

Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas

Rodolfo Maiche¹
Charles Huber²

Resumo: O bioetanol, etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração é obtido a partir da sacarificação de celulose, hemicelulose e pectina presentes na parede celular de biomassas. O bioetanol está sendo amplamente estimulado nos Estados Unidos por ser um substituto direto da gasolina, por não competir com culturas agrícolas destinadas à alimentação e causar menos impacto ambiental. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na terra, entretanto, essa molécula é muito bem protegida na parede celular de plantas; hidrolisá-la eficientemente a açúcares fermentáveis para produzir bioetanol, a preços competitivos, tornou-se um dos grandes desafios da biotecnologia moderna. A presente revisão objetiva avaliar o desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos, com enfoque em rotas bioquímicas.

Palavras-chave: bioetanol; etanol lignocelulósico; etanol de segunda geração; sacarificação; biomassa.

Abstract: Bioethanol, lignocellulosic ethanol or second generation ethanol is obtained through the saccharification of cellulose, hemicellulose and pectin presented in the cell wall of biomasses. Bioethanol is being thoroughly stimulated in the United States because it is a direct substitute for gasoline, does not compete with crops destined to be food supplies, and causes less environmental damage. Cellulose is the most abundant polysaccharide on Earth, however this molecule is well protected in the cell wall of plants, and efficiently hydrolyzing it to fermentable sugars, to produce bioethanol at competitive prices, has become one of the greatest challenges of modern biotechnology. This review aims to analyze the development of the production and research of bioethanol in the United States focusing on the biochemical routes.

Key words: bioethanol; lignocellulosic ethanol; second generation ethanol; saccharification; biomass.

¹ Tecnólogo em Gestão Ambiental

² Mestre em Biotecnologia Agrícola, Professor do IFSul - Campus Pelotas

1. Introdução

O governo dos Estados Unidos, por meio do Energy Independence and Security Act de 2007, definiu como meta, a partir de 2022, uma produção anual de 136 bilhões de litros de biocombustíveis alternativos ao petróleo – fonte de energia não-renovável e de alto potencial poluidor. Como uma das alternativas para atingir esse objetivo, o Departamento de Energia dos Estados Unidos estimula a produção de 60 bilhões de litros de bioetanol por ano, a partir de 2022 (GONÇALVES, 2010; USDA, 2009 e DOE, 2006).

O bioetanol, etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração é obtido por meio da hidrólise de polissacarídeos presentes na parede celular de biomassas. Esses polissacarídeos são continuamente renovados na natureza mediante a biotransformação de energia solar e CO₂ através da fotossíntese (LYND *et al.* 1991). A biomassa lignocelulósica (e.g., gramíneas, palha de trigo, bagaço e palha de milho, madeira) é geograficamente distribuída e a sua conversão em bioetanol favorece a redução das emissões dos gases do efeito estufa (GEF) em comparação com as emissões da combustão de gasolina (SLADE *et al.*, 2009; RUBIN, 2008 e DOE, 2006).

Os processos mais empregados na conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis são a hidrólise enzimática e a hidrólise por meios ácidos. Esses processos, invariavelmente, necessitam de uma etapa de pré-tratamento. Do ponto de vista ambiental, os processos enzimáticos tendem a reduzir mais as emissões dos GEF, e produzem o bioetanol por meio de técnicas de produção mais limpas (SHELLEY, 2009 e SLADE *et al.*, 2009).

2. Componentes da Parede Celular

Em termos gerais, a parede celular das plantas é formada por uma complexa cadeia de carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos fenólicos, sendo que os polissacarídeos correspondem a cerca de 90% do seu peso seco (CAO *et al.* 2010 e BUCKERIDGE *et al.*, 2007). A maioria das plantas tem parede celular composta de aproximadamente 15-40% celulose, 30-40% hemicelulose e pectina e 20% lignina (DOI, 2004).

A parede celular possui uma primeira camada de moléculas de celulose justapostas, formando um conjunto de fibras impermeáveis. Esse complexo de fibras se liga à hemicelulose através de ligações de hidrogênio e interações não-covalentes. A rede de celulose/hemicelulose está imersa em uma matriz de pectina que forma uma espécie de “gel” dentro da camada lamela média (BUCKERIDGE *et al.*, 2007 e DERBYSHIRE, 2007).

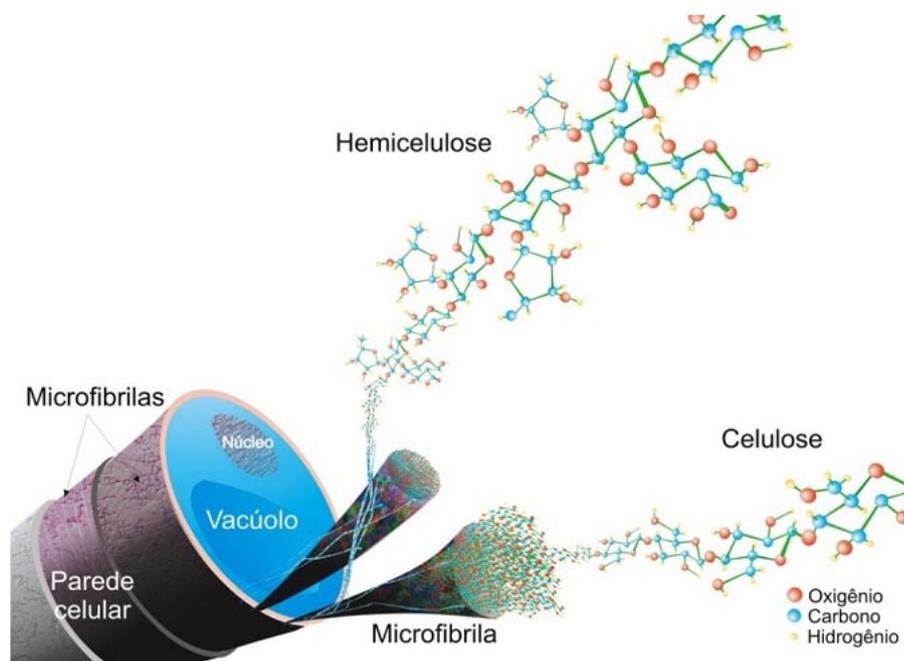


Figura 1 Componentes da parede celular vegetal (BUCKERIDGE *et al.*, 2007).

