas, também contém unidades H juntamente com unidades G e S (Kumar et al., 2018, Jansen et al., 2014).

Como pode ser observado na Figura 4, as unidades de lignina estão ligadas através de uma variedade de ligações o tipo éter (C-O-C) e carbono/carbono (C-C) distribuídas aleatoriamente (Rubin, 2008; Zhong e Ye 2014). As ligações interunidades mais abundantes são as ligações β -O-4' (éter arílico), β -5' (fenilcoumaril) e β - β (resinol). Outros elos estruturais, como ligações β -1' (espirodienona), 5-5'-O-4 (dibenzodioxocina), 5-5 4 e 4-O-5 estão presentes (Fillat et al., 2017.)

Os monômeros precursores da lignina são biossintetizados a partir da fenilalanina, utilizando o poder redutor proveniente de duas moléculas de NADPH e consumindo um ATP no processo (Henriksson e Lennholm, 2009). Além da interação entre as unidades de lignina, os complexos de lignina-carboidrato (LCC) também são formados nas paredes celulares das plantas (Chen e Dixon 2007). Os principais tipos de ligações de LCC em materiais lignocelulósicos são ligações de fenil-glicósídicas, éter ou éster. Tem sido sugerido que

estrutura química e física da lignina desempenha um papel importante durante a hidrólise enzimática (Fillat et al., 2017)

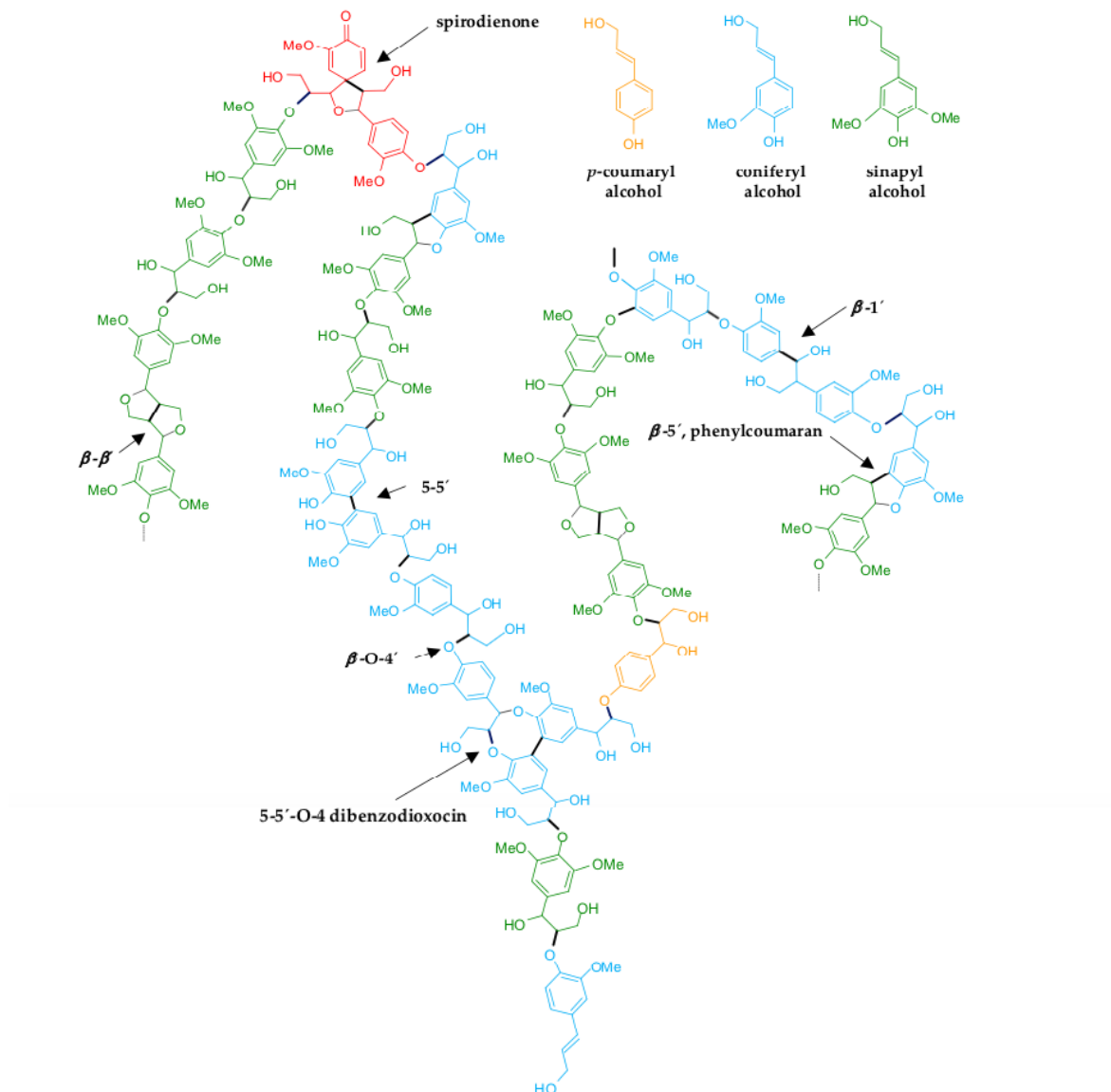


Figura 4 – Esquema representativo da estrutura da lignina com seus precursores e as ligações entre eles (Adaptado Fillat et al., 2017)

2.3 Conversão da biomassa lignocelulósica

A conversão da biomassa lignocelulósica pode ser resumida em três etapas principais: pré-tratamento (físico e/ou químico); tratamento enzimático e fermentação (Fillat et al., 2017; Hu et al., 2018). Em geral, o pré-tratamento aumenta a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose, modificando a estrutura dos carboidratos da parede celular. A hidrólise enzimática decompõe os carboidratos em açúcares fermentecíveis e açúcares não fermentecíveis pela ação de diferentes enzimas como endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), β -glicosidases (EC 3.2.1.91) e enzimas/proteínas “acessórias” tais como xilanases, proteínas do tipo expansinas e polissacarídeos lipídicos monooxigenases (LPMO) (Figura 5) (Hu et al., 2018). Esses açúcares fermentecíveis são processados por microrganismos sendo convertidos em bioetanol.

Os açúcares lignocelulósicos podem ser obtidos por acidólise ou via hidrólise enzimática, sendo este último uma escolha preferida, pois é mais seletivo, requer menos energia (temperaturas mais baixas são necessárias) e não libera subprodutos tóxicos (Ballesteros et al., 2010). No entanto, a estrutura recalcitrante da lignocelulose dificulta a acessibilidade dos carboidratos às enzimas hidrolíticas e impede a liberação de açúcares fermentecíveis. Neste contexto, o objetivo dos processos de pré-tratamento é promover mudanças na estrutura do material, de modo a liberar as fibras de celulose e aumentar a acessibilidade dos agentes de hidrólise (Alvira et al., 2010).

Para que a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica seja eficiente os processos de pré-tratamento devem garantir a remoção das hemiceluloses; remoção de lignina; uma redução no grau de polimerização e cristalinidade da celulose; e/ou incremento na porosidade de materiais pré-tratados (Kumar et al., 2009).

Os métodos de pré-tratamento podem se classificar em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (Mood et al., 2013; Agbor et al., 2011; Kumar et al., 2009). A escolha do processo de pré-tratamento ideal depende muito do objetivo do mesmo e da biomassa utilizada, uma vez que produtos diferentes são gerados. Além disso, a escolha de um método de pré-tratamento não deve basear-se apenas no seu rendimento potencial, mas também de outros parâmetros importantes, tais como o sua avaliação econômica e impacto ambiental. O processo ideal é aquele que obtêm polpa com baixo teor de

lignina, maior acessibilidade dos agentes químicos de hidrólise aos carboidratos da matriz com as menores perdas possíveis.

A Tabela 1 abaixo mostra as vantagens e as limitações dos principais processos de pré-tratamentos atuais.

Devido ao alto nível de recalcitrância que a presença da lignina confere ao material lignocelulósico podem ser necessários, junto ao pré-tratamento, processos que promovam maior remoção da lignina (deslignificação) aumentando os níveis de hidrólise do material (Nakagame et al., 2010; Siqueira et al., 2013).

Tabela 1. Principais processos de pré-tratamento.

Pré-tratamento	Objetivos	Características
Moagem	Redução da cristalinidade da celulose	Consumo de energia geralmente superior à energia inerente biomassa
Explosão a Vapor	Degrada hemiceluloses e transforma lignina; rentável.	Destruição de uma parte da fração de xilana; ruptura incompleta da matriz lignina-carboidrato; gera compostos inibidores.
AFEX (Ammonia Fibre Expansion)	Aumenta a área de superfície acessível; retira extensivamente lignina e hemiceluloses; pode não produzir inibidores de processos subsequentes.	Não eficiente para biomassa com alto teor de lignina.
Ozonólise	Reduz o teor de lignina; não produz resíduos tóxicos.	Custo elevado; requer grande quantidade de ozônio.
Ácido Diluído	Hidrolisa hemiceluloses a xilose e outros açúcares; altera a estrutura da lignina	Custo elevado, corrosão de equipamento, formação de inibidores
Alcalino	Diminui hemiceluloses e lignina; aumenta a área de superfície acessível.	Tempo elevado de reação, formação de sais incorporados a biomassa.
Organossolve	Hidrolisa lignina e hemiceluloses	Custo elevado, solvente precisa ser recuperado.
Biológico	Degrada a lignina e hemiceluloses; baixo gasto energético.	Taxa de conversão muito baixa.

Assim como o pré-tratamento, o desempenho da hidrólise dos carboidratos está condicionado a diversos fatores, como a cristalinidade da celulose, seu grau de polimerização, a umidade e a porosidade do material, o conteúdo de lignina e as perdas inerentes a cada um

dos processos (Balan et al., 2009). Para conversão da celulose e hemiceluloses faz-se uso da etapa de hidrólise ácida (processo químico) ou enzimática (processo biotecnológico), pela ação de enzimas produzidas por microrganismos (catalisadores orgânicos, como as denominadas celulasas), para liberar monômeros de açúcares e, depois, por fermentação, produzir o etanol.

Apesar do alto custo da utilização de enzimas, as vantagens do processo enzimático são inúmeras. A sua alta eficiência comparado ao processo de hidrólise ácida em condições ideais; o processo de produção controlado; a inexistência de problemas de corrosão, não necessitando de materiais de alto custo; a demanda de energia relativamente baixa para a realização do processo, e principalmente baixo impacto ambiental, que condiz com o perfil da bioeconomia que preza pela química verde (Wyman et al., 2005; Zheng 2019).

A hidrólise da celulose ocorre por meio de enzimas com diferentes características, que atuam sinergicamente. Endoglucanases atacam inicialmente e de forma aleatória os múltiplos sítios internos das regiões amorfas da fibra de celulose. Assim, disponibilizam sítios para o subsequente ataque das celobiohidrolases (Lynd, et al, 1991). Exoglucanases agem processando as terminações redutoras e não-redutoras da cadeia de celulose, liberando celobiose. As exoglucanases também podem agir na celulose cristalina ao descamar moléculas de celulose dessa estrutura e ao retirar monômeros e dímeros das terminações das cadeias de glucano. β -glicosidases hidrolisam celodextrinas e celobiose a glicose (Chauve et al., 2010). Todos os organismos que hidrolizam celulose possuem sistemas relativamente complexos compostos por enzimas de uma, duas ou três das classes mencionadas.

A celobiose, que é o produto da ação da celobiohidrolase inibe a ação da endoglucanase e da própria celobiohidrolase. A presença de β -glicosidase agindo em conjunto diminui essa inibição pelo produto (Lynd et al., 2002). As celobiohidrolases e as endoglucanases também são inibidas por xilobiose e xilooligômeros. Como a celulose é um polímero insolúvel em meio aquoso, as enzimas do complexo celulolítico necessitam de um sítio especial para sua adsorção na molécula, permitindo a ação do domínio catalítico. Esse domínio, chamado de domínio de ligação à celulose, do inglês cellulose-binding domain (CBD) está presente tanto nas exoglucanases quanto nas endoglucanases (Zhang; Lynd, 2004). As celobiasas não possuem esse domínio (Sipos et al., 2010). Existem dois tipos de exoglucanases, as celobiohidrolases I (CBH I) e celobiohidrolases II (CBH II), representando 60 e 20% das celulasas respectivamente, e diferenciam entre si principalmente pelo mecanismo de ação. As CBH I atuam preferencialmente na extremidade redutoras da cadeia, ao passo que a CBH II hidrolisa a extremidade não redutora (Lynd et al., 2002).

Trabalhos recentes com enzimas/ proteínas, “acessórias” como xilanases, swollenin, expansinas e polissacarídeos líticos monooxigenases (LPMO) mostram como estas podem aumentar o desempenho hidrolítico dos coquetéis de celulase, melhorando a acessibilidade das enzimas aos carboidratos (Hu et al., 2011; 2013 ;2014). Embora essas enzimas acessórias não hidrolisem diretamente a celulose, elas demonstraram ter alta especificidade na modificação seletiva da rede de carboidratos de maneira eficiente (Horn t al., 2012).

Hu et al., 2011 mostraram como as xilanases removem seletivamente o xilano da superfície e agem sinergicamente com as celulasas para melhorar as características das fibras, aumentando seu inchamento e porosidade. Também foi demonstrado que a clivagem oxidativa da região de celulose cristalina acessível pelo LPMO não só perturba e abre a estrutura de celulose altamente organizada, como também resulta na deposição de grupos ácidos na superfície da fibra (Villares, et al., 2017) Para Hu et al. 2018 a adição de LPMO resultou na clivagem oxidativa da biomassa, aumentando a carga negativa nas fibras de celulose. Isto melhorou a nanofibrilação da celulose enquanto estabilindo a suspensão da nanofibrila sem sacrificar a termoestabilidade da nanocelulose. Portanto a combinação de endoglucanase, LPMO e xilanases mostrou facilitar a nanofibrilação, reduzindo potencialmente a necessidade de refinação mecânica, resultando em uma biomassa com composição mais uniforme de nanofibras.

Os materiais lignocelulósicos quando hidrolisados liberam hexoses (glicose) oriundas da celulose que são facilmente fermentadas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A hidrólise da hemiceluloses fornece pentoses (xilose e arabinose), que não são diretamente fermentadas por leveduras industriais convencionais. Porém sendo a bio-transformação dessas pentoses a etanol um desafio no âmbito científico e tecnológico, pesquisadores vem desenvolvendo linhagens capazes de fermentar pentoses com eficiência (Andrade et al., 2013, Gao et al., 2018).

