



MICRORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS E SUA RELAÇÃO COM O AUMENTO NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Graziela Barbosa Paludo¹

¹Mestranda em Agroenergia pela Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas, Tocantins, Brasil. e-mail: grazi.paludo@mail.uft.edu.br

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

A preocupação com a disponibilidade de combustíveis fósseis vem se acentuando, em toda parte surgem questões sobre a oferta de energia no futuro. A demanda por matérias-primas alternativas para combustíveis e produtos químicos tem crescido, impulsionado pelo alto preço do petróleo e esforços para reduzir as emissões líquidas de dióxido de carbono e outros gases de efeito estufa. Os biocombustíveis constituem recursos com baixa toxicidade, biodegradáveis e renováveis, e estão associados a vantagens ambientais uma vez que permitem a redução das emissões de gases nocivos ao planeta e no panorama atual, representam uma alternativa energética cada vez mais explorada. Atualmente, a biomassa é vista como a principal fonte para atender a demanda mundial de energia primária. Nesta perspectiva, a aposta no uso de microrganismos para melhorar a produção de biocombustíveis apresenta-se como uma realidade cada vez mais significativa e em franco desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVES: Biomassa. Energia, Genética

GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISMS AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE INCREASE IN PRODUCTION OF BIOFUELS

ABSTRACT

Concern about the availability of fossil fuels has been increasing everywhere questions arise about the energy supply in the future. The demand for alternative raw materials for fuels and chemicals has grown, driven by high oil prices and efforts to reduce net emissions of carbon dioxide and other greenhouse gases. Biofuels are resources with low toxicity, biodegradable and renewable, and are associated with environmental advantages since they allow the reduction of emissions of noxious gases and in the current scenario, representing an alternative energy increasingly exploited. Currently, biomass is seen as a major source to meet the global demand for primary energy. In this perspective, the focus on the use of microorganisms to improve biofuel production presents itself as an increasingly more significant and rapidly developing.

KEYWORDS: Biomass. Genetics. Energy.

INTRODUÇÃO

As crescentes preocupações sobre a redução da disponibilidade dos combustíveis fósseis, juntamente com os problemas ambientais resultantes da sua exploração, produção e utilização, têm estimulado a investigação científica de forma a desenvolver e melhorar a produção de biocombustíveis a partir de recursos

renováveis. Os problemas ambientais relacionados com a emissão de gases decorrente do uso de combustíveis fósseis têm impulsionado pesquisas no sentido de desenvolvimento de combustíveis alternativos (COLLA et al., 2012).

As mudanças climáticas e a elevação das cotações do petróleo aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia têm motivado uma corrida sem precedentes à produção de combustíveis alternativos, preferencialmente de fontes renováveis de energia, como a biomassa (BUCKERIDEG et al., 2010). Existem diferentes rotas para converter a energia da biomassa em fluxo de energia final desejado, quer seja na forma de calor, combustível ou energia elétrica (SEABRA, 2008). Assim, abrem-se oportunidades para o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias-primas renováveis. Além dos biocombustíveis já conhecidos, um fluxo de inovações em desenvolvimento pode estar lançando as bases de uma indústria integrada de exploração da biomassa (COUTINHO & BONTEMPO, 2010).

A civilização da biomassa permite produzir não só alimentos para o homem, mas também forragem para os animais, materiais de construção, adubos verdes, biocombustíveis, matérias-primas industriais (fibras, plásticos etc.), fármacos e cosméticos. Há um espectro amplo de produtos derivados da biomassa e potencializados pelo uso de biotecnologias nas duas pontas do progresso: para aumentar a produtividade da biomassa e para ampliar o espectro dos produtos dela derivado (IGNACY SACHS, 2005).

Ainda que atualmente os únicos biocombustíveis produzidos em grande escala sejam o etanol e o biodiesel, diferentes classes de moléculas possuem propriedades desejáveis para este fim e algumas são passíveis de produção por via microbiana. Outras, embora não sejam normalmente sintetizadas por microrganismos podem vir a sê-lo através do uso de ferramentas biotecnológicas. A produção de biodiesel tem sido citada como uma das possíveis aplicações das lipases (ANTCZAK et al., 2009).

Os microrganismos convertem biomassa em produtos químicos que podem ser utilizados como biocombustíveis, esta produção de combustível não é, no entanto, recente, pois a fermentação e a destilação de álcool são feitas há muito tempo pelo homem. A modificação genética de bactérias e outros microrganismos consistem na manipulação de genes, isto é, no isolamento, manipulação e introdução de DNA, com o intuito de exprimir outro (s) gene (s). O objetivo principal é, pois a introdução de novas características que levem a um aumento de produtividade. São conhecidos vários casos de manipulação genética de microrganismos (bactérias e cianobactérias) na produção de biocombustíveis. (ANTUNES et al., 2011).

Este artigo tem o objetivo de apresentar uma revisão relacionada às últimas pesquisas que tratam de inovação de microrganismos geneticamente modificados para produção de biocombustíveis. Este se justifica pela crescente preocupação com a redução da disponibilidade dos combustíveis fósseis, somado aos problemas ambientais ocasionados pela sua utilização, o que deve estimular a investigação científica de forma a desenvolver e melhorar a síntese de biocombustíveis a partir de recursos renováveis.

A metodologia utilizada para realização deste trabalho foi baseada em pesquisa bibliográfica, para isso foram consultados diversos periódicos e artigos científicos que tratam da questão de inovação na transformação da biomassa por microrganismos em fontes renováveis de energia, levantando assim informações pertinentes ao objetivo proposto. A abordagem da pesquisa realizada foi do tipo

exploratório, descritivo e explicativo, visando exteriorizar a relevância dos estudos no que se refere aos desafios e perspectivas da produção de biocombustíveis a partir de microrganismo geneticamente modificados.

BIOCOMBUSTÍVEIS OBTIDOS A PARTIR DE MICRORGANISMOS

Inúmeros tipos de biomassa podem ser identificados como fontes alternativas para a produção de energias limpas. Essa biomassa pode ser derivada de biorresíduos, como por exemplo, sobras de alimentos, resíduos municipais e agrícolas; podem também ser provenientes de culturas energéticas comestíveis e não comestíveis; de plantas aquáticas consideradas fontes de bio-óleo, entre outros (SOUZA, et al. Citado por SINGH & GU, 2010).