2.1. Celulose

A Celulose é o biopolímero mais abundante na terra. Sua estrutura varia de centenas a milhares de moléculas de D-glicoses unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Essas ligações resultam na formação de uma extensa e rígida estrutura na qual cada molécula de D-glicose está posicionada a 180° em relação à molécula vizinha (HORTON *et al.*, 2006 e MURRY, 2004).

As moléculas de celulose formam fibras que podem ser cristalinas ou amorfas – estas menos recalcitrantes à hidrolisação. Quatro formas de estruturas cristalinas de celulose já foram caracterizadas por cristalografias de raios X e ressonância magnética nuclear (estado sólido ^{13}C), celulosas I, II, III, e IV (PARK *et al.*, 2010).

As formas dominantes de celulose são as microfibrilas com diâmetro de 2 a 10 nm, intercaladas por outros componentes da parede celular, como os xiloglucanos (XG). Microfibrilas cristalinas são compostas por cerca de 30 a 36 filamentos de celulose agregados lateralmente (unidirecional) através de forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Embora muitos progressos quanto à elucidação da estrutura das fibras cristalinas tenham sido feitos, elas continuam ainda pouco entendidas (ARANTES e SADDLER, 2010).

2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante da parede celular. Essa molécula é composta por um conjunto de XG – principalmente por D-xilose (RUBIN, 2008). A hemicelulose forma um complexo de polissacarídeos adsorvidos nas microfibras de celulose mediante ligações de hidrogênio, conferindo proteção as fibras de celulose (BUCKERIDGE *et al.*, 2007 e DOE, 2006).

Os XG representam, aproximadamente, 20% do total da parede celular de dicotiledôneas e monocotiledôneas. Esses polissacarídeos são formados por glucanos ligados através de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ e com ramificações de xilose (sozinha), xilose e galactose e xilose, galactose e fucose. Alguns estudos sugerem que a presença da fucose resulta em uma configuração planar dos XG, tornando-os, assim, mais propensos às ligações das enzimas glicosidases (PERRIN *et al.*, 1999).

2.3. Lignina

A Lignina é um biopolímero tridimensional composto de unidades de fenilpropanóides. Considerada como a “cola” celular, confere rigidez e revestimento às fibras de celulose; é o único biopolímero aromático renovável (RUBIN, 2008 e ROSSEL, 2006).

A lignina interliga-se com a camada de celulose-hemicelulose mediante contato superficial e/ou ligações covalentes. Ela é uma substância amorfa localizada tanto na lamela média quanto na segunda camada da parede celular, e seu peso é cerca de 90.000 daltons. A estrutura molecular da lignina é altamente resistente à hidrólise química e bioquímica (MOUTTA, 2009).

A degradação da lignina gera compostos fenólicos inibidores das atividades metabólicas de enzimas e microrganismos. Os principais compostos oriundos da decomposição da lignina são os seguintes: siringaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanilínico, vanilina e ácido ferúlico (MOUTTA, 2009). Além de ser um bom insumo para a produção de energia térmica, a lignina pode agregar mais valor comercial à produção de bioetanol se for convertida em compostos aromáticos como benzeno, tolueno e xileno (SHELLEY, 2009).

2.4. Pectina

As pectinas são polissacarídeos formados quase que exclusivamente por ácidos galacturônicos (e.g., homogalacturano) ligados por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ –energicamente mais favoráveis à hidrólise. Em dicotiledôneas, as pectinas representam cerca de 30% da parede celular, entretanto a estrutura péctica varia de acordo com o tecido botânico (KLIEMANN, 2006).

A pectina está ligada às propriedades mecânicas da parede celular. Um entendimento abrangente da sua estrutura e propriedades físico-químicas pode contribuir para a manipulação genética de plantas objetivando produzir mais quantidades de polissacarídeos fermentescíveis, e, ao mesmo tempo, menos recalcitrantes à despolimerização (DERBYSHIRE, 2007).

3. Pré-tratamento

O pré-tratamento é uma das etapas mais cruciais para a obtenção de um processo sacarificante e fermentador eficiente. O pré-tratamento da biomassa tem o propósito de remover a lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose (i.e., maximizar a exposição das fibras), aumentar a porosidade da parede celular e otimizar a hidrólise dos polissacarídeos, minimizando a formação de subprodutos tóxicos. Dentre as formas de pré-tratamento, destacam-se o *Ammonia fiber expansion* (AFEX), o hidrotérmico e a explosão com vapor (ALVIRA *et al.*, 2010; MOUTTA, 2009, BUCKERIDGE *et al.*, 2007 e ROSSEL, 2006).

O AFEX é uma das formas de pré-tratamento mais eficazes e está sendo bastante difundido nos Estados Unidos. Nesse processo, amônia líquida é adicionada à biomassa sob pressão moderada (6,8 a 27,2 atm) e temperaturas entre 70 e 200 °C, e a pressão é retirada subitamente. O AFEX descristaliza as fibras de celulose, hidrolisa a hemicelulose, remove a lignina despolimerizada e aumenta em tamanho e número os microporos da parede celular da biomassa. Esse processo pode obter rendimentos de D-glicolise próximos aos valores teóricos, utilizando-se vários tipos de biomassas (BALS *et al.*, 2010).

O hidrotérmico consiste no tratamento da biomassa com água a temperaturas entre 170 e 220 °C, solubilizando a lignina e hemicelulose (SAITO E CABELLO, 2006). Na explosão com vapor, a biomassa é tratada com vapor saturado sob alta pressão – 17 a 44,2 atm – com temperaturas que variam de 160 a 240 °C por 20 minutos. Aplica-se uma severa despressurização do meio fazendo com que as fibrilas de celulose, hemicelulose e lignina sofram modificações estruturais tornando a biomassa mais branda para a sacarificação (MOUTTA, 2009).

