

# AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR DIFERENTES LEVEDURAS UTILIZANDO O HIDROLISADO ENZIMÁTICO DO BAGAÇO DE CAJU PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

J.A.C. CORREIA<sup>1</sup>, A.P. BANDEIRA<sup>1</sup>, S.P. CABRAL<sup>1</sup>, L.R.B.GONÇALVES<sup>1</sup> e M.V.P. ROCHA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química  
E-mail para contato: jessyca\_1905@hotmail.com; valderez.rocha@ufc.br

**RESUMO** – Este trabalho visa estudar a produção de bioetanol a partir do bagaço de caju, matéria prima abundante no Nordeste. O pré-tratamento do bagaço de caju (BC) com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) e a hidrólise enzimática do Bagaço de caju pré-tratado (BC-PHA) foram avaliados visando a conversão de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis. O BC utilizado neste estudo continha  $20,56 \pm 20,19\%$  de celulose,  $10,17 \pm 0,89\%$  de hemicelulose e lignina  $35,26 \pm 0,90\%$ . O pré-tratamento resultou numa redução no teor de lignina dos sólidos residuais. A combinação das enzimas complexo celulase e  $\beta$ -glucosidase, na proporção de 0,61:0,39, com carga de 30 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> e 66 CBU/g<sub>BC-PHA</sub>, respectivamente, proporcionou a maior concentração de açúcares, com rendimento de glicose (511,68 mg/g<sub>BC-PHA</sub> - 36 g de glicose / L) e rendimento de xilose (237,8 mg/g<sub>BC-PHA</sub> - 13 g/L de xilose). O líquido obtido após hidrólise enzimática foi utilizado para avaliar a produção de etanol utilizando os micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e *K. marxianus* CCA510 a 30 °C e 150 rpm. A concentração de etanol foi semelhante para todos os micro-organismos (aproximadamente 15 g/L) com coeficiente de rendimento de produto com base no consumo de substrato ( $Y_{P/S}$ ) de 0,50 g<sub>Etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> para todas as cepas. No entanto, a levedura *S. cerevisiae* apresentou maior produtividade (  $7,5 \pm 0,37$  g/(L.h)).

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em carboidratos para posterior produção de etanol vem sendo considerada como uma das alternativas mais promissoras em substituição aos combustíveis derivados do petróleo (Hasunuma e Kondo (2012)).O seguinte trabalho tem por objetivo o aproveitamento da biomassa lignocelulósica oriunda da agroindústria do caju. Segundo dados da FAOSTAT, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de castanha de caju com a produção de mais de 230 mil toneladas em 2011. Para a produção de bebidas, o pedúnculo é processado e resultando em 15% (m/m) de bagaço, o que essencialmente não tem valor comercial e é geralmente descartado pela indústria local (Rodrigues *et al.*, 2011). Foi realizado, no presente trabalho, o pré-tratamento do bagaço de caju utilizando peróxido de hidrogênio alcalino. Segundo

Karagöz et al. (2012) e Selig et al. (2009), o peróxido de hidrogênio alcalino atua na redução da cristalização da celulose e com a ação oxidativa dos radicais derivados do peróxido, ocorre elevada despolimerização e solubilização da lignina. A hidrólise enzimática trata-se do processo de conversão do material lignocelulósico em açúcares para uma posterior fermentação (Balat, 2011). Diversas enzimas e parâmetros são avaliadas quanto a capacidade de conversão em açúcares fermentescíveis (McIntosh e Vancov, 2011)

Nesse contexto, este trabalho objetiva o estudo do pré-tratamento do bagaço de caju com peróxido de hidrogênio alcalino para expor a estrutura recalcitrante do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Posteriormente, foram avaliados alguns parâmetros na hidrólise enzimática, tais como a carga de enzimas e a carga de celulose, visando um maior rendimento de glicose e xilose para serem utilizados na produção de etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e *Kluyveromyces marxianus* CCA 510.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Material lignocelulósico: O Bagaço de Caju (BC) utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia no Ceará, Brasil. O BC foi lavado três vezes com água e seco a 60 °C por 24 h, triturado, peneirado e estocado até seu uso a temperatura ambiente. Após peneiramento do material, as partículas que ficaram retidas entre as peneiras de Mesh 20-80 (0,25-0,84 mm) foram utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos.

