

CAPÍTULO 1

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

Vanessa de O. A. Pellegrini, Anelyse A. Cortez e Igor Polikarpov

1.1 PAREDE CELULAR DE PLANTAS: ARQUITETURA E COMPOSIÇÃO

As plantas contêm cerca de 35 a 40 diferentes tipos de células, e elas se distinguem em tamanho, forma, posição e construção da parede celular.¹ Circundando as células vegetais, a parede celular é uma matriz extracelular muito resistente, a qual diferencia as células animais das células vegetais. É ela que determina tanto o tamanho quanto a forma da célula, bem como a textura do tecido, moldando, portanto, a forma final das células de plantas.²

Evolutivamente, o desenvolvimento de uma parede celular rígida foi fator limitante na capacidade de locomoção de plantas primordiais, levando-as a adotar a vida sedentária apresentada pelas plantas atuais.³ Uma vez que paredes celulares das plantas são capazes de determinar a resistência mecânica das estruturas das plantas, ela permite que essas estruturas cresçam a grandes alturas. A capacidade ou limitação da parede celular se expandir é o que determina o crescimento das células vegetais. É importante ressaltar que plantas com distintas arquiteturas requerem diferentes propriedades mecânicas dos órgãos, por exemplo, plantas que dependem da rigidez dos próprios tecidos para crescer investem mais em tecidos de sustentação, enquanto espécies com hábito escandente (trepadeiras) demandam menor estrutura de suporte.

Nas células que estão em crescimento, a parede é tipicamente fina (0,1-1 μm), flexível e consiste principalmente de polissacarídeos complexos com uma pequena quantidade de proteínas. Apesar da estrutura parecer frágil, a parede celular forma uma rede forte, capaz de comprimir e dar forma ao protoplasto.

As paredes das células vegetais possuem funções não encontradas nas paredes de outros organismos, tornando sua estrutura e composição complexa e variável. O papel da parede celular vegetal vai desde o envolvimento nos processos de crescimento até ao desenvolvimento, à manutenção e reprodução das plantas. Outra função relacionada com a parede vegetal é o controle hídrico das plantas, pois é a parede que determina a pressão de turgor celular e o volume de células.

1 Cosgrove (2005), Gilbert, Knox e Boraston (2013), Lampugnani et al. (2018).

2 Chaffey (2014).

3 Uzman (2003).

Além disso, a parede celular desempenha um papel ativo na defesa contra bactérias e fungos patogênicos, recebendo e processando as informações da superfície sobre ataque do patógeno e transmitindo-as à membrana plasmática da célula vegetal.⁴ Muitas das funções acima descritas são requeridas ao mesmo tempo, exigindo simultaneamente flexibilidade e resistência. Tanta diversidade de funções requer uma estrutura de parede celular vegetal igualmente sofisticada e complexa, justificando a variedade de enzimas capazes de desempenhar importantes papéis na absorção, no transporte e na secreção de substâncias nas plantas.

Em termos gerais, as paredes celulares das plantas são geralmente divididas em duas categorias: primárias e secundárias. A parede primária é depositada antes e durante o crescimento da célula vegetal, e assim envolve as células que estão em crescimento ou que são capazes de crescer. Embora possa conter pequena quantidade de lignina, suberina e cutina, as paredes primárias são constituídas principalmente por celulose, hemiceluloses, pectinas, proteínas (glicoproteínas e enzimas) e água.

As células vivas, formadas somente pelas paredes primárias, possuem a capacidade de alterar sua forma celular, dividir-se e diferenciar-se ativamente em novos tipos de células. Células maduras, mas que são envolvidas em processos metabólicos como fotossíntese, respiração e secreção, também são compostas essencialmente de paredes primárias. Outra categoria de células essencialmente compostas de parede primárias são as envolvidas na cicatrização de ferimentos e regeneração na planta.

Após cessar o crescimento celular, ocorre a deposição da parede celular secundária, que tipicamente deve dominar a composição da planta madura e conferir reforços substanciais para estabilizar a estrutura das células da planta como um todo, conferindo, assim, estabilidade mecânica.⁵

Majoritariamente, a parede celular secundária é composta de celulose e hemicelulose, as quais se encontram “vedadas” de forma impermeável e quimicamente durável pela matriz polimérica de lignina, importante componente das paredes celulares vegetais, uma vez que o desenvolvimento de paredes celulares lignificadas por plantas terrestres foi um passo fundamental para permitir a sua proeminência na biosfera terrestre.

1.2 PRINCIPAIS FRAÇÕES DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

A biomassa lignocelulósica é um material orgânico de origem vegetal com elevado potencial para contribuir com as demandas mundiais de energia, produtos químicos e materiais, de maneira renovável e sustentável. A alta produtividade das usinas sucroalcooleiras disponi-

4 Northcote (1972).

5 Gomez, Steele-King e McQueen-Mason (2008).

biliza uma enorme quantidade de matéria orgânica sob a forma de bagaço de cana, conforme pode ser visualizado na Figura 1.1.

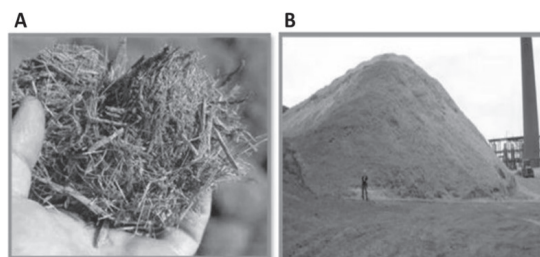


Figura 1.1 A) Detalhe do aspecto do bagaço de cana-de-açúcar. B) Amontoado de bagaço de cana-de-açúcar proveniente de usinas sucroalcooleiras.

Encontrada nas paredes celulares das plantas, é formada através de fotossíntese e composta principalmente das fibras vegetais de celulose (20-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%), frações poliméricas unidas por ligações covalentes.⁶

A celulose é o biopolímero natural mais abundante, encontrada na madeira, no algodão, cânhamo e em outros vegetais. Trata-se de um polissacarídeo constituído por unidades de β -D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Cada cadeia de celulose pode conter de dois mil a mais de 25 mil resíduos de glicose, os quais se encontram invertidos em relação aos seus vizinhos, resultando em uma cadeia linear de resíduos de glicose. Essa linearidade permite que associações próximas se formem com cadeias vizinhas em longas distâncias, resultando em formação de microfibrilas e uma estrutura semicristalina.⁷

A celulose é bastante resistente à tração e apresenta propriedades que a tornam um excelente material para compor uma parede celular compacta e rígida. Sua estrutura é insolúvel, quimicamente estável e muito recalcitrante diante de ataques químicos e enzimáticos. Todavia, as microfibrilas de celulose podem apresentar pequenas deslocamentos em sua estrutura, como poros e rachaduras, formando pontos fracos mediante o ataque químico e enzimático ou de forças mecânicas.

As microfibrilas de celulose podem variar em comprimento, largura e grau de ordenação. A variedade em largura corresponde à complexidade do número de cadeias paralelas que compõem a seção transversal de uma microfibrila. Estima-se que microfibrilas finas, por exemplo, sejam compostas de 20 a 40 cadeias individuais de celulose.

As microfibrilas apresentam regiões com domínios ordenados, nas quais as cadeias estão firmemente ligadas em paralelo, formando regiões altamente cristalinas, e regiões com menor grau de ordenação, denominadas regiões amorfas. A região cristalina constitui a fração de

⁶ Pauly e Keegstra (2008).