Imagens de microscópio eletrônico (ME) e microscópio de força atômica (MFA) (figura 2) mostram a palha de trigo sem pré-tratamento (A)-(C), palha de trigo que recebeu pré-tratamento hidrotérmico (D)-(F), palha de trigo deslignificada com pré-tratamento hidrotérmico (G)-(I) e palha de trigo que recebeu pré-tratamento de vapor explosivo (J)-(L). Em (A) (ME), pode-se observar as células individuais da palha e, em (C) (MFA), a primeira camada da parede celular com fibras de celulose entrelaçadas e parcialmente imersas em polímeros não-celulósicos (lado esquerdo). Em (D) (ME), pode-se distinguir as fibras parcialmente separadas; em (E) (ME), a fibra de celulose individual coberta por restos da parede celular e polímeros deslocados; em (F) (MFA), a fibra individual com depósitos “globulares” adsorvidos que são característicos

de lignina. Já em (G)-(H) (ME), nota-se que a deslignificação das palhas não causou grande separação das fibras, mas removeu os restos de parede celular e polímeros vistos em (E); em (H), podem ser visto os filamentos de celulose e, em (I) (MFA), a deslignificação não destruiu as fibras de celulose entrelaçadas. Em (J) (ME), a explosão com vapor separou parcialmente as fibras de celulose que se torceram em cerca de 90°; (K) (ME) mostra restos de parede celular e alguns glóbulos indicados pelas setas e, em (L) (MFA), são vistos depósitos “globulares” semelhantes aos vistos em (F).

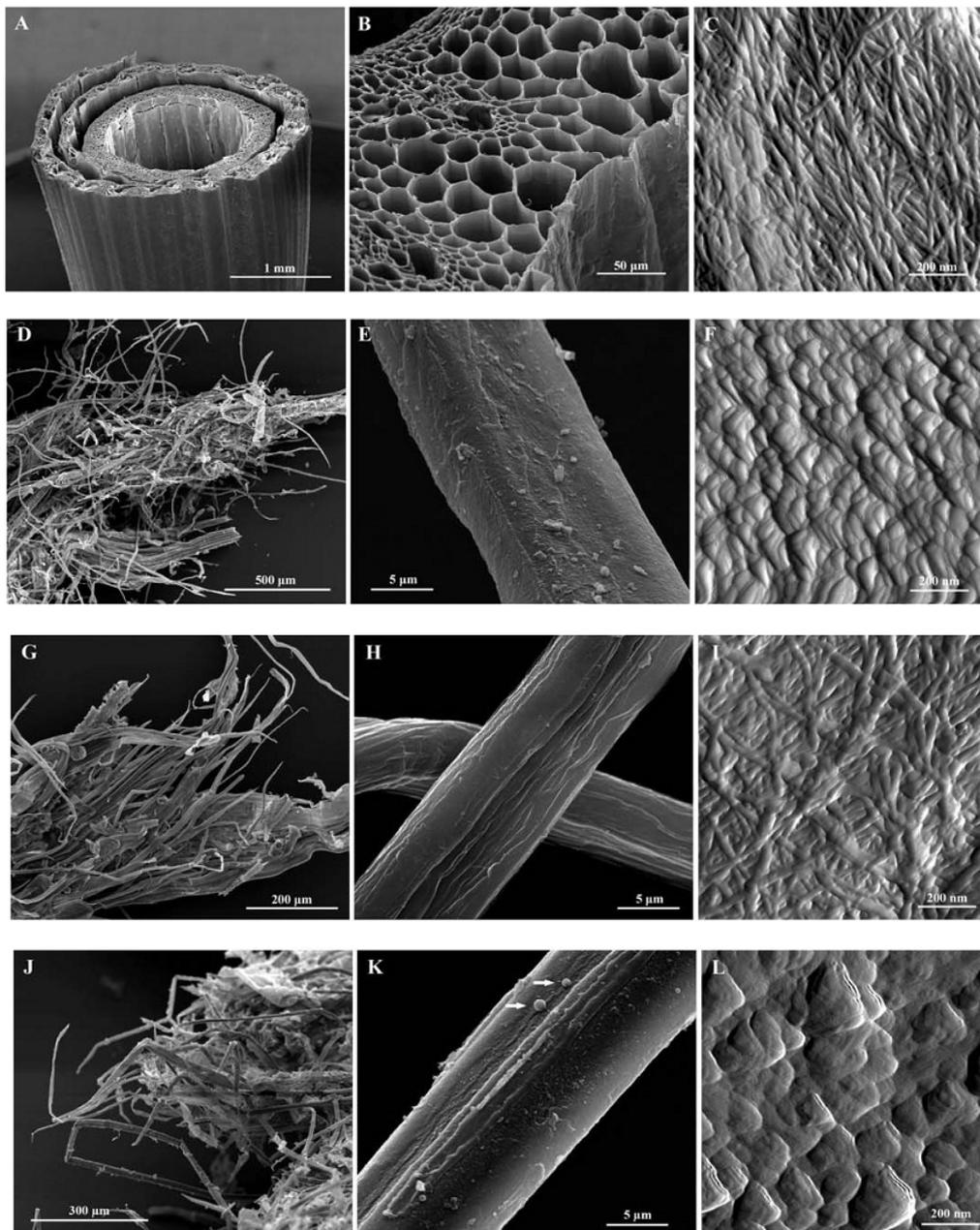


Figura 2 Images de microscópio eletrônico e microscópio de força tômica (KRISTENSEN et al., 2008).

Os subprodutos tóxicos do pré-tratamento provêm basicamente de quatro fontes: compostos da degradação dos polissacarídeos, compostos da degradação da lignina (principais), compostos derivados da degradação de componentes estruturais da parede celular e íons de metais pesados (MOUTTA, 2009 apud OLSSON, L e HAHN-HA \square GERDAL, 1996). Sob elevadas condições de pressão e temperatura, a D-glicose e a D-xilose podem ser degradadas, respectivamente, a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. Segundo Moutta (2009), no entanto, é possível modificar microrganismos para que eles sejam mais tolerantes aos subprodutos do pré-tratamento, minimizando, assim, o emprego de técnicas de destoxificação.

4. Processos e Gargalos de Produção

Até o presente momento, os processos químicos de hidrólise de biomassa ainda não se consolidaram nos Estados Unidos. Esses processos podem eficientemente remover e hidrolisar hemicelulose e pectina, contudo, são relativamente recalcitrantes à celulose e lignina, liberam quantidades significativas de subprodutos tóxicos, além de terem alto custo, pois não reutilizam e necessitam neutralizar os solventes hidrolíticos (SHELLEY, 2009 e BUCKERIDGE *et al.*, 2007). Devido à menor geração de subprodutos, maior eficiência energética e ao grande potencial de redução de custos, os processos com rotas bioquímicas são cientificamente mais investigados e tecnologicamente mais promissores à produção de bioetanol nos Estados Unidos (DOE, 2006).