São propostas quatro rotas para realizar a fermentação alcoólica de um substrato contendo pentoses e hexoses. O processo SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) no qual a sacarificação e fermentação ocorrem separadas, com fermentação dos açúcares C5 e C6 separados; SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) em que ocorre a sacarificação e fermentação de C6 simultânea; SSCF (Simultaneous Saccharification and CoFermentation) em que ocorre a sacarificação e fermentação simultânea com cofermentação dos açúcares C5 e C6 e, o CBP (Consolidated Bioprocess), em que a produção de enzima, sacarificação e fermentação ocorrem de forma simultânea (Zheng et al., 2009)

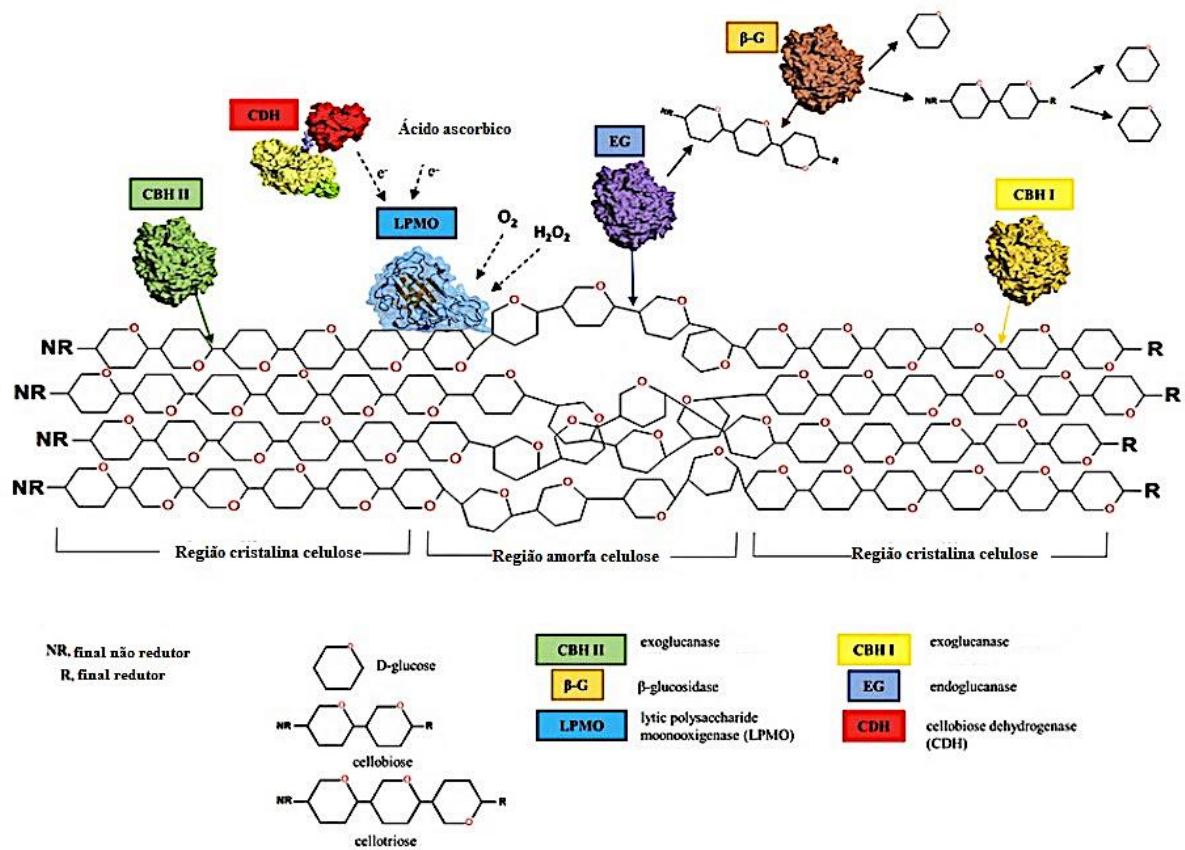


Figura 5. Hidrólise da celulose por ação sinérgica de diferentes classes de celulases. Figura adaptada Andlar et al., 2018.

2.4. Glicosídeo hidrolases; β -glicosidases e *TpBgl1* e *TpBgl3*

Oligo e polissacarídeos desempenham papel fundamental em diversos processos biológicos, como na composição estrutural, na parte de armazenamento de energia, sinalização intra e extra celular, etc. E as enzimas que hidrolisam estes açúcares - glicosídeo hidrolases – estão, portanto envolvidas em um amplo espectro de bioprocessos (Henrissat e Bairoch, 1996).

As glicosídeo hidrolases (GH) (EC 3.2.1.X) correspondem ao grupo mais representativo e numeroso das CAZymes (sigla obtida pelas iniciais de “CarbohydrateActive enzymes”; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>).

As GH podem atuar por meio de dois mecanismos de ação básicos que resultam em retenção da rede ou inversão da configuração anomérica. A estereoquímica da catálise é devido ao arranjo espacial dos grupos catalíticos no sítio ativo da enzima. A hidrólise do glicosídeo normalmente requer a presença de dois grupos catalíticos, que na maioria dos casos são resíduos de aspartato ou glutamato (Henrissat, B., & Davies, G. (1997).

Sua classificação mais simples é baseada nas especificidades de substrato. São enzimas que agem hidrolisando ligações O ou S-glicosídicas (Henrissat e Bairoch, 1993;1996). Também podem ser classificadas com base em semelhanças sequenciais (classificação no CAZy). A versão atual deste sistema de classificação contém 156 famílias e as β -glicosidases são encontrados nas famílias GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH30 e GH116, sendo GH1 e GH3 as famílias mais relevantes para aplicações biotecnológicas. Mesmo apresentando uma função catalítica similar, as variadas famílias de GH possuem diferentes conformações tridimensionais, possivelmente apontando para evolução convergente da função da proteína (Florindo et al., 2018).

As glicosídeo hidrolases da família 1 (GH1) possuem uma estrutura terciária do tipo barril (β/α)₈, no qual o sítio ativo está localizado na porção C terminal do barril. Estas enzimas hidrolisam ligações do tipo β -glicosídicas através de um mecanismo que é dividido em duas etapas: glicosilação e desglicosilação, com a geração de produtos com a retenção da configuração do carbono anomérico. A reação envolve dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima: TFNEP (este E age como ácido/base catalítico) e I/VTENG (este E age como nucleófilo) (Henrissat, 1991; Henrissat et al., 2005).

O sítio ativo das GH1 apresenta um subsítio de ligação da extremidade não-redutora do substrato, conhecido como subsítio -1 ou subsítio do glicone, enquanto a extremidade redutora do substrato é acomodada nos subsítios +1, +2, +3 e outros, também chamados de subsítio do aglicone. A clivagem da ligação glicosídica ocorre entre os subsítios -1 e +1 (Henrissat e Davis, 1997) (Figura 6).

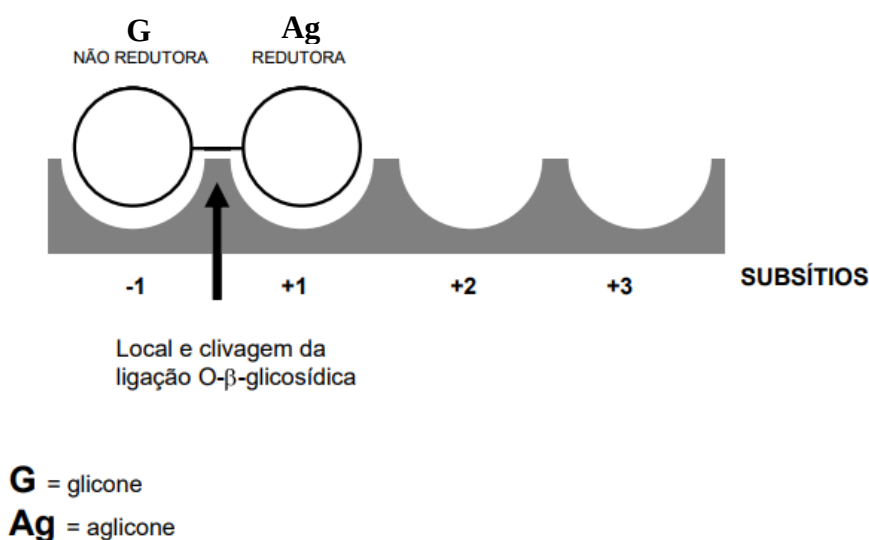


Figura 6- Esquema representativo clivagem da ligação glicosídica da família GH1.

A glicosídeo hidrolases da família 3 (GH3) são as maiores na classificação CAZy e contém atualmente mais de 13 600 seqüências de proteínas. A família agrupa diversas atividades de exo e inclui membros com ampla especificidade de substrato em relação ao tipo de monossacarídeo, ligações e o comprimento da cadeia do substrato. As GH3 removem os resíduos glicosil livres a partir das extremidades não redutoras dos seus substratos. A catálise ocorre através de um mecanismo de duplo deslocamento com retenção. O sítio de ativação desta enzima consiste, na verdade, em dois subsítios de ligação glicosil, com um núcleo enzimático e um resíduo ácido-base que une os dois (Davies et al., 1997). O sítio ativo das enzimas da família GH3 está situado entre os domínios $(\beta/\alpha)_8$ e $(\alpha/\beta)_6$ e cada um contribui com um resíduo catalítico carboxilado necessário para a catálise. As GH3 utilizam um resíduo aspartato (Asp) no seu ataque nucleofílico do substrato (Jeng et al., 2011; Cairns e Esen, 2010).

Os dados estruturais publicados da família GH3 mostram que estas enzimas possuem diferentes características em sua arquitetura, como exemplos temos a estrutura da beta-hexosaminidase de *Vibrio cholerae* (PDB 1TR9)(Gorman e Shapiro, não publicado), que apresenta um único domínio, com um enovelamento do tipo barril- $(\beta/\alpha)_8$; a estrutura da β -d-glicanoexohidrolase de cevada (PDB 1EX1)(Varghese et al., 1999), que possui dois domínios, com o domínio N-terminal do tipo barril- $(\beta/\alpha)_8$ e o C-terminal formado por um $(\alpha / \beta)_6$ – sanduíche; a β -glicosidase da família GH3 de *Thermotoga neapolitana* (TnBgl3) (PDB 2X40) (Pozzo et al. 2010), apresenta um C-terminal mais longo e este C-terminal adota a conformação do tipo fibronectina III (FnIII), sendo uma enzima com três domínios; β -glicosidase de *Kluyveromyces marxianus* (PDM 3ABZ)(Yoshida et al., 2010) apresenta uma inserção de um quarto domínio, chamado PA14 (resíduos392-559), entre o $(\alpha / \beta)_6$ – sanduíche.

As β -glicosidases (Bgls) (E.C. 3.2.1.21) hidrolisam uma ampla gama de substratos, como por exemplo, glicolipídios, glicoceramidas, flavonóides e celobiose. Desempenham um papel essencial na indústria química, de alimentos e principalmente na produção de biocombustíveis, uma vez que podem clivar ligação β -1,4-glicosídica (Tiwari et al., 2013). São tipicamente usadas em coquetéis enzimáticos para garantir os passos finais da hidrólise, mas também para reduzir os efeitos inibidores do produto, celobiose (Florindo et al., 2018).

A β -glicosidases de *Thermotoga petrophila* da família 1 e 3, TpBgl1 e TpBgl3 respectivamente, são hipertermofílicas. Estas bactérias foram isoladas a partir de reservatório de petróleo Kubiki em Niigata (Japão) e crescem perfeitamente a 80°C (Takahata et al., 2001). Algumas enzimas hipertermoestáveis produzidas por estes microorganismo têm demonstrado grande potencial para aplicações industriais e servido como modelos para investigar relações

estrutura-função para a estabilidade em GH (Santos et al., 2011; Cota et al., 2011; Santos et al., 2012; Silva et al., 2014).

Colussi et al., 2015 ao caracterizarem *TpBgl1* e *TpBgl3* confirmaram a termoestabilidade. Quando compararam as atividades catalíticas em celobiose, lactose e substratos derivados de pNP, ficou evidente que *TpBgl3* é específica, característica da família GH3 (Figura 7) (Pozzo et al., 2010), enquanto *TpBgl1* são promíscuas, o que tem sido descrito para família GH1 (Henrissat et al., 2005; Marana 2006). Comparando os parâmetros cinéticos *TpBgl3* atingiu um V_{max} quase duas vezes superior ao de *TpBgl1*. O parâmetro K_m foi semelhante. O turnover (k_{cat}) e à eficiência catalítica (k_{cat} / K_m), foram maiores para *TpBgl3*, assim como a atividade pNPGase (Tabela 2 e 3). Também foram realizados experimentos para determinar o efeito inibitório de monossacarídeos e observaram que *TpBgl1* não mostra inibição pelo produto (Figura 8).

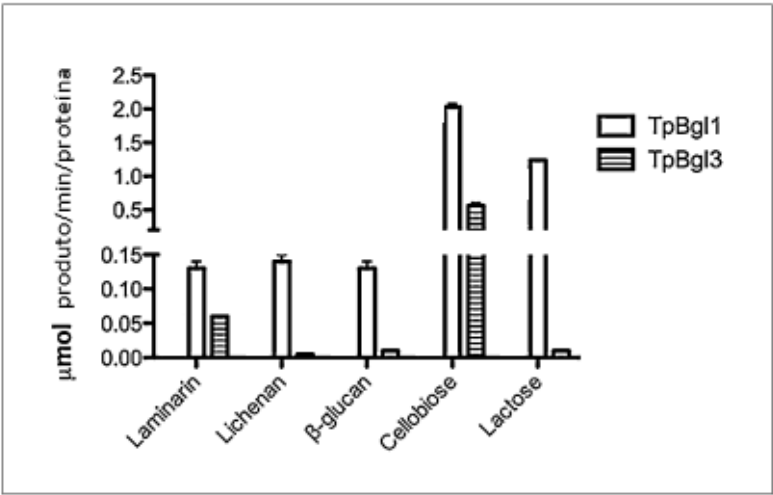


Figura 7. Atividade de hidrolise da *TpBgl1* e *TpBgl3* para monossacarídeos e polissacarídeos específicos. Figura adaptada Cota et al., 2015.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para *TpBgl1* e *TpBgl3*. Figura adaptada Cota et al., 2015.

Parâmetros cinéticos para <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i>		
Parâmetros	pNPG	
	<i>TpBgl1</i>	<i>TpBgl3</i>
V_{max} ($\mu\text{mol/min/nmol}$)	16.56 ± 0.21	34.25 ± 0.64
K_m (mM)	0.28 ± 0.02	0.38 ± 0.03
K_i (mM)	1100.00	30.10
k_{cat} (s^{-1})	276.00 ± 3.53	570.83 ± 10.63
k_{cat}/K_m	999.28 ± 166.59	1490.43 ± 348.53

3. Atividade *TpBgl1* e derivado de
Figura adaptada Cota et al., 2015.

Tabela
de hidrolise da *TpBgl3* para pNP específicos.

Atividade de <i>TpBgl1</i> e <i>TpBgl3</i> nos substratos derivados de pNP		
Substrato	Atividade Relativa (%)	
	<i>TpBgl1</i>	<i>TpBgl3</i>
4-NP- β -D-Glucopyranoside	100	100
4-NP- β -D-Fucopyranoside	93.6	1.1
4-NP- β -D-Galactopyranoside	35.6	0.6
4-NP- β -D-Cellobioside	35	3.3
2-NP- β -D-Glucopyranoside	16.1	14.8
4-NP- β -D-Xylobioside	1.5	9.4
4-NP- α -L-Arabinopyranoside	4.5	0.4
4-NP- β -D-Mannopyranoside	0.3	0.5
4-NP- α -L-Arabinofuranoside	0.2	0.7
4-NP- α -D-Glucopyranoside	0.4	0.4

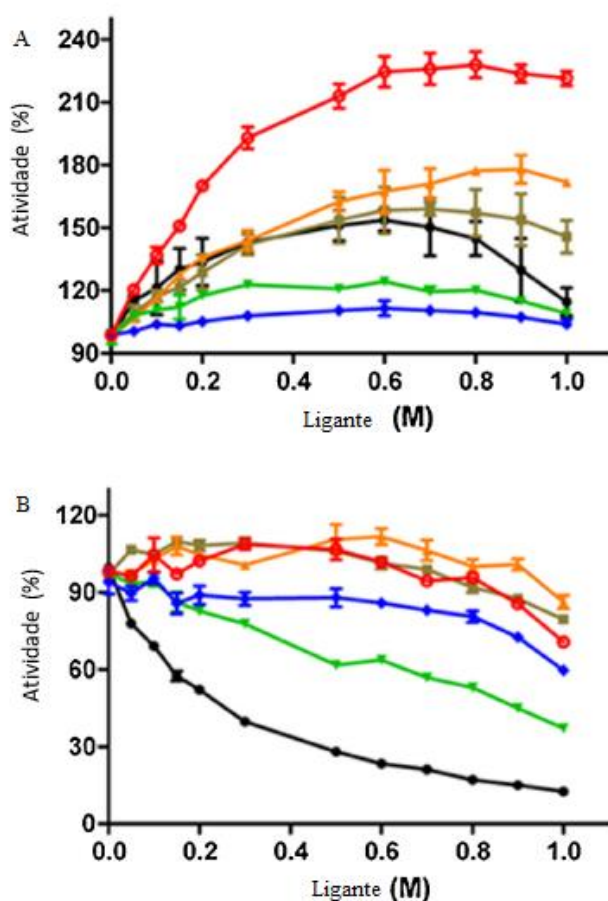


Figura 8. Efeitos de inibição/ativação de 6 monossacarídeos em 12 concentrações (até 1 M) na atividade de *TpBgl1* (A) e *TpBgl3* (B). Os monossacarídeos analisados foram glicose (preto), galactose (amarelo escuro), arabinose (laranja), manose (verde), frutose (azul) e xilose (vermelho). Figura adaptada Cota et al., 2015.