Enzimas: As enzimas, complexo celulase (NS22074) e  $\beta$ -glucosidase (NS50010), foram gentilmente fornecidas pela Novozymes (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark). A atividade enzimática do complexo celulase e  $\beta$ -glucosidase foram determinadas de acordo com Ghose (1987). O teor de proteínas dos coquetéis enzimáticos foi determinado utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade enzimática e a concentração de proteína dos coquetéis utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade enzimática e a concentração de proteínas das enzimas comerciais utilizadas no estudo de hidrólise do caju do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio

Enzima	Atividade Enzimática	Proteína (mg/ml Extrato)
Complexo celulase	108,12 FPU/ml <sup>i</sup>	28,47
$\beta$ -glucosidase	384,28 CBU/ml <sup>ii</sup>	28,29

### 2.2 Métodos

Pré-tratamento do bagaço de caju com peróxido de hidrogênio alcalino: O bagaço de caju foi pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) utilizando uma concentração de 4,3% v/v, em

agitador orbital a 250 rpm, 35 °C por 6 horas. A metodologia utilizada segue o melhor resultado obtido por Correia *et al.*(2013).

Caracterização da matéria-prima: O bagaço de caju (BC) antes e após o pré-tratamento (BC-PHA) com peróxido de hidrogênio alcalino, foi caracterizado quanto à sua composição de celulose, hemicelulose e lignina segundo a metodologia de Gouveia (2009). Também, realizou-se análise de extraíveis conforme descritos no protocolo NREL/TP-510-42619(Sluite *et al.*, 2008a) e a determinação de sólidos totais e cinza segundo NREL/TP-510-42621 (Sluite *et al.*, 2008b).

Hidrólise Enzimática: A hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado foi realizada segundo a metodologia escrita no protocolo da NREL/TP-510-42629 (Selig *et al.*, 2008) com algumas modificações. Uma quantidade de sólidos lavados referente a 0,3 g de celulose em 30 mL foi adicionada em frascos Erlenmeyers de 150 mL. Em cada frasco, adicionou-se 15,0 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4.8 e 120 µL de tetraciclina (10 mg/mL em 70% v/v em etanol) para prevenir o crescimento microbiano durante a hidrólise. Após, adicionou-se a quantidade de enzima suficiente para se obter a atividade desejada e calculou-se a quantidade de água necessária para completar o volume reacional de 30 mL. Todas as soluções e material sólido foram assumidos apresentar uma densidade específica de 1,00 g/mL. Posteriormente, os frascos foram postos em agitador orbital (Tecnal – TE 422) sob agitação de 150 rpm, a 45 °C por 72 horas. A cada 24 horas, retirou-se 1,0 mL da mistura reacional e centrifugou-se a 10.000g durante 15 minutos e os sobrenadantes foram usados para a análise de açúcares. Após a quantificação dos açúcares na amostra, determinou-se os rendimentos de glicose e xilose segundo Correia *et al.*(2013).

Efeito da carga enzimática na hidrólise enzimática do BC-AHP: O efeito da carga de enzima na hidrólise enzimática foi estudada com variação das cargas enzimáticas do complexo celulase e β-glucosidase de 5,0 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> e 11,0 CBU/g<sub>BC-PH</sub> para 35 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> e 77 CBU/g<sub>BC-PHA</sub>, respectivamente.

Efeito da carga de celulose na hidrólise enzimática do BC-AHP: Com o intuito de obter uma maior concentração de açúcares para posterior conversão em etanol, avaliou-se o efeito da carga de celulose (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g de celulose/100 mL) na sacarificação do BC-PHA, fixando a melhor carga enzimática obtida nos estudos anteriores.