Os principais gargalos para a produção de bioetanol através de rotas bioquímicas são os seguintes: desenvolvimento de um pré-tratamento eficiente para uma gama variada de biomassas e processos; desenvolvimento de processos eficientes de destoxificação dos subprodutos da hidrólise; desenvolvimento de enzimas altamente eficientes e de baixo custo; integração dos processos de hidrólise e fermentação; desenvolvimento de microrganismos capazes de hidrolisar eficientemente pentoses e hexoses; e desenvolvimento de processos que visam agregar valor comercial e ambiental à lignina (LORA, CORAL E ROCHA, 2008).

Para Lynd *et al.* (2008), um processo viável em escala industrial envolve o emprego de técnicas não-biológicas que minimizem a formação de inibidores tóxicos. Neste exemplo, (figura 3) a biomassa é pré-tratada com AFEX e lançada diretamente para bioconversão sem necessidades de destoxificação. O etanol é, então, purificado numa coluna de IHOSR (*Distillation with intermediate heat pumps and optimum sidestream return*), os sólidos residuais são removidos e alimentam o TC (*Thermochemical*) para gerar energia elétrica, e os líquidos residuais são tratados e reutilizados no processo.

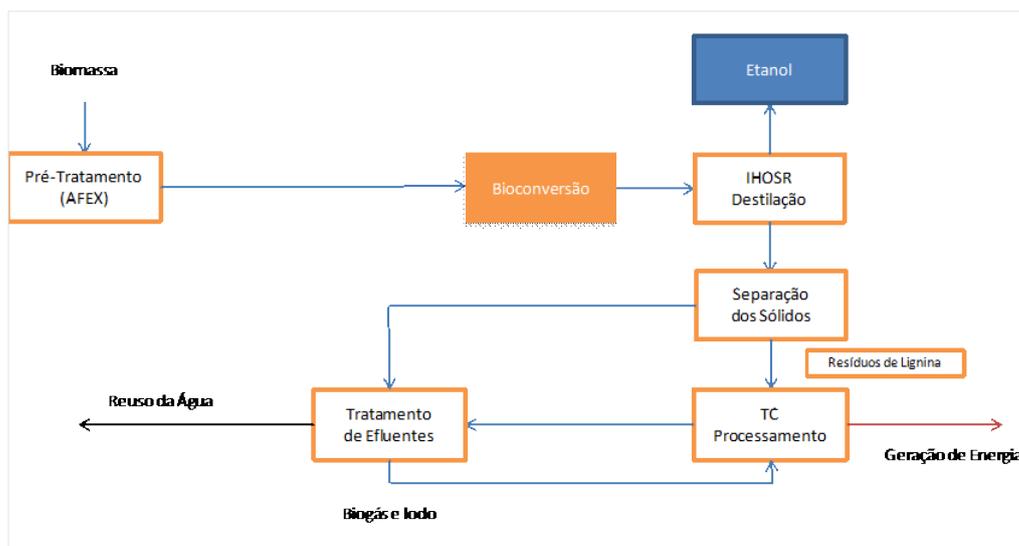


Figura 3 Processo de produção de bioetanol (LYND, et al., 2008).

Esforços significativos estão sendo feitos para aperfeiçoar os bioreatores e os processos de hidrólise e fermentação da biomassa. O *Consolidated bioprocessing* (CBP) desponta como uma das opções mais eficientes. Esse processo foca a integração das etapas de produção de celulases (enzimas celulolíticas), hidrólise de celulose e fermentação dos açúcares em uma só fase (LYND *et al.*, 2005). Um dos organismos mais aptos a operar em CBP é o *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua alta resistência ao etanol, ao amplo uso em escala comercial e às modificações genéticas que melhoraram seu metabolismo e incrementaram sua resistência aos inibidores químicos (ALRIKSSON, HORVATH E JONSSON, 2010).

5. Hidrolisação Enzimática

As glicosidases obtêm energia livre através da clivagem das ligações glicosídicas. Essas enzimas possuem uma complexa estrutura molecular na qual uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos não-catalíticos – *carbohydrate-binding modules* (CBM) – (figura 4) se ligam aos terminais redutores dos polissacarídeos. Os CBM aumentam a taxa de hidrólise do módulo catalítico das glicosidases (VIEGAS, 2008 e MCCARTNEY *et al.*, 2006); esses domínios “abraçam” as microfibrilas amorfas e cristalinas de celulose, e, dessa forma, facilitam a sacarificação (PINTO *et al.*, 2008 e MCCARTNEY *et al.*, 2006).

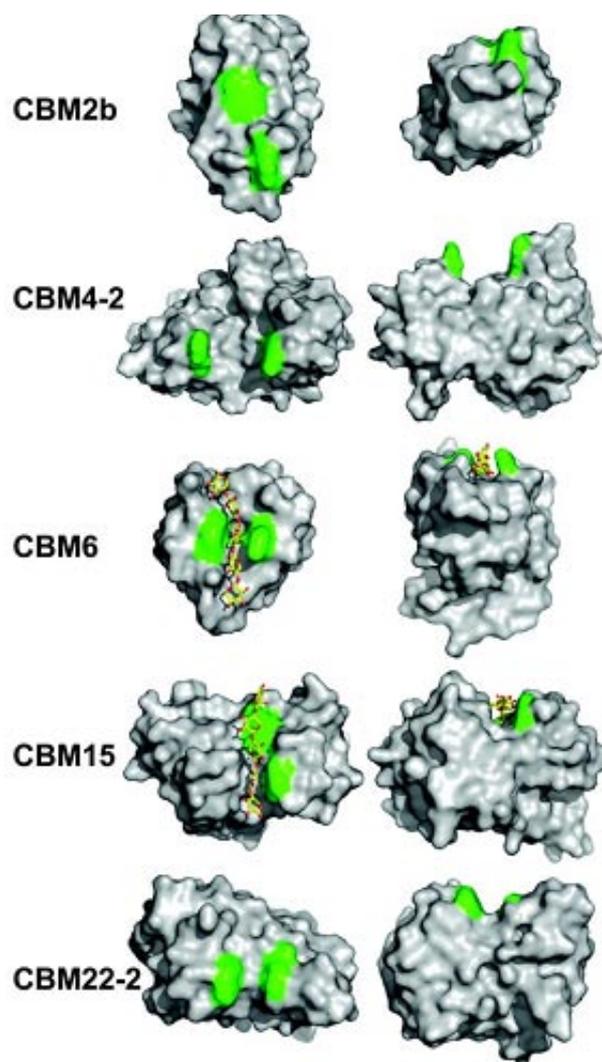


Figura 4 Estrutura em três dimensões dos CBM¹ de xiloglucanos (MCCARTNEY *et al.*, 2006).