Os microrganismos transformam biomassa em produtos químicos que podem ser utilizados como biocombustíveis nos transportes. (COLLA et al., 2012). O metano é produzido por digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. O seu uso como combustível é limitado, sendo usado na produção combinada de calor e eletricidade. O etanol é produzido por processo fermentativo, sendo aplicado como combustível (ANTUNES et al., 2011).

Entretanto, vem surgindo uma nova tecnologia, o desenvolvimento de novos processos ou biotecnologia para a produção de hidrogênio e óleo de algas. O bio-hidrogênio é usado em células de combustível de hidrogênio para gerar eletricidade. A produção corrente está limitada pelo custo dos reatores necessários para a síntese fotoquímica, e também pela baixa produtividade da fermentação anaeróbia (COSTA, 2012). Os óleos provenientes de microalgas são considerados uma tecnologia nova. Cerca de 40% da massa de algumas microalgas é óleo que pode ser extraído e usado com biodiesel (CHISTI, 2007).

A seguinte descrição de diferentes formas de se obter biocombustíveis é direcionada para metodologias que envolvem fermentação por microrganismos, nomeadamente bactérias e leveduras. De acordo com ANTONI et al. (2007), qualquer processo de fermentação microbiana requer uma fonte de energia para "alimentar" os microrganismos, que é obtida a partir de biomassa na forma de açúcares.

O Hidrogênio, o metano e o etanol são três exemplos de produtos que podem ser obtidos, como biocombustíveis, a partir da fermentação realizada por microrganismos, os mesmos serão mencionados ao longo do texto. Mas além desses descritos, salienta-se ainda o papel do n-butanol, do metanol e biodiesel (éster monoalquil de ácidos graxos obtido de óleos vegetais) na produção de energias limpas (ANTUNES et al., 2011).

HIDROGÊNIO

O hidrogênio é o elemento mais abundante do universo. De maneira geral não é encontrado na natureza em sua forma molecular, por isso necessita de métodos específicos de produção (SANTOS, 2009). O hidrogênio ganhou atenção devido ao seu potencial como uma alternativa sustentável para os métodos convencionais de produção de H₂, sendo que em seu processo não tem como produto CO₂, um dos gases do efeito estufa (DAS, 2008). Ainda o hidrogênio como combustível tem o potencial de reduzir a dependência de combustíveis fósseis, podendo ser queimado em motores à combustão ou usado em células a combustível para produzir eletricidade diretamente e o único subproduto da "queima" do hidrogênio é a água (ROSSI, 2012).

As formas tradicionais de produção de hidrogênio apresentam balanço energético desfavorável uma vez que para a geração de hidrogênio via eletrólise é consumido de 4,5 a 5 kw/h/m³ (COSTA, 2012). O hidrogênio pode ser biologicamente produzido a partir de microrganismos como algas ou cianobactérias através de fotólise da água, bactérias fotossintéticas, através de fermentação na ausência de luz, organismos anaeróbios bactérias acidogênicas ou a partir de substratos orgânicos. Este processo tem também a vantagem de reduzir a massa de resíduos orgânicos. Altos rendimentos de hidrogênio podem ser conseguidos usando bactérias termófilas, como por exemplo, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ou *Thermotoga elfii*. (FURINGO et al, 2009)

Nas fermentações anaeróbias é comum à presença de hidrogênio, esse subproduto poderá ser interessante na fermentação industrial em larga-escala. Entretanto, a produção de bio-hidrogênio por microrganismos ainda não está desenvolvida numa tecnologia que seja economicamente sustentável, o que corresponde a um atraso na expectativa depositada neste gás. A produção biológica a partir de biomassa renovável, que o tornaria uma fonte de energia primária sustentável, ainda necessita de mais pesquisa e desenvolvimento (NASCIMBENI, 2013).

A produção de bio-hidrogênio pode ser encarada como uma boa alternativa para fornecer uma fonte de energia econômica, não poluente e com uma boa relação custo benefício, porém ainda não foi desenvolvida a tecnologia que a torne viável (INPI, 2011).

METANO (BIOGÁS)

O biogás é uma mistura gasosa produzida a partir da decomposição anaeróbica de materiais orgânicos, composta primariamente de metano e dióxido de carbono, com pequenas quantidades de ácido sulfídrico e amônia. Traços de hidrogênio, nitrogênio, monóxido de carbono, carboidratos saturados ou halogenados e oxigênio estão ocasionalmente presentes no biogás. Geralmente, a mistura gasosa é saturada com vapor de água e pode conter material particulado e compostos orgânicos com silício (siloxanas). A composição e o conteúdo energético do biogás podem variar de acordo com o material orgânico e o processo através do qual o mesmo é produzido (ZANETTE, 2009).

As fábricas de biogás produzem gás metano de uma forma sustentada, juntamente com dióxido de carbono, a partir de biomassa. A vantagem do processo de biogás é a possibilidade de utilizar os constituintes polissacarídeos da biomassa para a produção de energia (por exemplo, energia elétrica e calor) em complexos industriais relativamente pequenos.

Alternativamente, o gás pode ser comprimido depois da purificação e enriquecido, sendo depois usado como combustível na combustão de motores ou carros. A grande vantagem dessa tecnologia é ser “amiga do ambiente”, que inclui o potencial para uma completa reciclagem de minerais, nutrientes e material fibroso. A biomassa que poder usada como substrato é muito diversificada, variando entre estrume, restos animais e vegetais e resíduos domésticos.

O biogás pode ser usado para a geração de energias elétrica, térmica e mecânica. A principal intenção no uso do biogás é substituir os gases de origem mineral como o GLP (Gás Liquefeito de Petróleo), usado como gás de cozinha, GN (Gás Natural) usado em equipamentos domésticos e GNV (Gás Natural Veicular). O biogás pode ser empregado nos mais variados tipos de produtos, como em fogões

domésticos, lâmpadas, motores de combustão interna (automóveis), geladeiras, chocadeiras, secadores de grãos ou secadores diversos e aquecimento e balanço calorífico (ROYA et al. 2011).

