

SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS CELULÓSICOS COM BACTÉRIAS RECOMBINANTES COMO ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DO EFEITO ESTUFA

André Oliveira de Souza Lima¹

André Luis Rodrigues²

RESUMO

Atualmente, o intenso uso de veículos automotores contribui para o aumento do efeito estufa. Uma das estratégias para a redução na emissão de gases poluentes é a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis. Neste contexto, o emprego do etanol vem apresentando contribuição significativa. Contudo, durante a produção do álcool de cana-de-açúcar, também são gerados subprodutos celulósicos que eventualmente são queimados para a concomitante geração de energia. Alternativamente à queima, o processo de bioconversão microbiana vem permitindo a geração de produtos de alto valor agregado (etanol, enzimas e alimentos). Tal processo, conhecido por sacarificação enzimática da celulose em glicose, requer a ação de três grupos de celulasas (endoglucanases, exoglucanases e beta-glucosidases). Entretanto, são raros os exemplos de microrganismos cultivados industrialmente que apresentem a capacidade de hidrolisar totalmente o polissacarídeo celulose na forma cristalina. Apesar disso, a construção de bactérias geneticamente modificadas, pode capacitá-las na sacarificação de resíduos celulósicos e/ou na síntese de álcool. Neste sentido, conclui-se que a obtenção de organismos recombinantes representa uma estratégia alternativa para a produção de álcool. Tal processo poderá contribuir para a redução do preço final deste produto, incluindo-o definitivamente em nosso cotidiano em substituição aos combustíveis fósseis e, conseqüentemente, reduzindo a expansão do efeito estufa.

Palavras-chave: sacarificação, bactérias recombinantes, efeito estufa.

ABSTRACT

Use of recombinant bacteria for celulosic residues saccharification as an strategy for green house effects migration. The extensive use of motor vehicles contributes to the greenhouse effect, since combustion of fossil fuels generates greenhouse gases.

¹ Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

² Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

Substitution of these fossil fuels by biofuels is one of the strategies employed for reduction of greenhouse gases. For instance, the substitution of gasoline and diesel oil by ethanol produced from sugar cane in the automotive industry has been playing an important role regarding the reduction of greenhouse gases emission. Nevertheless, during this process large amounts of cellulosic wastes are generated. Although these by-products are frequently burned to generate energy they may be bioconverted by microorganisms into products with high aggregate value such as ethanol, enzymes, and food. This process is called saccharification and requires the action of three kinds of enzymes (endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases) known as cellulases. Microorganisms normally used in industrial processes, which are capable to hydrolyze crystalline cellulose into glucose, are rare in nature. Therefore, the development of recombinant bacteria for saccharification of cellulosic residues represents an alternative way that results in the production of ethanol at reduced costs and, therefore, contributes to the use of this renewable source to reduce greenhouse gases generation.

Keywords: saccharification, recombinant bacteria, greenhouse effect.

INTRODUÇÃO

O efeito estufa é produto da ação de uma camada de gases que envolvem a atmosfera e prendem a energia no planeta. Trata-se de um fenômeno natural, mas durante os últimos anos aumentou devido aos processos de combustão provocados pelo homem, principalmente os associados à queima de hidrocarbonetos, como o aumento da frota automobilística e das atividades industriais. Entre os gases mais tóxicos envolvidos no efeito estufa, podem-se citar o dióxido de carbono (CO₂), o metano, o óxido de azoto e os clorofluorcarbonos (CFCs). Devido ao fato de ainda não termos tomado medidas drásticas de forma a controlar a emissão de gases de efeito estufa, é quase certo que teremos que enfrentar um aumento da temperatura global. Entre os efeitos das mudanças climáticas podem ser descritas inundações, ondas de calor, disseminação de doenças, etc. Como exemplo das conseqüências do efeito estufa, no ano de 2003, a Europa sofreu com temperaturas extremamente elevadas, o que acarretou em Paris, um incremento de 140% no número de mortes em relação aos anos anteriores (Vandentorren et al., 2004). Também são incluídos como possíveis conseqüências do efeito estufa o derretimento de geleiras em montanhas, o desprendimento de icebergs e a elevação do nível do mar (Vogt, 2006). Projeções de aumento significativo de temperatura são estimadas para as próximas décadas. Segundo o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), entre os anos de 2021-2050 somente os gases de efeito estufa contribuirão com aumento de 1,6 °C na temperatura da Terra (intervalo de 1,0-2,1 °C) (Houghton et al., 2001).