6. Microrganismos e Enzimas Sacarificantes

Algumas bactérias produzem *cellulosomes* – complexo de proteínas extracelulares – que hidrolisam moléculas de celulose mediante a catálise por meio de um arsenal de enzimas em sincronia (NOACH *et al.*, 2010 e DOI e KOSUGI, 2004). Genes de *cellulosomes* foram inseridos em fungos – organismos mais resistentes ao etanol – e resultados importantes foram obtidos por Tsai *et al.* (2009) na Universidade da Califórnia, Riverside.

Descobertas científicas de microrganismos capazes de produzir *cellulosomes* foram significativamente publicadas nos últimos anos. Evidências experimentais sugeriam que somente bactérias anaeróbicas eram capazes de produzir *cellulosomes*, mas alguns fungos que excretam tais enzimas foram identificados. A tabela 1 apresenta uma lista desses microrganismos.

¹ CBM ligando-se a polissacarídeos provenientes de espécies gramíneas dicotiledôneas. (Esquerda) visão de cima dos orifícios dos CBM onde os poli/oligosacarídeos se anexam. (Direita) os mesmos orifícios vistos pela lateral. CBM6 e CBM15 estão com os orifícios ligados aos oligossacarídeos. (Verde) aminoácidos aromáticos.

Tabela 1. Bactérias anaeróbicas e fungos produtores de <i>cellulosomes</i>	
Microorganismo	Fonte
Bactérias Anaeróbicas	
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Esgotos
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Esgotos
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Rúmen
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Solo
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Rúmen
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Compostados
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Madeira
<i>Clostridium josui</i>	Compostados
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Fabricação de papel
<i>Clostridium thermocellum</i>	Lodos
<i>Ruminococcus albus</i>	Rúmen
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rúmen
Fungos Anaeróbicos	
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Rúmen
<i>Orpinomyces joyonii</i>	Rúmen
<i>Orpinomyces PC-2</i>	Rúmen
<i>Piromyces equi</i>	Rúmen
<i>Piromyces E2</i>	Fezes

Fonte: DOI E KOSUGI, 2004.

Experimentos científicos comprovam que o sinergismo do complexo fungo-enzimas é mais eficiente na hidrólise da parede celular do que o extrato purificado de glicosidases. A taxa de hidrólise (g-celulose/g-celulase/hora) do complexo com o *Clostridium thermocellum* provou ser até 4,7 vezes maior do que a das celulases. Nesse ensaio, os inibidores tóxicos não foram removidos e a levedura pode se aderir ao substrato celulósico (LU *et al.*, 2006).

Fungos são organismos bastante conhecidos por decompor madeira. O fungo *Postia placenta* é apto à despolimerização de hemicelulose e celulose presentes nos tecidos lenhosos, não obstante ele é incapaz de degradar a lignina. Cientistas em universidades de sete países sequenciaram o DNA do *P. placenta* e fizeram estudos comparativos do seu genoma com o do *Phanerochaete chrysosporium*, um fungo de degradação branca (i.e., metabolizadores de lignina) parente do *P. placenta*. Essa análise comparativa concluiu que o *P. Placenta* sofreu uma mutação genética ao longo da evolução e perdeu a capacidade de hidrólise da lignina. Com base nesses marcadores de DNA, pode ser possível readaptar o *P. Placenta* à catálise de lignina e, desse modo, viabilizar o uso industrial dessa levedura (MARTINEZ *et al.*, 2009).

A produção de enzimas a preços competitivos e em larga escala é “chave” para o sucesso do bioetanol produzido através de rotas bioquímicas. A Genencor, uma das principais empresas fornecedoras de enzimas em escala industrial nos Estados Unidos, reportou a oferta de um produto capaz de hidrolisar e fermentar simultaneamente diversos tipos de biomassas, obtendo-se taxas elevadas de bioetanol. Além da Genencor, outras empresas se empenham em melhorar o rendimento das enzimas, diversificar o número de celulases, reduzir os custos das mesmas e desenvolver microrganismos capazes de produzir enzimas que fermentam D-glicose e D-xilose (ONDREY, 2010; ERICKSON, 2009 e SCHUBERT, 2006).

O foco no desenvolvimento de celulases mais eficientes culminou na elaboração de banco de dados com informações relevantes destas enzimas. A tabela 2 apresenta alguns desses bancos de dados, suas atualizações, número de proteínas sequenciadas e os organismos alvos das celulases.

Tabela 2. Banco de dados de enzimas metabolizadoras de parede celular e seus atributos			
Database	Espécies	Nº de enzimas sequenciadas	Última atualização
CAZy	Archaea, bactéria, vírus, eucariontes	112 398	Semi-mensal
Cell Wall Genomics	<i>Arabidopsis</i> , arroz e milho	2 381	Sem informação
Rice GT Database	Arroz	793	Agosto 2009
MAIZEWALL	Milho	753	Junho 2006
Wheat GTIdb	Trigo	8 300	Janeiro 2008
GHDB	<i>Arabidopsis</i> , arroz	319	Junho 2004
XTH World	<i>Arabidopsis</i> , arroz e tomate	1962 – 2006	Julho 2006
Expansin Database	Plantas	226	Março 2006

Fonte: CAO *et al.*, 2010.

7. Biomassas e Melhoramento Genético

O bagaço e a palha do milho estão entre as biomassas mais promissoras para a produção de bioetanol em larga escala nos Estados Unidos; outras são as cascas de trigo, gramíneas e resíduos orgânicos. Diversas biomassas serão empregadas para atingir as metas de produção do governo americano, haja vista as diversas peculiaridades biogeográficas regionais do país (DOE, 2006).