⁷ Payne et al. (2015).

maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente), enquanto que a região amorfa possui maior flexibilidade.⁸

As regiões amorfas são as primeiras frações a serem degradadas quando a celulose é submetida à ação hidrolítica, e parece provável que o aumento das regiões desordenadas na celulose possa fornecer um meio de aumentar sua digestibilidade.⁹

A celulose pode se organizar em múltiplos polimorfos, sendo a celulose nativa (tipo I) o polimorfo dominante em madeiras e plantas naturais. Estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que a celulose nativa é constituída por uma mistura dos polimorfos naturais Ia e Ib. A principal diferença entre estes polimorfos está relacionada ao sistema cristalino das estruturas: enquanto a Ia é triclinica, a Ib é monoclinica.¹⁰ A proporção entre as frações Ia e Ib em uma amostra de celulose nativa depende do material vegetal que a originou. Sabe-se que nas celuloses de algodão e madeira, por exemplo, predomina o polimorfo Ib. Existem, ainda, outras formas cristalinas de celulose, originadas a partir do tratamento químico da celulose nativa. Tais formas constituem o grupo dos polimorfos sintéticos, formado pelas celuloses do tipo II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}.¹¹

Na parede celular das células vegetais, as microfibrilas de celulose estão imersas em uma matriz com diversos outros polissacarídeos capazes de interagir com estas moléculas organizadas. Dentre eles, destaca-se a hemicelulose, segundo componente mais abundante da biomassa lignocelulósica, com o papel principal de amarrar microfibrilas de celulose, fortalecendo assim a parede celular.

A hemicelulose é um grupo heterogêneo de polissacarídeos capaz de interagir intimamente com microfibrilas de celulose em virtude de sua capacidade de ligação de hidrogênio às cadeias de celulose. Tipicamente, são caracterizados por estruturas de açúcares com ligações β -(1 \rightarrow 4) em uma configuração equatorial (Figura 1.2). Esta definição inclui xiloglucanos, xilanos, mananos e β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glucanos.¹²

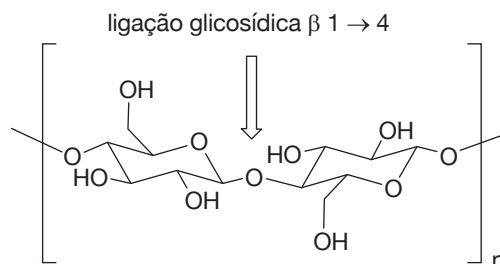


Figura 1.2 Estrutura molecular da celulose com ligação glicosídica β 1 \rightarrow 4.

8 Gomez, Steele-King e McQueen-Mason (2008).

9 Id. *ibid.*, Payne et al. (2015).

10 Dufresne (2003), Moon et al. (2011).

11 Payne et al. (2015), Buckeridge, Cavalari e Silva (2008).

12 Scheller e Ulvskov (2010).

De acordo com o tipo da planta, a hemicelulose pode ser composta de unidades diversas de monossacarídeos contendo, principalmente, pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico) (Figura 1.3). Conforme o estágio de desenvolvimento e tipo de tecido, várias classes de hemiceluloses são encontradas. A classificação destes polissacarídeos ocorre segundo o principal monossacarídeo da cadeia principal e as ramificações laterais.

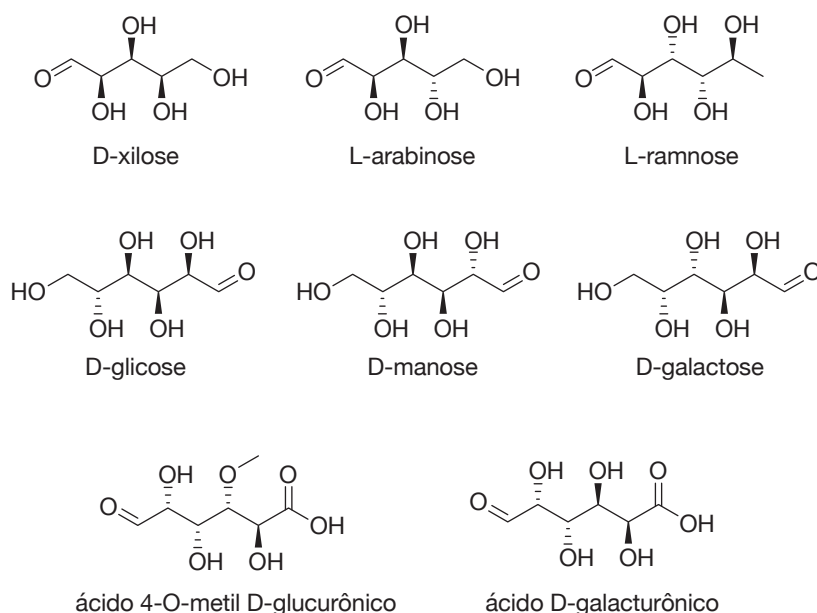


Figura 1.3 Monossacarídeos que constituem a estrutura da hemicelulose.

O xiloglucano (XyG) é encontrado na maioria das espécies de plantas terrestres, até mesmo em musgos. É um polissacarídeo de reserva, formado por uma cadeia principal de glicoses e ramificações de xiloses, as quais também podem estar associadas a resíduos de galactose e fucose. Todavia, existem muitas variações para padrão de ramificações deste polissacarídeo. As ramificações interferem no alinhamento linear entre os resíduos de glicose da cadeia principal, impedindo que o xiloglucano forme microfibrilas. Além disso, elas determinam a solubilidade do xiloglucano, sendo que os menos ramificados são mais insolúveis, e também influenciam nos aspectos funcionais da molécula.¹³ O xiloglucano liga-se às microfibrilas de celulose por meio das ligações de hidrogênio, mantendo o espaçamento entre as mesmas e impedindo que estas se agreguem e formem feixes muito espessos. Se o xiloglucano é removido, as microfibrilas de celulose podem perder o espaçamento e a sua orientação, e colapsar.

¹³ Id. *ibid.*

Em se tratando da fração hemicelulósica, o xiloglucano é componente principal em paredes celulares primárias, enquanto que nas secundárias, que predominam na biomassa vegetal, a hemicelulose mais abundante é o xilano.¹⁴

O xilano consiste em uma cadeia principal formada por xiloses, e as ramificações podem ser ácido glucurônico, L-arabinose e D-galactose. A estrutura do xilano é variável até mesmo entre os diferentes tecidos de uma mesma espécie. As cadeias laterais determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula de xilano com outros componentes hemicelulósicos. Além disso, influenciam na interação do xilano com as microfibrilas de celulose. Sabe-se que o xilano é o constituinte principal das chamadas madeiras duras, ou madeira de lei, sendo responsável por revestir estas microfibrilas e auxiliar as ligações destas com outros polímeros através das ligações de hidrogênio.

Uma modificação comum dos xilanos é a substituição com resíduos glucuronosil e 4-O-metil glucuronosil ligados por uma ligação α - (1 \rightarrow 2) à cadeia principal de polissacarídeo. Os xilanos dominados por esse tipo de substituição são conhecidos como glucuronoxilanos, e são o polissacarídeo não celulósico dominante nas paredes secundárias das dicotiledôneas. Já em monocotiledôneas comuns (que incluem gramíneas e outras espécies relacionadas), os xilanos geralmente contêm vários resíduos de arabinose ligados à cadeia principal e são conhecidos como arabinoxilanos e glucuronoarabinoxilanos.¹⁵

Outro importante componente da hemicelulose é o manano, o qual apresenta tanto papel estrutural, pois é capaz de se ligar às microfibrilas de celulose, quanto de armazenamento, como reserva de carboidratos. Além disso, funciona como molécula de sinalização envolvida com o crescimento e desenvolvimento das plantas.¹⁶

O manano pode ser classificado em quatro subfamílias: manano linear, glucomanano, galactomanano e galactoglucomanano, as quais são amplamente distribuídas nos tecidos vegetais.¹⁷ Cada um desses polissacarídeos apresenta um esqueleto ligado a β -1,4 contendo manose ou uma combinação de resíduos de glicose e manose. Além disso, o esqueleto de manano pode ser substituído por cadeias laterais de resíduos de galactose ligados por α -1,6.¹⁸

Apesar do manano ser muito estudado em seu papel como composto de armazenamento de sementes, ele é encontrado em quantidades variáveis em todas as paredes celulares. São as principais unidades estruturais nas madeiras e nas sementes de muitas plantas, como nozes marfim e grãos de café. Alguns destes mananos, especialmente da *Aloe vera*, apresentam propriedades imunofarmacológicas e terapêuticas.¹⁹

14 Gomez, Steele-King e McQueen-Mason (2008).

15 Scheller e Ulvskov (2010), Rennie e Scheller (2014).

16 Moreira e Filho (2008).

17 Id. ibid.

18 Liepman et al. (2007).

19 Aspinall, Begbie e McKay (1962).

Os galactomananos são encontrados principalmente nas sementes da família Leguminosae e estão localizados na parte endospermica das sementes. Possuem capacidade de reter água pela salvação, e sua presença em sementes de regiões com altas temperaturas atmosféricas é muito importante na prevenção da secagem completa das sementes, o que levaria à desnaturação da proteína, especialmente daquelas enzimas essenciais para a germinação de sementes.