ETANOL

Etanol é um biocombustível líquido derivado de biomassa renovável, que tem como principal componente o álcool etílico, que pode ser utilizado, diretamente ou mediante alterações, em motores a combustão interna com ignição por centelha, em outras formas de geração de energia ou em indústria petroquímica, podendo ser obtido por rotas tecnológicas distintas, conforme especificado em regulamento (BRASIL, 2011).

O etanol ou álcool etílico é uma substância com fórmula molecular C_2H_6O . Este apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados de petróleo, sendo a principal delas o elevado teor de oxigênio, que constitui cerca de 35% em massa do etanol. As características do etanol possibilitam a combustão mais limpa e o melhor desempenho dos motores, o que contribui para reduzir as emissões poluidoras, mesmo quando misturado à gasolina. Nesses casos, comporta-se como um verdadeiro aditivo para o combustível normal, melhorando suas propriedades (BNDES, 2008). Ainda de acordo com a mesma fonte, o bioetanol vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis.

As tecnologias para a obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do bioetanol. Para executar essa tarefa, a hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina.

A fermentação de bioetanol é o processo microbiano realizado em maior escala. A produção industrial de etanol usa como regra geral, melaço de cana-de-açúcar ou amido hidrolisado enzimaticamente (proveniente do milho) e fermentação descontínua com *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol. Esse processo tem como subprodutos CO_2 e pequenas quantidades de metanol e glicerol, e o etanol resultante é para uso direto como combustível (isto é, não necessita de qualquer tratamento adicional). A fermentação de açúcares, presentes em biomassa celulósica, é um processo realizado pela maioria das bactérias, sendo *Zymomonas mobilis* uma das espécies que possibilita maior rendimento na produção de etanol por fermentação. A fermentação biológica de etanol a partir de melaço é uma tecnologia já considerada madura, enquanto que a utilização de substratos não alimentares, como os resíduos celulósicos, é um processo em desenvolvimento.

A maior produção de etanol que se produz na atualidade é o de primeira geração, obtido a partir da fermentação do caldo da cana. No entanto, as pesquisas atuais não estão voltadas mais para a sacarose da cana, mas para a celulose, presente no bagaço e na palha da cana. O processo de produção do etanol a partir da celulose consiste na quebra da celulose, o açúcar que compõe a parede celular das plantas. Em tese, qualquer planta poderia ser usada para produzir etanol combustível, de galhos caídos à grama, passando por algas e palha seca (BELLINGHINI, 2010).

CIANOBACTÉRIAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A produção de biodiesel a partir de algas tem sido proposta como uma das formas mais eficientes de produzir biocombustíveis, porque muitas algas possuem uma alta produtividade lipídica que facilmente pode ser convertida em energia e que quando comparada com a produção de etanol celulósico é mais viável em termos de quantidade produzida. Muitas cianobactérias e algas têm ainda a capacidade de produzir hidrogênio, o que pode ser considerado uma forma indireta de reciclar o CO₂. A produtividade média de biodiesel de microalgas em um sistema de produção com bom desempenho é de 1×10^5 litros por hectare ano (CHISTI, 2008).

Investigadores da Universidade da Califórnia modificaram geneticamente uma cianobactéria para que essa possa consumir dióxido de carbono através da fotossíntese e libere como produto o isobutanol, esse tem sido visto como uma promissora alternativa na substituição da gasolina, em vista de seu potencial. Este processo tem duas vantagens frente à meta global de alcançar uma economia sustentável, que utilize energia limpa. Em primeiro lugar, é uma forma de reciclar dióxido de carbono, reduzindo assim as emissões de gases de efeito de estufa. Em segundo lugar, é usar a energia solar para converter o dióxido de carbono em um combustível líquido para abastecer automóveis, podendo para isso utilizar a infraestrutura já existente para estocagem e distribuição do produto (ATSUMI et al. 2009).

Usando a cianobactéria *Synechococcus elongatus*, estes investigadores aumentaram, geneticamente, a quantidade da enzima responsável por fixar o dióxido de carbono. Seria particularmente interessante instalar uma fábrica produtora de biocombustível, com base nestas cianobactérias geneticamente modificadas, perto de uma fábrica que emita dióxido de carbono, como por exemplo, uma central termoelétrica. Isto permitiria que o gás de efeito estufa fosse capturado e reciclado diretamente em combustível líquido (ATSUMI et al. 2009).

Uma equipe de investigação da Universidade do Arizona numa abordagem diferente da comumente utilizada para o aproveitamento das qualidades atribuídas para as cianobactérias fotossintéticas, visando à produção de energia. O grupo de pesquisa usou genes de um bacteriófago (microrganismo que ataca bactérias) para “programar” as cianobactérias a se autodestruírem, permitindo a recuperação de gorduras ricas em energia, e dos seus subprodutos, os biocombustíveis. Segundo LIU (2011), as cianobactérias são fáceis de manipular geneticamente, e têm um grande rendimento para os biocombustíveis, sendo capazes de substituir a gasolina.

Mas, para a realização deste potencial, é necessário fazer a colheita das gorduras, o que atualmente exige uma série de reações químicas bastante onerosas. A fim de que as cianobactérias possam libertar com maior facilidade os ácidos graxos contidos em seu interior, os pesquisadores inseriram nas cianobactérias genes de bacteriófagos. Estes genes são responsáveis pela dissolução das membranas, facilitando assim a liberação dos ácidos graxos (LIU et al. 2011).

Biodiesel de microalgas deve ser competitivo com o petróleo de origem fóssil e sua competitividade dependerá principalmente do custo de produção da biomassa de algas. Uma maneira de abordar a questão da competitividade é estimar o preço ou o custo de produção da biomassa procedente do cultivo de algas com um determinado teor de óleo bruto e comparar com o preço de aquisição do petróleo (CHISTI, 2008).