2.4. Compostos Inibidores

Alguns pré-tratamentos envolvem reações colaterais que resultam na liberação de certos subprodutos derivados da biomassa que são inibidores dos processos bioquímicos posteriores (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).

Eles incluem principalmente derivados de furano, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, além de outros compostos aromáticos (Figura 9). Extrativos (principalmente terpenos, gorduras, ceras e compostos fenólicos) e compostos inorgânicos também podem promover a inibição de enzimas e microorganismos nas etapas subsequentes (Moreno et al., 2017). O tipo de inibidores formados depende muito da natureza da biomassa e do tipo de pré-tratamento utilizado. Os problemas de inibição tornam-se mais significativos à medida que os subprodutos se acumulam ao longo do processo (Jönsson e Martín, 2016).

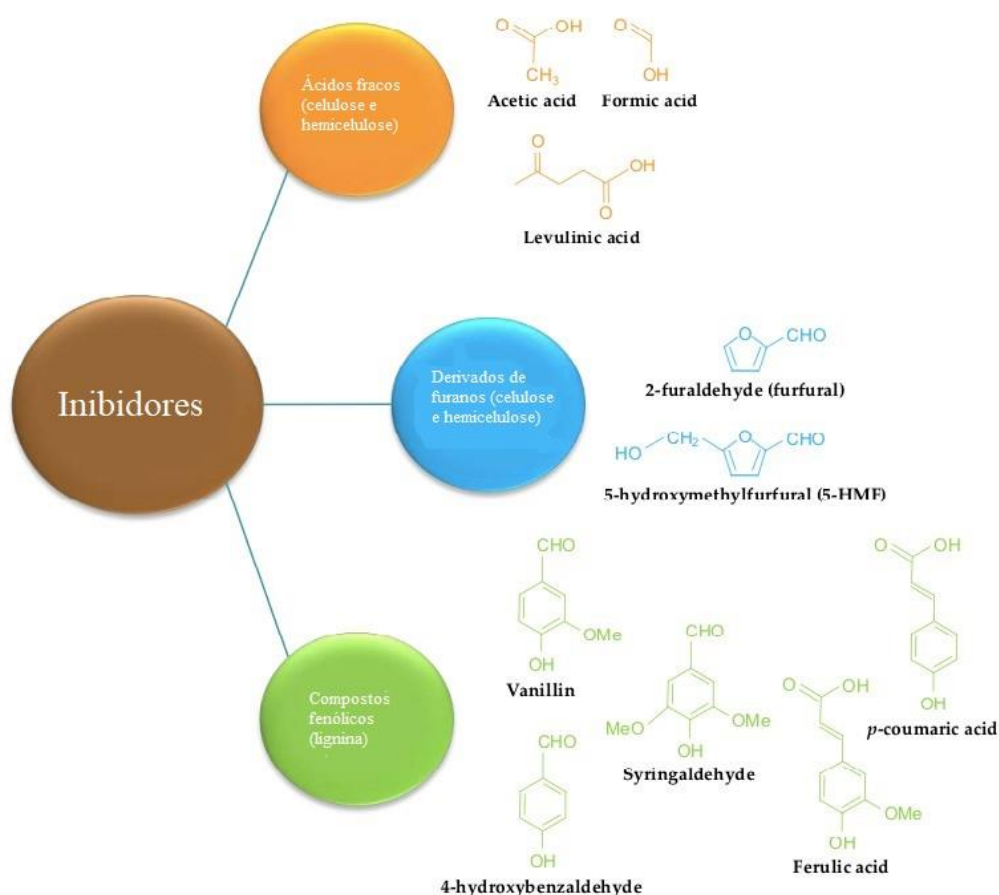


Figura 9. Esquema de compostos inibidores formados durante os diversos pré-tratamentos. Figura adaptada Fillat et al., 2017.

Os compostos formados podem inibir tanto a hidrólise enzimática como os microorganismo fermentadores. Os furanos são descritos como fortes inibidores da fermentação pois interferem no metabolismo dos microorganismo acarretando danos nas fases de crescimento. Os ácidos carboxílicos causam acúmulo intracelular de os íons H^+ que diminuem o pH causando um desequilíbrio na relação ATP/ADP pelo aumento da atividade das bombas ATP/ H^+ o que leva a desbalanços no metabolismo dos microrganismos (Taherzadeh e Karimi, 2011).

Os compostos fenólicos apresentam efeito inibitório considerável na fermentação sendo os de baixo peso molecular os mais tóxicos (Buchert et al., 1989; Clark e Mackie, 1984). Estes compostos causam perda da integridade das membranas biológicas, afetando assim sua função de barreira seletiva e matrizes enzimáticas, o que acarreta danos para os microorganismos usados no bioprocessamento (Heipieper et al., 1994). No entanto, o mecanismo do efeito inibidor não foi elucidado, e em grande parte devido à falta de análises qualitativas e quantitativas precisas (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).

Em relação às enzimas hidrolíticas, os fenóis são os principais compostos de degradação que os inibem e desativam, reduzindo as taxas e os rendimentos durante a etapa de sacarificação. Grupos hidroxila fenólicos associados a taninos e a partículas de lignina adsorvem proteínas e desativam enzimas celulolíticas durante a hidrólise da celulose microcristalina. A vanilina e siringaldeído mostraram inibir as celulasas - e em particular as β -glicosidases -, enquanto o ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido tânico, são capazes de desativá-las (Ximenes et al., 2010; 2011).

Para Ximenes et al. 2011, os a maioria dos compostos fenólicos solúveis em água (como os taninos) na faixa de massa molecular de 500 a 3000 formam múltiplas ligações de hidrogênio com proteínas o que pode levar a inibição e a desativação durante longos períodos de hidrólise. Portanto a remoção desses compostos preservaria a atividade enzimática.

Até o momento não foi descrito com exatidão o mecanismo da interação entre as celulasas e os compostos fenólicos solúveis. O que sabemos é que se trata de interações de caráter hidrofóbico e eletrostático (Silva et al., 2016; Brethauer et al., 2011; Yang e Wyman, 2006; Lijnzaad et al., 1996), sendo que a natureza da interação pode variar dentro da mesma classe de celulasas (Silva et al., 2016). Portanto, informações estruturais a nível molecular proporcionarão uma compreensão mais profunda das interações e os resíduos exatos em que ocorrem.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo identificar os resíduos responsáveis pela interação entre as β -glicosidases *TpBgl1* e *TpBgl3* e os compostos fenólicos para identificar o tipo de interação entre as moléculas e melhor compreender o processo inibição/desativação.

Foram realizados estudos de atividade enzimática na presença e na ausência dos fenólicos, demonstrando a capacidade que cada molécula possui de inibir e desativar as atividades de *TpBgl1* e *TpBgl3*, além de acoplamento molecular e simulação de dinâmica molecular para verificação da estabilidade estrutural das enzimas, na presença dos fenólicos e identificação dos resíduos que interagem com as mesmas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de atividade enzimática foram conduzidos em colaboração com Prof. Dr. Wanius Garcia e a doutoranda Vivian Silva da Universidade Federal do ABC, no centro de pesquisas naturais e humanas. Os experimentos de acoplamento molecular e simulação de dinâmica molecular foram desenvolvidos no departamento de física e biofísica da Unesp de Botucatu, com a colaboração do Prof. Dr. Marcos Fontes e o doutorando Antoniel Gomes.

4.1. Expressão e extração de proteína heteróloga de β -glicosidases de Thermotoga petrophila em Escherichia coli

A expressão, extração e purificação das enzimas foram Células competentes de *Escherichia coli* BL2n (De3) (Invitrogen) contendo os DNAs recombinantes em vetor pBAD/Myc-His B (Invitrogen) para expressão de *TpBgl1* (GenBank: ABQ46970.1) e *TpBgl3* (GenBank:ABQ46916.1) foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. Fabio Marcio Squina (pesquisador colaborador neste projeto). Para os testes de expressão das células de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes, pré-inóculos de 15,0 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido adicionados de kanamicina 50 $\mu\text{g/mL}$ foram incubados a 37°C, sob 140 rpm de agitação por 16 horas. Após o crescimento celular cada um destes pré-inóculos foram utilizados para inocular 1L de meio LB pH 7,5 (10 g Peptona + 5 g Extrato de Levedura + 10 g NaCl+ 30 μL de NaOH 0,5M) contendo kanamicina 50 $\mu\text{g/mL}$, e em seguida, os inóculos foram mantidos sob 140 rpm de agitação a 37°C até as culturas atingirem uma densidade ótica de aproximadamente 0.6 quando medidas no comprimento de onda de 600nm. Neste momento, induziu-se o material com 100 mmol L⁻¹ de IPTG mantendo-se as culturas sob 140 rpm de agitação e a 37°C por mais 4 horas.

Passado o período de expressão, o volume total de cada uma das culturas foi centrifugado por 30 minutos a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante (meio de cultura) e recuperando-se o pellet (células de *E. coli* contendo as β -glicosidases expressas em seu citoplasma). O pellet foi então ressuspensão em 40 mL de solução contendo 50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 10% (v/v) glicerol e 0,1 mM PMSF, mais 0,25 mg/mL de lisozima e deixado em repouso por 60 minutos no gelo. A completa lise celular foi alcançada por 8 ciclos de sonicação, sendo cada ciclo de 30 segundos *On*, 30 segundos *off*, a 30% em um “550 Sonic Dismembrator- Fisher Scientific”. Após a sonicação o material lisado foi colocado por 30 minutos em banho-maria a 70°C, esta etapa é uma pré-purificação das proteínas, uma vez que

as proteínas expressas são termoestáveis e irão manter a conformação enquanto as demais irão desnaturar devido à alta temperatura, facilitando assim, a separação na próxima etapa.

Finalizando com centrifugação das amostras por 30 minutos a 10.000 rpm a 4° C, a fim de separar a fração solúvel da insolúvel.

4.2 Purificação por Cromatografia por afinidade

A proteína é expressa com uma cauda N-terminal de 6 histidinas. A presença desta cauda confere à proteína alta afinidade de ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) quelados, no caso o utilizado foi o Ni^{2+} (GEHealthcare). O composto químico imidazol (composto heterocíclico contendo dois nitrogênios com $\text{pKa} = 7.0$ e $\text{pKa} = 14.9$) foi utilizado para realizar a eluição da proteína que se liga à resina contendo os íons Ni^{2+} , já que o anel imidazólico tem maior afinidade química para a ligação a esses íons em pH 8,0 e pode competir com os resíduos de histidina pela ligação. O processo teve início com o empacotamento de 4 mL de resina de níquel e a exaustiva lavagem com água deionizada, seguida do equilíbrio da resina com 10 volumes (no caso 40 mL) de tampão (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 5 mM imidazol). A fração solúvel proveniente da lise celular de 1L de cultura bacteriana descrito na seção anterior (seção 4.3) foi incubada com a resina equilibrada, durante uma hora a 4 °C. Posteriormente, voltou-se a fração solúvel e a resina para uma coluna de empacotamento, deixou-se passar o lisado pela resina e, então, lavou-se a resina com o mesmo tampão do equilíbrio. A eluição das β -glicosidases de interesse foi realizada utilizando-se quatro volumes de resina de tampão (o mesmo do equilíbrio) com 130 mM de imidazol. O restante das proteínas foi eluído com 500 mM de imidazol.

As frações que foram eluídas da coluna empacotada com a resina, em cada etapa dessa purificação (incluindo o lisado), foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. As concentrações de *TpBgl1* e *TpBgl3* foram determinadas por absorbância em UV a 280 nm. Os produtos finais purificados foram então congelados com glicerol e armazenados a -30°C.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese com agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu

de: Gel de empilhamento a 6%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 13% contendo Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) e SDS 0,1%, além de Persulfato de Amônio a 10% e TEMED, mantendo a relação de Acrilamida/Bis-Acrilamida em 30%:0,8%. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad). As amostras proteicas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; β -mercaptoetanol 5%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol (condição redutora). As soluções foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de eletroforese. O marcador de peso molecular utilizado foi Unstained Low Range SDS-PAGE Standards 14,4-97,4 kd (BIO-RAD). O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025M, Glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 70V até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. O gel foi corado em solução de azul de coomassie - R250 0,1% em água, ácido acético 10% e etanol 50% ou a partir de Kit de coloração com prata Pierce silver stain (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e descorado em solução de ácido acético 10% e etanol 30% para posterior análise.

4.4 Medidas de atividade enzimática padrão de *TpBgl1* e *TpBgl3*.

Após a expressão e purificação das proteínas recombinantes *TpBgl1* e *TpBgl3* foram realizadas medidas de atividade enzimática padrão. O ensaio enzimático foi realizado com 100 ng de enzima, 40 μ L de solução de tampão acetato-borato-fosfato (250 mM) (pH 6 para *TpBgl1* e pH 4 para *TpBgl3*) e 50 μ L de 0,5 mM de 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) como substrato. Após incubação a 70°C/10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de 1M de Na₂CO₃. A liberação de *p*-nitrofenol foi monitorada colorimetricamente a 405 nm usando um leitor de microplacas. Uma unidade de atividade β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que *p*-nitrofenol libera a 1 μ mol por minuto, sob condições normais. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, e os valores médios foram considerados.

4.5 Inibição e desativação enzimática de *TpBgl1* e *TpBgl3*

Os ensaios de inibição foram realizados combinando *TpBgl1* e *TpBgl3* com compostos fenólicos diferentes (hidroquinona, ácido benzóico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido tânico) e substrato (pNPG) adicionado imediatamente no início do ensaio. Cada reação foi composta por 100 μ L de solução de tampão

acetato-borato-fosfato (250 mM), ajustada a diferentes valores de pH (pH 6 para *TpBgl1* e pH 4 para *TpBgl3*) contendo 1 μ M de *TpBgl1* e *TpBgl3* , 1 mM de pNPG e 0,1 mM de compostos fenólicos. Cada reação foi incubada a 70°C durante 4 minutos. Posteriormente, a reação foi parada por adição de 100 μ L de Na₂CO₃ 1 M e a liberação de p-nitrofenol foi monitorada colorimetricamente a 405 nm utilizando um leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, e os valores médios foram relatados. Os ensaios de desativação foram realizados incubando as β -glucosidases (*TpBgl1*, *TpBgl3*) a 0,1mM com diferentes compostos fenólicos durante 24 horas. Após o período de incubação, adicionou-se pNPG à concentração final de 1 mM e cada reação foi realizada como descrito acima.