Por terem rápido crescimento e baixa necessidade de nutrientes e agrotóxicos, as gramíneas perenes são significativamente eficientes na produção de bioetanol. Um estudo na universidade de Nebraska concluiu que o bioetanol produzido da gramínea *Panicum virgatum*, cultivada em terras marginais de dez fazendas na região central dos Estados Unidos, logrou elevado rendimento energético (i.e., baixo uso de insumos agrícolas e alta taxa de conversão), e o bioetanol produzido através desta planta reduziu em 94% as emissões de GEF em comparação com a gasolina (SCHMER, 2008).

O estudo do genoma de organismos susceptíveis à produção de bioenergia é conhecido como *biogenomics*. Diversas plantas mais amenas à degradação enzimática estão sendo estudadas, dentre as quais se inclui a árvore *Populus Tricarpa* – primeira árvore a ter o genoma sequenciado –, devido ao seu rápido crescimento e compacto DNA (ZHOU, 2009).

A tabela 3 mostra quais são os organismos mais importantes para a produção de bioenergia e o estado das pesquisas sobre os seus genomas.

Tabela 3. Genomas dos organismos usados na produção de bioenergia

Organismo	Genoma (tamanho em megabases)	Status
Produtores de biomassa		
<i>Populus trichocarpa</i>	480	Completo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	120	Completo
<i>Monilohot esculenta</i>	770	Em progresso
<i>Sorghum bicolor</i>	760	Em progresso
<i>Eucalyptus globulus</i>	600	Em progresso
<i>Brachypodium distachyon</i>	355	Em progresso
<i>Elaeis guineensis</i>	~3400	Em progresso
<i>Panicum virgatum</i>	~5 600	Em progresso
<i>Setaria italica</i>	~515	Em progresso
Degradadores de biomassa		
<i>Acidothermus cellulolyticus 11 B</i>	2,4	Completo
<i>Bacillus pumilis SAFR 032</i>	3,7	Completo
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903</i>	3,0	Completo
<i>Clostridium phytofermentans ISDg</i>	4,8	Completo
<i>Clostridium thermocellum ATCC 27405</i>	3,8	Completo
<i>Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406</i>	4,4	Completo
<i>Flavobacterium johnsoniae UW 101</i>	6,1	Completo
<i>Rubrobacter xylanophilus DSM 9941</i>	3,2	Completo
<i>Saccarophagus degradans</i>	5,1	Completo
<i>Thermobifida fusca strain YX</i>	3,6	Completo
<i>Clostridium celluloliticum H 10</i>	4,0	Em prospecção
<i>Elusimicrobium minutum Pei 191</i>	1,6	Em prospecção
<i>Fusarium solani</i>	51	Em prospecção
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	35,1	Em prospecção
<i>Postia placenta</i>	33	Em prospecção
<i>Sagittula stellata E-37</i>	5,3	Em prospecção
<i>Trichoderma reesei</i>	33	Em prospecção
<i>Cellulomas flavigena DSM 20109</i>	~4,0	Em progresso
<i>Cellvibrio japonicus Ueda 107</i>	~6,0	Em progresso
<i>Fibrobacter succinogenes S85</i>	~3,8	Em progresso
<i>Ruminococcus albus</i>	4,0	Em progresso
<i>Teredinibacter tunerae T7902</i>	~2,0	Em progresso
<i>Termite hindgut community</i>	SI ³	Completo
Degradadores de biomassa do gênero Poplar		
<i>Anoplophora glabripennis</i>	SI	Em progresso
Produtores de combustível		
<i>Clostridium acetobutylicum ATCC 824</i>	4,0	Completo
<i>Clostridium beijerinckii NCIMB 8052</i>	6,0	Completo
<i>Pichia stipitis</i>	15,4	Completo
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis MB4</i>	2,7	Completo
<i>Zymomonas mobilis ZM4</i>	2,1	Completo
<i>Bacillus coagulans 36D1</i>	2,9	Em prospecção
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus 39E</i>	2,4	Em prospecção
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	~4,0	Em prospecção

Fonte: RUBIN, 2008.

Estudos para “amolecer” a parede celular de plantas estão sendo feitos. Lewis *et al.* (2010) reportou resultados significativos numa pesquisa que objetivou diminuir a recalcitrância da palha do milho à hidrólise – e também maximizar o grau de açúcares fermentáveis nos grãos – mediante vários cruzamentos entre mudas de *Zea mays* geneticamente recombinadas. Os resultados apresentaram grãos com elevado teor de açúcar e palhas mais suscetíveis à sacarificação.

Objetivando estudar a interferência da pectina à exposição das fibras de celulose, pesquisadores na Itália produziram variantes da planta *Arabidopsis* com menos homogalacturanos esterificados, mediante a expressão da enzima fúngica poligalacturonase e um inibidor da pectina metilesterase. Esse estudo identificou o aumento da atividade das glicosidases em *Arabidopsis* (LIONETTI, 2010).

Minimizar a formação da lignina durante a etapa de crescimento das plantas é uma tática promissora (CHEN e DIXON, 2007). Buanafina *et al.* (2010) conseguiu reduzir a expressão de derivados do ácido ferúlico envolvidos na síntese de lignina em gramíneas (e.g., *Festuca arundinacea* L). A inibição ocorreu pela expressão de uma esterase do ácido ferúlico derivada do fungo *Aspergillus niger*. A degradação da parede celular dessas gramíneas teve significativamente menos inibição do que as plantas de controle.

8. Conclusões

A meta de produção de bioetanol do governo americano é muito arrojada e exige elevados investimentos em pesquisas e tecnologias para que o bioetanol se torne competitivo com a gasolina. A celulose é uma fonte de energia abundante, entretanto, é muito bem protegida contra a sacarificação. Dominar essa recalcitrância da natureza é um dos maiores desafios da biotecnologia moderna. Os ganhos ambientais do uso de combustíveis renováveis são extraordinários, pois literalmente “queimamos” materiais fósseis que liberam gases nocivos ao meio ambiente.

Os cristais de celulose impõem um grande desafio à eficiência das rotas bioquímicas. É preciso, então, desenvolver técnicas eficazes na desestruturação desses cristais; se não, corre-se o risco de frequentes oscilações dos rendimentos na produção de bioetanol.

No pré-tratamento, deve-se investir mais em estudos que maximizem a integração dessa etapa à hidrólise e à fermentação. Faz-se necessário entender ao máximo a qualidade e quantidade dos compostos inibidores para viabilizar a construção de métodos mais limpos. Ademais, seria ideal suprimir a fase de pré-tratamento mediante o aperfeiçoamento dos insumos e processos.