Fermentação do hidrolisado de BC-PHA para a produção de etanol: Avaliou-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e *K. marxianus* CC510 na produção de etanol. Para a propagação do inóculo, foi realizada a metodologia citada por Rodrigues *et al.* (2011). O hidrolisado obtido após a hidrólise enzimática do BC-PHA, foi utilizado como meio de cultivo, sendo suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,0 g/L) e extrato de levedura (5,0 g/L). O pH deste meio foi ajustado para 4,5 e esterilizados a 110 °C por 10 min. As fermentações foram conduzida em Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio sob agitação a 30 °C e 150 rpm em agitador orbital (TECNAL, TE-420) com a concentração inicial de micro-organismo de 1,0 ± 0,1 g/L. Os ensaios foram feitos em triplicata e amostras dos meios de cultivo

(1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos (0 a 10 h) e submetidas à análise de biomassa, glicose, xilose e etanol.

Concentração de biomassa, glicose, xilose e etanol: A concentração celular foi determinada através da análise da densidade ótica (DO) e a concentração de biomassa, expressa em g/L, foi obtida por curva de calibração para cada micro-organismo. A densidade ótica foi acompanhada por espectrofotometria a 600 nm para a levedura do gênero *Saccharomyces* e a 660 nm para as leveduras do gênero *Kluyveromyces*. A concentração dos carboidratos (glicose e xilose) e etanol foram medidas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e coluna Aminex HPX-87H a 65°C, sendo o eluente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mmol/L e vazão de 0,5 mL/min.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do bagaço de caju *in natura* e após pré-tratamento com PHA

A composição do caju bagaço *in natura* utilizado no presente estudo foi de 20,6 ± 2,2% m/m de celulose, 10,2 ± 0,9% m/m de hemicelulose, 35,3 ± 0,9% m/m de lignina, 7,8 ± 0,6% m/m de extraíveis e 1,6 ± 0,1% m/m de cinzas. Após o pré-tratamento usando PHA 4,3% v/v (pH 11,5) a 35 °C e 250 rpm por 6 horas e uma carga de sólidos de 5% m/v, a composição do BC pré-tratado foi 44,2 ± 0,3% m/m de celulose, 18,3 ± 0,9% m/m de hemicelulose, 2,9 ± 0,1% m/m de lignina, 4,9 ± 0,3% m/m de extraíveis e 5,3% ± 0,9% m/m de cinzas. O pré-tratamento com PHA resultou numa diminuição do teor de lignina presente na fibra, indicando que uma fração significativa da lignina foi removida (91,7% de remoção). Com a diminuição do teor de lignina, a porcentagem de celulose e hemicelulose aumentou de 20,56 e 10,17% m/m para 44,16 e 18,27% m/m, respectivamente. Segundo Cao et al. (2012) e Karagöz et al. (2012), o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino aumenta a eficiência na hidrólise enzimática por deslignificação e pré-tratamento com PHA é mais eficaz para a solubilização da lignina do que o pré-tratamento alcalino (Chen et al., 2008).

#### 3.2 Estudo da carga enzimática

As hidrólises e seus parâmetros foram estudados com a enzima celulase complex e a β-glucosidase, visto que a enzima β-glucosidase atua de forma conjunta com a celulase, convertendo celobiose em glicose e evitando assim a inibição da celulase (Keshwani, 2009).

Com a proporção 0,61:0,39 (complexo celulase: β-glucosidase), estudou-se o efeito das cargas dessas enzimas sobre a produção de glicose e xilose utilizando o BC-PHA e os resultados estão apresentados na Tabela 2. O estudo da carga enzimática é considerada como um dos fatores mais importantes na produção de etanol de materiais lignocelulósicos. A proporção foi calculada com base na quantidade de proteína presente no ensaio em (mg proteína/g celulose), levando em consideração a quantidade de proteína presente em 1 ml de extrato enzimático, atividade por ml de extrato para cada enzima e a quantidade de bagaço para se obter 1g celulose.