A distribuição hemicelulósica varia entre as chamadas “madeiras moles” (gimnospermas) e “madeiras duras” (angiospermas). Nas madeiras moles se encontram principalmente glucogalactomanano, contendo resíduos de manose/glucose/galactose em uma proporção de 3:1:1, e glucomanana, com resíduos de manose/glucose na proporção de 3:1.²⁰

Presentes em grandes quantidades na fração hemicelulósica das “madeiras moles”, as glucomananas são polissacarídeos com grau de polimerização superior a 200.²¹ Glucomananas têm uma boa variedade de aplicações, incluindo a prevenção de doenças crônicas e controle de peso.²²

Galactoglucomananas são polissacarídeos contendo resíduos de D-galactose ligados a ambas unidades D-glucosil e D-manosil como ramificações terminais ligadas por α -1,6.²³ Possuem alta solubilidade em água devido ao seu conteúdo relativamente grande de cadeias laterais de D-galactose, impedindo que as macromoléculas se alinhem de modo a resultar na formação de fortes ligações de hidrogênio.²⁴ A alta solubilidade em água dos galactoglucomananos colabora para que sejam considerados polímeros naturais biodegradáveis de fonte renovável e com grande potencial econômico.²⁵

Os β -1,3-1,4-glucanos, ou apenas β -glucanos, são os componentes hemicelulósicos predominantes em paredes celulares de alguns tipos de gramíneas, como a cevada e a aveia. São formados por ligações mistas de β -1,4-glucanos intercalados por β -1,3-glucanos. A presença de ligações β -1,3 cria torções na estrutura do β -glucano, que não só previnem o alinhamento extensivo das cadeias de microfibrilas celulósicas, mas também permitem que o β -glucano forme géis hidrossolúveis.²⁶

Esta capacidade do β -glucano em formar estruturas em gel é biologicamente importante, uma vez que proporciona resistência adicional à parede, aliada à flexibilidade. Além disso, acredita-se que a matriz semelhante a gel proporciona porosidade que permite a transferência de água, nutrientes e outras pequenas moléculas através da parede durante o crescimento vegetal.²⁷ Nas paredes celulares primárias, esta molécula com ligações alternadas de glucano desempenha

20 Puls (1997).

21 Northcote (1972).

22 Ishurd et al. (2006).

23 Aspinall, Begbie e McKay (1962).

24 Timell (1964).

25 Xu et al. (2009).

26 Fincher (2009a).

27 Harris e Fincher (2009), Fincher (2009b).

um papel na expansão celular, e sua quantidade varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

Como visto, as hemiceluloses apresentam diferenças estruturais dependendo de cada espécie de planta e entre os diferentes tipos celulares que compõem o tecido vegetal. O principal papel das hemiceluloses é unir as microfibrilas de celulose, fortalecendo a parede celular. São importantes componentes do ramo alimentício e constituem uma parte importante da biomassa lignocelulósica.²⁸ Além da associação com as microfibrilas de celulose, as hemiceluloses também formam ligações covalentes com a lignina.

A lignina, terceiro constituinte da biomassa lignocelulósica aqui abordado, é uma macromolécula de estrutura tridimensional complexa. Na natureza, o polímero de lignina normalmente forma ligações éter ou éster com a hemicelulose, que também está associada à celulose. A lignina é composta principalmente de três elementos: C, H e O. Sua unidade estrutural é uma rede polimérica não cristalina com fenilpropano (C9) como estrutura principal, com substituintes hidroxí (-OH) e metoxi (-OCH₃).²⁹

Ela possui uma estrutura aromática na qual as unidades elementares são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que quando incorporados à estrutura aromática da lignina produzem, respectivamente, monolignóis *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (vide capítulo 7).³⁰ A porcentagem destes precursores varia de acordo com diferentes plantas. Geralmente, a lignina de madeira mole tem um conteúdo rico (~ 90%) de álcool guaiacil ou *p*-coniferil (G), com muito baixo teor de álcool *p*-acetálico (H), enquanto a lignina de madeira dura contém uma mistura de unidades de guaiacil (G) e siringil (S). Em gramíneas, por sua vez, predominam a guaiacila e siringila em proporções equiparáveis, com *p*-hidroxifenilas. Deste modo, podemos classificar a lignina em três tipos: tipo – G (lignina de madeira mole); tipo – G – S (lignina de madeira dura); e tipo – H – G – S (lignina de gramíneas).³¹

Uma vez que a lignina envolve essencialmente os polissacarídeos das paredes celulares, ela proporciona ao material rigidez, resistência e impermeabilidade à parede celular, garantindo a defesa contra o ataque de microrganismos. No entanto, tal estrutura também impede a penetração de enzimas destruidoras da parede celular, tornando a lignina um material muito resistente ao ataque enzimático.

Deste modo, enquanto celulose e hemicelulose têm sido amplamente utilizadas na produção de papel, açúcares e biocombustíveis, a lignina, principal subproduto dessas atividades industriais, não tem sido tão utilizada ainda. A maior parte dos resíduos de lignina é despejada ou queimada como combustível de baixo teor, e quando queimada não só provoca desperdício de recursos, mas também incorre em poluição ambiental.³²

28 Scheller e Ulvskov (2010).

29 Mahmood et al. (2016).

30 Cao et al. (2018).

31 Zakzeski et al. (2010), Li et al. (2013).

32 Indubai, Mahanwar e Gadekar (2018).

Para melhorar a viabilidade econômica de uma biorrefinaria, a biomassa deve ser amplamente convertida em produtos de valor agregado, e isso deve incluir o fluxo de lignina.³³ Por isso, atualmente muito se discute a valorização da lignina, e numerosos estudos mostram o potencial do uso de despolimerização de lignina para produção de produtos químicos com alto valor agregado e a da utilização da biomassa e seus subprodutos em um futuro verde, e como realidade próxima.

1.3 ESTUDOS DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURA FÍSICA DE PAREDE CELULAR

A superação de atuais desafios relacionados com a exploração exaustiva dos combustíveis não renováveis e os impactos ambientais provocados pelas emissões de gases de efeito estufa e nossa capacidade de avançar na direção da bioeconomia estão diretamente ligados com nossa capacidade de resolver gargalos biotecnológicos e bioindustriais de produção econômica de açúcares monoméricos e compostos químicos com valor agregado a partir de biomassa lignocelulósica. Deste modo, torna-se imprescindível o sólido conhecimento tanto da composição química quanto da estrutura física de parede celular de plantas, através do estudo aprofundado e do uso aprimorado de técnicas moleculares, bioquímicas e biofísicas.

A caracterização da biomassa lignocelulósica, realizada de maneira sistemática, nos ajuda a ampliar as perspectivas e a compreensão das alterações composicionais e morfológicas capazes de atuar na melhoria e otimização da hidrólise enzimática na biomassa lignocelulósica. Técnicas químicas e físicas, como determinação de frações de celulose, hemicelulose e lignina, microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura, além da difração de raios X (DRX), análises termogravimétricas (TGA) e ressonância magnética nuclear (RMN), são capazes de fornecer informações relevantes e fundamentais dos substratos envolvidos nos estudos.