4.6 Modelagem por Homologia de *TpBgl1* e *TpBgl3*

O modelo ideal para modelagem foi obtido pela ferramenta de pesquisa BLAST (Basic Local Alignment Search Too) que utilizou a busca de modelos estruturais adequados no Banco de Dados de Proteínas (PDB) O SwissModel foi usado para produzir modelos de homologia de *TpBgl1* e *TpBgl3* (Arnold et al., 2006). Os modelos foram inspecionados manualmente e avaliados usando o software Pymol (Delano, 2002). A análise estereoquímica dos modelos foi feita utilizando o servidor Molprobit (Chen et al., 2010).

4.7 Acoplamento Molecular (“*molecular docking*”)

A fim de definir os possíveis locais de interação entre os compostos fenólicos e as enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3*, o acoplamento molecular, do inglês molecular docking foi realizado utilizando a versão GOLD 5.2 (CCDC Software Limited, Cambridge, Inglaterra). Inicialmente, *blind-docking* foi realizado para quatro compostos fenólicos (ácido p-coumaríco, siringaldeído, ácido sinapínico e ácido tânico) utilizando um espaço amostral igual ao tamanho da enzima estudada. Uma vez que todos os compostos foram ligados ao sítio catalítico em ambas as enzimas, dez simulações de execução de encaixe dirigido ao local foram realizadas com configurações GA (*genetic algorithm*) na máxima eficiência de pesquisa utilizando um raio de área de pesquisa de 15 Å a partir dos resíduos Asn165 (OD1) e Lys164 (NZ) para *TpBgl1* e *TpBgl3*, respectivamente. Todos os resultados foram classificados pela função GoldScore

(Jones, Willett, Glen, 1995) e através de análise estrutural dos complexos utilizando o programa Pymol (Delano, 2002).

4.8 Simulações de Dinâmica Molecular

Tanto as proteínas nativas como os complexos de *TpBgl1* e *TpBgl3* com os compostos fenólicos obtidos a partir do acoplamento molecular, foram submetidos a simulações de dinâmica molecular do inglês molecular dynamics (MD) usando o pacote GROMACS (v. 5.0.5) (Abraham et al., 2015) sob campo de força gromos 53a6 (Oostenbrink et al., 2004) e único ponto de carga de água. Antes de prosseguir todas as simulações, os estados de protonação de cada sistema foram calculados usando PROPKA3 (Olsson et al., 2010) sob o pH da atividade enzimática ótima para ambas as proteínas *TpBgl1* e *TpBgl3*, tal como descrito anteriormente (Cota et al., 2015). Cada sistema foi colocado numa caixa triclínica com 4 Å de distância do átomo mais distante, depois solvatado e equilibrado com NaCl 100 mM. O algoritmo Steepest Descent foi utilizado para minimizar todos os sistemas de energia abaixo de 100 kJ / mol / nm, então 1 ns de simulação MD foram realizados sob termostato de acoplamento de temperatura fraca V-rescale (Bussi, Donadio, Parrinello, 2007) a 310 K e mais 1 ns da simulação isobárica (1 bar) sob o barostato de acoplamento de pressão de Berendsen (Berendsen et al., 1984) utilizando as restrições de posição. Em seguida, foram realizadas 100 ns de simulações MD sem restrição sob o termostato Nose-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985) e Barostat Parrinello-Rahman (Parrinello, Rahman, 1981). O corte de curto alcance para as interações eletrostáticas e van der Waals foi ajustado para 1,0 nm, e a eletrostática de longo alcance foi tratada utilizando o método Ewald (PME) de malha de partículas com tamanho de espessura de 0,12 nm. Todos os quadros foram coletados a cada 10 ps. As topologias dos ligantes foram construídas usando o servidor on-line ATB (Automated Topology Builder) v. 2.2 (Koziara et al., 2014). As topologias resultantes foram cuidadosamente analisadas e todas as cargas foram fixadas com base nos parâmetros de campo de força usados, como sugerido anteriormente (Lemkul, Allen, Bevan, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes *TpBgl1* e *TpBgl3*

Após condições de redução as enzimas purificadas migraram em SDS-PAGE 13% formando bandas nítidas e homogêneas, consistentes com a massa molecular esperada. Para Colussi et al., 2015 *TpBgl1* é um homodímero em solução, cujo a massa molecular (MM) esperada é 108 kDa (a MM teórico de um monômero é de 54 kDa). Para *TpBgl3* em solução, o MM esperado é 168 kDa (a MM teórico de um monômero é 84 kDa). A figura 10 ilustra as bandas formadas pelos monômeros.

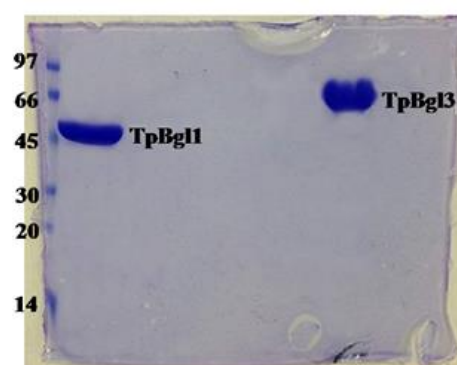
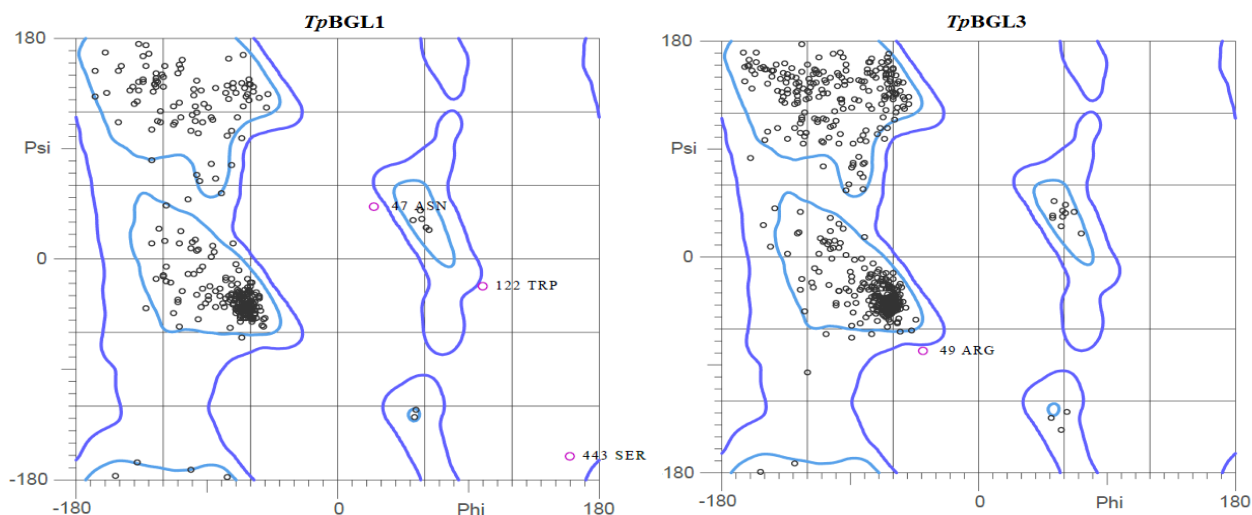


Figura 10. Foto SDS-Page com bandas padrão massa molecular (MM), *TpBgl1* (54 kDa) e *TpBgl3* (84kDa).

5.2 Modelos por homologia *TpBgl1* e *TpBgl3*

Uma vez que *TpBgl1* e *TpBgl3* ainda não têm estrutura cristalográfica conhecida, suas estruturas foram geradas por modelagem de homologia tridimensional (3D). Os modelos 3D do *TpBgl1* e *TpBgl3* foram construídos pelo servidor SWISS-Model (Arnold et al., 2006) usando como molde as estruturas disponíveis das β -glicosidases de *Thermotoga maritima* (*TmBGL1*, PDB 1W3J), 98,87% de identidade de sequência de aminoácidos e *Thermotoga neapolitana* (*TnBGL3*, PDB 2X40), 88,21% de identidade de sequência de aminoácidos, respectivamente.

Os modelos gerados foram submetidos ao servidor online da Molprobitry que gerou gráficos de Ramachandran que validam e confirmam a qualidade dos modelos. A Figura 11 mostra que 97,1% (428/441) de todos os resíduos estavam em regiões favorecidas (98%) para *TpBgl1* e,



95,8% (688/718) de todos os resíduos estavam em regiões favorecidas (98%) para *TpBgl3*, ambas regiões delimitadas pela curva azul escuro.

Figura 11. Gráficos de Ramachandran que validam e confirmam a qualidade dos modelos por homologia gerados para *TpBgl1* e *TpBgl3*.

5.3 Ensaios enzimáticos de inibição e desativação

Os ensaios de inibição e desativação das enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3* com os oito compostos fenólicos (hidroquinona, ácido benzóico, vanilina, ácido p-coumaríco, ácido cafeico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido sinapínico e ácido tânico) apresentaram resultados diferentes.

Os resultados dos ensaios de inibição de *TpBgl1* mostraram que a hidroquinona, o siringaldeído e o ácido sinapínico (Figura 12A, barras 1, 6 e 8, respectivamente) não inibem significativamente a enzima dentro dos erros experimentais. A vanilina, o ácido p-cumárico e o ácido cafeico diminuíram significativamente a atividade enzimática em torno de 10% (Figura 12A, barras 3, 4 e 5, respectivamente). O ácido benzóico e o ácido ferúlico chegaram a atingir 20% de inibição enzimática (Figura 12A, barras 2 e 7, respectivamente). O ácido tânico apresentou uma inibição acima de 20%, porém não ultrapassou os 30% (Figura 12A, barra

9). Entre os oitos compostos fenólicos utilizados o maior poder inibitório em relação ao controle foi apresentado pelo ácido tânico (Figura 12A).

Para a inibição de *TpBgl3* observamos que hidroquinona, ácido benzóico, vanilina e siringaldeído, dentro dos erros experimentais não apresentaram inibição da atividade enzimática (Figura 12B, barras 1, 2 e 6, respectivamente). O ácido p-cumárico e o ácido sinapínico chegam a inibir a enzima até 10% (Figura 12B, barras 4 e 8, respectivamente). O ácido cafeico e ácido ferúlico possuem um poder de inibição em torno de 20% (Figura 12B, barras 5 e 7, respectivamente). O ácido tânico mostrou inibição chegando a 85% (Figura 12B, barra 9).

No ensaio de desativação as enzimas foram incubadas com os compostos fenólicos durante 24h. Nos resultados obtidos para *TpBgl1* apenas o ácido sinapínico não desativou significativamente a enzima, dentro dos erros experimentais (Figura 12C, barra 8), semelhantes aos apresentados no ensaio de inibição (Figura 12A). Hidroquinona, vanilina, ácido p-cumárico e o ácido cafeico apresentaram uma desativação não em torno de 10 a 15% (Figura 12C, barras 1, 3, 4 e 5, respectivamente). O ácido benzóico, o siringaldeído e o ácido ferúlico apresentaram uma inibição acima de 20%, porém está não ultrapassou os 30% (Figura 12C, barras 2, 6 e 7, respectivamente). O ácido tânico mostrou uma capacidade de desativação em torno de 75 a 85% (Figura 12C, barra 9).

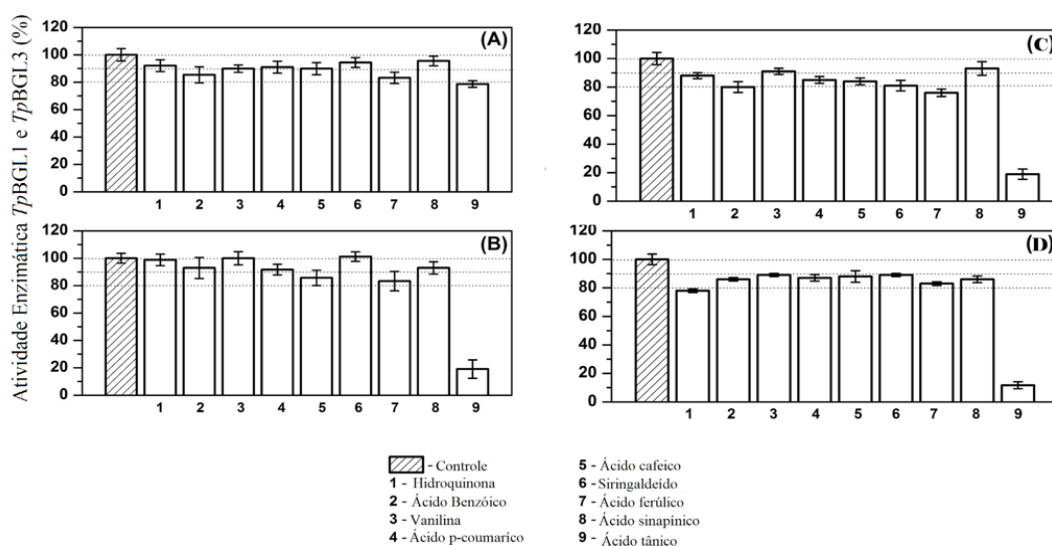


Figura 12- Ensaio enzimático de inibição(A,B) e desativação(C,D) das enzimas *TpBgl1*(A, C) e *TpBgl3*(B,D) com os oito compostos fenólicos (hidroquinona, ácido benzóico, vanilina, ácido p-coumarico, ácido cafeico, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido sinapínico e ácido tânico).

Para a desativação de *TpBgl3* o, ácido benzóico, vanilina, ácido p-coumaríco, ácido cafeico, siringaldeído, e ácido sinapínico foram capazes de desativar a enzima em torno de 10% (Figura 12D, barras 2, 3, 4, 5, 6 e 8, respectivamente), já a hidroquinona e o ácido ferúlico, em torno de 20% (Figura 12D, barras 1 e 7, respectivamente). O ácido tânico desativou a atividade enzimática em torno de 90% sobre o controle (Figura 12D, barra 9).

5.4 Acoplamento Molecular

Inicialmente foi realizada *blind-docking* para quatro compostos fenólicos (ácido p-coumaríco, siringaldeído, ácido sinapínico e ácido tânico) utilizando um espaço amostral igual ao tamanho das enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3*. Obteve-se um conjunto coesivo de soluções, onde todos os compostos fenólicos foram localizados dentro do sítio ativo de ambas as enzimas (Figura 13). A Figura 13A e 15C ilustram o modelo tridimensional de *TpBgl1* e *TpBgl3*, respectivamente, complexadas com os compostos fenólicos no sítio ativo das enzimas. Porém em 15B e 15D temos ilustrado o modelo com as superfícies eletrostáticas, em vermelho temos representados os resíduos negativos/ácidos, em azul os resíduos positivos/básicos ambos hidrofílicos. As regiões em branco são neutras, ou seja, hidrofóbicas.

Os melhores valores de GoldScore estão ilustrados na Tabela 4 para os quatro compostos fenólicos, juntamente com os resíduos em que há a interação. Os resíduos em destaque são os principais resíduos dos sítios ativos, incluindo os catalíticos, das enzimas *TpBgl1* (Manara et al., 2006) e *TpBgl3* (Pozzo et al., 2010), que fazem interação com a celobiose.