A literatura sugere que, atualmente, a biomassa de microalgas pode ser produzida por cerca de três mil dólares por tonelada (CHISTI, 2007). O que não torna viável a sua utilização quando comparada aos combustíveis de origem fóssil. Portanto, o preço de produção da biomassa precisa diminuir, e isso só ocorrerá através de avanços em tecnologia de produção e melhoramento genético de algas, para transformar a produção de biodiesel a partir de microalgas uma opção viável. E, além disso, segundo o mesmo autor nenhuma parte do biodiesel produzido comercialmente a partir de óleo de soja nos EUA e óleo de canola na Europa pode competir com diesel derivado de petróleo sem os créditos fiscais, créditos de carbono e outros subsídios semelhantes que recebe (CHISTI, 2007).

Na Figura 1 pode-se ver como funciona um processo de produção de óleo de microalgas para produção de biodiesel.

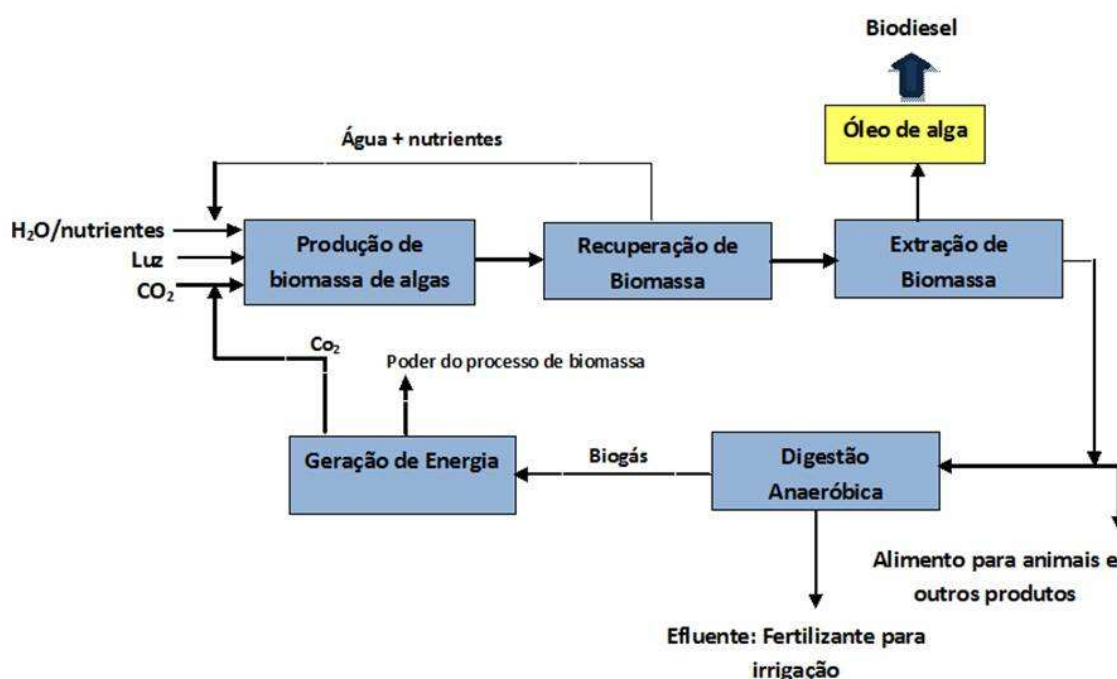


FIGURA 1: Fluxograma de produção de biodiesel através de algas

Fonte: Adaptado a partir dos dados de CHISTI, 2008.

Para a produção de biomassa deve ser fornecida a cultura de microalgas: água, nutrientes inorgânicos, dióxido de carbono e luz. Na fase de recuperação da biomassa, as células em suspensão no caldo estão separadas da água residual e dos nutrientes, que são então reciclados para serem reutilizados na fase de produção de biomassa. A biomassa recuperada é utilizada para extração do óleo de algas, que será convertido em biodiesel num processo separado (CHISTI, 2008).

Os resíduos gerados da produção de óleo a partir de algas podem ser ainda usados como alimento para animais e outros produtos de valor agregado. A maior parte da biomassa sofre digestão anaeróbica, o que produz biogás que pode ser utilizado para gerar eletricidade. Os efluentes do digestor anaeróbico são usados

como um fertilizante e são ricos em nutrientes e, como a água de irrigação. A maior parte da energia gerada a partir do biogás pode ser consumida no próprio processo de produção de biomassa e qualquer excesso de energia pode ser vendido a companhias energéticas. As emissões de dióxido de carbono geradas durante a produção de energia são reutilizadas para alimentar o processo de produção de biomassa (CHISTI, 2007).

BACTÉRIAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Cientistas americanos incorporaram no DNA (ácido desoxirribonucleico) da bactéria *Escherichia coli* genes que lhe permite sintetizar enzimas que processam a celulose, transformando-a em açúcares, que por sua vez são usados para produzir biocombustível de forma direta. Investigadores da Universidade da Califórnia desenvolveram um processo alternativo para obter combustível biológico recorrendo a *Escherichia coli* (STEEN et al. 2010).

Numa primeira fase os investigadores clonaram genes de duas espécies de bactérias que ocorrem no solo e no sistema digestivo de animais herbívoros que são responsáveis pela produção de enzimas que processam a celulose oriunda de biomassa vegetal. Após adicionaram sequências de aminoácidos capazes de induzir a secreção dessas enzimas pelas bactérias testadas, estas sequências então foram importadas para o DNA de *E. coli*. Dessa forma a nova *E. coli* modificada passa a ter o mesmo desempenho e especificidade das bactérias clonadas passando a processar a celulose e transformado essa em açúcares (STEEN et al. 2010).

Numa segunda fase, de acordo com o líder da equipe “Incorporamos genes que permitem produzir ésteres de biodiesel de ácidos graxos e etanol” (STEEN et al. 2010). Com essa alteração é possível que as bactérias fabriquem biocombustível que podem ser diretamente usado. Adicionalmente, o biocombustível produzido é excretado pelas bactérias, migrando para a superfície do recipiente que esta sendo utilizado como reator de produção, dessa forma o mesmo pode ser coletado, sem necessidade de recorrer à destilação ou a qualquer outro tipo de purificação (STEEN et al. 2010).

