

# 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



## TÍTULO DO TRABALHO:

Avaliação da produção de etanol a partir da fibra do caju pré-tratada em microondas

## AUTORES:

Tigressa Helena Soares Rodrigues, Samuel Quintela Soares Martins, Maria Valderez Ponte Rocha, Luciana Rocha Barros Gonçalves e Gorete Ribeiro de Macedo

## INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal do Ceará

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 5º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 5º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 15 a 22 de outubro de 2009, em Fortaleza-CE. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 5ºPDPETRO.

## AValiação DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FIBRA DO CAJU PRÉ-TRATADA EM MICROONDAS

### Abstract

Nowadays, there is great interest in exploring alternative energy sources to maintain the sustainable growth of society. Cashew apple bagasse, lignocellulosic by-product in Brazil with no commercial value, is obtained from cashew apple process to juice production. In this work, the potential of microwave-assisted alkali pretreatment in order to improve the rupture of the recalcitrant structures of the cashew fiber is studied. Results showed that, after enzymatic hydrolysis, alkali concentration exerted influence on glucose formation, being the best result achieved after pretreatment with 1.0 mol.L<sup>-1</sup> of NaOH (73 ± 8 mg.g<sup>-1</sup><sub>CAB-M</sub>) when 2% (w/v) of CAB-M was used. On enzymatic hydrolysis step, improvement on solid percentage (16 % w/v) and enzyme loading (30 FPU.g<sub>FTP</sub><sup>-1</sup>) increased glucose concentration to 15 g.L<sup>-1</sup>. The fermentation of hydrolyzate by *Saccharomyces cerevesiae* resulted in ethanol concentration and productivity of 7.20 g.L<sup>-1</sup>, and 1.44 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectively. The results demonstrate that microwave-assisted alkali pretreatment is able to remove recalcitrant structures of CAB and to improve its enzymatic digestibility.

### Introdução

O aumento populacional associado ao consumo crescente de energia, principalmente os derivados do petróleo, que por sua vez não são de fontes renováveis, tem impulsionado pesquisas na busca por fontes alternativas de energia que atenda a grande demanda por combustíveis. Associado ao problema da demanda, questões ambientais estão envolvidas no uso em demasia de combustíveis de origem fóssil. Nesse sentido, a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, especialmente o etanol, vem sendo avaliada como rota promissora de bioenergia (Cardona Alzate e Sánchez Toro, 2006; Sun e Cheng, 2002; Zhu et al., 2006). Os materiais lignocelulósicos representam a maior porcentagem de biomassa de baixo custo existente, abrangendo resíduos de origem doméstica, agricultora e industrial, permitindo a obtenção de um combustível de valor agregado e a reutilização de um rejeito (Cardona Alzate e Sánchez Toro, 2006; Hu e Wen, 2008).

As agroindústrias no Nordeste brasileiro representam papel sócio-econômico relevante na economia regional, em especial a agroindústria do caju, sendo o estado do Ceará o maior produtor de caju, seguido dos estados Rio Grande do Norte e Piauí. O beneficiamento do caju tem por principal finalidade a produção de castanha, um produto tipo exportação de grande valor no mercado externo. O mercado interno e externo do beneficiamento da castanha em 2004, foi de aproximadamente 232.000 toneladas, representada pela movimentação de 147,2 milhões de dólares em exportações de amêndoas, milhares de empregos, diretos e indiretos, em todas as atividades dos segmentos produção, industrialização e comercialização da cadeia agroindustrial. No momento do descastanhamento, grande parte do pedúnculo, cerca de 90%, é desperdiçada sendo grande parte perdida ainda no campo. No processamento do pedúnculo do caju para produção de bebidas, principal aplicação do pseudofruto, 40% (m/m) de bagaço são obtidos, que por sua vez não possuem valor comercial podendo ser adquirido por R\$ 0,25/Kg (Paiva et. al., 2002; Assunção e Mercadante, 2003; Ferreira et al., 2004; Matias et al., 2005; Rodrigues et al., 2007). Nesse contexto, a fibra do caju se enquadra como fonte lignocelulósica alternativa abundante e de baixo custo para obtenção de açúcares fermentescíveis e sua subsequente conversão em etanol.