A recalcitrância da biomassa lignocelulósica dificulta não só os processos de separação desses componentes, mas até mesmo as análises que visam quantificá-los, exigindo muitas vezes o uso de métodos nos quais a amostra é submetida a minuciosos processos de tratamento capazes de estimar os teores dos componentes lignocelulósicos.³⁴

Atualmente, existem diversos processos de pré-tratamento disponíveis, podendo ser químicos, físicos, biológicos ou de fracionamento por solvente. Soluções ácidas, alcalinas ou oxidativas podem constituir pré-tratamentos químicos. Em pré-tratamentos catalisados por ácidos, por exemplo, a fração de hemiceluloses é hidrolisada, enquanto nos pré-tratamentos alcalinos a fração da lignina é removida e a hemicelulose deve ser despolimerizada no passo seguinte, com o uso de difração de raios X. Já as operações físicas de pré-tratamento baseiam-se na redução do

33 Rinaldi et al. (2016).

34 Foston, Hubbell e Ragauskas (2011), Singh et al. (2014).

tamanho da partícula de biomassa através da moagem, promovendo maior eficácia das enzimas em virtude do aumento da área de contato e, também, devido à redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose.

Os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos para degradar a lignina e as hemiceluloses da biomassa. Estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como peroxidases e lacases, que auxiliam na remoção de uma quantidade considerável dos constituintes peroxidases e lacases e não polissacarídicos da biomassa lignocelulósica. Por último, a categoria de tratamento prévio por fracionamento por solvente se baseia em solubilização e fracionamento dos vários componentes da parede celular vegetal através do rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas. Durante o pré-tratamento de biomassa, que é um passo biotecnológico muito comum na valorização de biomassa lignocelulósica, a quantidade de celulose, hemicelulose e lignina é alterada, e, por isso, é fundamental determinar de maneira eficaz e acurada a porcentagem desses açúcares. Além disso, a análise da eficiência hidrolítica está diretamente relacionada com as frações dos carboidratos acima citados.

Vários métodos são adotados para a quantificação dos teores lignocelulósicos, incluindo métodos químicos, a espectroscopia ótica ou ressonância magnética nuclear de alta resolução em sólidos.³⁵

A hidrólise ácida tem por finalidade a desestruturação e solubilização total ou parcial dos polissacarídeos (celulose e polioses) presentes na biomassa vegetal, obtendo, ainda, o isolamento da lignina. A utilização de H_2SO_4 a 72%, seguido de aquecimento do material à temperatura de 45 °C, é um método bastante utilizado para a determinação do teor de carboidratos em laboratórios e indústrias de celulose e papel, para caracterizar a composição das amostras de biomassa.³⁶

Entre os métodos físicos, a técnica de RMN ^{13}C em estado sólido também pode ser empregada no processo de caracterização de materiais lignocelulósicos e obtenção de informações sobre a sua composição química, por detectar, em nível molecular e atômico, mudanças estruturais nas amostras. O método de excitação utilizado, nomeado como CPMASSTOSS, integra excitação através de polarização cruzada entre os núcleos de ^1H e ^{13}C , com rampa de radiofrequência (CP, do inglês *ramped crosspolarization*), rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês *magic angle spinning*), eliminação das bandas laterais (TOSS, do inglês *total suppression of spinning sidebands*) e desacoplamento heteronuclear no canal ^1H , o que possibilita a obtenção de um espectro de alta resolução de ^{13}C , com uma boa relação sinal-ruído. A atribuição dos deslocamentos químicos costuma ser baseada em dados da literatura e na comparação entre as amostras.³⁷

Outra informação relevante acerca dos biomateriais lignocelulósicos é a cristalinidade da amostra, que é um dos fatores que contribuem para a recalcitrância da biomassa lignoce-

35 Foston, Hubbell e Ragauskas (2011), Dence (1992), Fukushima e Hatfield (2004).

36 Erdtman (1972), Horst et al. (2014), Gouveia et al. (2009), Ibáñez e Bauer (2014).

37 Rezende et al. (2011), Wickholm, Larsson e Iversen (1998).

lulósica. Por isso, geralmente é feita a medida do índice de cristalinidade (IC), que indica a quantidade de celulose que se encontra em estado cristalino.

O IC pode ser aferido através de diferentes técnicas, entre elas, métodos químicos, difração de raios X, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e Raman. É importante ressaltar que diferentes técnicas irão fornecer diferentes ICs para uma mesma amostra.³⁸

No geral, DRX é a técnica mais utilizada para determinar IC, considerada rápida e de baixo custo,³⁹ sendo realizada com a utilização de um difratômetro e baseada na comparação das intensidades de difração da celulose cristalina e no total da fração amorfa que a biomassa contém, incluindo lignina e hemicelulose. Para a obtenção do valor de IC, as medidas são frequentemente processadas e a IC é calculada através da metodologia dos picos proposta por Segal e colaboradores (mais popular e difundida).⁴⁰ Entretanto, recentemente foi demonstrado que este método tende a superestimar grandemente o valor de IC, e por isso o método que envolve a deconvolução, em que os picos cristalinos individuais são extraídos por um processo de ajuste de curva a partir dos perfis de intensidade de difração, é atualmente considerado o mais preciso.⁴¹ Utiliza-se um programa de ajuste de pico (PeakFit: www.systat.com) para assumir funções gaussianas para cada pico e um pico amplo em torno de 21,5° atribuído à contribuição amorfa, conforme descrito por Park et al.⁴² Em geral, medidas de IC usando DRX produzem valores significantemente mais elevados quando comparados com os outros métodos disponíveis.

As análises de RMN podem também ser utilizadas para obter uma estimativa dos conteúdos de celulose cristalina e amorfa após os diferentes tratamentos. Este método geralmente fornece valores inferiores de índice de cristalinidade (IC), quando comparado ao método de difração de raios X (DRX). Isso pode ser relacionado com os métodos de análise de resultados e também com as próprias medidas físicas, uma vez que o método de RMN leva em consideração as interações de curto alcance, enquanto DRX avalia a cristalinidade integral.⁴³

Além da cristalinidade, a porosidade da amostra é conhecida como outro fator importante que afeta a taxa de eficiência enzimática, uma vez que influencia diretamente o acesso da enzima ao substrato.⁴⁴ Uma variedade de técnicas analíticas tem sido usada para estimar a acessibilidade da água na celulose e a área total da superfície disponível em diferentes matrizes lignocelulósicas, entre elas o uso da medida de tempos de relaxação transversal (T2) por RMN. O uso dessa técnica se baseia no fato de que diferentes materiais celulósicos apresentam diferentes tamanhos de poros, que dependem das características físico-químicas dos locais de

38 Segal et al. (1962), Park et al. (2009), Thygesen et al. (2005), Schenzel, Fischer e Brendler (2005).

39 Park et al. (2009), Evans, Newman e Roick (1995).

40 Segal et al. (1962).

41 Bernardinelli et al. (2015).

42 Park et al. (2010).

43 Id. (2009), Bernardinelli et al. (2015).

44 Chandra et al. (2008), Tanaka et al. (1988).

celulose onde as moléculas de água podem ser acomodadas. Ou seja, há uma estreita relação entre o tempo de relaxamento transversal (T2) e a relação superfície-volume dos poros.⁴⁵

Moléculas de água nas diferentes estruturas do substrato mostram distribuições T2 variando de componentes maiores a componentes menores de T2. Componentes T2 maiores (os tempos mais longos) estão associados às moléculas de água com maior mobilidade e, portanto, correspondem aos poros maiores, enquanto que os componentes T2 mais curtos foram associados às moléculas de água com menor mobilidade, geralmente sorvidas na parede celular ao redor dos lúmens.⁴⁶

Para entendimento e compreensão da morfologia e arquitetura molecular da parede celular, técnicas microscópicas são empregadas de modo bem eficiente. Uma delas é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que nos permite a observação de amostras sob magnificação variável, desde aumentos muito pequenos com imagens panorâmicas até grandes aumentos e amplo campo de observação. A obtenção das imagens se dá partir da interação de um feixe de elétrons focalizado sobre a amostra, o qual varre sua superfície ponto a ponto, revelando características relevantes da amostra, como composição elementar, topografia, cristalinidade, potencial elétrico, campo magnético local etc.⁴⁷

Através do uso do MEV, há a capacidade de geração de imagens com alta resolução, alcançando 5 nm nos microscópios de emissão de campo (FESEM), ou seja, resolução muito superior quando comparada com a de microscópios ópticos, que é de 0,5 μm , o que nos possibilita a obtenção de imagens representativas da amostra.⁴⁸ Além disso, as imagens têm aparência tridimensional, o que facilita a interpretação dos dados, resultado da alta profundidade de campo e dos efeitos de contraste produzidos pelos elétrons.