Uma equipe de pesquisadores da Universidade da Califórnia modificou bactérias para produção de um biocombustível, com as mesmas funções do que a gasolina. Enquanto microrganismos produzem esse biocombustível em uma baixa taxa, essa nova bactéria geneticamente modificada tem uma produção cerca de dez vezes superior quando comparada a microrganismos sem essa modificação. Uma das espécies que produz naturalmente essa substancia química chamada n-butanol ou butanol normal, proposta como um substituto para a gasolina são as bactérias do gênero *Clostridium* (BOND-WATTS et al. 2011).

BOND-WATTS (2011), e equipe introduziram esta mesma via metabólica em bactérias do gênero *E.coli*, por esse microrganismo ser considerado como mais fácil de ser geneticamente modificado. Segundo BOND-WATTS (2011), esta nova *E. coli* modificada geneticamente produz cerca de 5 g/l de n-butanol, praticamente o mesmo que *Clostridium*. Ao todo, foram inseridos genes de *Clostridium acetobutylicum*, *Treponema denticola* e *Ralstonia eutrophus* em *E. coli*. (BOND-WATTS et al. 2011).

LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A produção de bioetanol é realizada comumente por fermentação por uma levedura chamada *Saccharomyces cerevisiae*, a mesma levedura usada há muitos

séculos para fermentar a massas e bebidas alcoólicas. Embora essa espécie seja bastante eficiente em transformar glicose em álcool, ela não consegue digerir outros tipos de açúcar, como a xilose (açúcar presente na madeira). Isso se torna um problema para a utilização e fermentação de alguns tipos de biomassa, como madeira e cascas de plantas, pois grande parte do produto da fermentação da celulose presente nesses materiais acaba sendo desperdiçada. Outro elemento que limita o uso dessa matéria-prima é o ácido acético, produto ou coproduto gerado na transformação da biomassa em açúcar. Essa substância é tóxica para a levedura e diminui sua eficiência na produção de etanol (KIM et al. 2010).

KIM (2010) e equipe anunciaram a criação de um novo tipo de levedura que produz com maior eficiência o chamado etanol de segunda geração, aquele feito a partir da celulose da biomassa vegetal. A espécie modificada em laboratório é capaz de gerar álcool a partir de substâncias que não eram toleradas por esse tipo de micro-organismo, gerando mais combustível a partir da mesma quantidade de material. A pesquisa, descrita na revista especializada *Nature Communications*, pode dar um novo impulso à fabricação de álcool com o bagaço da cana-de-açúcar e outras fontes lignocelulósicas (KIM et al., 2010).

KIM et al., (2010) observando a incapacidade da *Sacharomyces cerevisiae* de converter o amido em glicose desenvolveram uma linhagem capaz de sacarificar o amido, produzindo glicose para produzir etanol. Para isso foram utilizados dois outros microorganismos, *Aspergillus awamori* e *Debaromyces occidentalis*. Do *A. awamori* foram retirados os genes que sintetizam a glico-amilase (capaz de degradar amido), e do *D. occidentalis* os genes que sintetizam a α -amilase. Desta forma, obtiveram um resultado satisfatório, para essa comprovação foi utilizada uma cepa de *s. cerevisiae* industrial e outra da nova linhagem, ambas foram colocadas em um meio contendo 20% de amido solúvel, e os resultados foram contundentes a linhagem industrial produziu 0% de etanol enquanto que a nova linhagem produziu 89,8% de etanol (KIM et al., 2010). Esses resultados demonstram que a inserção de genes, com características desejadas faça com que a produção de etanol seja aumentada em quase 90%, reduzindo assim os custos de produção através do aumento de produtividade.

Os pesquisadores YONG-SU JIN (2013) e equipe da Universidade de Illinois, nos Estados Unidos, foram capazes de resolver os dois problemas em laboratório ao manipular o metabolismo da *S. cerevisiae*: além da glicose, a levedura modificada também consegue digerir a xilose e o ácido acético, transformando as duas substâncias em etanol, e dessa forma com uma alimentação mais variada e completa o microrganismo vive mais e produz mais combustível. "Nós introduzimos os caminhos metabólicos para o consumo de xilose e acetato de outros microrganismos nessa levedura" (YONG-SU JIN, 2013). De acordo com os resultados obtidos com testes laboratoriais, a cepa criada pelos cientistas pode ser usada com as mesmas técnicas tradicionais empregadas na produção de bioetanol de segunda geração, mas com uma eficiência maior. O pesquisador afirma ainda que:

A quantidade de produção de etanol do açúcar será a mesma, mas nossa levedura modificada será capaz de converter o acetato da hidrólise celulósica em etanol também. Portanto, nossa levedura pode produzir mais etanol do que as cepas existentes (YONG-SU JIN, 2013, p. 4).

Ele ressalta que ainda é necessário aperfeiçoar a capacidade de consumo de ácido acético antes de pensar em comercializar a levedura modificada. Outra

questão que deve ser analisada é se o fungo artificial vai apresentar os mesmos resultados obtidos em experimentos controlados realizados em laboratório em uma planta industrial real (YONG-SU JIN, 2013).

A manipulação da levedura *S. cerevisiae*, também, tem sido realizada no Brasil, onde a competição entre as indústrias energética e alimentícia pela cana-de-açúcar só faz crescer a necessidade pelo etanol de segunda geração. Segundo João Ricardo da EMATER-DF em entrevista ao Correio Brasiliense: "Também trabalhamos para fazer a levedura que fermenta xilose e seja forte contra compostos tóxicos. Esse estudo está um passo à frente por também usar o composto tóxico para produzir etanol" (CORREIO BRAZILIENSE, 2013).

Essa é, na verdade, a mais recente de várias pesquisas que tentam adaptar a *S. cerevisiae* à fermentação de celulose, um material que sempre foi indigesto para essa espécie. Há outros tipos de organismos que se dão muito bem com os açúcares do bagaço de cana, mas nenhum deles demonstrou o mesmo desempenho ou a mesma resistência em produzir etanol em escala industrial. Para vencer esse impasse, os pesquisadores procuram unir as duas habilidades em um só microrganismo, uma tarefa que depende da delicada manipulação do comportamento de uma espécie viva. Outro problema apontado pelo especialista para o aproveitamento da celulose na produção de combustível é que a forma de fermentação de etanol no Brasil é feita a céu aberto, uma condição inadequada para a manipulação de micro-organismos modificados em laboratório. Um grande volume de investimentos é necessário a fim de adaptar esse modelo às leveduras especiais (CORREIO BRAZILIENSE, 2013).