Atualmente, uma diversidade de pré-tratamentos tem sido avaliada na remoção de açúcares de lignocelulósicos, destacando-se pré-tratamento com ácido diluído e concentrado em simples e duplo estágio, alcalino, SO<sub>2</sub>, amônia e peróxido de hidrogênio (Saha, 2003). Em relação ao pré-tratamento em microondas, trata-se de um método alternativo e de eficiência reconhecida na geração de calor por radiação, além de fácil operação (Zhu et al., 2005). Estudos relatam que a radiação proveniente das microondas é capaz de alterar a estrutura da parede celular dos vegetais gerando calor interpartículas, contribuindo para uma maior ruptura das estruturas recalcitrantes da lignocelulose, degradando a lignina e parte das hemiceluloses, elevando a acessibilidade enzimática durante a hidrólise (Hu e Wen, 2008; Xiong et al., 2000; Zhu et al., 2005). Contudo, avaliou-se nesse trabalho o pré-tratamento álcali combinado com microondas no pré-tratamento do bagaço de caju na geração de açúcares fermentescíveis através da hidrólise enzimática da fibra e subsequente fermentação do líquido em etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

## Metodologia

### **Materia-prima lignocelulósica**

O bagaço de caju foi o substrato lignocelulósico utilizado neste estudo, gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos do Brasil situada no Ceará, Brasil. O bagaço de caju foi lavado com água corrente para retirada de impurezas, seco a 50°C, triturado e estocado até seu uso. Após peneiramento do material, as partículas que ficaram retidas entre as peneiras de mesh 18-80 foram utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos.

### **Pré-tratamento da fibra com microondas**

O pré-tratamento da fibra do caju foi realizado em um aparelho de microondas de uso doméstico modelo LG – MS/114 ML de 2,45 GHz frequência e 1270W de potência. Antes do pré-tratamento a fibra foi imersa em soluções de NaOH (0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup>). Em seguida, o material foi posto no microondas, sendo a potência e o tempo ajustados para 600 W e 15 minutos, respectivamente. Após o pré-tratamento, o pH do material foi neutralizado por lavagens com água destilada. Depois foi seco a 50°C para retirada de umidade e estocado até seu uso.

### **Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado com extrato enzimático comercial, Celluclast 1.5 L (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), foi realizada em triplicata sob agitação de 150 rpm, em erlenmeyers de 250 mL a 45°C por 72 horas. A concentração de sólidos estudada foi de 2 e 16% (m/v) e atividade enzimática de 15 e 30 FPU/g. A solução enzimática foi preparada em tampão citrato 50 mM e pH 5,0. A atividade do complexo enzimático foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo (Ghose, 1987). A atividade da Celluclast 1.5 L obtida foi de 134,63 FPU/mL.

### **Fermentação**

Inicialmente, a cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada de uma levedura comercial no Laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal do Ceará. Para a obtenção do inóculo, o microrganismo foi inicialmente ativado em meio ágar sabouraud da empresa Biolife e incubado a 30°C por 48h. Em seguida, transferiu-se a cultura para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio constituído por: 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 10 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4,5 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,65 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. A cultura foi mantida a 30°C por 24h e, em seguida, centrifugada a 10000 rpm por 15 min para se obter a biomassa inicial do ensaio fermentativo. A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio em um

agitador rotativo *shaker* a 30°C e 150 rpm. A concentração inicial de microrganismo inoculado no meio de cultura foi 10 g.L<sup>-1</sup>. O hidrolisado do pré-tratamento foi utilizado como meio de cultivo sem suplementação de fonte de nitrogênio. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise.

### Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada através da análise da massa seca (Atala et al., 2001). Amostras do meio de cultura foram coletadas e centrifugadas a 6000 rpm por 15 min. O precipitado foi seco a 50°C em estufa até peso constante. O sobrenadante foi utilizado para análise de carboidratos. A concentração de carboidratos (celobiose e glicose) e etanol foram medidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês, HPLC), utilizando um sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mmol.L<sup>-1</sup> em Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizado como fase móvel na taxa de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65°C. A conversão de açúcares foi definida em termos de mg do carboidrato por g de fibra pré-tratada, (mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>).

