



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS
PRONAT

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

**USO DE RESÍDUOS DA RIZICULTURA COMO FONTE ENERGÉTICA PARA
OBTENÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO A PARTIR DE LEVEDURAS
AMAZÔNICAS**

BOA VISTA, RR

2019

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

**USO DE RESÍDUOS DA RIZICULTURA COMO FONTE ENERGÉTICA PARA
OBTENÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO A PARTIR DE LEVEDURAS
AMAZÔNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Recursos Naturais, da Universidade Federal de
Roraima, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutora em Recursos Naturais.

Área de concentração: Manejo e Conservação de
Bacias Hidrográficas.

Orientadores: Dra. Adriana Flach.

Dra. Ana Paula Folmer Correa

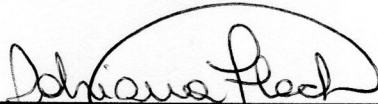
Dr. Marcos José Salgado Vital.

BOA VISTA, RR
2019

ANDRÉIA DA SILVA ALENCAR

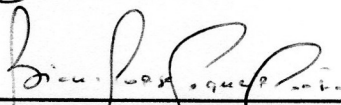
USO DE RESÍDUOS DA RIZICULTURA COMO FONTE ENERGÉTICA PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO A PARTIR DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS

Tese apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Doutorado em Ciências Ambientais (Recursos Naturais) da Universidade Federal de Roraima, defendida em 30 de setembro de 2019 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



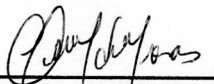
Profa. Dra. Adriana Flach

Orientadora - Universidade Federal de Roraima



Profa. Dra. Bianca Jorge Sequeira

Membro - Universidade Federal de Roraima



Profa. Dra. Cléria Mendonça de Moraes

Membro - Universidade Federal de Roraima



Profa. Dra. Daniela Cavalcante dos Santos Campos

Membro - Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Marcos Batista Machado

Membro - Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Silvana Tullio Fortes

Membro - Universidade Federal de Roraima

Dedico à minha filha Laurinha, aos meus pais Batista e Iracema, e aos meus avós Lídia Alencar (*in memorian*), José Gouveia (*in memorian*), e Maria das Dores Gouveia (*in memorian*), por todo amor e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que foi a minha sustentação e proteção até o fim desta etapa.

Aos meus pais, Batista e Iracema Alencar pelos conselhos, preocupação, carinho, educação, auxílio e torcida nas horas difíceis e em todas as conquistas, ninguém é feliz sozinho e sou muito sortuda em ter vocês sempre ao meu lado.

À minha filha, Laura Alencar Guedes, por ser a filha mais compreensível e amorosa, mesmo tão pequenina. Minha princesa foi minha fonte de energia em meio aos momentos difíceis para a conclusão desta pesquisa. Feliz por ter conseguido, mesmo que do nosso jeito, acompanhar cada etapa do seu primeiro aninho. Amo você.

À minha orientadora, Adriana Flach, pela oportunidade e orientação. Os quatro anos de orientação foram, sem dúvidas, cheios de crescimento. Aprendi muito sobre o mundo da Química, a ouvir mais e a ser mais segura. Aprendi também a ser mais paciente, a tentar conciliar a maternidade com a vida de pesquisadora. Sei que saímos mudadas dessa orientação, eu levo um pouco do seu amor pela pesquisa e espero ter deixado boas lembranças. Obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos e por não desistir de mim.

Ao meu orientador, Marcos José Salgado Vital, que me guiou no mundo científico por doze anos. Nada que eu escrevesse poderia expressar toda a gratidão e admiração que tenho. Com todo seu empenho e paciência, me tornei uma profissional encantada pela Microbiologia em todas as suas linhas. Obrigada por toda a dedicação e confiança em meu sucesso.

À minha orientadora Ana Paula Folmer Corrêa por todo o ensinamento e amizade conquistada neste pouco tempo de convivência. Sua contribuição nesta pesquisa foi impar.