O bioprocessamento é a etapa mais crítica para a consecução da meta do governo americano. A integração de todos os processos em um só bioreator é determinante para viabilizar o bioetanol em larga escala. Controlar e aperfeiçoar todas as variáveis que intervêm no rendimento dos processos de produção de bioetanol será vital para o êxito do CBP. Deve-se, também, evitar a miscelânea de técnicas e equipamentos incongruentes com a operacionalidade do CBP, e minimizar os conflitos de interesse oriundos dos desenvolvedores das tecnologias.

As pesquisas de melhoramento genético de microrganismos e desenvolvimento de enzimas são as fases mais avançadas. Desse modo, é indispensável integrar essa gama de estudos científicos e tecnologias para construir um modelo de bioprocessamento adaptado aos mais diferentes tipos de biomassas e regiões dos Estados Unidos. O Departamento de Energia deve, nesse âmbito, exercer um papel mais pragmático e integrador.

O melhoramento da parede celular e desenvolvimento de plantas que competem minimamente por nutrientes e solo são promissores. A gama de vegetais úteis para bioenergia vem crescendo continuamente, porém, observa-se

um ritmo menos acelerado na produção de plantas que possam se desenvolver em terras marginais ou em sistemas biológicos mais sustentáveis.

Sendo assim, devem-se unir mais esforços para modificar com sucesso o paradigma dos combustíveis fósseis. As mudanças geralmente são sempre recalcitrantes tanto no domínio vegetal quanto humano. No entanto, através de bons exemplos, resultados e persistência, os Estados Unidos rumam no caminho certo para que o bioetanol se torne uma das principais fontes de combustível do país.

Referências bibliográficas

- ALRIKSSON, BjoRn; ILONASARVARI, Horvath; LEIF, Jonsson. Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry*, Amsterdã, Holanda, v.45, f.2, p.264(8), Fevereiro 2010.
- ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, Amsterdã, Holanda, v.101, f.13, p.4851(11), Junho 2010.
- ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, Londres, Inglaterra, v.3, p.4, Fevereiro 2010.
- BALS, Bryan; ROGERS, Chad; JIN, Mingjie; BALAN, Venkatesh; DALE, Bruce. Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for Biofuels*, Londres, Inglaterra, v.3, f.1, p.1, Janeiro 2010.
- BUANAFINA, Marcia; LANGDON, Tim; HAUCK, Barbara; DALTON, Sue; TIMMS-TARAVELLA, Emma; MORRIS, Phillip. Targeting expression of a fungal ferulic acid esterase to the apoplast, endoplasmic reticulum or golgi can disrupt feruloylation of the growing cell wall and increase the biodegradability of tall fescue. *Plant Biotechnology Journal*, Oxford, Inglaterra, v.8, p.316(16), Abril 2010.
- BUCKERIDGE, Marcos; DOS SANTOS, Wanderley; DE SOUZA, Amanda. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. *Diretrizes de Políticas Públicas para a pesquisa científica e tecnológica em bioenergia no estado de São Paulo: Coletânea FAPESP PPP Etanol 2007*. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/Coletanea.php?cap=3> Acesso em: 9 de Jun. 2010.
- CAO, Peijian; JUNG, Ki-Hong; RONALD, Pamela. A Survey of Databases for Analysis of Plant Cell Wall-Related Enzymes. *BioEnergy Research*, Dordrecht, Holanda, v.3, f.2, p.108-115, Junho 2010.
- CHEN, Fang; DIXON, Richard. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, Londres, Inglaterra, v.25, f.7, p. 759-761, Julho 2007.
- DERBYSHIRE, Paul; MCCANN, Maureen; ROBERTS, Keith. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, Londres, Inglaterra, v.7, f.31, p.31, Junho 2007.
- DOE, US. *Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda*, DOE/SC 0095, US Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy 2006. Disponível em: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/> Acesso em: 01 Jun. 2010.

DOI, Roy; KOSUGI, Akihiko. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews Microbiology*, Londres Inglaterra, v.2, f.7, p.541(11), Julho 2004.

ERICKSON, Brent. "Genencor Accellerase 1500." *Industrial Biotechnology*, New Rochelle, NY, v.5, f.1, p8(1), Março 2009.

GONÇALVES, José Alberto. A distante revolução da celulose: grande aposta da política energética americana, a produção em larga escala do etanol celulósico passa por dificuldades -- e deve levar mais tempo do que o previsto. *Exame*, São Paulo, v.44 , f.5 pS16-20, Março 2010.

HORTON, Robert; MORAN, Laurence; SCRIMGEOUR, Gray; PERRY, Marc; RAWN, David. *Principles of Biochemistry: Fourth Edition*. Upper Saddle River, NJ USA: Pearson Education Internaional, 2006.

KLIEMANN, Erika. Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá. Florianópolis: UFSC, 2006. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

KRISTENSEN, Jan; THYGESSEN, Lisbeth; FELBY, Claus; JORGENSEN, Henning; ELDER, Thomas. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, Londres, Inglaterra, v.1, f.5, p.5, Abril 2008.

LEWIS, Magan Friskop; LORENZANA, Robenzon; JUNG, Hans-Joachim; BERNARDO, Rex. Potential for simultaneous improvement of corn grain yield and stover quality for cellulosic ethanol. *Crop Science*, Madison, WI, v.50,f.2, p.516(8), Abril 2010.

LIONETTI, Vincenzo; FRANCOCCI, Fedra; FERRARI, Simone; VOLPI, Chiara; BELLINCAMPI, Daniela; GALLETI, Roberta; D'OVIDIO, Renato; DE LORENZO, Giulia; CERVONE, Felice. Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Richardson, TX, v.107, f.2 p.616(6), Janeiro 2010.

LORA, Electo Eduardo Silva; CORAL, Doris del Socorro Obando; ROCHA, Mateus Henrique. Rotas termoquímica e bioquímica para biocombustíveis: estado-da-arte, oportunidades e desafios para o Brasil. *AGRENER GD 2008 – 7º Congresso Internacional sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural*. Disponível em: <http://www.nipeunicamp.org.br/agrener/anais/2008/Artigos/23.pdf?3bc2dbeb0a7bf779fe39c865b70b3b3f=0d57f4f84e4640be3c9224acbd738f5a> Acesso em: 13 Jun. 2010.