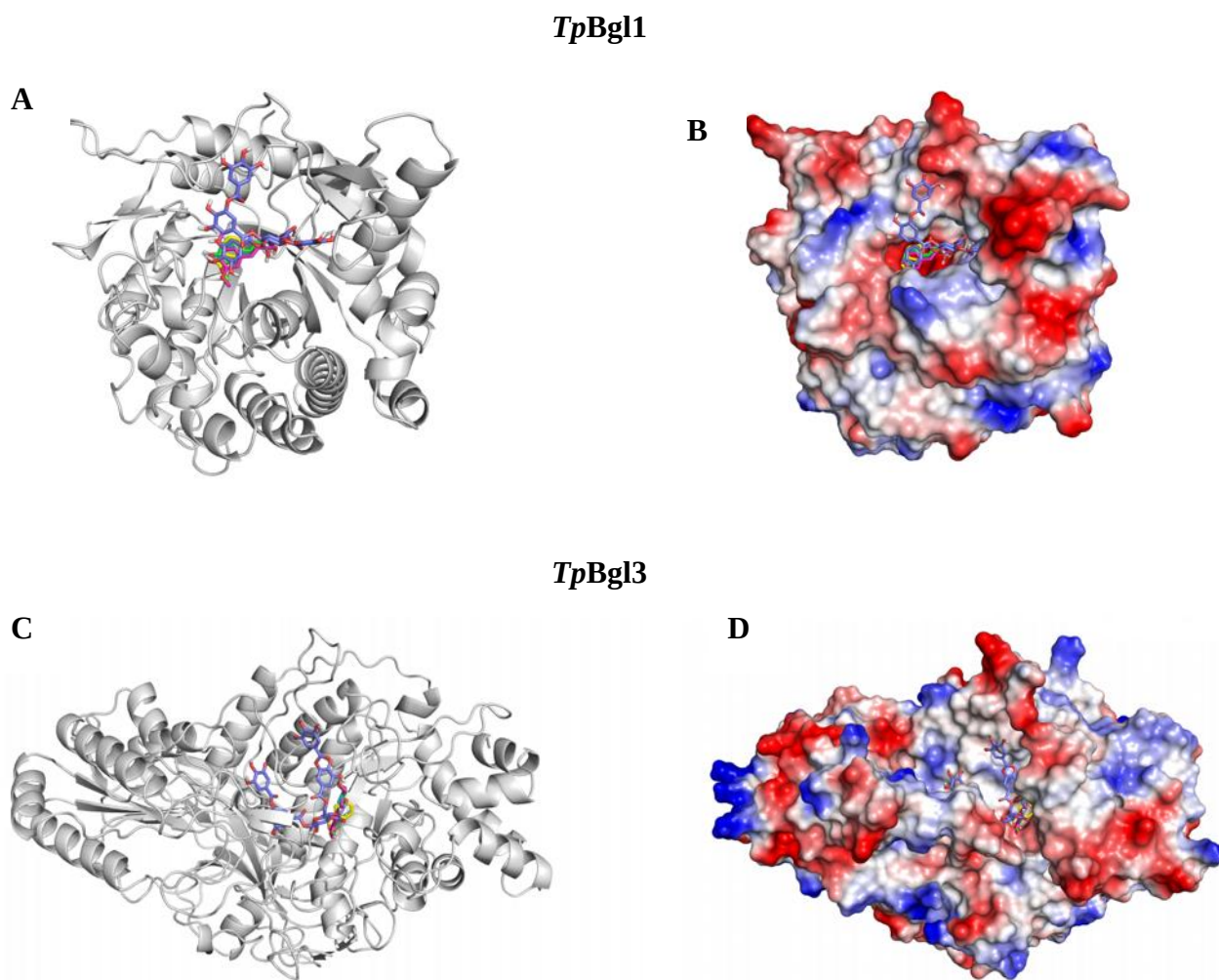


Figura 13- Modelos tridimensionais das enzimas *TpBgl1* (A, B) e *TpBgl3* (C, D) complexadas com os ligantes, compostos fenólicos (ácido p-coumaríco, siringaldeído, ácido sinapínico e ácido tânico) no sítio ativo.

Tabela 4- Os melhores valores de GoldScores do resultado do acoplamento molecular de *TpBgl1* e *TpBgl3* com os quatros compostos fenólicos. Todos os resíduos que mostraram interação ($\leq 3,6$ Å) são apresentados. Os resíduos em destaque são considerados importantes para o sítio ativo de *TpBgl1* (Manara et al., 2006) e *TpBgl3* (Pozzo et al., 2010), de acordo com a literatura.

	<i>TpBgl1</i>	GoldScore	<i>TpBgl3</i>	GoldScore
Ácido p-coumaríco	Gln20 , Glu166, Asn219, Asn293, Tyr295, Glu351 , Trp398 , Glu405 , Trp406 , Phe414	41,61	Ala41 , Asp59 , Arg65, Arg131 , His165 , Asp243 , Trp244 , Glu459	47,41
Ácido sinapínico	Trp122, Glu166, Val169, Tyr295, Ser296, His298, Trp324, Trp398 , Glu405 , Phe414	47,37	Ala41 , Asp59 , Arg65, Leu117, Lys164 , His165 , Arg175 , Met176, Met208, Tyr211 , Asp243 , Trp244 , Glu459	53,99
Siringaldeído	Gln20 , His121 , Trp122, Glu166, Tyr295, Trp324, Glu351 , Trp398 , Glu405 , Trp406 , Phe414	40,5	Ala41 , Asp59 , Leu117, His165 , Met208, Tyr21 , Asp243 , Trp244 , Glu459	45,57
Ácido tânico	Gln20 , His121 , Asn165 , Glu166, Trp168, Trp177, Asn246, Tyr295, His298, Val307, Phe312, Trp324, Glu351 , Trp398 , Glu405	108,71	Gly39, Asp59 , Arg65, Asn67, Leu117, Arg131 , Lys164 , His165 , Arg175 , Met208, Asp243 , Trp244 , Thr369, Gly370, Asp373, His375, Thr423, Val424, Gly458, Glu459 , Tyr461	114,61

5.5 Simulações de Dinâmica Molecular

A simulação de dinâmica molecular da enzima nativa *TpBgl1* apresentou média de 0,29 nm de desvios quadráticos médios, do inglês *root mean square deviation* (RMSD). O RMSD de *TpBgl3* nativa foi de 0,3 nm (Figura 14, linhas pretas). Ambas as proteínas quando complexadas com compostos fenólicos apresentaram flutuações semelhantes de RMSD em comparação com suas respectivas enzimas nativas, no entanto, os complexos *TpBgl1* apresentaram um padrão de vibração mais diversificado, no qual o ácido tânico e o siringaldeído modificaram mais a estrutura do que o ácido p-coumaríco e ácido sinapínico (Figura 14). Em

contraste, os complexos formados pelos compostos fenólicos e *TpBgl3* foram mais estáveis, apresentando semelhantes flutuações de RMSD (Figura 14).

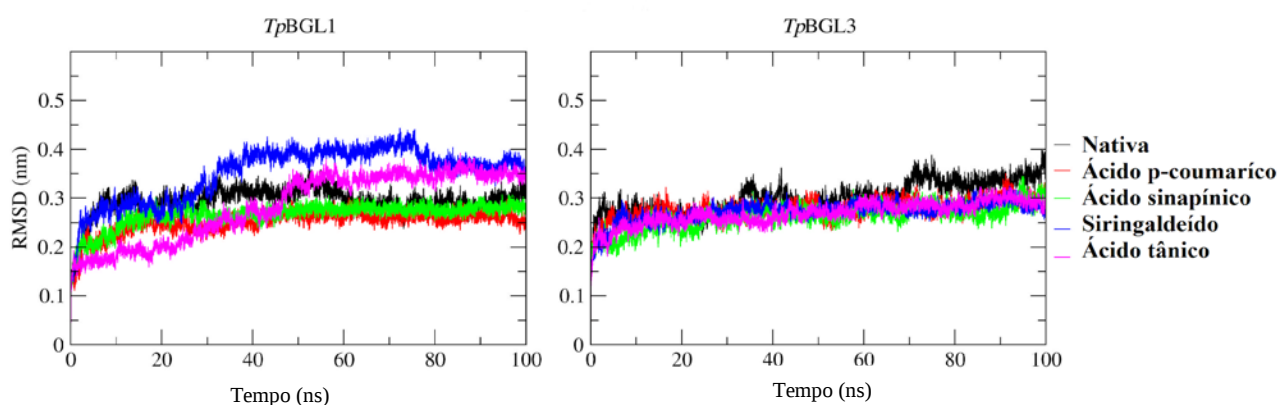


Figura 14- Trajetórias de desvio de RMSD dos C α das enzimas *TpBgl1* (esquerda) e *TpBgl3* (direita) nativas e complexadas com compostos fenólicos durante simulações de dinâmica molecular.

A Figura 15 ilustra o momento após simulação de dinâmica molecular e podemos observar um comportamento diferente do ácido tânico em relação aos demais compostos, quando complexados com as enzimas, corroborando com os resultados enzimáticos (Figura 14).

Os compostos ácido p-coumarílico, ácido sinapínico e siringaldeído apresentaram comportamento semelhante nas simulações de dinâmica molecular com as enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3*, deixando a posição inicial do encaixe, porém ainda interagindo de maneira não específica com as enzimas através de interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos encontrados nos compostos e os pontos hidrofóbicos das enzimas, formados principalmente por triptofano, valina e/ou tirosina (Figura 15A, B, C, D, E e F). Ligações de hidrogênio foram observadas entre triptofanos ou tirosinas com grupos hidroxilo ou carboxilo dos compostos fenólicos (Figura 15A, B, C, D, E e F).

O ácido tânico permaneceu na região do sítio ativo ao longo de toda a simulação de dinâmica molecular com as enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3*, como podemos observar na figura 13G e 13H que ilustram os contatos polares (≤ 3.6 Å) e hidrofóbicos CH- π (≤ 4.0 Å) apresentados em linhas tracejadas amarelas e roxas, respectivamente (Figura 15G, H).

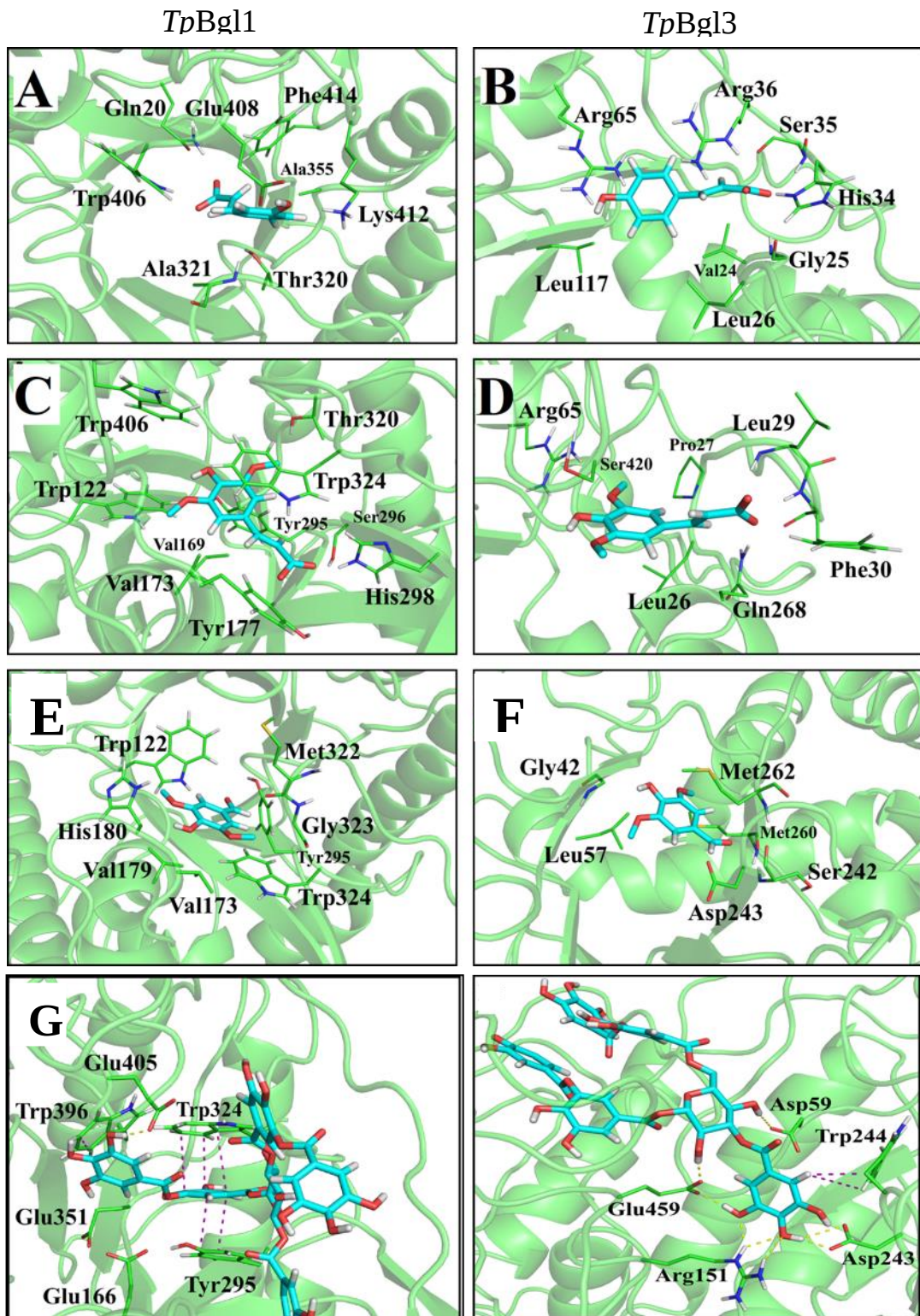


Figura 15- *TpBgl1* (esquerda) e *TpBgl3* (direita) complexadas com o ácido p-coumaríco (A e B); ácido sinapínico (C e D); sirringaldeído (E e F) e o ácido tânico (G e H). As enzimas são apresentadas de forma esquemática na figura em verde. Em destaque são os resíduos que intergem com os compostos fenólicos ($\leq 3,6$ Å). Os compostos fenólicos são apresentados em esquemas azul claro.

Através dos resultados anteriores podemos constatar, dentro dos compostos estudados, que o ácido tânico apresentou maior interação com a enzima *TpBgl1*. Para entender melhor esta

interação e confirmar que o ácido tânico permanece na região do sítio ativo desta enzima ao longo de toda a simulação de dinâmica molecular, medimos a distância média do ácido tânico aos átomos do anel Tyr295 e Trp324 (Figura 12), que estão localizados nesta reação, e mostraram interação com o composto no momento após a simulação de dinâmica molecular ilustrado na Figura 15G. A Figura 16 confirma que ao longo dos 100 ns da dinâmica molecular a distância sofre pouca oscilação comprovando que o ácido tânico mantém a interação com estes resíduos de triptofano, permanecendo na mesma localização.