A análise microestrutural se faz importante para a análise de materiais lignocelulósicos, pois é a partir dela que podemos inferir, por exemplo, as correlações e mudanças ocorridas nas amostras que passaram por diferentes pré-tratamentos e/ou após hidrólise enzimática, conseguindo relacionar fator de severidade, eficiência hidrolítica com alterações que são visíveis nas superfícies das fibras analisadas.⁴⁹ A Figura 1.4 ilustra uma imagem de microscopia eletrônica de fibra ampliada de bagaço de cana *in natura*. É possível observar que amostras *in natura* apresentam feixes de fibras não evidentes e aparecem recobertos por uma camada superficial densa, mostrando uma superfície de maneira geral lisa e homogênea.

45 Brownstein e Tarr (1979), Capitani, Di Tullio e Proietti (2012).

46 Tsuchida et al. (2014).

47 Williams (2005).

48 Rezende et al. (2011).

49 Espirito Santo, M. et al. (2018), Espirito Santo, M. C. et al. (2019).

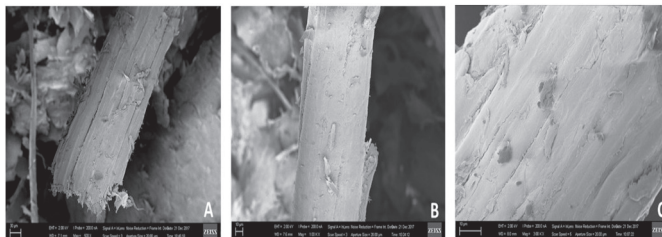


Figura 1.4 Imagens da superfície de amostras de bagaço *in natura* obtidas por FESEM mostrando o aspecto geral da amostra. Os aumentos de 500x, 1000x e 3000x são mostrados nos quadros A, B e C, respectivamente.

A microscopia confocal de varredura por fluorescência (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) e a microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) são metodologias ópticas utilizadas a fim de obter informações acerca da distribuição e organização molecular da lignina na biomassa.⁵⁰

A lignina da biomassa é um cromóforo emissor, e mudanças, aglomeração ou concentração em seu arranjo molecular podem ser facilmente observadas pela técnica de CLSM. Foi proposto que o mecanismo que ocorre é uma transferência não radioativa de energia de cromóforos excitados pela estrutura do álcool cinamyl, naturalmente presente na molécula.⁵¹

Uma vez que a lignina é afetada na estrutura da parede celular por sofrer polimerização devido a fatores como tipo de solvente, temperatura, pH e força iônica, é possível correlacionar as propriedades de sua emissão com a sua disposição na matriz celulósica do bagaço, caracterizando a biomassa através de espectros de fluorescência.⁵²

Já o FLIM nos permite a obtenção de imagens baseando-se na diferença das taxas de decaimento exponencial da fluorescência de uma amostra fluorescente, neste caso, da lignina. A técnica não tem por função quantificar a luz emitida, mas sim o tempo de vida do estado excitado das moléculas fluorescentes.⁵³

As imagens obtidas têm como base a aplicação de múltiplas cores com marcadores fluorescentes para a observação da distribuição celular das moléculas. Cada marcador apresenta um tempo específico de duração para a emissão da fluorescência em seu estado excitado, sendo geralmente representado em imagens FLIM em conceito de cores. A cada pixel da imagem é atribuída uma cor correspondente ao tempo de decaimento da fluorescência. Cada marcador fluorescente apresenta um tempo específico de duração para a emissão de fluorescência no seu estado excitado.⁵⁴

50 Hafrén e Oosterveld-Hut (2009), Chundawat et al. (2011).

51 Albinsson et al. (1999), Coletta et al. (2013).

52 Coletta et al. (2013).

53 Boddeke et al. (1996).

54 Coletta et al. (2013).

1.4 SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

A celulose é um componente essencial tanto das paredes primárias quanto das paredes secundárias das plantas superiores. A rede formada pela associação de celulose e hemiceluloses é considerada a principal responsável pelo controle da expansão das células vegetais, auxiliando no crescimento em extensão das mesmas, enquanto a orientação da deposição das microfibrilas de celulose determina a direção da expansão celular.

As microfibrilas de celulose são sintetizadas através da celulose-sintase, cujo substrato é a UDP-glucose. A análise estrutural da celulose indica que a celulose-sintase é uma enzima altamente ativa, com muitos sítios ativos que coordenadamente catalisam a polimerização do glucano. Essa enzima forma conjuntos que se dispõem em formato de rosetas simétricas com seis complexos enzimáticos globulares, também chamados de complexos terminais (CTs), na região da membrana plasmática da célula vegetal. Dessa forma, quando a UDP-glucose é utilizada como substrato, cada complexo globular da roseta é capaz de externalizar múltiplas cadeias de β -1,4-glucano, que coalescem como microfibrilas no meio externo à membrana plasmática.⁵⁵

Dependendo do organismo, os CTs podem se apresentar de diversas formas. Em plantas terrestres, são encontrados em forma de uma única roseta, enquanto em algumas algas existe uma ou mais estruturas lineares compostas de várias rosetas. Além disso, foi constatado que há uma forte correlação entre a estrutura do CT e as dimensões da microfibrila de celulose. Os CTs de plantas terrestres e algumas algas verdes sintetizam microfibrilas de 3,5-10 nm de espessura, consistindo de 36 a 90 cadeias de β -1,4-glucano.⁵⁶

Devido aos avanços na área da genômica, foi descoberto que, em plantas superiores, a família de genes *CesA* codifica as proteínas CESA, que constituem os complexos de celulose-sintase. Sabe-se que os genes *AtCESA4*, *AtCESA7* e *AtCESA8* são essenciais para a biossíntese de celulose em paredes celulares secundárias. Esses três genes são coexpressos, e as proteínas formadas fazem parte do mesmo complexo. Já a celulose sintetizada pela parede primária depende dos genes *AtCESA1*, *AtCESA3* e *AtCESA6*.⁵⁷

A polimerização dos resíduos de glicose dispostos por ligações β -1,4 é catalisada pela celulose-sintase, que utiliza UDP-glucose como substrato. Esta reação ocorre diretamente por meio da transferência glicosídica por inversão de configuração do carbono anomérico. Ademais, nesse tipo de reação, uma única molécula de celulose-sintase é capaz de iniciar, promover o alongamento e encerrar a síntese de uma cadeia de glucano. Este mecanismo sugere que a celulose-sintase se liga diretamente ao substrato UDP-glucose e é capaz de iniciar a síntese sem

55 Somerville et al. (2004), Somerville (2006).

56 Saxena e Brown Jr. (2005).

57 Ariola et al. (1998), Scheible et al. (2001).

a presença de um *primer*. Além disso, a enzima permanece atracada à extremidade crescente sem a necessidade de se separar e anexar novamente durante o processo de biossíntese.⁵⁸

A biossíntese de celulose pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, ocorre a polimerização, em que as cadeias de glicose se unem por ligações glicosídicas formando as cadeias glucânicas, como descrito acima. Na seguinte, as cadeias recém-sintetizadas de glucano se associam umas às outras, formando uma estrutura cristalina. Entretanto, enquanto a polimerização dos resíduos de glicose requer o complexo celulose-sintase e o substrato UDP-glucose, nenhuma proteína parece estar diretamente envolvida com o processo de cristalização em plantas vasculares. Indiretamente, sabemos que as proteínas responsáveis pela organização dos sítios de síntese da celulose e pelo transporte das cadeias de glucano através da membrana plasmática também estão, provavelmente, envolvidas com o processo de cristalização.