Observa-se na Tabela-2 que com o aumento da carga enzimática, ocorreu um aumento no rendimento e concentração dos açúcares. As cargas enzimáticas utilizadas nos ensaios 03, 04 e 05, possibilitam maiores rendimentos, logo maiores concentrações de glicose e xilose. Visando a produção de etanol, maiores concentrações desses açúcares no meio que será utilizado como meio fermentativo, maior será a concentração de etanol. Porém, os rendimentos de glicose obtidos nos ensaios 03, 04 e 05, não são significativamente diferentes, de acordo com análise de variância, com  $p < 0,05$ . Aumentando a carga de enzima de 0,2 vezes (de 30 FPU/66 CBU a 35 FPU/77 CBU), não conseguiu aumentar o rendimento de açúcar final, o que sugere que a carga de celulase e  $\beta$ -glicosidase pode ter alcançado o ponto de saturação. Portanto, as cargas enzimática utilizadas no ensaio 04 (30 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> complexo celulase e 66 CBU/g<sub>BC-PHA</sub>  $\beta$ -glicosidase) foram escolhidas para o processo de hidrólise do BC-PHA. Com o aumento da carga enzimática para as condições do ensaio 05, por exemplo, aumentaria mais o custo com enzimas e influenciaria no custo com a produção de etanol.

Então, para o próximo estudo, utilizou-se a proporção de 0,61:0,39, com carga enzimática de 30 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> e 66 CBU/g<sub>BC-PHA</sub> para as enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente.

Tabela 2 - Efeito das cargas enzimática da combinação das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase, na proporção de 0,61:0,39, no rendimento e concentração de glicose, xilose obtidos da hidrólise enzimática de BC-PHA a 45 °C, 150 rpm durante 72 horas.

Ensaio	Carga de Enzimas		Glicose		Xilose	
	Celulase (FPU/g <sub>BC-PHA</sub> )	$\beta$ -glicosidase (CBU/g <sub>BC-PHA</sub> )	Rendimento (%)	Concentração (g/L)	Rendimento (%)	Concentração (g/L)
01	5,0	11,0	76,2 ± 0,9	6,9 ± 0,1	33,1 ± 0,1	2,9 ± 0,0
02	15,0	33,0	85,8 ± 0,7	7,7 ± 0,3	64,8 ± 0,3	5,7 ± 0,2
03	20,0	44,0	98,15 ± 0,6	8,8 ± 0,2	90,7 ± 0,1	7,9 ± 0,1
04	30,0	66,0	103,0 ± 1,7	9,3 ± 0,0	95,3 ± 2,1	8,3 ± 0,3
05	35,0	77,0	103,8 ± 1,1	10,0 ± 0,1	100,0 ± 1,6	9,0 ± 0,2

### 3.3 Estudo da carga de celulose

Um dos principais fatores que afetam a taxa de produção de açúcares por hidrólise enzimática é a concentração inicial de substrato (de celulose e/ou hemicelulose). Altas concentrações de substrato podem causar inibições, o que reduz substancialmente a eficiência do biocatalisador. Para avaliar esse efeito, realizou-se um ensaio variando a carga inicial de celulose, ou seja, a concentração inicial de BC-PHA. A Figura 1 apresenta a concentração de glicose obtida no hidrolisado variando a carga de celulose, utilizando as condições enzimáticas do Ensaio 04 (celulase 30 FPU/g<sub>BC-PHA</sub>,  $\beta$ -glicosidase 66 CBU/g<sub>BC-PHA</sub>).

Analisando a Figura 1, observa-se um aumento na concentração de açúcares com o aumento da carga de celulose. Nota-se que aumentando a concentração de 1 para 4 g<sub>celulose</sub>/100 mL, ocorre um

aumento de 260% na concentração de glicose, correspondendo a uma concentração de 36 g/L com a maior carga de celulose avaliada. Aumento semelhante foi obtido para a concentração de xilose (225%), corresponde a maior concentração de 13 g/L. Para o material lignocelulósico avaliado, observou-se um inchamento com concentrações maiores que 10% m/v, correspondendo a 4,2 g<sub>celulose</sub>/100 mL de meio reacional, por isso não se realizou ensaios com cargas maiores.