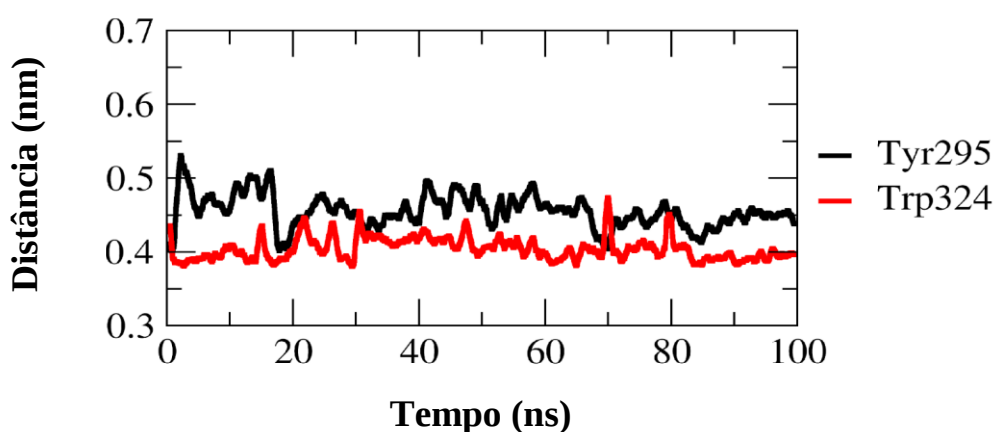


Figura 16- Distância média entre o ácido tânico e os átomos do anel Tyr295 e Trp324 da enzima *TpBgl1* durante a simulação de dinâmica molecular.

Para entender melhor a interação entre o ácido tânico e *TpBgl3*, foi calculado o número de ligações de hidrogênio entre o ácido tânico, o sítio ativo e com toda a enzima durante as simulações de dinâmica molecular. Os resultados mostraram que o complexo *TpBgl3* /ácido tânico apresentou maior número de ligações de hidrogênio, tanto no sítio ativo como na proteína inteira, quando comparado com *TpBgl1* (Figura 17). Essas ligações também se mostraram mais estáveis em *TpBgl3* do que em *TpBgl1* confirmado pela baixa flutuação da linha verde escuro (ligações de totais de hidrogênio em *TpBgl3*) quando comparado com a linha azul escuro (ligações totais de hidrogênio em *TpBgl1*) ao longo do tempo (Figura19).

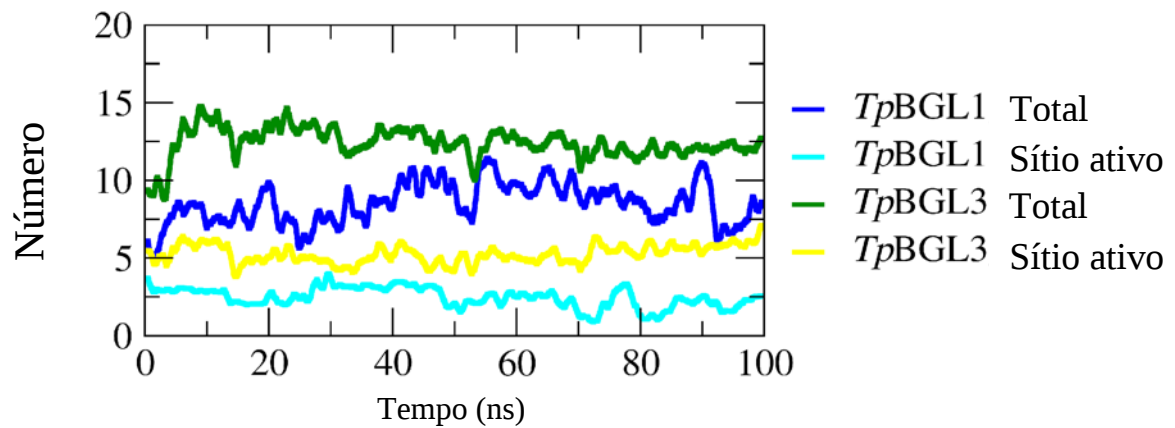


Figura 17- Padrão de ligação de hidrogênio do ácido tânico com base no número de contatos com os resíduos do sítio ativo ou com a proteína total durante simulações de dinâmica molecular.

Os cálculos da flutuações da média da raiz quadrática, do inglês root mean square fluctuations (RMSF), para *TpBgl1* não tiveram diferenças significativas entre o sistema nativo e o complexado. No entanto, *TpBgl3* apresentou uma flutuação aumentada no loop dos resíduos 413-425, com RMSF acima de 0,4 nm (Figura 18).

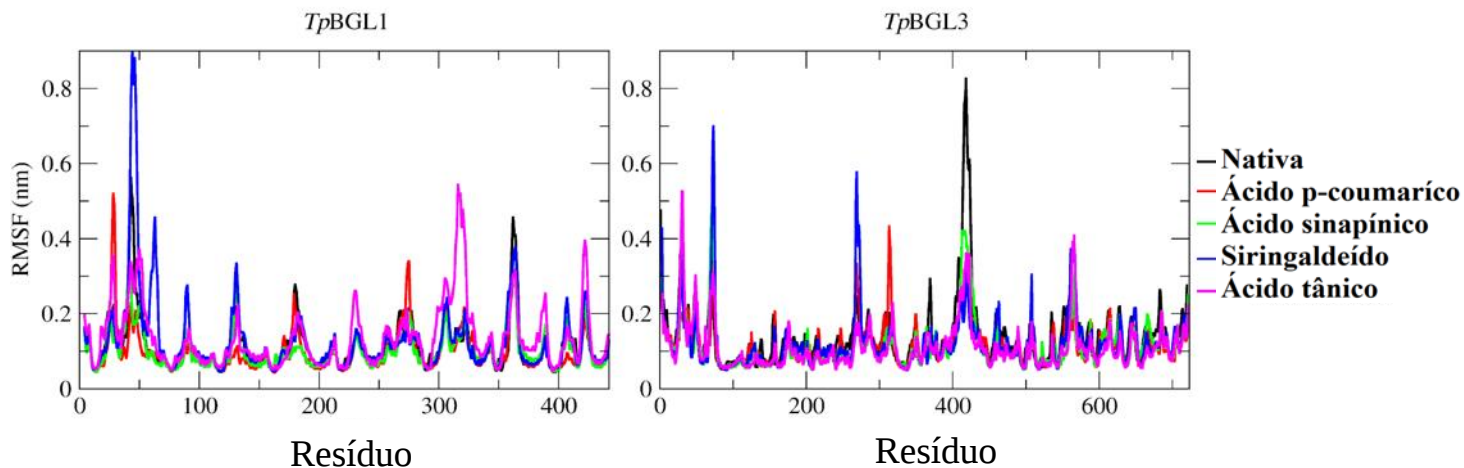


Figura 18- RMSF de *TpBgl1* (esquerda) e *TpBgl3* (direita) nativo e complexado com compostos fenólicos durante simulações de dinâmica molecular.

No gráfico RMSF de *TpBgl3* nativa, complexada com ácido tânico e com celobiose observou-se que a região do loop dos resíduos 413-425 apresenta alta vibração na estrutura

nativa, em torno de 0,8 nm, e que tanto o ácido tânico como a celobiose estabilizam a região reduzindo a metade a flutuação (Figura 19).

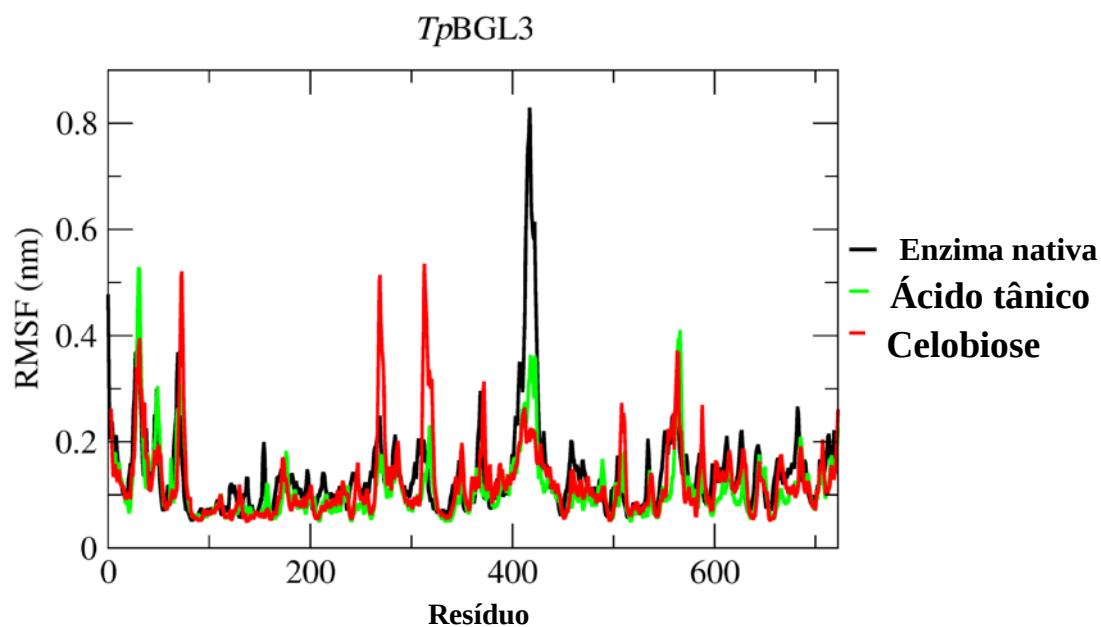


Figura 19- RMSF de *TpBgl3* nativa (preto) e complexada com ácido tânico (verde) e celobiose (vermelho) durante simulações de dinâmica molecular.

6. DISCUSSÃO

Os efeitos da influência dos compostos fenólicos nas β -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*) foram quantificados medindo as atividades hidrolíticas remanescentes após a incubação das enzimas em diferentes momentos. Inibição por 4 minutos e ensaios de desativação após 24 horas. Observamos que o ácido tânico inibiu fortemente e / ou desativou as atividades da β -glucosidase. Os outros fenóis tiveram pouco ou nenhum efeito.

Em relação a influência do tempo de incubação na atividade de *TpBgl1*, podemos dizer que a desativação da enzima deve aumentar quanto maior o tempo de exposição às condições de desativação. Isso foi observado para atividades combinadas de celulase, endoglucanase e β -glicosidase na presença de ácido tânico por Ximenes et al., 2011. Segundo esses autores, o processo de desativação de β -glicosidases dependente do tempo é semelhante ao decaimento da atividade catalítica. Semelhante ao observado em ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO; EC 4.1.1.39), que também apresenta decaimento da atividade catalítica resultando no inibidor ligado fortemente ao sítio catalítico, este processo é intitulado “fallover” (Pan. X., 2008). Isso poderia explicar a apenas a desativação observada em *TpBgl1* após 24 horas de tratamento com compostos fenólicos (Figura 12C).

O acoplamento molecular mostrou que todos os compostos fenólicos interagem dentro do sítio ativo de *TpBgl1* e *TpBgl3* (Figura 11). Os melhores valores de GoldScore para os ácidos p-coumaríco, siringaldeído, e ácido sinapínico foram semelhantes, apresentando muitas conformações espaciais dentro do sítio ativo (Tabela 4). O ácido tânico apresentou o valor do GoldScore duas vezes maior em relação aos demais, preservando sempre os grupos hidroxílicos na direção do sítio ativo (Tabela 4).

Isto pode estar relacionado a maior disponibilidade de átomos presentes em sua estrutura, em comparação com os outros compostos. Porém é interessante destacar que a celobiose, substrato das β -glicosidases, apresenta um GoldScore de 59,65 e 63,48 para *TpBgl1* e *TpBgl3*, respectivamente (dados não apresentados). Maior que a média de 50 apresentada por ácido p-coumaríco, siringaldeído, e ácido sinapínico, que pelos resultados enzimáticos, possuem baixo poder de inibição e desativação das enzimas. Mas, quando comparado ao ácido tânico, o GoldScore da celobiose é duas vezes menor, novamente confirmando os resultados enzimáticos de maior poder de inibição e desativação do ácido tânico.

Em geral, todos os compostos foram capazes de interagir diretamente com os principais resíduos dos sítios ativos, incluindo os catalíticos, de ambas as enzimas (Tabela 4). Dentre os resíduos mais importantes encontrados em *TpBgl1*, destacamos Trp398, que atua

como uma plataforma basal do subsítio -1, estabelece interações de empilhamento (CH- π) com o anel de glicona; e Glu351, que atua como o nucleófilo catalítico das β -glicosidases (Manara, 2006). Em *TpBgl3*, os mais importantes são os resíduos Asp59 e Trp244, envolvidos no alojamento do substrato no subsítio -1 e Asp243, o nucleófilo catalítico que é altamente conservado em todas as β -glicosidases da família 3 (Pozzo et al., 2010).

Os resultados apresentados pelo acoplamento molecular são interações de acoplamento estático e podem não revelar o verdadeiro comportamento dos complexos formados ao longo do tempo. Para resolver esta questão realizamos as simulações de dinâmica molecular, que contam com um tempo maior de interação dos compostos fenólicos e as enzimas, garantindo resultados robustos.

Apesar do acoplamento molecular apontar que os compostos ácido p-coumaríco, siringaldeído, e ácido sinapínico se ligam no sítio ativo das enzimas, durante as simulações de dinâmica molecular eles não mantem as mesmas interações, apenas o ácido tânico permanece no sítio ativo mantendo as interações com os mesmos resíduos destacados na Tabela 4, o que justifica a pouca variação do poder de inibição destes compostos nos ensaios de inibição e desativação enzimática.

O comportamento do ácido tânico durante as simulações de dinâmica molecular foi diferente dos demais compostos. Foram observados complexos estáveis tanto em *TpBgl1* quanto em *TpBgl3* (Figura 18), assumindo que a conformação espacial dentro do sítio ativo é muito semelhante à molécula de celobiose, embora a forma como o ácido tânico tenha influenciado cada proteína fosse diferente (Tabela 4, Figura 15 G e H).

Em *TpBgl1* o ácido tânico fez ligações de hidrogênio dentro e ao redor do sítio ativo através de grupos hidroxilo. Além disso, outro tipo de interação tornou-se mais presente durante a simulação, onde os anéis aromáticos de Tyr295 e Trp324 atraíram o grupo fenol de ácido tânico formando uma estrutura de empilhamento estabilizada através de interações CH- π (Figura 12G). O triptofano e a tirosina são os principais resíduos encontrados nas interações carboidrato-proteína, atraindo e posicionando o ligante dentro do local ativo através de interações CH- π (Asensio et al., 2013; Hudson et al., 2015). Em *TpBgl3* o complexo com o ácido tânico apresentou maior número de ligações de hidrogênio tanto no local ativo como na proteína total (Figura 15).

O ácido tânico foi a melhor molécula de ligação em comparação com todos os compostos fenólicos estudados, não só pelo maior comprimento das estruturas, mas por suas substituições de grupos químicos. Apesar dos anéis aromáticos, o ácido tânico apresenta alta quantidade de grupos hidroxilo enquanto os outros apresentam grupos metoxi. O grupo metoxi

formou interações moleculares fracas principalmente com grupos CH (Palusiak e Grabowski, 2002), sugerindo uma pequena polarização entre átomos de oxigênio e carbono (também observado em topologias de dinâmica molecular). Por outro lado, o grupo hidroxilo é amplamente conhecido como um grupo polar encontrado em muitas moléculas que é capaz de aceitar e doar elétrons de hidrogênio, fazendo parte de contatos moleculares mais fortes.

A hidrofobicidade da lignina muda de acordo com a presença de grupos hidroxilo e carboxilo, influenciando o poder de interação lignina-enzima e consequentemente a hidrólise enzimática (Yu et al., 2014; Huang et al., 2016). Os grupos hidroxilo fenólicos podem se ligar as enzimas levando à inativação da enzima (Rahikainen et al., 2013). Os grupos carboxílicos (COOH) alteram os efeitos físico-químicos da lignina aumentando a hidrofobicidade; criando cargas eletrostáticas e aumentando a ligação de hidrogênio, afetando assim interações lignina-enzima de forma diferente (Nakagame et al., 2011a).