## Resultados e Discussão

### Influência da variação da concentração do álcali no pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática

Diferentes concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas para avaliação do potencial do uso de microondas no pré-tratamento da fibra do caju seguido de sua hidrólise enzimática (Figuras 1 e 2). Recentemente, alguns trabalhos nessa área estão sendo desenvolvidos pela capacidade da radiação romper as estruturas mais recalcitrantes da matéria lignocelulósica além da solubilização da lignina e degradação parcial da hemicelulose devido ao álcali (Rocha et al., 2009; Zhu et al., 2005, 2006; Hu e Wen, 2008). As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados após a hidrólise enzimática, concentrações de glicose e celobiose, respectivamente. Vale ressaltar que as condições da hidrólise enzimáticas estudadas nesse trabalho são citadas por outros autores como as melhores condições de atividade enzimática para Celluclast 1.5L (Öhgren et al., 2006; Rocha 2009; Vásquez et al., 2007).

Na Figura 1, os melhores resultados para concentração de glicose foram obtidos quando se utilizou concentrações de NaOH de 0,2 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. No trabalho de Hu e Wen (2008), os autores testaram as mesmas concentrações de NaOH, exceto 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, utilizando uma erva nativa do norte dos EUA como matéria-prima lignocelulósica. Neste trabalho, os rendimentos de glicose foram crescentes até a utilização de 0,2 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH. A partir deste valor, o acréscimo na concentração do álcali não influenciou no rendimento de glicose. No trabalho de Rocha et al. (2009), os autores realizaram pré-tratamento da fibra do caju com ácido sulfúrico diluído, no qual a concentração de glicose obtida foi de 47 mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>, valor inferior aos resultados obtidos neste trabalho, 76,4 e 72,9 mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>, respectivamente, utilizando 0,2 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH, o que eleva o potencial do microondas no pré-tratamento de lignocelulósicos.

Na Figura 2, são mostrados os resultados da concentração de celobiose presente no hidrolisado durante o processo. Na concentração de 0,6 mol.L<sup>-1</sup> (dados não apresentados) identificou-se concentrações de celobiose abaixo de 9,5 mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup> somente em 72 horas de hidrólise em todos os ensaios realizados em triplicata, desconhecendo-se os motivos que levaram a esse resultado. Em relação ao controle (0,0 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH), a concentração de celobiose decresceu pela ação enzimática de  $\alpha$ -glucosidase, enzima presente no complexo enzimático Celluclast 1.5L, que é capaz de converter moléculas de

celobiose em glicose. Acredita-se que sua ação foi lenta com o decorrer do tempo pela dificuldade de acesso da enzima ao substrato (fibra de caju) uma vez que a maior parte da lignina continuava presente, pois a função do NaOH no pré-tratamento é solubilizá-la. Observa-se que a concentração de celobiose é crescente e máxima quando a concentração de NaOH utilizada foi de 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. Celobiose é um produto da ruptura da cadeia de celulose assim como glicose, entretanto sua presença no hidrolisado pode acarretar na inibição enzimática da celulase. Com isso, acredita-se que o acréscimo dos níveis de celobiose no decorrer da hidrólise tenha influenciado nos teores de glicose obtidos. Contudo, a presença de quantidades suficientes de  $\alpha$ -glucosidase e, conseqüentemente de elevadas quantidades do complexo enzimático, são necessárias para obtenção de elevados rendimentos de glicose das lignoceluloses (Lynd et al., 2002; Rocha et al., 2009).

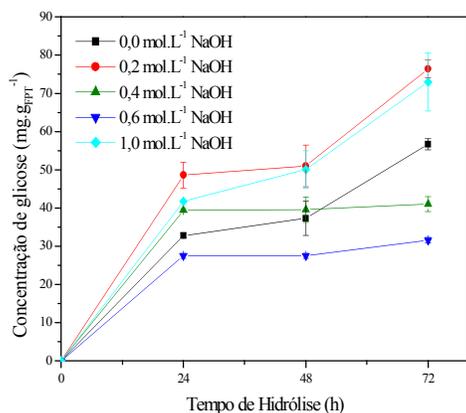


Figura 1. Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de glicose após hidrólise enzimática (15 FPU.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>, 45°C e 150 rpm) da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