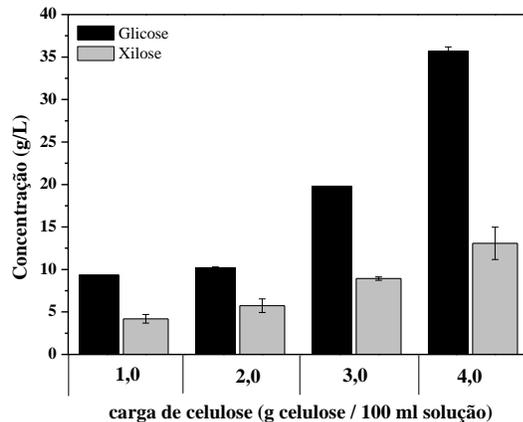


Figura 1- Efeito da carga de celulose na concentração de açúcares obtidos por hidrólise enzimática (45 °C, 150 rpm por 72 h) do BC-PHA, usando 30 FPU/g<sub>BC-PHA</sub> de celulase e 66 CBU/g<sub>BC-PHA</sub> de  $\beta$ -glucosidase.

Com base neste resultados, a carga de celulose de 4 g/100 ml, foi selecionada para a hidrólise enzimática do BC-PHA e o hidrolisado obtido utilizado no estudo de produção de etanol. Outros autores (Vasquez et al., 2007) também observaram que o aumento da percentagem de sólidos teve um efeito positivo sobre a produção de glucose quando se utiliza o bagaço de cana.

### 3.4 Fermentação do hidrolisado de BC-PHA para a produção de etanol (HFS)

Os perfis de glicose, xilose e etanol são apresentados nas Figuras 2A, 2B e 2C, para os micro-organismos *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ATCC36907 e *K. marxianus* CCA510, respectivamente. O substrato utilizado nesse processo foi o hidrolisado enzimático obtido com as melhores condições obtidas no estudo de hidrólise do BC-PHA. Observa-se por análise das Figura 2A, 2B e 2C que os perfis de glicose, xilose e etanol para os três micro-organismos avaliados, atingem patamares semelhantes, porém a levedura *S. cerevisiae* metaboliza mais rápido a glicose, comparado com a *K. marxianus* ATCC36907 e CCA510. No estudo realizado com *S. cerevisiae*, a xilose não foi metabolizada e com 2 h a concentração de glicose no meio atingiu 0 g/L. A maior concentração de etanol ( $15 \pm 0,74$  g.L<sup>-1</sup>) foi obtida nesse período de cultivo com uma produtividade de  $7,5 \pm 0,37$  g/(L.h) para *S. cerevisiae*. As duas leveduras *K. marxianus* consumiram a xilose, no entanto a concentração de etanol obtida foi a mesma no ensaio fermentativo conduzido com *S. cerevisiae*, aproximadamente 15 g/L. Porém, o metabolismo dessas cepas é mais lento e esse patamar na concentração de etanol foi obtido com 6 h de cultivo, com produtividade de 3,75 g/L.h. Então, a

fermentação com *S. cerevisiae* apresenta maior produtividade em comparação com outros micro-organismos estudados. O coeficiente de rendimento de produto com base no consumo de substrato ( $Y_{P/S}$ ) foi  $0,50 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  para todas as cepas, valor próximo ao rendimento teórico  $0,51$ . Esses resultados indicam que o hidrolisado obtido pela hidrólise enzimática do BC-PHA pode ser utilizado com substrato para a produção de etanol utilizando os três micro-organismos avaliados.