Embora a cristalização ocorra logo após as cadeias de glucano serem expulsa da célula, ela não ocorre instantaneamente. Um modelo propõe que existem duas etapas durante a cristalização. Numa primeira etapa, as cadeias de glucano formam uma estrutura monomolecular; em seguida, várias dessas estruturas se associam através de ligações de hidrogênio, para formar a microfibrila cristalina de celulose. Os eventos de polimerização e cristalização, apesar de serem separados, estão correlacionados de forma que um influencia o outro.

Industrialmente, a celulose pode ser produzida extracelularmente por bactérias não patogênicas, como, por exemplo, a *Acetobacter xylinum*. Além disso, pode ser isolada essencialmente a partir de fontes vegetais, da madeira de diferentes plantas. Na madeira, a celulose está embebida numa matriz de lignina e de outros polissacarídeos (hemiceluloses); para ser isolada, passa por inúmeros processos químicos de separação e purificação.

A biossíntese dos polissacarídeos da parede celular ocorre em diferentes regiões da célula. As hemiceluloses são sintetizadas no complexo de Golgi, portanto os açúcares devem ser transportados para dentro do lúmen da organela para que os polissacarídeos sejam sintetizados. Devido às similaridades entre as cadeias de glucano da celulose e as estruturas principais das hemiceluloses, genes membros da família celulose sintase-like localizados no Golgi estão envolvidos com a síntese desses polissacarídeos.⁵⁹

No interior do complexo de Golgi, as glicosiltransferases (GTs) transferem um resíduo de açúcar para a cadeia do polissacarídeo em construção, formando o complexo polimérico, que, por sua vez, é transportado através de vesículas secretoras do complexo de Golgi para a superfície da parede celular. Os diferentes tipos de GTs envolvidos na biossíntese de hemiceluloses dependem do tipo de açúcar que será utilizado como substrato.

Dito que a celulose e as hemiceluloses constituem os principais componentes da parede celular vegetal e, conseqüentemente, da biomassa vegetal, diversas enzimas capazes de superar a recalcitrância desse material são necessárias para a sua degradação. As celulasas, que fazem

58 Somerville (2006).

59 Pauly e Keegstra (2008).

parte do grupo das hidrolases de glicosídeos (GHs), são as enzimas responsáveis pela degradação de celulose, enquanto as hemicelulases são encarregadas da despolimerização das hemiceluloses.

As celulasas atuam sinergicamente para hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 da celulose, estando subdivididas em três grupos: as endoglucanases, também conhecidas como endo β -1,4-glucanases, que atuam de forma aleatória sobre a fibra de celulose, clivando as ligações β -1,4 intramoleculares e liberando oligossacarídeos; as exoglucanases, ou exo-1,4- β -glucanases, cuja função é hidrolisar as ligações glicosídicas das extremidades da cadeia principal da celulose liberando celobiose; e, por fim, as celobiasas (β -glicosidases), enzimas capazes de hidrolisar a celobiose e os oligossacarídeos maiores em moléculas de glicose.⁶⁰

As endoglucanases são as enzimas do complexo celulásico capazes de iniciar a hidrólise. Além disso, sua ação ao longo da cadeia de celulose, reduzindo o grau de polimerização, é responsável pela rápida solubilização do polissacarídeo por meio de sua fragmentação em oligossacarídeos, fazendo com que estas enzimas sejam extremamente importantes no processo de hidrólise da biomassa.

O grupo das exoglucanases é constituído por fungos, principalmente pelas enzimas celobio-hidrolases (CBH), que atuam progressivamente nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose gerada pela ação das endoglucanases, liberando, majoritariamente, celobiose. Contudo, ordinariamente, as CBHs sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose).

Já as celobiasas hidrolisam as moléculas de celobiose e oligossacarídeos liberados pela ação das CBHs em moléculas de glicose. Dessa forma, considerando que as celobiasas degradam o produto que inibe as CBHs, há uma diminuição desse efeito de inibição, garantindo um processo de degradação eficiente. Portanto, as β -glicosidases são enzimas essenciais na hidrólise da biomassa vegetal, podendo ser consideradas limitantes para o processo.

O maior desafio enfrentado pelas enzimas do complexo celulolítico é o acesso limitado ao substrato correspondente, uma vez que este se encontra no interior das microfibrilas de celulose, que estão altamente ordenadas e empacotadas. Dessa maneira, há a participação de enzimas acessórias não hidrolíticas, que auxiliam no afrouxamento das regiões inacessíveis, aumentando assim a área de contato entre a superfície da celulose e o complexo celulolítico. As proteínas que constituem estas enzimas acessórias são: expansinas, swolleninas, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e os CBMs (domínio de ligação a carboidrato).

As expansinas são enzimas capazes de desassociar a rede de polissacarídeos da parede celular, permitindo a extensão da célula. Isso ocorre devido ao deslocamento do local de adesão entre as microfibrilas de celulose e os demais polissacarídeos da parede, permitindo um relaxamento que aumenta a distância entre as microfibrilas. Embora estas enzimas não apresentem atividade hidrolítica, foi reportado que elas aumentam a taxa de hidrólise enzimática da celulose cristalina por celulasas.

60 Payne et al. (2015), Reese, Siu e Levinson (1950), Serpa e Polikarpov (2011).

As swoleninas, por sua vez, promovem um dano parcial na fibra de celulose, fazendo com que ocorra perda da estrutura. Assim como as expansinas, ao tornar as fibras de celulose mais acessíveis para atuação de celulases, também aumentam a taxa de conversão da celulose.

Outro grupo de enzimas acessórias recentemente descrito são as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), que são biocatalisadores capazes de quebrar ligações glicosídicas utilizando um mecanismo oxidativo, na presença de átomos de oxigênio e um doador de elétrons extracelular. Este mecanismo torna a biomassa mais suscetível à quebra, impulsionando a hidrólise realizada pelas enzimas do complexo celulolítico.

Por fim, o domínio de ligação a carboidrato (CBM) é um pequeno módulo, formado pela sequência contínua de 30-200 aminoácidos, frequentemente presente em enzimas que hidrolisam polissacarídeos como celulose, β -glucanos, xilano e outros açúcares. Os CBMs têm capacidade de direcionar a proteína à qual são ligados covalentemente para substrato específico, aumentando assim a afinidade de celulases por celulose, por exemplo.

A diversidade e a complexidade das hemiceluloses requerem uma diversidade correspondente de enzimas que atuam na sua degradação. As hemicelulases atuam na despolimerização da hemicelulose e também recebem ajuda das enzimas acessórias, cuja função é remover as ramificações laterais para tornar a cadeia principal de xilano suscetível à ação sinérgica das hemicelulases. Para tanto, enzimas como α -L-arabinofuranosidases são utilizadas para remover arabinose, as β -glucuronidasas removem as unidades de ácido glucurônico, as β -feruloil esterases hidrolisam as ligações entre a arabinose e o ácido ferúlico e as acetil xilana esterases hidrolisam a ligação do grupo acetil com a cadeia principal. Com a liberação das ramificações laterais, as endo-1,4- β -xilanases hidrolisam as ligações β -1,4 do xilano, liberando oligossacarídeos de xilose, que, por sua vez, são hidrolisados pela ação da 1,4- β -xilosidasas.