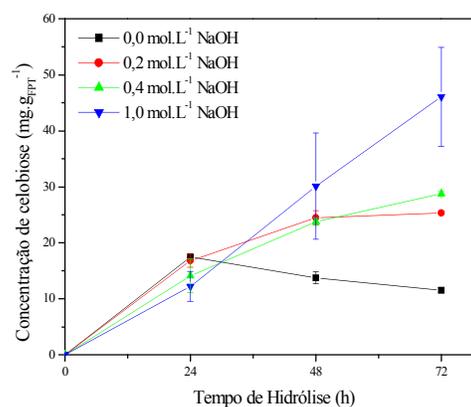


Figura 2. Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de celobiose após hidrólise enzimática (15 FPU.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>, 45°C e 150 rpm) da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

De acordo com os resultados obtidos, as próximas etapas foram realizadas visando o acréscimo na produção de açúcares. Para tanto, estudou-se acréscimo na concentração de sólidos (16% m/v) e atividade enzimática (30 FPU/g) na hidrólise enzimática da fibra de caju. As condições de pré-tratamento foram fixadas em 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH, 600 W de potência por 15 minutos.

#### Influência da concentração de sólidos e atividade enzimática na hidrólise enzimática

A Figura 3 apresenta os efeitos da concentração de sólidos (2 e 16% m/v) na concentração de açúcares obtidos após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada. Observa-se que a máxima conversão em glicose (54 mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>) obtida em 16% m/v foi inferior em relação a hidrólise com 2% m/v (72,9 mg.g<sub>FPT</sub><sup>-1</sup>). Entretanto, os respectivos dados em termos de concentração de glicose foram de 8,8 g.L<sup>-1</sup> para 16% m/v e 1,5 g.L<sup>-1</sup> para 2% m/v.

Nos estudos de Tengborg et al. (2001), uma leve redução na conversão da celulose pelo aumento na concentração de sólidos de resíduos de madeira pré-tratado por vapor foi observada numa faixa de 2-5 % m/v. Contudo, isso foi mais acentuado após acréscimo na concentração de sólidos para 10 % m/v, porém a concentração final de glicose dobrou de valor. Vásquez et al. (2007) avaliou alguns fatores como temperatura, carga enzimática e porcentagem de sólidos na conversão de celulose de bagaço de

cana-de-açúcar. Em geral, a negativa influência da porcentagem de sólidos é atribuída à inibição enzimática provocada pelo aumento na concentração de glicose durante a hidrólise enzimática. No entanto, avaliando o objetivo final, a fermentação do hidrolisado, elevadas concentrações de açúcares são necessárias para produção de etanol, o que é alcançado ao se trabalhar com elevadas concentrações de biomassa pré-tratada. Para tanto, visando o aumento na concentração de glicose no hidrolisado para subseqüente etapa de fermentação, aumentou-se a carga enzimática de celulase para  $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ .

Na Figura 4 encontram-se os dados referentes à influência do acréscimo da atividade enzimática na fibra de caju a 16% (m/v). A máxima concentração de glicose ( $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $98 \pm 8 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ ) foi obtida após 72 h de hidrólise enzimática a  $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ . Resultados similares foram obtidos por Rocha et al. (2009) após hidrólise enzimática da fibra do caju pré-tratada com ácido sulfúrico diluído. Os autores obtiveram  $19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glicose utilizando 16% (m/v) de fibra pré-tratada e  $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ .

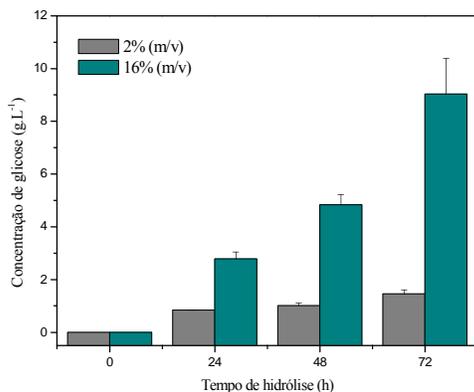


Figura 3. Concentração de glicose após hidrólise enzimática ( $15 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ ,  $45^\circ\text{C}$  e  $150 \text{ rpm}$ ) da fibra de caju pré-tratada em microondas a  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaOH a  $600 \text{ W}$  por  $15 \text{ min}$ .