Aos meus irmãos e sobrinho, Adrielson, Anderson e Luis Fernando Alencar pelo carinho e ajuda. Sei que muitas vezes fui ausente na vida de vocês, mas sei que entendem o quanto minha profissão sempre foi minha paixão. Agradeço pela admiração e torcida.

Aos bolsistas e ex-bolsistas de iniciação científica e de Pós-graduação dos laboratórios de Microbiologia do PRONAT e CBio por toda colaboração e convivência: Joselma Pedrosa, Bruna Rufino, Danielle Oliveira, Karla Dalila, Lucas Chagas e Giuliana Chaves.

Aos professores e colegas do Grupo de Biotecnologia e Química Fina por toda colaboração e convivência: Dr. Luiz Antônio Mendonça, Cecília Maria de Araújo, Darlison Feitosa, Lion Martins, Felipi Rodrigues, Letícia Odilair, Murilo dos Santos, Gilmar Prado, Jackiely dos Santos, Edineide dos Santos, Gilmara Prado e Andrey Oliveira (*in memoriam*).

Aos colegas de Doutorado, Ângela Maria Moreira da Silva, Andrea Cristina Sant'Ana, Sewbert Rodrigues Jati, Marco Antônio de Oliveira dos Santos e Raimundo Costa Filho, pelos quais tenho imenso respeito e admiração.

À professora Gardênia Cabral, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, que sempre foi minha protetora e conselheira em todos os momentos. Obrigada pelas palavras de carinho e encorajamento.

Aos técnicos Paulo Cruz, Collin e Márcio Sena por todo o profissionalismo e auxílio no decorrer do curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, minha segunda casa há dez anos, pela oportunidade, conhecimento e logística.

Ao Dr. Pedro Aurélio Costa Lima Pequeno pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às pesquisadoras Dra. Lidiany Camila da Silva Carvalho e Dra. Vanderly Andrade pela amizade e torcida. A companhia e nossas conversas na sala de pesquisadores foi indispensável nos momentos de estafa.

À Universidade Federal do Amazonas pelo treinamento de hidrólise ácida, em especial ao Dr, Ítalo Thiago Matos, por quem tenho grande admiração e respeito, por toda a parceria ao longo deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos que sempre se preocuparam com minha saúde mental e física, me auxiliando nos momentos de dificuldades e me fazendo feliz nos momentos de desespero: Nelson Martins, Vanessa Alves, Alessandra Rodrigues, Sol Santos, Madalena Oliveira, Kelson Martins, Jamilly, Eliane Simas, Suená Santos, Sany Prado, Edmar Prado, Shirlany Torquato, Andréa Canto, Érica Veras, Suelen Belo, Karuliny Taveira, Clediane Souza, Conceição Alves, Edilacy Rosário, Leovergildo Farias, Leonildo Farias, Manoel Rosário, Daise Padilha, Edinelson Souza, Eloisa Maia, Lindemberg Galvão, Bruno Gomes, Kaynam Ramos, Monica Formoso, Elizabeth Alonso, Leonardo Hatman, Patricia Lima, Rafaela Vieira, Karoliny Vieira, Gilvana Prado, Rostan Guedes, Suellen Mota, Tharles Mesquita, Nanny Silva, Andres Barbosa e Carolina.

Aos meus amigos e familiares que foram para outro plano ao longo destes quatro anos, que não puderam partilhar este momento de finalização, mas que me deixaram lembranças de força, encorajamento e carinho: Vovô José Gouveia, Dr. Pablo Acosta, Rodrigo Lopes, Ingrid Peixoto e Vovó Maria das Dores Gouveia. Que estejam na luz e em paz.

O mundo é um livro, e quem fica sentado em casa lê somente uma página.