No entanto, quando comparamos os resultados de *TpBgl1* com os de *TpBgl3*, observamos que elas são influenciadas de forma diferente pelo ácido tânico e isso se deve por estas enzimas possuírem mecanismo catalíticos diferentes. Silva et al., 2016 relatou que cerca de $1,5 \pm 0,5$ e $3,5 \pm 1,1$ moléculas de ácido tânico foram ligadas a cada *TpBgl1* e *TpBgl3*, respectivamente.

Quando Cota et al. 2015 compararam as atividades catalíticas de *TpBgl1* e *TpBgl3* na quebra da celobiose, relataram que *TpBgl1* é uma enzima promíscua enquanto *TpBgl3* é mais específica em relação a seus ligantes. Os resultados de Silva et al. 2016 também afirmam que as enzimas podem adsorver a lignina através de diferentes mecanismos. Eles mostraram que a adsorção de *TpBgl1* em ligninas foi fortemente dependente do pH, sugerindo que a adsorção é modulada por interações eletrostática. Para *TpBgl3*, os resultados sugerem que o domínio do tipo FnIII presente nesta enzima, interage com a lignina através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que podem, parcial ou completamente, superar as forças eletrostáticas repulsivas entre o domínio catalítico e a lignina, o que justificaria o maior poder de inibição do ácido tânico em *TpBgl3* do que em *TpBgl1*.

Tian et al. (2016) observaram que entre as famílias de celulasas, quase não há resíduos de aminoácidos arginina e lisina, exceto GH6 e GH7 (GH6 tem duas argininas e um lisina GH7 tem cinco argininas e uma lisina). Curiosamente, essas duas famílias contêm a maioria das exoglucanases que podem degradar a celulose cristalina, que exibe uma energia de ligação mais alta. Portanto, é razoável especular que estes resíduos estão associados a maior energia de ligação. A Tabela 1 mostra que o ácido tânico interage com três argininas e uma lisosima,

presentes no sítio ativo de *TpBgl3*, onde estes resíduos não estão presentes em *TpBgl1*. É possível que esse fator possa ter levado a uma maior inibição / desativação de *TpBgl3*.

Paes et al. (2012) estudando enzimas da família GH10 e GH11 observaram que ligações de hidrogênio são mais precisas do que interação hidrofílica durante o processo de interação enzima-ligante, o que leva a uma ligação mais lenta do ligante ou liberação do produto. O maior número e ligações de hidrogênio estáveis tanto no sítio ativo quanto na proteína total em *TpBgl3*, quando comparado com *TpBgl1* (figura 17), novamente explica sua maior inibição / desativação.

Apesar da baixa média de RMSD observada em *TpBgl3*, observou-se uma vibração crescente ao longo da dinâmica molecular, que foi altamente influenciada pelo circuito 413-425, com RMSF acima de 0,4nm (Figura 19). Apoiando nossos achados, as estruturas de cristal de *TpBgl3* geralmente não são modeladas nessa região (Pozzo et al, 2010; Silva et al, 2016) devido a uma densidade eletrônica ambígua, sugerindo um padrão de vibração alto para esta região.

Esta região está localizada muito perto do local ativo e pode constituir uma estrutura importante para a atividade enzimática, agindo como uma dobradiça para a seleção do substrato a ser hidrolizado. *TpBgl3* apresenta um mecanismo mais refinado, atraindo moléculas de açúcar dentro do sítio ativo através da captação pelo resíduo Trp421 por fechamento de loop de alta velocidade nos resíduos 413-425. Este mecanismo está associado aos resíduos Trp244 / Tyr245, localizados dentro do sítio ativo. Trp244 é responsável pelo alojamento do substrato no subsítio -1. Além disso, as simulações de dinâmica molecular de *TpBgl3* em complexo com celobiose (substrato natural) dão mais suporte à hipótese de seletividade do substrato, pois o loop foi capaz de impedir que ele saia do local ativo, o mesmo que observado no ácido tânico (Figura 19). Pozzo et al., 2010 confirmam que estes triptofanos possuem alta conservação dentro do grupo de proteínas e auxiliam no sítio catalítico.

Portanto o mecanismo diferenciado de *TpBgl3* garante que seu ligante natural não saia do sítio ativo através dos triptofanos presentes no loop de alta vibração no resíduos 413-425, confirmam o porque esta enzima é mais inibida pelo ácido tânico, do que *TpBgl1*. Como o ácido tânico minetiza o ligante natural, conforme discutido anteriormente, o loop assegura que ele permaneça no sítio por mais tempo.

Estes resultados são sustentados por Cota et al. 2015, quando descrevem que *TpBgl1* possui ampla especificidade de substrato e fraca inibição aos monossacarídeos, quando comparada a *TpBgl3*, sustentando um mecanismo de ação menos complexo, mais instável, que

mantém as interações por menos tempo, ilustrado nos resultados de dinâmica molecular e de menor inibição e desativação pelo ácido tânico.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do ensaio enzimático, acoplamento molecular e simulações de dinâmica molecular convergem para um ponto comum, no qual todos os compostos fenólicos influenciaram de forma semelhante as enzimas, com exceção do ácido tânico que mostrou maior poder de inibição e desativação tanto de *TpBgl1* como *TpBgl3*. Isto porque o ácido tânico possui muitos grupos hidroxilo, como as moléculas de açúcar acarretando em melhores interações.

Concluimos que o comportamento catalítico diferente das enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3* influencia na intensidade de inibição e desativação das mesmas pelo ácido tânico. O mecanismo de interação com ligante natural em *TpBgl3* se mostrou mais complexo e seletor quando comparado com o de *TpBgl1*, o que levou a sua maior inibição pelo ácido tânico.

Portanto, medidas que diminuam a concentração do ácido tânico no meio reacional da hidrólise enzimática se faz necessário, para que a inibição seja diminuída, elevando o potencial de conversão da celulose em bioetanol.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM MJ, MURTOLA T, SCHULZ R, PÁLL S, SMITH JC, HESS B, LINDAHL E. **GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers.** SoftwareX.1-2:19-25. 2015.
- ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J.J.; HUNG, L. W. KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. F.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., v. 66, p. 213-221, 2010.
- AGBOR, V.B. et al. **Biomass pretreatment: Fundamentals toward application.** Biotechnology Advances, v. 29, p. 675-685, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Atlas de energia elétrica do Brasil.** 2008. Disponível em <<http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/Atlas/download.htm>>, Acesso em: 02 nov. 2014.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J. **Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** Bioresource Technology, v. 101, n.13, p. 4851 – 4861, 2010.
- ANDRADE, R.R. et al. **Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle.** Bioresource Technology, v. 130, p. 351–359, 2013.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A.S., JENSEN, P.A., DAM-JOHANSEN K. **Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes.** Biotechnol Adv. v.28, p.308–324, 2010.
- ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE T. **The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling.** Bioinformatics, 22(2):195-201. 2006.
- ASENSIO J.L., ARDÁ A., CAÑADA F.J., JIMÉNEZ-BARBERO J. **Carbohydrate–aromatic interactions.** Acc Chem Res, v.46, p.946–954. 2013.
- BALAN, V.; SOUSA, L.D.; CHUNDAWAT, S.P.S.; MARSHALL, D.; SHARMA, L.N.; CHAMBLISS, C.K. **Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*).** Biotechnology Progress, v. 25, p. 365 – 375, 2009.
- BÉGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation.** Annual review of microbiology, v. 44, p.219-48, 1990.
- BEHERA S, ARORA R, NANDHAGOPAL N, KUMAR S. **Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass.** Renew Sustain Energ Rev., v.36, p.91-106, 2014.
- BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, VANGUNSTEREN WF, DINOLA A, HAAK JR. **Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath.** Journal of Chemical Physics., 81: 3684-90, 1984.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. **Weak lignin-binding enzymes.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 163-170, 2005.
- BOGAN, A.A., THORN, K.S. **Anatomy of hot spots in protein interfaces.** J Mol Biol., 280(1):1-9, 1998.
- BRADFORD, M. M. **A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRETHAUER, S., STUDER, M. H., YANG, B., AND WYMAN, C. E. **The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking.** Bioresour. Technol. v. 102, p. 6295–6298, 2011.
- BUSSI G, DONADIO D, PARRINELLO M. **Canonical sampling through velocity rescaling.** The Journal of Chemical Physics.v.126, 2007.

- CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A. **β -Glucosidases**. Cell Mol Life Sci. v., 67, p.3389–3405, 2010.
- CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N.L. **Análise comparativa cinética dos dois fungos β -glucosidases**. Biotecnologia para Biocombustíveis, 2010.
- CHEN et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66:12-21). Expression, purification, crys-tallization and preliminary crystallographic analysis of na endo-1,5-alpha-L-arabinanase from hyperthermophilic *Thermotoga petrophila*. Acta Crystallogr Sect F 2009; 65:902–5., 2010
- CHEN, S.F., MOWERY, R.A., SCARLATA, C.J., CHAMBLISS, C.K. Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover J Agric Food Chem, 55), pp. 5912-5918, 2007.
- CHHABRA, S. R.; SHOCKLEY, K.R.; WARD, D.E.; KELLY, R.M. **Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides**. Applied and environmental microbiology, v. 68, p. 545–554, 2002.
- CLOETE, T.E.; MALHERBE, S. **Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications**. ReV.EnViron. Sci. Bio/Technol., v. 1, p. 105–114, 2002.
- COLUSSI, F.; DA SILVA, V. M.; MILLER, I.; COTA, J.; DE OLIVEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA NETO, M.; SQUINA, F. M.; GARCIA, W. **Oligomeric state and structural stability of two hyperthermophilic β -glucosidases from *Thermotoga petrophila***. Amino Acids, Advance Access published January 31, 2015.
- CONVERSE, A. O.; WARE, W. **On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis**. In: IEA/BIOFOR – WORKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, Ottawa, Canada. 1994.
- COTA, J., CORRÊA, T.L.R., DAMÁSIO, A.R.L., DIOGO, J.A., HOFFMAM, Z.B., et al. **Comparative analysis of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential**. New Biotechnol, 32:13–20, 2015.
- COTA J.; ALVAREZ, T.M.; CITADINI, A.P.; SANTOS, C.R.; OLIVEIRA, N. M.; OLIVEIRA, R.R.; PASTORE, G.M.; RULLER, R.; PRADE, R.A.; MURAKAMI, M.T.; SQUINA, F.M. **Mode of operation and low resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- β -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila***. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 406, p.590-594, 2011.
- DAVIES, G.J.; WILSON, K.S.; HENRISSAT, B. **Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases**. Biochem J. v. 321, p. 557-9, 1997.
- DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- EMERICK, R.P. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. **Coot: model-building tools for molecular graphics**. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., v. 60, p. 2126-32, 2004.
- ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F. **Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. Enzyme Microb Technol.;31:353–64. 2002.
- FAULON, J.-L.; CARLSON, G.A.; HATCHER, P.G. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. **Organic Geochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1169-1179, 1994.
- FELTUS, F. A.; VANDENBRINK, J. P. **Bioenergy grass feedstock: current options and prospects for trait improvement using emerging genetic, genornic, and systems biology toolkits**. Biotechnol. Biofuel. p. 5, v. 80, 2012.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FISCHER, H., DE OLIVEIRA NETO, MARIO.; NAPOLITANO, H.B.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A.F. **The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale.** Journal of Applied Crystallography, v. 43, p. 101-109, 2010.

FOX, J.M.; LEVINE, S.E.; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W. **Initial- and processive-cut products reveal cellobiohydrolase rate limitations and the role of companion enzymes.** Biochemistry, p. 442–452. v. 51, 2012.

FLORINDO, R. N., SOUZA, V. P., MUTTI, H. S., CAMILO, C., MANZINE, L. R., MARANA, S. R., NASCIMENTO, A. S. **Structural insights into β -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*.** New Biotechnology, 40, 218–227. doi:10.1016/j.nbt.2017.08.012, 2018.

GEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil.** Campinas: Nipe/UNICAMP, 2009. 536p

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIG, D. **Characterization of fungal cellulases.** Biores.Technol, v. 36, p. 37–50, 1991.

GRABBER, J. H. **How do lignin composition, structure, and crosslinking affect degradability? A review of cell wall model studies.** Crop Sci. 45, 820–831, 2005.

GUO, F.; SHI, W.; SUN, W.; LI, X.; WANG F.; ZHAO, J.; QU, Y. **Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism.** Biotechnology for Biofuels, 7:38, 2014.

GURGEL, L.V.A. **Meceração e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II).** 2007. 180p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. **Cellulose and Carbohydrate Chemistry.** In EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Wood chemistry and wood biotechnology. Berlin: Walter de Gruyter, v. 1, p. 71-100, 2009.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** Biochem.J.v. 293, 781-788, 1993.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. **Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.** Biochem.J., v. 316, p. 695–696, 1996.

HENRISSAT, B. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** Biochemistry Journal. v. 280, p. 309-16, 1991.

HENRISSAT, B., DAVIES, G. J. **Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases.** Current Opinion in Structural Biology. v. 7. p.637-644, 1997.

HENRISSAT, B., GLOSTER, T. M., DAVIES, G. J. **Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes.** Current Opinion in Structural Biology. v. 15, p.637-645, 2005.

HIMMEL, M. E. et al. **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** Science, 2007, 315:804-807.

HOOVER, W. G. **Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions.** Phys. Rev. A, 31:1695–1697. 1985.

HUANG C., HE J., MIN D., LAI C., YONG Q. **Understanding the nonproductive enzyme adsorption and physicochemical properties of residual lignins in moso bamboo pretreated with sulfuric acid and kraft pulping.** Appl. Biochem. Biotechnol. 2016.

HUDSON, K. L., BARTLETT, G. J., DIEHL, R. C., AGIRRE, J., GALLAGHER, T., KIESSLING, L. L., AND WOOLFSON, D. N. **Carbohydrate-aromatic interactions in proteins.** J. Am. Chem. Soc. 2015, 137:15152–15160.

- JENG W-Y, WANG N-C, LIN M-H, ET AL. **Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*.** Journal of Structural Biology., v. 173, p. 46–56, 2011.
- JIN, Y., YANG, N., TONG, Q., JIN, Z., XU, X. **Intensification of sodium hydroxide pretreatment of corn stalk using magnetic field in a fluidic system.** Bioresour. Technol., v.220, p.1-7, 2016.
- JONES, G, WILLETT, P, GLEN RC. **Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation.** Journal of Molecular Biology, 245(1): 43-5. 1995.
- JONES, L., ENNOS, A. R. AND TURNER, S.R. **Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis.** Plant J. 26: 205-216, 2001.
- JÖNSSON, L.J., MARTÍN, C. **Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects.** Bioresour. Technol., v.199 p. 103-112, 2016.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A. **Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material.** Angewandte Chemie – International Edition, v. 44, n. 22, p. 3358 – 3393, 2005.
- KO JK, XIMENES E, KIM Y, LADISCH M. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. Biotechnol Bioeng. 2015;112:447–56
- KO, .JK., UM, Y., PARK ,Y.C., SEO, J.H., KIM, K.H. **Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose.** Appl Microbiol Biotechnol. v.99, p.4201–4212, 2015.
- KOSARIC, N.; WIECZOREK, A.; COSENTINO, P. G.; MAGEE, R. J.; PRENOSIL, J.E. **Biotechnology.** Badel Verlag Chemie, v. 3, p. 325, 1983.
- KOZIARA KB, STROET M, MALDE AK, MARK AE. **Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies.** Journal of Computer-Aided Molecular Design, 28: 221-233, 2014.
- KULKARNI, A.R.; PATTETHIL,S.; HAHN, M.G.; YORK, W.S.; ANDO'NEIL, M. A. **Comparison of arabinoxylan structure in bioenergy and model grasses.** Ind.Biotechnol.v. 8, p.222–229, 2012.
- KUMAR L, ARANTES V, CHANDRA R, SADDLER J. **The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility.** Bioresour Technol.v.103.201–8, 2012.
- KUMAR, D., MURTHY, G. S. **Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production.** Biotechnology for Biofuels, v.6, p.63, 2013.
- KUMAR, P. et al. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 48, n. 8, p. 3713- 3729, 2009.
- 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.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227(5259), 680-685, 1970.
- LEE, J. **Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.** Journal of Biotechnology, v.56, p.1-24, 1997.
- LEMKUL JA, ALLEN WJ, BEVAN DR. **Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies.** Journal of Chemical Information and Modeling, 2010, 50(12): 2221-2235.
- LIJNZAAD, P., BERENDSEN, H. J., AND ARGOS, P. **Hydrophobic patches on the surfaces of protein structures.** Proteins v. 25, p. 389–397, 1996.
- LIMA, L.M.T.R.; BECKER, C.F.; GIESEL, G.M.; MARQUES, A.F.; CARGNELUTI, M.T.; OLIVEIRA NETO, M.; MONTEIRO, R.Q.; VERLI, H.;POLIKARPOV, I. **Structural and thermodynamic analysis of**

thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases BBA. Proteins and Proteomics. v. 1794, p. 873-881, 2009.