A Embrapa prevê que as primeiras usinas especializadas no processamento da biomassa lignocelulósica comecem a funcionar a partir de 2015, por iniciativas privadas (CORREIO BRAZILIENSE, 2013).

A espécie de fungos *Mucor Circinelloides* é um promissor candidato à produção de etanol diretamente a partir de material lignocelulósico, pois fermenta tanto pentoses quanto hexoses; produz celulasas - endo- β -glucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase, Xilanase e β -xilosidase. Os pesquisadores TAKANO E HOSHINO (2012), realizaram uma pesquisa com o objetivo selecionar dois fungos de alto desempenho (cepas de *M. circinelloides*) tanto para secreção de celulasas quanto para fermentação de etanol, e avaliar os dois sistemas possíveis: conversão direta da palha de arroz e um sistema de co-culturas para conversão. TAKANO & HOSHINO (2012) utilizaram *M. Circinelloides* tanto para a expressão de celulasas quanto para a produção de etanol, foram estudadas 11 cepas. Buscou-se o desenvolvimento de sacarificação e fermentação simultâneas usando apenas fungos pertencem à *Zygomycetes*, especialmente *M.circinelloides*. *M. circinelloides* NBRC 5398 que podem segregar uma grande quantidade de celulasas para obter açúcares fermentescíveis de palha de arroz e *circinelloides M. NBRC 4572* que pode fermentar glicose e xilose em alto rendimento, estes foram selecionados entre as cepas da biblioteca de fungos. Com a co-cultura dessas duas cepas, foi produzido 1,28 g de etanol por litro, após 96 horas de fermentação utilizando palha de arroz como substrato. Para aumentar o rendimento de etanol, usando o processo de fermentação e sacarificação simultâneos, proposto com o sistema de co-cultura, a secreção de celulasas por *M. circinelloides* NBRC 5398 ou outras estirpes deve ser ainda melhorada.

YANASE et al. (2010) desenvolveram uma pesquisa objetivando construir uma linhagem recombinante de *Kluyveromyces marxianus* que produza β -

glicosidase e endoglucanase na superfície da célula capaz de converter β -glicano (material celulósico) em etanol a 50°C. Para isso foram utilizados alguns microrganismo para a bioengenharia. Do *Aspergillus aculeatus* foi obtido o gene de expressão da β -glicosidase e do *Trichoderma reesei*, o gene de expressão da endoglucanase. A produtividade de etanol pelo organismo geneticamente modificado foi testada em várias temperaturas. Neste trabalho foi demonstrado que a linhagem de levedura recombinante *K. marxianus* expressando os genes EG (endoglucanase) e BGL (glucosidase) foi capaz de produzir etanol (fermentar) em altas temperaturas a partir de material celulósico (β -glucano). E mais recentemente foi criada a bactéria, conhecida como ALK2, pode fermentar todos os açúcares presentes na biomassa, a 50 °C, e trata-se de uma bactéria termofílica e anaeróbica. Os cientistas, liderados por Joe Shaw e Lee Lynd, do Dartmouth College, nos EUA, modificaram geneticamente a bactéria para que ela produzisse mais e melhor o etanol. Deu certo: além do alto rendimento, no fim o etanol foi praticamente o único produto gerado pela bactéria (YANASE et al. 2010).

NOVAS ENZIMAS

Recentes avanços em enzimas para a conversão de biomassa celulósica em açúcares trouxe o etanol a partir de celulose ou da biomassa vegetal à beira da realidade comercial. Um número de potencial de indústrias já anunciaram planos para começar a construção de biorrefinarias de processamento de celulose. Um desafio para a indústria de biomassa celulósica a emergente será a forma de produzir, colher, armazenar e entregar grandes quantidades de matéria-prima para biorrefinarias de uma maneira econômica e ambientalmente sustentável. O desenvolvimento de microrganismos geneticamente melhorados (GEMS) e enzimas industriais especializadas - têm melhorado muito a eficiência da produção de etanol. A biotecnologia industrial também produziu uma série de novos polímeros de base biológica, plásticos e têxteis (MATTHEW et al., 2009).

O Brasil também tem investido nessa tecnologia com a construção da primeira usina de etanol celulósico em escala comercial do País, com previsão de inauguração no início de 2014, sediada no Estado de Alagoas, esta representa um grande avanço para o Brasil porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia, a usina, do grupo GraalBio, terá capacidade de produção considerável, 82 milhões de litros/ano e meta para até 2020 de produzir 1 bilhão de litros/ano (UNICA, 2013). Segundo UNICA (2013) para acelerar o desenvolvimento em escala comercial do etanol de segunda geração, produzido a partir da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) abriu uma linha de crédito em 2012, que vem sendo utilizada por diversas empresas ativas no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como Abengoa e DuPont.

Vários desafios tecnológicos para a produção de etanol celulósico comercial ainda permanecem. Estimativas atuais do Departamento de Energia dos Estados Unidos estimam o custo de produção de etanol celulósico em dois a três dólares por galão. A eficiência do sistema depende ainda de melhorias nos setores de coleta, transporte e armazenamento de biomassa celulósica e em tecnologias de pré-tratamento mais eficientes, para melhorar a receptividade de biomassa para a atuação da enzima celulase. Nesse contexto há ainda espaço para melhorias em coquetéis enzimáticos de celulase e organismos de fermentação mais eficazes para

converter pentoses e hexoses (açúcares complexos presentes na biomassa celulósica) em açúcares facilmente fermentáveis e isso somente podem ser conquistados com a inserção de microrganismos geneticamente modificados (MATTHEW et al., 2009).

ZUNIGA (2010) desenvolveu uma pesquisa que utilizou o bagaço de cana para a produção de celulases específicas por meio de fermentação em estado sólido com o microrganismo *Aspergillus niger*. Essas celulases produzidas permitiram conversões de 15% de etanol. A aplicabilidade deste coquetel enzimático poderá proporcionar um crescimento sustentável na produção de bioetanol.