A fim de reduzir os impactos nas próximas gerações, em 1997 foi estabelecido um acordo internacional conhecido como Protocolo de Kyoto. Os países desenvolvidos signatários deste documento se comprometeram, a partir de fevereiro de 2005, a reduzir as emissões de gases-estufa e garantir um modelo de crescimento limpo nos países em desenvolvimento. O documento prevê que entre 2008 e 2012, os países desenvolvidos reduzam suas emissões em 5,2% em relação aos níveis medidos em 1990. Entre os países signatários (atualmente 161), o Brasil também participa na categoria de país em desenvolvimento (UNFCCC, 2006). Apesar de não ser obrigado a atingir as metas de redução até 2012, o Brasil há muitos anos vem colaborando na redução da emissão de gases de efeito estufa, por meio da implementação de programas estimulando o uso de combustíveis renováveis. Tal parcela de contribuição é muito importante, pois, dados mundiais de 1995, indicam que o setor de transportes é responsável por 22% de todo o dióxido de carbono produzido, e anualmente, este valor aumenta em cerca de 2,5% (Nakicenovic e Swart, 2000). O Brasil entrou na tecnologia dos biocombustíveis em 1974, com o início do Programa Nacional do Álcool - Proálcool. Em poucos anos, com o desenvolvimento tecnológico automotivo e da produção de álcool, carros movidos exclusivamente a álcool foram lançados. Apenas uma década depois do início do programa, a produção de álcool era plena e nove em cada dez carros novos eram movidos a álcool. O Proálcool criou mais de 500 mil empregos e permitiu que o Brasil reduzisse a importação de petróleo. Entretanto, uma brusca redução no preço do petróleo bem como modificações na política nacional do álcool, fizeram com que a aquisição de carros a álcool declinasse na década de 90, atingindo um mínimo de 0,1% em 1998 (Houghton et al., 2001). Apesar disso, é estimado que o uso do álcool entre 1975 e 1998, possa ter evitado a emissão de 385 Mt de CO₂ (Pinguelli e Ribeiro, 1998).

Atualmente, o Brasil produz o álcool hidratado usado para mover veículos a álcool e bi-combustíveis. Também o álcool anidro é adicionado à gasolina na proporção de 25%. Segundo Nakicenovic e Swart (2000), a adição do álcool à gasolina representa uma redução anual de 11% na emissão de dióxido de carbono. Além disso, tal procedimento eliminou totalmente os aditivos ambientais venenosos (chumbo tetraetila e o MTBE – metil-térccio-butil-éter, originário do petróleo) da matriz de combustíveis brasileira, contribuindo significativamente na redução de poluentes. Portanto, o uso do álcool combustível no Brasil tem impulsionado o desenvolvimento tecnológico, assegurando o suprimento de energia, gerando empregos, evitando a poluição local e contribuindo para a redução do efeito estufa (Houghton et al., 2001).

REVISÃO DA LITERATURA

A celulose é o constituinte principal dos vegetais, consistindo na matéria orgânica mais abundante do mundo. A estrutura básica desse material consiste de um polímero linear com 8.000-12.000 unidades de glicose, unidas entre si por ligações 1,4-beta-glicosídicas. Nos vegetais, a molécula de celulose é arranjada em fibrilas consistindo de várias moléculas de celulose paralelas unidas por pontes de hidrogênio, as quais ocorrem ligadas à lignina e à hemicelulose (Matulova et al., 2005). Como resultado da associação dos diferentes tipos de polímeros que compõem a matéria vegetal, obtém-se um material de estrutura rígida e resistente ao ataque enzimático, dessa forma a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente (Enari, 1983).