LIMA, M.A. Et al., ***Aspergillus niger* β -glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape: insights into glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase structure and function.** J Biol Chem. v.288 p.46, 2013.

LIU H, SUN J, LEU SY, CHEN S. **Toward a fundamental understanding of cellulase-lignin interactions in the whole slurry enzymatic saccharification process.** Biofuels Bioprod Biorefin., v.10, p.648-663, 2016.

LYND, L.; CUSHMAN, J.; NICHOLS, R.; WYMAN, C. **Fuel ethanol from cellulosic biomass.** Science, v. 51, p. 1318–1323, 1991.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506-577, 2002.

LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. Biotechnology Progress, v. 15, n.5, p. 777-793, 1999

MARANA, S.R. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. Life, 58(2), 63-73. 2006.

MARTINS, L.H.D.S., RABELO, S.C., COSTA, A.C.D. **Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse.** Bioresour. Technol., v.191 p. 312-321, 2015.

MATULOVA, M.; NOUAILLE, R.; CAPEK, P.; PÉAN, M.; FORANO, E.; DELORT, A.M. Degradation of wheat straw by fibrobactersuccinogenes S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1247-1253, 2005.

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

MCFARLANE, H.E., DÖRING, A., PERSSON, S. **The cell biology of cellulose synthesis.** Annu. Rev. Plant Biol. p. 65, v.69-94, 2014.

MCNICHOLAS, S.; POTTERTON, E.; WILSON, K. S.; NOBLE, M. E. M. **Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software.** Acta Crystallographica, v. 67, p. 386—394, 2011.

MOOD, S.H. et al. **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 27, p.77–93, 2013

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresour. Technol., v.96, p.673-686, 2005.

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. **Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method.** Acta Cryst., v. 53, p. 240-255, 1997.

NAKAGAME, S., CHANDRA, R. P., KADLA, J. F., AND SADDLER, J. N. **Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin.** Biotechnol. Bioeng. v. 108, p. 538–548, 2011.

NAKAGAME, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., Saddler, J.N. **The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose.** Bioresour. Technol. 102 (6), 4507–4517, 2011b.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. **The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis.** Biotechnology and Bioengineering, v. 105, n. 5, 2010.

NEWMAN, R.H.; HILL, S.J.; HARRIS, P.J. **Wide-angle x-ray scattering and solid-state nuclear magnetic resonance data combined to test models for cellulose microfibrils in mung bean cell walls.** Plant Physiology, p. 163, v. 1558-1567, 2013.

NGUYEN, T.Y., CAI, C.M., OSMAN, O., KUMAR, R., WYMAN, C.E. **CELF pretreatment of corn stover boosts ethanol titers and yields from high solids SSF with low enzyme loadings**. *Green Chem.*, v.18, p.1581-1589, 2016.

NOSÉ, S. **A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble**. *Mol. Phys.* 52:255–268, 1984.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. **Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover**. *Bioresource Technology*, p.2503–2510, v. 98, 2007.

OLSEN, S.N.; BOHLINA, C.; MURPHYA, L.; BORCHB, K.; MCFARLANDC, K.C.; SWEENYC M.D.; WESTHA. P. **Effects of non-ionic surfactants on the interactions between cellulases and tannic acid: A model system for cellulase–poly-phenol interactions**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 49 p. 353–359, 2011.

OLSSON, M.H.M., SONDERGARD, C.R., ROSTKOWSKI, M., JENSEN, J.H. **A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6**. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1656-1676. 2004.

OTWINOWSKI, Z; MINOR, W. **Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode**. *Methods in Enzymology*, v. 276: Macromolecular Crystallography, part A, p. 307326, 1997, C. W. Carter, Jr. & R. M. Sweet, Eds., Academic Press (New York).

PALUSIAK, M., GRABOWSKI, S. J., **Methoxy Group as an Acceptor of Proton in Hydrogen Bonds**, *J. Mol. Struct.*, 642, 97–104. 2002.

PAN, X. **Role of functional groups in lignin inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose**.

PAREEK, N., GILLGREN, T., JONSSON, L.J., **Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses**. *Bioresour. Technol.* 148, 70–77, 2013.

PARRINELLO, M., RAHMAN, A. **Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method**. *J. Appl. Phys.* 52:7182–7190, 1981.

PEREIRA JUNIOR, N. **Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química**. In: ENCONTRO ANUAL DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 11, 2006. São Paulo. Anais... São Paulo, 2006

POLLET A, DELCOUR JA, COURTIN CM. **Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families**. *Crit Rev Biotechnol* 30(3):176–191, 2010.

POZZO, T.; PASTEN, J.L.; KARLSSON, E.N.; LOGAN, D.T. **Structural and functional analyses of β -glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3**. *Journal Molecular Biology*, v. 397, p. 724–739, 2010.

QIN, C., CLARKE, K., LI, K., **Interactive forces between lignin and cellulase as determined by atomic force microscopy**. *Biotechnol. Biofuels* 7, 65. 2014.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. S.; FOLCH- MALLO, J. **Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars**. In: CHANDEL, A. K., SILVA, S.S. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization. Croatia: InTech., cap. 6, p.284. 2013.

RABINOVICH, M.L.; MELNIK, M.S.; BOLOBOVA, A.V. **The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes**. *Biochemistry-Moscow*, v. 68, p. 850–71, 2002.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVIDSON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, J. R. W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The path forward for biofuels and biomaterials**. *Science*, v. 311, p. 484-489, 2006.

- RAHIKAINEN J, MIKANDER S, MARJAMAA K, TAMMINEN T, LAPPAS A, VIIKARI L, et al. **Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood study of enzyme binding and inactivation on lignina rich surface.** *Biotechnol Bioeng.*, v.108, p.2823-2834, 2011.
- RAHIKAINEN, J.L., MARTIN-SAMPEDRO, R., HEIKKINEN, H., ROVIO, S., MARJAMAA, K., TAMMINEN,T., ROJAS, O.J., KRUUS, K., **Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion:the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption.** *Bioresour.Technol.* 133, 270–278, 2013.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants.** New York: W.H. Freeman & Company, 1992.
- RENÓ, M.L.G.; OLMO, O.A.D.; PALACIO, J.C.E.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. Sugarcane biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar–alcohol industry. **Energy Conversion and Management**, v. 86, n. 0, p. 981-991, 2014.
- RODRIGUES, F.A.; GUIRARDELLO, R. **Evaluation of a Sugarcane Bagasse Acid Hydrolysis Technology.** *Chem. Eng. Technol.*, v. 31, p. 883–892, 2008.
- RODRIGUES, R. C. L. B. et al. **Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables.** *Process Biochemistry*, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.
- RUBIN, E.M. **Genomics of cellulosic biofuels.** *Nature*, v. 454, p. 841-845, 2008.
- RUEL, K., BERRIO-SIERRA, J., DERIKVAND, M.M., POLLET, B., THÉVENIN, J., LAPIERRE, C., JOUANIN, L. AND JOSELEAU, J.P. **Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in Arabidopsis thaliana.** *New Phytol.* 184: 99-113, 2009.
- SAMMOND, D.; W.; YARBROUGH, J.; M.; MANSFIELD, E.; BOMBLE. Y; J.; et al. **Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity.** *The Journal of Biological Chemistry* v. 289, n. 30, pp. 20960–20969, 2014.
- SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194, 2009.
- SANTOS CR, PAIVA JH, MEZA AN, COTA J, ALVAREZ TM, RULLER R, PRADE RA, SQUINA FM, MURAKAMI MT) **Molecular insights into substrate specificity and thermal stability of a bacterial GH5-CBM27 endo-1,4-β-d-mannanase.** *J Struct Biol* v. 177, p. 469–476, 2012.
- SANTOS, C. R.; SQUINA, F.M.; NAVARRO, A.M.; OLDIGES, D.P.; LEME, A.F.; RULLER, R.; MORT, A.J.; PRADE, R.; MURAKAMI, M.T. **Functional and biophysical characterization of hyperthermostable GH5 α-l-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*.** *Biotechnol Lett* v. 33, p. 131–137, 2011.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J. A., MARTINEZ-RIPOLL, M., LEQUERICA, J. L., AND POLAINA, J. **Crystal structure of b-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases.** *J. Mol. Biol.* 275, 491 – 502.,1998.
- SCHELLER, H.; ULVSKOV, P. **Hemicelluloses.** *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 61, p. 263–89, 2010.
- SEWALT, V., GLASSER, W., BEAUCHEMIN, K., **Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives.** *J. Agric. Food Chem.* 45 (5), 1823–1828, 1997.
- SHANG Y, SU R, HUANG R, YANG Y, QI W, LI Q, ET AL. **Recycling cellulases by pH-triggered adsorption-desorption during the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Appl Microbiol Biotechnol.*, v.98, p.5765–5774, 2014.
- SILVA VM, COLUSSI F, OLIVEIRA NETO M, BRAZ A, SQUINA MF, OLIVEIRA CL, GARCIA W **Modular hyperthermostable bacterial endo- β-1,4-Mannanase: molecular shape, flexibility and temperature dependent conformational changes.** *Plos One* v. 9(3):e92996, 2014.

SILVA, VIVIAM M.; DE SOUZA, ANDERSON S. ; NEGRÃO, DJANIRA ; POLIKARPOV, IGOR ; SQUINA, FABIO M. ; DE OLIVEIRA NETO, MARIO ; MUNIZ, JOÃO R.C. ; GARCIA, WANIUS . **Non-productive adsorption of bacterial β -glucosidases on lignins is electrostatically modulated and depends on the presence of fibronectin type III-like domain.** Enzyme and Microbial Technology, v. 87-88, p. 1-8, 2016.

SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. **An overview of second generation biofuel technologies.** Bioresource Technology, v. 101, p. 1570–1580, 2010.

SINGH J, SUHAG M, DHAKA A. **Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review.** Carbohydr Polym., v.117, p.624-631, 2015.

SINGHANIA R.R.; SUKUMARAN R.K; PATEL A.K; LARROCHE C; PANDEY A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 46,n. 7, p. 541-549.,2010.

SIPOS, B. et al. **Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol).** Enzyme and Microbial Technology, v.47, p. 84- 90, 2010.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. **Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite.** Applied Energy, v. 102, p. 399–402, 2013.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. **Chemical Composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution.** In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARE-LO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. **Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil.** Bioresource Technology, v. 101, n. 13, p. 4820 - 4835, 2010

SVERGUN, D.I. & STUHRMANN, H.B. **New developments in direct shape determination from small-angle scattering 1.Theory and model calculations.** Acta Crystallogr. A 47:736-744. 1991.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. **Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects.** In Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes; Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S.C., Dussap, C.G., Gnansounou, E., Eds.; Springer: Berlin, Germany,; pp. 287–311, 2011.

TIAN, L., LIU, S., WANG, S., LUSHAN WANG, L., **Ligand-binding specificity and promiscuity of the main lignocellulolytic enzyme families as revealed by active-site architecture analysis.** Sci Rep. 6, 23605. 2016.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S. **β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications.** BioMed Research International v. 2013, 2013.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. **An approach to multi-copy search in molecular replacement.** Acta Cryst, v. 56, p. 1622-1624, 2000.

VARGHESE, J.N, HRMOVA M, AND FINCHER GB. **Three-dimensional structure of a barley beta-D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase.** Structure, v. 7p.179-90, 1999.

VÁRNAI A, SIIKA-AHO M, VIKARI L. **Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs.** Biotechnol Biofuels., v.6, p.30, 2013.

VÁRNAI A, VIKARI L, MARJAMAA K, SIIKA-AHO M. **Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates.** Bioresour Technol., v.102, p.1220-1227, 2011.

VERDOUCQ, L., MORINIERE, J., BEAVAN, D. R., ESEN, A., VASELLA, A., HENRISSAT, B., ANDCZJZEK,M. **Structural determinants of substrate specificity in family 1 β -glucosidases.** J. Biol. Chem. 277, 31796 – 31803., 2004.

- WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. **Increasing the availability of cellulose in biomass materials.** *Methods in Enzymology*, v. 160, p. 3–11, 1988.
- WYMAN, C. E. et al. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** *Bioresource Technology*, v. 96, n.18, p. 1959-1966, 2005
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M.; . **Deactivation of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, p.54–60, 2011.
- YANG, B., AND WYMAN, C. E. **BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates.** *Biotechnol. Bioeng.* v. 94, p. 611–617, 2006.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. **Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering*, p.88–98, v.86, 2004.
- YOSHIDA, E. et al. **Role os PA14 domain in determining substrate specificity os a glycoside hydrolase family 3 beta-glicosidase form *Kluyveromyces marxianus*.** *Biochemical Journal*, v. 431, p. 39-49, 2010.
- YU Z., GWAK K.-S., TREASURE T., JAMEEL H., CHANG H.-M., PARK S. **Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass.** *Chem Sus Chem* 7, 1942–1950, 2014.
- ZECHEL, D.L; BORASTON, A.B.; GLOSTER, T.; CATHERINE M. BORASTON, C.M.; MACDONALD, J.M.; . TILBROOK, D.M.G.; STICK, R.V.; DAVIES, G.J. **Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to β -glucosidases.** *Journal American Chemical Society*, v.125, p.14313-14323, 2003.
- ZHANG, K., PEI, Z., WANG, D. **Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review.** *Bioresour. Technol.*, v.199, p.21-33. 2016.
- ZHENG, Y.; ZHANG, S.; MIAO, S.; , SU, Z.; PING WANG, P. **Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Journal of Biotechnology*, v. 166, p. 135– 143, 2013.
- ZHONG, R.; YE, Z-H. **Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation.** *Plant and Cell Physiology*, Advance Access published October 7, 2014.
- ZHONG, R.; MORRISON, W.H.; NEGREL, J. AND YE, Z.-H. **Dual methylation pathways in lignin biosynthesis.** *Plant Cell*, v. 10, p.2033-2046, 1998.
- ZHOU, Y. J.; BUIJS N. A.; SIEWERS V.; NIELSEN, J. **Fatty acid-derived biofuels and chemicals production in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 2, n. 32, 2014.
- ZOLOTNITSKY G., COGAN U., ADIR N., SOLOMON V., SHOHAM G., SHOHAM Y. **Mapping glycosyl hydrolase substrate subsites by isothermal titration calorimetry.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 11275–11280. 2004.