A empresa *Novozymes*, desenvolveu as enzimas batizadas de Cellic CTec2 (celulase) e a Cellic HTec2 (hemicelulase), que podem liberar os açúcares contidos na palha de milho, restos de madeira e bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo. São proteínas especializadas em catálise biológica. Desta forma encontra-se na hidrólise da celulose, uma alternativa para uma maior produção, sem que seja necessário interferir bruscamente no equilíbrio ecológico, além de utilizar como matéria-prima os resíduos da fabricação convencional do etanol. A recentemente criada bactéria, conhecida como ALK2, pode fermentar todos os açúcares presentes na biomassa, a 50°C, e trata-se de uma bactéria termofílica e anaeróbica. Os cientistas, liderados por Joe Shaw e Lee Lynd, do Dartmouth College, nos EUA, modificaram geneticamente a bactéria para que ela produzisse mais e melhor o etanol. Deu certo: além do alto rendimento, no fim o etanol foi praticamente o único produto gerado pela bactéria. O que comprova a necessidade de investimentos para que possam ser obtidos resultados promissores (BRENT & MATTHEW, 2009).

O Etanol celulósico não tem quase nenhuma emissão de gases com efeito de aquecimento climático, porque o dióxido de carbono capturado no cultivo das plantas é aproximadamente igual ao das emissões produzidas enquanto é queimado num motor. Sendo assim, seria uma forma energética eficiente e não tão poluidora quanto às formas de energia que são utilizadas atualmente (VIAN, 2011).

CONVERSÃO DIRETA DA ENERGIA SOLAR EM COMBUSTÍVEL LÍQUIDO, USANDO MICRORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

A energia solar é captada e transformada em energia química pelo processo de fotossíntese. Todas as plantas realizam a fotossíntese, mas elas diferem na forma de armazenamento dessa energia em forma de biomassa. Algumas plantas produzem amido ou glicose, outras celulose, ou óleos. Todas as formas são fontes de biocombustíveis, assim como os óleos produzidos por microalgas. A produção pode ser obtida por processo químico ou biológico ou pela combinação de ambos (XUEFENG, 2010). A conversão direta da energia solar em combustível líquido, usando microrganismos fotossintéticos é uma alternativa atraente para substituir os combustíveis fósseis. Existem várias vantagens em usar organismos como microalgas e cianobactérias. Entre elas destacam-se a sua maior taxa de crescimento em relação às plantas, e sua capacidade de prosperar em áreas que não podem suportar a agricultura, dessa forma podem proporcionar uma forma de resolver o conflito potencial entre o uso da terra para a produção de alimentos ou para produção de biocombustíveis (MACHADO & ATSUMI, 2012).

Ainda de acordo com o mesmo autor, o sistema microbiano é mais eficiente na transformação da energia solar em biocombustíveis. Além do mais as cianobactérias são mais tolerantes a introdução de novos genes, ou seja, a modificações genéticas. A conversão direta de dióxido de carbono para

biocombustíveis através das cianobactérias podem melhorar significativamente a eficiência da produção de biocombustíveis (XUEFENG, 2010). Segundo XUEFENG (2010), a Algenol Biocombustíveis Inc. desenvolveu uma tecnologia inovadora com cianobactérias e produziu etanol a uma taxa de 6000 galões/ha/ano. Em contraste, ao rendimento anual de etanol de milho é de 321 galões/ha/ano, com cana de açúcar 727 galões/ha/ano e de palha de milho 290 a 580 galões/ha/ano. É evidente que a produção de etanol, a partir de cianobactérias é significativamente mais eficiente do que é o etanol produzido a partir de matérias-primas vegetais. Esta nova tecnologia faz muito a diferença na produção de biocombustíveis, e não se limita a produção de etanol, se estende a outros combustíveis alternativos.

A produção de biocombustíveis através do sistema biológico resulta num combustível bem próximo das características dos combustíveis fósseis, o que proporciona melhor adaptação aos motores existentes e menores trabalho de refino. A utilização de cianobactérias para produzir produtos químicos valiosos ainda está em fase inicial de exploração, há um longo caminho a percorrer (MACHADO & ATSUMI, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os combustíveis originados de biomassa têm sido usados pela humanidade ao longo dos tempos. A maioria reporta a álcoois produzidos a partir da fermentação de substâncias como amido, açúcares e óleos de plantas. Atualmente, com o aumento dos preços e com a crescente instabilidade política que ocorre nos países produtores de petróleo, o uso de biocombustíveis de origem biológica vem ganhando preponderância.

A importância dos microrganismos na produção destes biocombustíveis está cada vez mais sendo reconhecida. Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa renovável são fonte de energia sustentável com o maior potencial para a produção de CO₂ neutro. Elas podem ser facilmente aplicadas gradualmente para complementar combustível fóssil. Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de biomassa por microrganismo, bem como uma mistura de ambos os métodos técnicos de produção química/biológica.

A produção de biocombustíveis terá de incluir a biomassa de plantas inteiras, gramíneas e resíduos agroindustriais para alcançar maior produtividade. Isso contribuirá para reduzir a concorrência com a produção de alimentos e para a conservação da natureza, visto que menores áreas serão necessárias para um aumento de produção. Biocombustíveis microbianos tem grande potencial de desenvolvimento em etapas do processo, tais como pré-tratamento, fermentação, separação do substrato, acoplamento de energia e outros. Pesquisas biológicas terão de contribuir para a melhoria da produção de biocombustíveis, para a criação de usinas de energia chamadas de biorrefinarias, de hidrólise enzimática, de fermentação especializada em materiais lignocelulósicos e tratamento de resíduos e isso somente será possível com a utilização de microrganismos geneticamente modificados que possuem especificidade para atuar na biomassa vegetal, fonte de energia proposta e disponível em substituição aos combustíveis de origem fóssil.