Dentre os materiais que fazem parte dos subprodutos gerados pela agroindústria, a celulose apresenta-se como um dos mais abundantes, estando presente em resíduos, tais como: bagaço da cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de milho, serragem, entre outros. Por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar tem sido descartado em rios acarretando a lixiviação dos mesmos. Já os resíduos da produção de arroz, quando não são queimados para a geração de energia, são depositados em estradas vicinais ou lançados clandestinamente nos mananciais de água, acarretando graves problemas ambientais (Della, 2005). Em termos nacionais, a geração de resíduos celulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar e a casca de arroz podem ser estimados em aproximadamente 60 e 2 Mt/ano, respectivamente (CEPA/SC, 2004; PROCANA, 2007). Felizmente, grande parte do bagaço de cana-de-açúcar produzido, principalmente o material proveniente do estado de São Paulo, tem sido queimado para a geração de energia elétrica. Apesar dos benefícios advindos dessa prática, esta também contribui com a emissão de CO₂ para a atmosfera.

Como alternativa ao destino dado aos resíduos celulósicos, estes poderiam ser gerenciados de forma que benefícios interessantes pudessem ser atingidos tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. Isto porque a celulose presente na composição desses subprodutos pode ser hidrolisada enzimaticamente pela ação de microrganismos para a geração de glicose, pelo processo chamado sacarificação. Segundo Pandey e Pandey (2002), a casca de arroz é composta por 52% de celulose, 28% de lignina e de 20% de hemicelulose. O mesmo ocorre com o bagaço de cana-de-açúcar que apresenta aproximadamente 46,6% ($\pm 8,6$) de celulose, 25,2% ($\pm 4,3$) de hemicelulose e 20,7% ($\pm 5,4$) de lignina (Toit et al., 1984; Monteiro et al., 1991; Pandey e Pandey, 2002;). Portanto, a riqueza em celulose desses dois resíduos, bem como sua disponibilidade a um baixo custo, representam um importante recurso para a produção de glicose via processo de sacarificação (Reyes et al., 1998; Fujita et al., 2004).

A produção de etanol, ou a síntese de qualquer produto de origem microbiana a partir de resíduos celulósicos, inicia-se pela deslignificação do material lignocelulósico, ocasionando assim a separação da celulose, hemicelulose e lignina. Para a realização desta separação, já foram descritos diferentes tipos de processos, dentre os quais podem ser destacados o uso de ácidos (Fogel et al., 2005; Reyes et al., 1998) ou o emprego de vapor (Moniruzzaman, 1996). Em seguida, deve ocorrer a despolimerização da celulose e da hemicelulose para liberação de açúcares, os quais serão utilizados pelo microrganismo para a síntese do produto de interesse. Entre os principais produtos que podem ser gerados por este procedimento, destacam-se o etanol (Grohmann, 1993; Lee, 1997; Krishna e Chowdary, 2000; Mielenz, 2001; Lawford e Rousseau, 2003), açúcares (Fogel et al., 2005), bioplástico (Silva et al., 2004), ácidos orgânicos (Tanaka et al., 2006), *Single Cell Protein* (SCP), enzimas, etc.

Na grande maioria dos processos estudados nos países da América do Norte e Europa, a conversão da celulose em monossacarídeos tem sido efetuada por meio do emprego de enzimas conhecidas como celulases (Kennedy e Hossain, 1992; Hayn et al., 1993; Lynd et al., 2002; Fujita et al., 2004). Estes monossacarídeos são posteriormente convertidos em etanol (Grohmann, 1993; Lee, 1997). Segundo o IPCC (Houghton et al., 2001), o *National Renewable Energy Laboratory* dos Estados Unidos, há cerca de dez anos mantêm uma planta que processa enzimaticamente uma tonelada/dia de resíduos celulósicos. Este processo tem sido estimulado e destacado pelo IPCC, pois permite a produção de combustíveis renováveis, além de reduzir a emissão de gases com efeito-estufa (Lynd et al., 1991).

Atualmente, muito se conhece sobre o processo de hidrólise da celulose cristalina à glicose, sendo determinado que no mínimo três grupos de celulases estão envolvidos (Nakari-Setälä e Penttilä, 1995; Seiboth et al., 1997; Srisodsuk et al., 1997; Cohen et al., 2005). Dezenas de celulases já foram descritas entre os mais diversos grupos microbianos. Muitas vezes, estas enzimas além de terem sido isoladas e caracterizadas, também tiveram o gene que as codifica determinado. Segundo Lynd et al. (2002), as celulases atuam de forma sinérgica e diferentemente conforme o organismo e o substrato, e podem ser genericamente caracterizadas como: beta-endoglucanases, beta-exoglucanases ou celobiohidrolases e beta-glucosidases. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam internamente ligações glicosídicas (α -1,4), atuando sobre celooligossacarídeos, celulose contendo ácido fosfórico, celulose substituída como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC); porém não atacam a celobiose. As exoglucanases (EC 3.2.1.91) clivam a celulose e celooligossacarídeos a partir do terminal redutor e não redutor da cadeia desses polímeros, liberando o