Santo Agostinho

RESUMO

A busca por alternativas que possam suprir a demanda de óleos vegetais está recebendo considerável atenção dos pesquisadores. Esta premissa associada à utilização de resíduos do setor agrícola tem sido considerada, pois a necessidade de proteger o meio ambiente são questões que tem fortalecido a prática da sustentabilidade no âmbito industrial. Em vista disso, a presente pesquisa buscou contemplar três objetivos principais: (i) avaliar a possibilidade de utilização das cascas de arroz oriundas do beneficiamento de arroz no Estado de Roraima em escala industrial, (ii) estabelecer condições ótimas de utilização das cascas de arroz para a obtenção de açúcares fermentáveis e (iii) avaliar o potencial de produção de óleo microbiano por leveduras selvagens isoladas de solos roraimenses. Para isto, inicialmente foi realizada uma pesquisa qualiquantitativa referente a produção e o beneficiamento do arroz em Roraima, em seguida, as cascas cedidas por quatro beneficiadoras localizadas no Distrito Industrial da cidade de Boa Vista/RR foram testadas por hidrólise ácida e enzimática, por meio de delineamento experimental. E por fim, as leveduras foram testadas quanto ao acúmulo de lipídios intracelular em meio convencional e em meio alternativo utilizando os hidrolisados obtidos em condições ácidas e enzimáticas, em testes independentes, e assim, avaliada a composição de ácidos graxos presentes para indicar o potencial de utilização dos óleos produzidos pelos microrganismos. Todos os testes laboratoriais foram realizados em triplicata e submetidos à análise estatística. Os resultados indicam que o volume de cascas gerados no beneficiamento do arroz em Roraima pode ser utilizado no desenvolvimento de produtos em escala industrial, agregando assim valor ao resíduo. Foi possível estabelecer protocolos para a utilização das cascas para fins fermentativos, em especial, na área da Microbiologia. Em condições convencionais, as leveduras de linhagens selvagens do gênero *Yarrowia* acumularam lipídios intracelulares com rendimento semelhantes ao rendimento lipídico de leveduras oleaginosas. Uma cepa da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* produziu ácido araquidônico (C20:4), um ácido graxo de interesse médico, utilizando protocolos não otimizados. Em condições alternativas, a utilização do hidrolisado enzimático da casca de arroz como substrato apresentou resultados próximos ao uso da glicose. Concluiu-se que, novas linhagens de leveduras apresentaram a capacidade em produzir quantidades consideráveis de lipídeos, com composição de ácidos graxos aplicáveis à produção de biodiesel, indústria médica e cosmética, e que Roraima possui potencial para o desenvolvimento de produtos fabricados com resíduos da rizicultura.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Beneficiadoras. Lipídios microbianos. Resíduos sólidos. Roraima.

ABSTRACT

The search for alternatives that can meet the demand for vegetable oils is receiving considerable attention from scientists. This premise associated with the use of waste from the agricultural sector has been considered, as the needs to protect the environment are issues that have strengthened the practice of sustainability in the industrial sphere. In view of this, the present research aimed to address three main objectives: (i) to evaluate the possibility of using rice husks from rice processing in the state of Roraima on an industrial scale, (ii) to establish optimal conditions for the use of rice husks to obtain fermentable sugars and (iii) to evaluate the potential of microbial oil production by wild yeasts isolated from roraimensi soils. To this end, a qualitative and quantitative research was initially conducted regarding rice production and processing in Roraima, and then the husks provided by four processors located in the Industrial District of Boa Vista/RR were tested by acid and enzymatic hydrolysis by experimental design. Finally, the yeasts were tested for intracellular lipid accumulation in conventional and alternative media using hydrolysates obtained in acidic and enzymatic conditions, in independent tests, and thus evaluated the composition of fatty acids present to indicate the potential of use of oils produced by microorganisms. All laboratory tests were performed in triplicate and subjected to statistical analysis. The results indicate that the volume of husks generated in rice processing in Roraima can be used in the development of industrial scale products, thus adding value to the residue. It was possible to establish protocols for the use of peels for fermentative purposes, especially in the area of microbiology. Under conventional conditions, yeasts from wild strains of genus *Yarrowia* accumulated intracellular lipids with yield similar to the lipid yield of oil yeasts. One strain of *Rhodotorula mucilaginosa* produced arachidonic acid (C20:4), a fatty acid of medical interest, using non-optimized protocols. Under alternative conditions, the use of rice husk enzymatic hydrolyzate as substrate showed results close to the use of glucose. It was concluded that new yeast strains showed the ability to produce considerable amounts of lipids, with fatty acid composition applicable to biodiesel production, medical and cosmetic industry, and that Roraima has potential for the development of products made with rice residues.