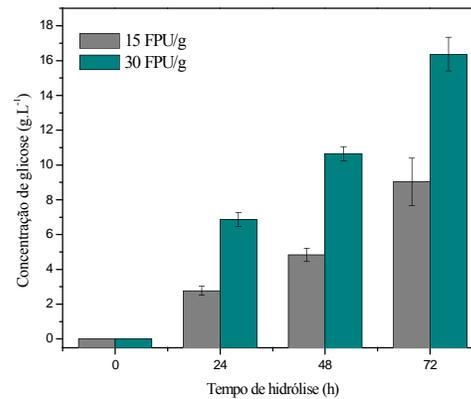


Figura 4. Concentração de glicose após hidrólise enzimática ( $45^\circ\text{C}$  e  $150 \text{ rpm}$ ) da fibra de caju (16% m/v) pré-tratada em microondas a  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaOH a  $600 \text{ W}$  por  $15 \text{ min}$ .

### Fermentação dos hidrolisados

Pré-tratamento da fibra do caju em microondas combinado com álcali foi avaliado com o objetivo de elevar os níveis de glicose após a etapa de hidrólise enzimática. As condições do pré-tratamento foram fixadas em  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaOH,  $600 \text{ W}$  de potência por  $15 \text{ minutos}$ . A hidrólise enzimática da fibra pré-tratada foi realizada na porcentagem de sólidos de  $16 \%$  (m/v),  $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$  a  $45^\circ\text{C}$  por  $72 \text{ h}$ . O hidrolisado obtido foi usado como substrato para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

A fermentação foi conduzida usando  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de biomassa inicial da levedura e os perfis de glicose, etanol e biomassa encontram-se na Figura 5. Observa-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de crescer, consumir a glicose existente e produzir etanol do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise enzimática sem suplementação adicional de nutrientes com o consumo de toda glicose existente no meio de cultura.

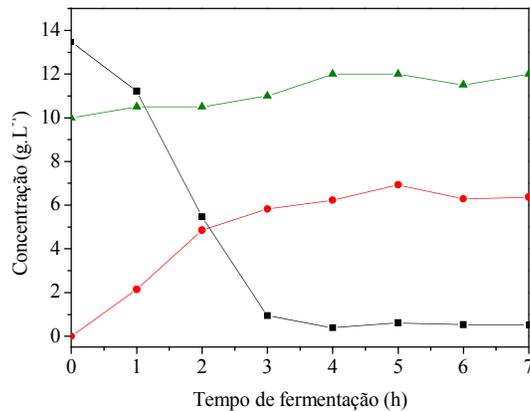


Figura 5. Ensaio fermentativo do hidrolisado obtido após hidrólise enzimática ( $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ ) da fibra de caju (16% m/v) pré-tratada em microondas a  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaOH a 600 W por 15 min. Glicose (■), Etanol (●) e Biomassa (▲) de *S. cerevisiae*. Fermentação realizada a  $30^\circ\text{C}$  e 150 rpm.

O hidrolisado inicialmente apresentava concentração inicial de glicose de  $14,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e após 5 horas de fermentação, a concentração de etanol e produtividade obtidas foram  $7,20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $1,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. Após esse tempo, não se identificou glicose no meio fermentativo. Rendimento em etanol em relação à glicose presente foi de  $0,49 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Zhu et al. (2006) avaliou a produção de etanol por palha de trigo pré-tratada com microondas/alkali no processo SSF (sacarificação e fermentação simultâneas). Máxima concentração de etanol ( $34,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi obtida após 72 h de fermentação, com produtividade de  $0,48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os mesmos autores destacaram que para o processo SSF, o pré-tratamento de palha de trigo em microondas combinado com álcali resultou em maiores produtividades em etanol quando comparado com o pré-tratamento álcali convencional.