dissacarídeo de celobiose. Esta enzima não ataca celulose substituída e celobiose. Finalmente as beta-1,4 glucosidases (EC 3.2.1.21), hidrolisam a celobiose e outros celo-oligossacarídeos curtos à glicose. Neste contexto, o uso de microrganismos superprodutores de celulases, ou celulases melhoradas têm despertado interesse (Lima, 2001; Mielenz, 2001; Fujita et al., 2004; Lima et al., 2005), tendo em vista que algumas celulases naturais evoluíram somente para satisfazer as necessidades do próprio microrganismo e não a total sacarificação da celulose, como seria desejado em um processo industrial.

Para o uso de microrganismos na produção de álcool ou de qualquer outro produto, a partir de resíduos celulósicos como substrato, podem ser empregadas basicamente duas estratégias. A primeira, que utiliza dois organismos, um responsável pela sacarificação do resíduo e o outro pela síntese do produto em si. O segundo processo é conhecido como *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Neste, o microrganismo além de ser capaz de produzir álcool, ou outro produto, também é apto a sintetizar celulases, ou estas são adicionadas ao sistema durante o cultivo (Krishna e Chowdary, 2000; Mielenz, 2001). Nestes processos, os principais procariotos produtores de celulases utilizados são *Bacillus* spp., *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acetobacter xylinum*, etc. Entre as bactérias produtoras de etanol destacam-se *Klebsiella oxytoca*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium thermocellum* e *Cellulomonas fimi*; sendo as duas últimas celulolíticas (Lynd et al., 2002; Demain et al., 2005). Entre os principais eucariotos enquadram-se *Trichoderma reesei*, como produtor de celulases e *Saccharomyces cerevisiae*, como produtor de etanol. Segundo dados da literatura, as pesquisas que têm como objetivo o melhoramento dos resultados obtidos nos processos de bioconversão de resíduos celulósicos, baseiam-se principalmente na otimização das propriedades das celulases utilizadas no processo (resistência a variações de pH do meio, termoestabilidade, etc.); bem como no melhoramento dos organismos capazes de realizar ambos os processos de bioconversão e geração de produtos de interesse econômico.

Com o objetivo de tornar os processos de bioconversão mais eficientes, atualmente os pesquisadores têm empregado métodos de engenharia genética, metabólica e de proteínas (Aristidou e Penttila, 2000; Kataeva et al., 2001; Lynd et al., 2002; Bro et al., 2006). Para tanto, os genes de interesse podem ser inseridos em vetores de expressão (plasmídios, cosmídios, etc.) e então introduzidos por transformação genética em determinados organismos. Uma vez na célula receptora, o DNA exógeno pode integrar-se ao genoma ou permanecer na forma extracromossômica. Em ambos os casos, a expressão do gene de interesse, conhecida

como expressão heteróloga, pode viabilizar a produção da proteína na célula hospedeira. Assim, podem ser criados microrganismos designados para atividades específicas, os quais muitas vezes não ocorrem na natureza, e podem ser aplicados em determinados processos industriais.

Especificamente, no que se refere ao melhoramento de microrganismos para o processo de bioconversão de resíduos celulósicos a etanol, podemos citar vários casos. Por exemplo, Minamiguchi et al. (1995) conferiram a levedura *S. cerevisiae* a capacidade de expressar uma endoglucanase do fungo filamentosso *Aspergillus aculeatus*. Já Murai et al. (1998), obtiveram uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de produzir as enzimas beta-glucosidase e FI-carboximetilcelulase de *A. aculeatus*; tornando esta levedura produtora de etanol e capaz de crescer em meios de cultura contendo como única fonte de carbono os açúcares celobiose e celo-oligossacarídeos. A eficiente conversão da molécula de celulose a etanol também foi realizada por Fujita et al. (2002). Neste caso, a levedura expressava a α -glucosidase I de *A. aculeatus* e a endoglucanase II de *T. reesei*. Em um novo ensaio, foi introduzido na levedura mais gene para uma exoglucanase, que melhorou ainda mais a performance desse microrganismo (Fujita et al., 2004).