A presença de hemicelulases no complexo celulolítico é fundamental para desestruturar o entrelaçamento entre hemicelulose e celulose presente na parede celular vegetal, uma vez que esse grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e a superfície das microfibrilas de celulose, dificultando a ação das celulases durante o processo de hidrólise. Desta maneira, as hemicelulases também são essenciais para aumentar a eficiência das celulases na hidrólise enzimática da biomassa vegetal.

Muitos microrganismos desempenham um papel importante na conversão da biomassa vegetal, produzindo verdadeiros coquetéis enzimáticos que constituem o complexo celulolítico discutido acima. As celobio-hidrolases são majoritariamente expressas pela maioria dos fungos produtores de celulases, sendo, portanto, consideradas as enzimas-chaves no processo de hidrólise enzimática e muito importantes para as indústrias que atuam na conversão de celulose.

A conversão da celulose em glicose catalisada pelas celulases possui eficiência relativamente baixa, sobretudo, devido à estrutura cristalina da celulose, que dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos, mas também devido à presença de lignina na biomassa lignocelulósica, pois esta restringe a hidrólise, escondendo a superfície celulósica e impedindo o intumescimento das fibras. Por essa razão, torna-se imprescindível uma etapa de pré-tratamento da biomassa,

a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose e remover a lignina para, dessa forma, expor as moléculas de celulose e hemicelulose ao ataque enzimático.

Nossa atual compreensão de síntese e degradação enzimática de carboidratos complexos no contexto de parede celular está no mínimo incompleta. Nas últimas duas décadas, o número de sequências de genes/proteínas recolhidas a partir de projetos de sequenciamento de genomas individuais e DNA ambiental cresceu exponencialmente. Porém, apenas uma fração minúscula dessas proteínas previstas foi caracterizada experimentalmente, e a função da maioria das proteínas permanece hipotética ou apenas prevista com base na similaridade da sequência.⁶¹

Como em todas as classes de proteínas, o número crescente de enzimas ativas contra carboidratos (CAZymes) não foi acompanhado por uma atribuição sistemática e precisa da função, e o número de enzimas bioquimicamente caracterizadas está crescendo muito lentamente.⁶²

Um dos fatores limitantes quando se trabalha com um grande número de alvos reside na triagem, expressão e testes de solubilidade. Neste sentido, plataformas de alto desempenho (*high throughput*) vêm sendo empregadas para a clonagem, transformação e testes de expressão em larga escala, possibilitando estudos estruturais e funcionais para uma gama de enzimas relacionadas à degradação da parede celular vegetal.⁶³ Esta ferramenta se mostra extremamente eficaz para a produção de hidrolases glicosídicas recombinantes para posterior caracterização estrutural e bioquímica.

Grande parte dos alvos expressos em plataformas de alto desempenho é otimizada para expressão em *Escherichia coli*. No entanto, algumas enzimas fúngicas são difíceis de ser produzidas na sua forma solúvel em *E. coli*, pois necessitam glicosilação e/ou possuem várias pontes dissulfeto. Para superar este obstáculo, diferentes sistemas de expressão são requeridos, utilizando, por exemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Pichia pastoris*.⁶⁴

Aumentar o *know-how* sobre as enzimas que degradam a parede celular é fundamental para que os estudos sejam, além de concomitantes, complementares. Por isso, é imprescindível a busca pela compreensão integral da interação entre os constituintes da parede celular vegetal e as enzimas que os degradam, bem como a ampliação da gama de ferramentas biotecnológicas que tornam o processo mais eficiente, a fim de viabilizar a utilização da biomassa lignocelulósica como fonte de energia renovável.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(12) 301, 2014.

61 Helbert et al. (2019).

62 Lombard et al. (2014).

63 Camilo e Polikarpov (2014).

64 Segato et al. (2014), Miotto et al. (2014), Pellegrini et al. (2015), Shumiao et al. (2010), Ahmad et al. (2014).

- ALBINSSON, B.; LI, S.; LUNDQUIST, K.; STOMBERG, R. *J. Mol. Struct.*, 508(1), 19, 1999.
- ARIOLA, T.; PENG, L.; BETZNER, A. S.; BURN, J.; WITTKE, W.; HERTH, W.; CAMILLERI, C.; HÖFTE, H.; PLAZINSKI, J.; BIRCH, R.; CORK, A.; GLOVER, J.; REDMOND, J.; WILLIAMSON, R. E. *Science*, 279(5351), 717, 1998.
- ASPINALL, G. O.; BEGBIE, R.; MCKAY, J. E. *J. Chem. Soc.*, 214, 1962.
- BERNARDINELLI, O. D.; LIMA, M. A.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I.; AZEVEDO, E. R. *Biotechnol. Biofuels*, 8(1), 110, 2015.
- BODDEKE, F. R.; SCHENKEVELD, V. M. E.; VANGEEST, L. K.; YOUNG, I. T. *Proc. 13th Int. Conf. Patt. Recogn.*, 3, 854, 1996.
- BROWNSTEIN, K. R.; TARR, C. E. *Phys. Rev.*, 19(6), 2446, 1979.
- BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. Parede celular. In: KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. *Protein Expr. Purif.*, 99, 35, 2014.
- CAO, L.; YU, I. K. M.; LIU, Y.; RUAN, X.; TSANG, D. C. W.; HUNT, A. J.; OK, Y. S.; SONG, H.; ZHANG, S. *Bioresour. Technol.*, 269, 465, 2018.
- CAPITANI, D.; DI TULLIO, V.; PROIETTI, N. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 64, 29, 2012.
- CHAFFEY, N. *Ann. Bot.*, 113(6), 7, 2014.
- CHANDRA, R.; EWANICK, S.; HSIEH, C.; SADDLER, J. *Biotechnol. Prog.*, 24(5), 1178, 2008.
- CHUNDAWAT, S. P. S.; DONOHUE, B.; SOUSA, L.; ELDER, T.; AGARWAL, U.; LU, F.; RALPH, J.; HIMMEL, M. V. B.; DALE, B. *Energy Environ. Sci.*, 4(3), 585, 2011.
- COLETTA, V. C.; REZENDE, C. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; POLIKARPOV, I.; GUIMARÃES, F. E. G. *Biotechnol. Biofuels*, 6(1), 43, 2013.
- COSGROVE, D. J. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.*, 6(11), 850, 2005.
- DENCE, C. W. The determination of lignin. In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. *Methods in lignin chemistry*. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1992.
- DUFRESNE, A. *Comp. Inter.*, 10(4-5), 369, 2003.
- ERDTMAN, H. J. *Polym. Sci. Pt B: Polym. Lett.*, 10(3), 228, 1972.
- ESPIRITO SANTO, M.; REZENDE, C. A.; BERNARDINELLI, O. D.; PEREIRA, N.; CURVELO, A. A. S.; AZEVEDO, E. R.; GUIMARÃES, F. E. G.; POLIKARPOV, I. *Ind. Crops Prod.*, 113, 64, 2018.
- ESPIRITO SANTO, M. C.; CARDOSO, E. B.; GUIMARÃES, F. E. G.; AZEVEDO, E. R.; CUNHA, G. P.; NOVOTNY, E. H.; PELLEGRINI, V. O. A.; CHANDEL, A. K.; SILVEIRA, M. H. L.; POLIKARPOV, I. *Ind. Crops Prod.*, 139, 111542, 2019.