LU, Yanpin; ZHANG, Yi-Heng Percival; LYND, Lee. Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Richardson, TX, v.103, f.44, p.16165(5), Outubro 2006.

LYND, Lee; LASER, Mark; BRANSBY, David; DALE, Bruce; DAVISON, Brian; HAMILTON, Richard; HIMMEL, Michael; KELLER, Martin; MCMILLAN, James; SHEEHAN, John; WYMAN, Charles. How biotech can transform biofuels: for cellulosic ethanol to become a reality, biotechnological solutions should focus on optimizing the conversion of biomass to sugars. Nature Biotechnology, Londres, Inglaterra, v.26, f.2, p.169(4), Fevereiro 2008.

LYND, Lee; CUSHMAN, Janet; NICHOLS, Roberta; WYMAN, Charles. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science, Washington, D.C., v.251, f.4999, p.1318-1324, Março 1991.

LYND, Lee; VAN ZYL, Willem; MCBRIDE, John; LASER, Mark. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Current Opinion in Biotechnology, Amsterdã, Holanda, v.16, f.5, p.577(7), Outubro 2005.

MARTINEZ, Diego; CHALLACOMBE, Jean; MORGENSTERN, Ingo; HIBBETT, David; SCHMOLL, Monika; KUBICEK, Christian; FERREIRA, Patricia; RUIZ-DUENAS, Francisco; MARTINEZ, Angel; KERSTEN, Phil; HAMMEL, Kenneth E.; WYMELENBERG, Amber Vanden; Gaskell. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Richardson, TX, v.106, f.6, p.1954(6), Fevereiro 2009.

MCCARTNEY, Lesley; BLAKE, Anthony; FLINT, James; BOLAM, David; BORASTON, Alisdair; GILBERT, Harry; KNOX, J. Paul. Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Richardson, TX, v.103, f.12, p.4765(6), Março 2006.

MOUTTA, Rondinele de Oliveira. Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrosilado hemicelulósico visando à utilização de processos em produção de bioetanol. Lorena: USP, 2009. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

MURRY, John. Organic Chemistry: 6 ed. Belmont, CA USA: Thomson Learning, 2004.

NOACH, Ilit; BARAK, Yoav; FROLOW, Felix; LAMED, Raphael; BAYER, Edward. Homology swapping of intrinsic secondary structural elements between cellulosomal types I and II cohesins and their effect on dockerin binding. Pure and Applied Chemistry, Research Triangle Park, NC, v.82, f.1, p.193(12), Janeiro 2010.

ONDREY, Gerald. Bioalcoholic fuels: the U.S. is turning to bioethanol as one of its saviors from foreign oil; but another alcohol is emerging that promises to be a better renewable fuel supplement. *Chemical Engineering*, Rockville, MD, v.117, f.5, p.25(5) Maio 2010.

PARK, Sunkyu; BAKER, John; HIMMEL, Michael; PARILLA, Philip; JOHNSON, David. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, Londres, Inglaterra, v.3, f.10, p.10, Maio 2010.

PERRIN, Robyn; DEROCHER, Amy; BAR-PELED, Maor; ZENG, Weiqing; NORAMBUENA, Lorena; ORELLANA, Ariel; RAIKHEL, Natasha; KEEGSTRA, Kenneth. Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis. *Science*, Washington, D.C, v.284, f.5422, p.1976, Junho 1999.

PINTO, Ricardo; AMARAL, Antonio; FERREIRA, Eugenio; MOTA, Manuel; VILANOVA, Manuel; RUEL, Katia; GAMA, Miguel. Quantification of the CBD-FITC conjugates surface coating on cellulose fibres. *BMC Biotechnology*, Londres, Inglaterra, v.8, f.1, p.1, Janeiro 2008.

ROSSEL, Carlos. Fermentação alcoólica do licor resultante da hidrólise. III workshop do projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria do Estado de São Paulo, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Rossel%20Fermenta%E7%E3o%20do%20Hidrolisado.pdf> Acesso em: 13 de Junho de 2010).

RUBIN, Edward. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, Londres, Inglaterra, v.454, f.7206, p.841-846, Agosto 2008.

SAITO, Irene; CABELLO, Cláudio. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. *Energia na Agricultura*, Botucatu, SP, v.21, f.3, p. 33-34, Junho 2006.

SCHMER, M.R.; VOGEL, K.P.; MITCHELL, R.B.; PERRIN, R.K.. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Richardson, TX, v.105, f.2, p.464(6), Janeiro 2008.

SCHUBERT, Charlotte. Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*, Londres, Inglaterra, v.24, f.7, p.777(8), Julho 2006.

SHELLEY, Suzanne. Renewable feedstocks: trading barrels for bushels. *Chemical Engineering*, Rockville, MD, v.116, f.6, p.16(3), Junho 2009.

SLADE, Raphael; BAUEN, Ausilio; SHAH, Nilay. The greenhouse gas emissions performance of cellulosic ethanol supply chains in Europe. *Biotechnology for Biofuels*, Londres, Inglaterra, v.2, p.15, Agosto 2009.

TSAI, Shen-Long; OH, Jeongseok; SINGH, Shailendra; CHEN, Ruizhen; CHEN, Wilfred. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v.75, f.19, p.6087-6093, Outubro 2009.

USDA; DOE. Sustainability of Biofuels: Future Research Opportunities. Report from the October 2008 Workshop, DOE/SC-0114. US Department of Energy Office of Science e US Department of Agriculture. Disponível em: <http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/sustainability/> Acesso em: 01 Jun. de 2010.

VIEGAS, A.; BRÁS, NF; CERQUEIRA, NM; FERNANDES, PA; PRATES, JA; FONTES, CM; BRUIX, M; ROMÃO, MJ; CARVALHO, AL; RAMOS, MJ; MACEDO, AL; CABRITA, EJ. Molecular determinants of ligand specificity in family 11 carbohydrate binding modules - an NMR, X-ray crystallography and computational chemistry approach. *FEBS Journal*, Oxford, Inglaterra, v.275, f.10, p.2524(12), Maio 2008.

ZHOU, Fengfeng; XU, Ying. RepPop: a database for repetitive elements in *Populus trichocarpa*. *BMC Genomics*, Londres, Inglaterra, v.10, f.14, p.14, Janeiro 2009.