São vários os relatos de melhoria da bioconversão da celulose por meio do emprego de microrganismos procariotos geneticamente modificados. Entre estes, Wood e Ingram (1992) descreveram a transformação da bactéria *Klebsiella oxytoca*, previamente alterada com os genes para a síntese de etanol de *Zymomonas mobilis*. Além destes genes, foram introduzidos neste organismo genes de endoglucanases de *C. thermocellum*, os quais permitiram a degradação de celulose e síntese de etanol. Resultados positivos também foram obtidos com a introdução de genes de celulases no organismo naturalmente produtor de etanol *Zymomonas mobilis* (Brestic-Goachet et al., 1989). Os genes inseridos foram obtidos a partir dos microrganismos *Erwinia chrysanthemi* e *Acetobacter xylinum*; sendo este último introduzido também em *E. coli* (Okamoto et al., 1994). Dentre as várias construções de celulases que já foram expressas com eficiência em *E. coli*, pode-se citar a expressão da fusão protéica b-glucosidase A (BglA) do organismo hipertermofílico *Fervidobacterium* sp. (Lima, 2001), bem como a clonagem e superprodução de uma endoglucanase termoestável, muito interessante para processos industriais, a EglA de *Bacillus pumilus* (Lima et al., 2005). Em ambos os casos, estas celulases foram ativas e permitiram que o microrganismo recombinante fosse capaz de hidrolisar parcialmente substratos celulósicos. Um cassete de celulases foi construído, contendo as duas enzimas mencionadas anteriormente (BglA e EglA). O vetor foi introduzido em *E. coli* e conferiu a esta bactéria a capacidade de utilizar CMC como única fonte de carbono

para a sua multiplicação (Rodrigues, 2004). Como exemplo de sucesso de SSF com procariotos, podemos destacar um dos trabalhos de Zhou e Ingram (1999). Neste, *K. oxytoca*, contendo os genes relacionados à síntese de etanol (*pdh* e *adhB*) de *Z. mobilis* integrados ao genoma e um plasmídeo com genes de celulases (*celY* e *celZ*) de *E. chrysanthemi*, foi capaz de converter 76% de celulose amorfa em etanol. Outro exemplo foi a capacitação da bactéria *Clostridium acetobutylicum*, produtora de solventes de interesse industrial, como o butanol, para a utilização de celulose como fonte de carbono e energia (Mingardon et al., 2005). Neste caso, genes necessários ao metabolismo da celulose foram clonados a partir do microrganismo *Clostridium cellulolyticum*, permitindo que *Clostridium acetobutylicum* pudesse expressar as enzimas necessárias à degradação da celulose.

Além dos trabalhos descritos, muitos outros provam que a expressão heteróloga de celulases e/ou genes para a síntese de etanol em procariotos, representa uma eficiente estratégia para a questão da bioconversão de resíduos celulósicos. Nestes trabalhos, um ponto importante verificado foi a seleção de promotores constitutivos eficientes, isto é, não dependentes de indução e não vulneráveis à inibição. Por exemplo, Lynd et al. (2002) descreveram avanços com a introdução de promotores de *Z. mobilis*, para a síntese de *celZ* de *E. chrysanthemi* em *E. coli*. O organismo obtido foi capaz de secretar 50% da proteína, a qual perfazia 5% do total da proteína celular. Na construção descrita por Rodrigues (2004), foi utilizado um promotor de *B. pumilus* que além de ser eficiente nas bactérias *E. coli* e *B. pumilus*, também mostrou-se apto a induzir de forma constitutiva a transcrição em *Enterobacter cloacae* e *Methylobacterium* sp.

DISCUSSÃO

A conversão microbiológica de resíduos celulósicos da agroindústria é uma interessante estratégia no combate aos gases de efeito estufa. Tal procedimento tem especial potencial para o Brasil, devido à importância econômica da agroindústria nacional. Em nosso país, são várias as culturas (cana-de-açúcar, arroz, milho, soja, etc) que geram bagaços, palhas e cascas como sub-produtos. Neste contexto, métodos que permitam a melhoria da eficiência do processo de sacarificação certamente são de grande valia.