- EVANS, R.; NEWMAN, R. H.; ROICK, U. C. *Holzforschung*, 49(6), 498, 1995.
- FARRO, E. G. S.; LEITE, A. E. T.; SILVA, I. A.; FILGUEIRAS, J. G.; AZEVEDO, E. R.; POLIKARPOV, I. *Int. J. Biomol. Macromol.*, 117, 7, 2018.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A. R. *RNA*, 5(7), 847, 1999.
- FINCHER, G. B. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12(2), 140, 2009a.
- _____. *Curr. Plant Physl.*, 149(1), 27, 2009b.
- FOSTON, M. B.; HUBBELL, C. A.; RAGAUSKAS, A. J. *Materials*, 4(11), 1985, 2011.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. J. *Agric. Food Chem.*, 52(12), 3713, 2004.
- GILBERT, H. J.; KNOX, J. P.; BORASTON, A. B. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 23(5), 669, 2013.
- GODOY, A. S.; PEREIRA, C. S.; RAMIA, M. P.; SILVEIRA, R. L.; CAMILO, C. M.; KADOWAKI, M. A.; LANGE, L.; BUSK, P. K.; NASCIMENTO, A. S.; SKAF, M. S.; POLIKARPOV, I. *Sci. Rep.*, 8(1), 3678, 2018.
- GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. *New Phytol.*, 178(3), 473, 2008.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; MAIOR, A. M. S.; ROCHA, G. J. M. *Quím. Nova*, 32, 2009.
- HAFRÉN, J.; OOSTERVELD-HUT, H. M. J. *J. Wood Sci.*, 55(3), 236, 2009.
- HARRIS, P. J.; FINCHER, G. B. Distribution, fine structure and function of (1,3;1,4)- β -glucans in the grasses and other taxa. In: BACIC, A.; FINCHER, G. B.; STONE, B. A. *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*. San Diego: Academic Press, 2009.
- HELBERT, W.; POULET, L.; DROUILLARD, S.; MATHIEU, S.; LOIODICE, M.; COUTURIER, M.; LOMBARD, V.; TERRAPON, N.; TURCHETTO, J.; VINCENTELLI, R.; HENRISSAT, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116(13), 6063, 2019.
- HORST, D. J.; BEHAINNE, J. J. R.; ANDRADE JÚNIOR, P. P.; KOVALESKI, J. L. *Energy Sustain. Dev.*, 23, 78, 2014.
- IBÁÑEZ, A. B.; BAUER, S. *Biomass Bioener.*, 68, 75, 2014.
- INDUBAI, G. V.; MAHANWAR, P.; GADEKAR, P. T. *Opin. J. Poly. Chem.*, 8, 1, 2018.
- ISHURD, O.; KERMAGI, A.; ELGHAZOUN, M.; KENNEDY, J. F. *Carbohydr. Polym.*, 65(4), 410, 2006.
- KADOWAKI, M. A. S.; HIGASI, P.; GODOY, M. O.; PRADE, R. A.; POLIKARPOV, I. *FEBS J.*, 285(3), 559, 2018.
- LAMPUGNANI, E. R.; KHAN, G. A.; SOMSSICH, M.; PERSSON, S. J. *Cell Sci.*, 131(2), 2018.
- LI, J.; LIN, J.; XIAO, W.; GONG, Y.; WANG, M.; ZHOU, P.; LIU, Z. *Bioresour. Technol.*, 130, 8, 2013.
- LIEPMAN, A. H.; NAIRN, C. J.; WILLATS, W. G. T.; SORENSSEN, I.; ROBERTS, A. W.; KEEGSTRA, K. *Plant Physl.*, 143(4), 1881, 2007.
- LOMBARD, V.; RAMULU, H. G.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. *Nucleic Acids Res.*, 42, 490, 2014.

- MAHMOOD, N.; YUAN, Z.; SCHMIDT, J.; XU, C. *Ren. Sustain. Energy Rev.*, 60, 317, 2016.
- MIOTTO, L. S.; REZENDE, C. A.; BERNARDS, A.; SERPA, V. I.; TSANG, A.; POLIKARPOV, I. *PLoS ONE*, 9(9), e108393, 2014.
- MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. *Chem. Soc. Rev.*, 40(7), 3941, 2011.
- MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79(2), 165, 2008.
- NORTHCOTE, D. H. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 23(1), 113, 1972.
- PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. *Biotechnol. Biofuels*, 3(1), 10, 2010.
- PARK, S.; JOHNSON, D. K.; ISHIZAWA, C. I.; PARILLA, P. A.; DAVIS, M. F. *Cellulose*, 16(4), 641, 2009.
- PAULY, M.; KEEGSTRA, K. *Plant J.*, 54(4), 559, 2008.
- PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREEN, M.; STÅHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. *Chem. Rev.*, 115(3), 1308, 2015.
- PELLEGRINI, V. O.; SERPA, V. I.; GODOY, A. S.; CAMILO, C. M.; BERNARDES, A.; REZENDE, C. A.; JUNIOR, N. P.; FRANCO CAIRO, J. P.; SQUINA, F. M.; POLIKARPOV, I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(22), 9591, 2015.
- POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATTM, R. C.; CRAIEVICH, A. J. *Synchrotron Radiat.*, 5, 72, 1998.
- PULS, J. *Macr. Symp.*, 120(1), 183, 1997.
- REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. J. *Bacteriol.*, 59(4), 485, 1950.
- RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26, 100, 2014.
- REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. *Biotechnol. Biofuels*, 4, 2011.
- RINALDI, R.; JASTRZEBSKI, R.; CLOUGH, M. T.; RALPH, J.; KENNEMA, M.; BRUIJNINCX, P. C. A.; WECKHUYSEN, B. M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55(29), 8164, 2016.
- SAXENA, I. M.; BROWN JR., R. M. *Ann. Bot.*, 96(1), 9, 2005.
- SCHEIBLE, W. R.; ESHED, R.; RICHMOND, T.; DELMER, D.; SOMERVILLE, C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(18), 10079, 2001.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61(1), 263, 2010.
- SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. *Cellulose*, 12(3), 223, 2005.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. *Text. Res. J.*, 29(10), 786, 1962.
- SEGATO, F.; BERTO, G. L.; ARES DE ARAÚJO, E.; MUNIZ, J. R.; POLIKARPOV, I. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.*, 70, 267, 2014.

- SERPA, V. I.; POLIKARPOV, I. Enzymes in bioenergy. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (ed.). *Routes to cellulosic ethanol*. Nova York: Springer-Verlag, 2011.
- SHUMIAO, Z.; HUANG, J.; ZHANG, C.; DENG, L.; HU, N.; LIANG, Y. J. *Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 467, 2010.
- SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 32, 713, 2014.
- SOMERVILLE, C. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22(1), 53, 2006.
- SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T. *Science*, 306(5705), 2206, 2004.
- SONODA, M. T.; GODOY, A. S.; PELLEGRINI, V. O. A.; KADOWAKI, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 1863(6), 1015, 2019.
- TANAKA, M.; IKESAKA, M.; MATSUNO, R.; CONVERSE, A. O. *Biotechnol. Bioenerg.*, 32(5), 698, 1988.
- THYGESEN, A.; ODDERSHEDE, J.; LILHOLT, H.; THOMSEN, A. B.; STÅHL, K. *Cellulose*, 12(6), 563, 2005.
- TIMELL, T. E. *Carb. Chem.*, 19, 247, 1964.
- TSUCHIDA, J. E.; REZENDE, C. A.; OLIVEIRA-SILVA, R.; LIMA, M. A.; D'EURYDICE, M. N.; POLIKARPOV, I.; BONAGAMBA, T. J. *Biotechnol. Biofuels*, 7(1), 1, 2014.
- UZMAN, A. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 31(4), 212, 2003.
- WICKHOLM, K.; LARSSON, P. T.; IVERSEN, T. *Carbohydr. Res.*, 312, 1998.
- WILLIAMS, T. J. *Scanning*, 27(4), 215, 2005.
- XU, C.; WILLFÖR, S.; HOLMLUND, P.; HOLMBOM, B. *Carbohydr. Polym.*, 75(3), 498, 2009.
- ZAKZESKI, J.; BRUIJNINCX, P. C. A.; JONGERIUS, A. L.; WECKHUYSEN, B. M. *Chem. Rev.*, 110(6), 3552, 2010.