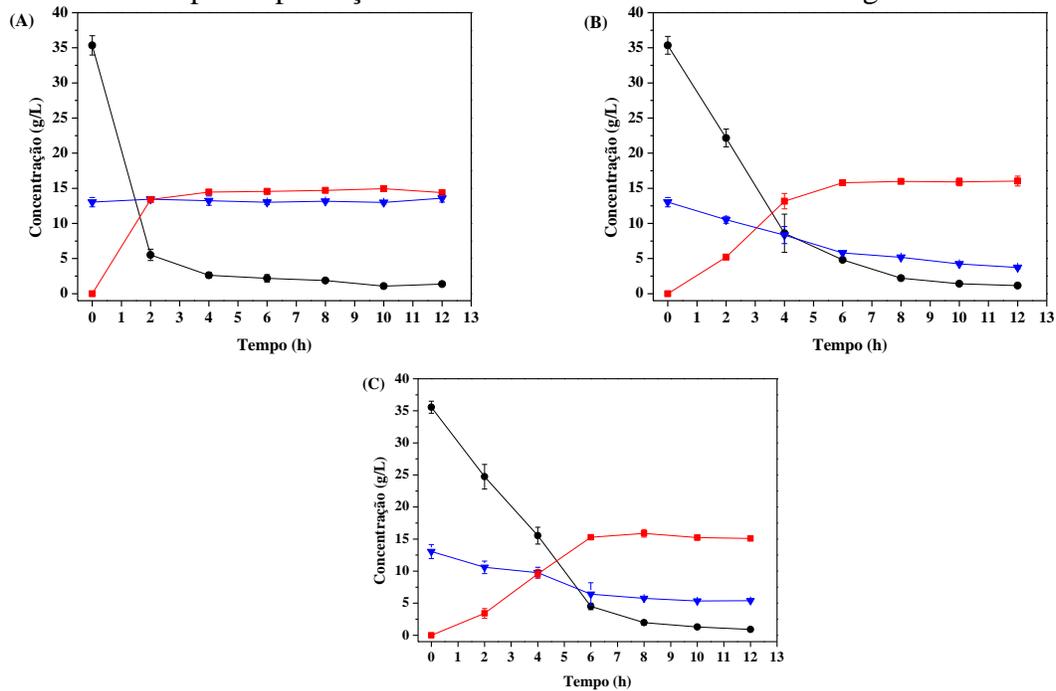


Figura 2-Produção de etanol conduzida a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm, com o hidrolisado obtido da melhor condição de hidrólise enzimática ( $30 \text{ FPU}/\text{g}_{\text{BC-PHA}}$  complexo celulase,  $66 \text{ CBU}/\text{g}_{\text{BC-PHA}}$   $\beta$ -glucosidase,  $4 \text{ g}_{\text{celulose}}/100 \text{ mL}$ , 150 rpm,  $45^{\circ}\text{C}$  por 72 horas) utilizando os micro-organismos (A) *S. cerevisiae*, (B) *K. marxianus* ATCC36907 e (C) *K. marxianus* CCA510. (●) Glicose; (▼) Xilose e (■) Etanol.

## 4. Conclusões

Resultados obtidos mostraram que a fibra do caju apresenta potencial em carboidratos para produção de etanol por fermentação. O pré-tratamento com PHA possibilitou uma deslignificação do BC e após estudos de parâmetros da hidrólise enzimática, a carga enzimática com  $30 \text{ FPU}/\text{g}$  BC-AHP do complexo celulase e  $66 \text{ CBU}/\text{g}$  BC-AHP de  $\beta$ -glucosidase e  $4,0 \text{ g}$  celulose /  $100$  solução proporcionou o melhor rendimento de açúcar. Com o hidrolisado contendo  $35,7 \text{ g/L}$  glicose e  $13 \text{ g/L}$  xilose, foi realizada uma fermentação que resultou em um coeficiente de rendimento de produto com base no consumo de substrato ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,50 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  valor próximo ao rendimento teórico  $0,51$ .

## 5. Referências bibliográficas

BRADFORD, M. M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 7, p. 248–254, 1976.

CORREIA, J. A.C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. *Bioresource Technology*. v.139, p.249–256, 2013.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, v.43, p. 1462-1466, 2008.

GOUVEIA, E. R.; DO NASCIMENTO, R. T; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC), *Pure Applied Chemistry*, v. 59, p.257-268, 1987.

HASUNUMA T.; KONDO A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains, *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1287–1294, 2012.

KARAGÖZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource Technology*., v.104, p. 348-357, 2012.

KESHWANI, D. R. *Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production*.2009. Tese (Doutorado). Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, v.35, p. 3094-3103, 2011.

RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 164, p. 929- 943, 2011.

SELIG, M.; WEISS, N.; JI Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP) - Technical Report, NREL/TP-510-42629, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, *Laboratory Analytical (LAP) - Technical Report*, NREL/TP-510-42618, 2008a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass, *Laboratory Analytical Procedure (LAP) - Technical Report*, NREL/TP-510-42619, 2008b.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B.; PEREIRA JR., N. *Appl. Biochem.and Biotechnol.* 136-140, 141-154, 2007.