REFERÊNCIAS

- ANTCZAK, M. S., KUBIAK, A., ANTCZAK, T., BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key Factors Affecting Efficiency of the Process. **Renewable Energy**. V. 34, 1185-1194, 2009.
- ANTUNES, R.; SILVA, I. C. **O Papel dos Microrganismos no Futuro dos Biocombustíveis**. São Paulo: INPI, 2011. 33 p.
- ANTONI, D, ZVERLOV VV, SCHWARZ WH. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77: 23-35, 2007.
- ATSUMI S, HIGASHIDE N, LIAO JC. *Direct* photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. **Nature Biotechnology**, 27: 1177-1180, 2009.
- BELLIGHINI, R. H. **Uma planta, uma usina**. 2010. Disponível em: <<http://www.tnpetroleo.com.br/clipping/4719/uma-planta-uma-usina>>. Acesso em: 22 out. 2013
- BNDES (Banco Nacional do Desenvolvimento); Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) - **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316p.
- BOND-WATTS BB, BELLEROSE RJ, CHANG MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. **Nature Chemical Biology**, 2011, 7: 222-337.2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário Estatístico da Agroenergia 2011**. 284P. Brasília, 2012.
- BRENT ERICKSON AND MATTHEW T. CARR, **Bio-Ethanol Development in the USA**, in Biofuels Edited by Wim Soetaert, Erick J. Vandamme, John Wiley & Sons Ltd, 49-52.2009.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: Cortez, L.A.B. (coordenador) Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade, São Paulo, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends Biotechnol.** 26, 126–131.2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol**, 2007, Adv. 25, 294-396.
- COLLA, M., L., **Aplicações e produção de lipases microbianas**. Revista CIATEC – UPF, vol.4 (2), p.p.1-14, 2012.
- CORREIO BRAZILIENSE (DF) – Tecnologia. Disponível em: <Levedura de pão gera combustível - <http://cliptime.net/levedura-de-pao-gera-combustivel/>>. Acesso em: 22 out. 2013.

COSTA, B. J. **Produção biotecnológica de hidrogenio etanol e outros compostos a partir do glicerol da reação de formação do biodiesel** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

COUTINHO, P.L.A.; BOMTEMPO, J.V. **Uso tecnológico para favorecer o ambiente de inovação: Um as propostas em matérias primas renováveis**. In: SIMPOI, 2010.

DAS, D. **Advances in biological hydrogen production processes**. International Journal of Hydrogen Energy. 2008, 33: 6046-6057.

EMATER. Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural. 2013. Disponível em: <<http://www.emater.df.gov.br/>>. Acesso em: 12 out. 2013.

FURIGO A. J. **Produção biotecnológica de hidrogênio**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, departamento de Engenharia Química e Alimentos- Florianópolis – SC, 2009.

INPI. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. **O papel dos microorganismos no futuro dos biocombustíveis**. 2011. Disponível em: <<http://www.marcaspatentes.pt>>. Acesso: 22 out. 2013.

KIM, J. et al. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, α -amylase and debranching enzyme. **Revista Biotechnol Lett**, 32:713–719.2010.

LIU X, SHENG; J, CURTISS. **Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 108, no 17: 6899-6904, 2011.

MACHADO, I.M.P.; ATSUMI, S. **Cyanobacterial biofuel production**. USA. 2012. Department of Chemistry, University of California, Davis, CA. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 22 out. 2013.

MATTHEW T. CARR AND JAMES R. HETTENHAUS, **Sustainable Production of Cellulosic Feedstock for Biorefineries in the USA**, in Biofuels Edited by Wim Soetaert, Erick J. Vandamme, John Wiley & Sons Ltd, 9-13, 2009.

NASCIMBENI, F.A. **Avaliação da Produção biológica de hidrogênio em reator em batelada sob condição termofila**. Universidade de São Carlos, São Paulo, 2013.

SACHS, I. **Da civilização do petróleo a uma nova civilização verde**. Estudos Avançados, v.19, n.55, São Paulo, 2005.

SANTOS, F. M. S. M.; SANTOS, F. A. C. M. **O combustível hidrogênio**. Educação, ciência e tecnologia, número 252, 2009. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millenium/Millenium31/15.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

ROYA, B; FREITAS, E.; BARROS, E.; ANDRADE, F.; PRAGANA, M.; SILVA, D. J. A. Biogás – uma energia limpa. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, ano 2011, v. 13, n. 13, p. 142 – 149. 2011

ROSSI, D.M. **Produção biotecnológica de hidrogênio, 1,3 propanodiol e etanol utilizando glicerol residual proveniente da síntese de biodiesel**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SANTOS, M.F. **Economia & Energia** Ano XV-No 82 Julho/Setembro de 2011 ISSN 1518-2932, 2011.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. Tese de doutorado apresentado à Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, 2008.

SINGH, J.; GU, S.; **Renew. Sust. Energy**. Rev., V. 14, p.2596-2610, 2010.

SOUZA M.P; BJERK T.R.; GRESSLER P.D.; SCHENEIDER R.C.; CORBELLINI A.V.; MORAES M.S. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis parte I: bioetanol. **Revista Tecno-lógica- UNISC**, 2012.

STEEN EJ, KANG Y, BOKINSKY G, HU Z, SCHIRMER A, MC CLURE A, DEL CARDAYRE SB, KEASLING JD. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. **Nature**, 463: 559-562, 2010.

TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from rice straw by coculture with two high-performing fungi. Japão. **Frontiers of Chemical Science and Engineering** . v. 6. p. 139-145, 2012.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/>>. Acesso em: 22 out. 2013.

VIAN, C. E. F. **Etanol**. Brasil. 2011. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia/embrapa.br>>. Acesso em: 22 out. 2013.

XUEFENG, L. **A perspective: Photosynthetic production of fatty acid- based biofuels in genetically engineered cyanobacteria**. China. 2010. Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, No. 189 Songling Road, Qingdao. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 22 out. 2013.

YANASE, S. et. al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. Japão: *Appl Microbiol Biotechnol* v. 88. P.381–388. 2010.

YONG-SU JIN; WEI, JOSH QUARTERMAN; SOO RIN KIM; JAMIE H.D. CATE, Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by

engineered yeast. **Nature**, 3580: V. 4 – 08 de outubro de 2013 – Online <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3580>>. Acesso em: 22 out. 2013.

ZANETTE, A. L. Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009. 97p.

ZUNIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado. São Paulo: USP, 2010. 228p.