Em outros estudos, Rocha et al. (2009) avaliou pré-tratamento da fibra do caju com ácido sulfúrico diluído e seguido de pré-tratamento alcalino, sendo o material obtido nomeado CAB-H e CAB-OH, respectivamente. A fermentação dos hidrolisados resultaram em concentrações de etanol e produtividade de  $8,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $2,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para CAB-H e  $20,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $3,33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para CAB-OH.

## Conclusões

O pré-tratamento em microondas combinado com álcali da fibra do caju contribuiu para o acréscimo de açúcares na etapa de hidrólise enzimática pela remoção de parte da hemicelulose e lignina contida na fibra. Os parâmetros que proporcionaram maiores rendimentos em glicose foram: concentração do álcali ( $0,2$  e  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), porcentagem de sólidos durante a hidrólise enzimática (16 % w/v) e atividade enzimática ( $30 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ ). Nessas condições, a concentração de glicose obtida foi de  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $98 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{FPT}}^{-1}$ ) após 72 h de hidrólise. A fermentação do hidrolisado obtido por células de *S. cerevisiae* resultaram na concentração de etanol de  $7,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  após 5 h de fermentação, com rendimento de  $0,49 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$ . Contudo, o pré-tratamento em microondas combinado com álcali é uma alternativa na remoção das estruturas recalcitrantes da fibra do caju tornando a celulose mais disponível ao ataque enzimático, sendo os nutrientes do hidrolisado consumidos pela levedura durante a etapa de fermentação, obtendo-se etanol.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a ANP, Banco do Nordeste, Capes, CNPq e Novozymes pelo suporte técnico e financeiro neste estudo.

### Referências Bibliográficas

- Alzate, C. A. C., Toro, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass, *Energy*, v. 31, p. 2447-2459, 2006.
- Assunção, R. B. e Mercadante, A. Z., Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*), *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 16, n. 6, p. 647-657, 2003.
- Atala D.I.P., Costa A. C, Maciel R., Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature, *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 91, n. 3, p. 353-365, 2001.
- Ferreira, A. C. H., Neiva, J. N. M., Rodríguez, N. M., Lobo, R. N. B. e Vasconcelos, V. R., Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p.1380-1385, 2004.
- Ghose T. K., Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC), *Pure Applied Chemistry*, v. 59, p.257-268, 1987.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., e Pretorius, I. S., Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 66, n. 3, p.506-577, 2002.
- Matias, M. F. O., Oliveira, E. L., Gertrudes, E. e Magalhães, M. M. A., Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale, L.*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products, *Brazilian Archives of Biology Technology*, v. 48, p. 143-150, 2005.
- Öhgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M. F., Galbe M., Hahn-Hägerdal B. e Zacchi G., Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400, *Journal of Biotechnology*, v. 126, p. 488-498, 2006.
- Paiva, J.R., Cardoso, J.E., Barros, L. de M., Crisóstomo, J.R., Cavalcanti, J.J.V. e Alencar, E.S., Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região semi-árida do Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 78).
- Rocha, M. V. P., Rodrigues, T. H. S., Macedo, G.R., Gonçalves, L. R. B., Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 155, p. 407-417, DOI: 10.1007/s12010-008-8432-8, 2009.
- Rodrigues, T. H. S., Dantas, M. A. A., Pinto, G. A. S. e Goncalves, L. R. B., Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136, p. 675 – 688, 2007.
- Saha, B. C., Hemicellulose Bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, p. 279-291, 2003
- Sun, Y., Cheng J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

Tengborg, C., Galbe M., Zacchi G., Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood, *Biotechnol. Prog.*, v. 17, p. 110-117, 2001.

Vásquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza Jr., M. B., e Pereira Jr., N., Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 141-154, 2007.

Xiong, J., Ye, J., Liang, W.Z. e Fan, P.M., Influence of microwave on the ultrastructure of cellulose I., *Journal Source of China University Technology*, v. 28, n. 3, p. 84-89, 2008.

Hu Z.N. e Wen Z.Y., Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment, *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.369-378, 2008.

Zhu S.D., Wu Y.X., Yu Z.N, Liao J.T. e Zhang Y., Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3082-3086, 2005.

Zhu S.D., Wu Y.X., Yu Z.N., Zhang X.; Wang C.W., Yu F.Q., Jin S.W., Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 869-873, 2006.