Devido aos grandes avanços ocorridos na área da genética molecular nos últimos anos, a construção de microrganismos, geneticamente modificados, capazes de hidrolisar mais eficientemente a celulose é uma realidade. Exemplos de sucesso incluem a inserção de genes de celulases de diferentes organismos, ou até mesmo, a

inclusão de genes relacionados à produção de etanol. Inovações como estas que permitam o uso de resíduos para a ampliação da produção de etanol ou a redução de custos de produção, certamente favorecem sua inserção definitiva em nosso cotidiano, e conseqüentemente, contribuem para um desenvolvimento social/econômico mais harmônico com o meio ambiente.

A busca pelo etanol como alternativa aos combustíveis fósseis, tornou o Brasil um dos principais candidatos para o fornecimento desse combustível, ou sua tecnologia de produção, a outros países, como por exemplo, para o Japão e Estados Unidos (Orellana e Neto, 2006). Dessa forma, é certo considerar que a grande quantidade de bagaço de cana-de-açúcar gerado pelos processos de produção de etanol venha a se tornar matéria-prima para outros processos produtivos, como a sacarificação, gerando emprego e desenvolvimento.

CONCLUSÃO

A redução da produção de gases de efeito estufa é uma meta mundial. No Brasil, esta pode ser obtida por meio do melhor aproveitamento de seus resíduos agro-celulósicos. Entre as tecnologias disponíveis para este propósito, a sacarificação destes resíduos e sua bioconversão em álcool tem sido descrita. Desta forma, pode-se concluir que o desenvolvimento de novas linhagens bacterianas mais eficiente neste processo, contribuem para: a) a redução do efeito estufa – devido à substituição da gasolina por álcool (maior disponibilidade de álcool) e diminuição da queima dos resíduos; b) possível redução no preço do álcool, arroz, milho, soja, etc – devido à geração de renda obtida por meio da venda dos subprodutos destas indústrias; c) redução do impacto ambiental dos resíduos da agroindústria – estes terão valor comercial e, portanto, não serão descartados de forma inapropriada no meio ambiente; d) desenvolvimento tecnológico regional e nacional – com tecnologia de ponta para a obtenção dos organismos modificados, que posteriormente poderão ser utilizados em sistemas fechados no país inteiro; e e) benefícios sociais e econômicos – desenvolvimento de recursos humanos qualificados durante a pesquisa e desenvolvimento; e no futuro abertura de novos postos de trabalho para implementação da tecnologia nas indústrias.

REFERÊNCIAS

ARISTIDOU, A.; PENTTILA, M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, **11**(2):187-198.

BRESTIC-GOACHET, A. et al. 1989. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. **Journal of General Microbiology**, **135**:893-902.

BRO, C. et al. 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. **Metabolic Engineering**, **8**(2):102-111.

CEPA/SC. 2004. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina: 2003-2004**. Florianópolis: Editora do Governo do Estado, 377 p.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. 2005. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, **71**(5):2412-2417.

DELLA, P. V. 2005. **Síntese e caracterização do pigmento cerâmico de hematita, obtida a partir de carepa de aço, encapsulada em sílica amorfa obtida a partir de casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 168p.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **69**(1):124-154.

ENARI, T. M. 1983. Microbial Cellulases. In: W. M. Forgy (Org.). **Microbial Enzymes and Biotechnology**. New York: Applied Science Publishers, p. 183-223.

FOGEL, R. et al. 2005. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **122**(1-3):741-752.

FUJITA, Y. et al. 2004. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, **70**(2):1207-1212.

FUJITA, Y. et al. 2002. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**(10):5136-5141.

GROHMANN, K. 1993. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol. In: J. N. Saddler (Org.). **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. Vancouver: CAB International, p. 183-209.

HAYN, M. et al. 1993. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: J. N. Saddler (Org.). **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. Vancouver: CAB International, p. 33-72.

HOUGHTON, J. T. et al. 2001. **Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. New York: Cambridge University Press, 94 p.

KATAEVA, I. A. et al. 2001. Properties and mutation analysis of the CelK cellulose-binding domain from the *Clostridium thermocellum* cellulosome. **Journal of Bacteriology**, **183**(5):1552-1559.

KENNEDY, J. F.; HOSSAIN, M. A. 1992. Cellulose biotechnology and its uses in industrial processes. **The Genetic Engineer & Biotechnologist**, **12**:12-14.

KRISHNA, S.H.; CHOWDARY, G.V. 2000. Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **48**(5):1971-1976.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. 2003. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **105**(108):457-469.

LEE, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, **56**(1):1-24.

LIMA, A. O. et al. 2005. Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **68**(1):57-65.

LIMA, A. O. S. 2001. **Utilização da GFP (*Green Fluorescent Protein*) na Análise da Evolução Dirigida da β -Glucosidase A de *Fervidobacterium* sp.** Tese (Doutorado em Agronomia) - ESALQ, USP, Piracicaba, 116p.

LYND, L. R. et al. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, **251**(4999):1318-1323.

LYND, L. R. et al. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **66**(3):506-577.

MATULOVA, M. et al. 2005. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. **Applied and Environmental Microbiology**, **71**(3):1247-1253.

MIELLENZ, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, **4**(3):324-329.

MINAMIGUCHI, K. et al. 1995. Secretative expression of the *Aspergillus aculeatus* cellulase (FI-CMCase) by *Saccharomy cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **79**(4):363-366, 1995.

MINGARDON, F. et al. 2005. Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and Environmental Microbiology**, **71**(3):1215-1222.

MONIRUZZAMAN, M. 1996. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. **Bioresource Technology**, **55**(2):111-117.

MONTEIRO, J. B. R.; SILVA, D. O.; MORAES, C. A. 1991. Produção de biomassa protéica de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus* em bagaço de cana-de-açúcar. **Revista de Microbiologia**, **22**(2):164-169.

MURAI, T. et al. 1998. Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing beta-glucosidase and carboxymethylcellulase from *aspergillus aculeatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**(12):4857-4861.

NAKARI-SETALA, T.; PENTTILA, M. 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. **Applied and Environmental Microbiology**, **61**(10):3650-3655.

NAKICENOVIC, N.; SWART, R. 2000. **Emissions Scenarios**. Cambridge: Cambridge University Press, 570p.

OKAMOTO, T. et al. 1994. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **42**(4):563-568.

ORELLANA, C.; NETO, R. B. 2006. Brazil and Japan give fuel to ethanol market. **Nature Biotechnology**, **24**(3):232.

PANDEY, P.; PANDEY, A. K. 2002. Production of cellulase-free thermostable xylanases by an isolated strain of *Aspergillus niger* PPI, utilizing various lignocellulosic wastes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **18**(3):281-283.

PINGUELLI, R. L.; RIBEIRO, S. K. 1998. Avoiding emissions of carbon dioxide through the use of fuels derived from sugar cane. **Ambio**, **27**(6):465-470.

PROCANA. Os impressionantes números do setor (Safrá 2006/07). Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>. Acesso em: 2 maio 2007.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. 1998. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. **Química Nova**, **21**(X):140-143.

RODRIGUES, A. L. 2004. **Construção de um vetor para a produção da endoglucanase A de *Bacillus pumilus* e da β -glicosidase A de *Fervidobacterium sp.* em *Escherichia coli***. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 48p.

SEIBOTH, B. et al. 1997. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**, **179**(17):5318-5320.

SILVA, L. F. et al. 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **31**(6):245-254.

SRISODSUK, M. et al. 1997. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. **Journal of Biotechnology**, **57**(1-3):49-57.

TANAKA, T. et al. 2006. Production of d-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, **97**(2):211-217.

TOIT, P. J.; OLIVER, S. P.; VAN BILJON, P. L. 1984. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates: Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and aminoacid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, **26**(9):1071-1078.

UNFCCC. Kyoto protocol to the United Nations framework convention on climate change. Disponível em: <<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.html>>. Acesso em: 2 maio 2007.

VANDENTORREN, S. et al. 2004. Mortality in 13 French cities during the August 2003 heat wave. **American Journal of Public Health**, **94**(9):1518-1520.

VOGT, C. Mudanças climáticas – aquecimento global já pode ser sentido. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima06.htm>>. Acesso em: 2 maio 2007.

WOOD, B. E.; INGRAM, L. O. 1992. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**(7):2103-2110.

ZHOU, S.; INGRAM, L. 1999. Engineering endoglucanase-secreting strains of ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **22**(6):600-607.