Keywords: Fatty acids. Beneficiaries. Microbial lipids. Solid waste. Roraima.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Início do beneficiamento do arroz. (A) arroz recém chegado à beneficiadora. (B) entrada do arroz no sistema de beneficiamento. (C) Fornos e Silos de espera.	21
Figura 2	–	Utilização das cascas pelas beneficiadoras locais. (A) cascas utilizadas in natura nas fornalhas. (B) máquina de fabricar briquete. (C) briquete.	23
Figura 3	–	Volume de cascas após o beneficiamento.	24
Figure 1	–	Total reducing sugar concentration ([TRS], g.L ⁻¹) of acid hydrolysis according to solid: liquid ratio (a), acid concentration (b) and state of rice husk (intact/tritured) (c).	42
Figure 2	–	Total reducing sugar concentration ([TRS], g.L ⁻¹) according to “substrate concentration” and “state of husk”, “enzyme concentration” (b) and “time” (c).	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Agronegócio do arroz no Brasil.....	19
Tabela 2 –	Beneficiadoras registradas na Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima.....	20
Tabela 3 –	Dados de origem, produção e destino dos resíduos do arroz irrigado beneficiado em Roraima.....	22
Table 1 –	Acid hydrolysis assays detailing use of the factorial experiment.....	40
Table 2 –	Enzymatic hydrolysis assays detailing the experimental design.....	41
Table 3 –	Complete results of total reducing sugar concentrations [TRS (g.L ⁻¹)] and total reducing sugar yield [Y _{TRS} (g.kg ⁻¹)] of each assay using intact and trituated rice husk for acid hydrolysis.....	42
Table 4 –	Complete results of total reducing sugar concentration ([TRS], g.L ⁻¹) and total reducing sugar yield (Y _{TRS} , g.kg ⁻¹) of each assay using intact and trituated rice husks for enzymatic hydrolysis.....	43
Table 1 –	Final microbial biomass, YSCO and yield for each strain in medium composed of glucose PA and different nitrogen sources.....	58
Table 2 –	Final biomass, YSCO final concentration and yield for each strain according to the of rice husk hydrolysate (RHH).....	60
Table 3 –	Fatty acids profiles accumulated according to the strain and to different substrate.....	63
Table 4 –	Statistical analysis of different nitrogen sources in medium composed of glucose as carbon source.....	72
Table 5 –	Statistical analysis when rice husks hydrolysates were provided as carbon source.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	ARTIGO 1: Rizicultura em Roraima e o gerenciamento dos resíduos.....	15
2.1	NORMAS DA REVISTA IBERO-AMERICANA DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS (RICA).....	29
3	ARTIGO 2: Production of fermentable sugars from rice husks by enzymatic and acid hydrolysis.....	37
3.1	ENGLISH REVISION CERTIFICATE.....	48
3.2	NORMAS DA REVISTA BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY.....	49
4	ARTIGO 3: AMAZONIAN YEASTS ABLE TO PRODUCE LIPIDS USING RICE HUSKS HYDROLYSATE AS CARBON SOURCE.....	54
4.1	NORMAS DA REVISTA BIOTECHNOLOGY ADVANCES.....	74
5	CONCLUSÕES.....	84

1 INTRODUÇÃO

O rápido e intenso desenvolvimento da tecnologia tem possibilitado a expansão dos processos biotecnológicos industriais, o que tem favorecido o aumento de pesquisas, que visem obter metabólitos que beneficiem os seres humanos. Essas pesquisas ganham destaque pela relevância tanto do ponto de vista social como também ambiental, pois representam a possibilidade de uso de recursos naturais renováveis, bem como, a obtenção de um grande número de compostos de interesse industrial nesses processos. Destacam-se nessas pesquisas, os microrganismos que, além das diversas vantagens para análises *in vitro*, possuem várias possibilidades de replicação em escala industrial, o que os tornam interessantes para o mercado.

Desde as civilizações mais antigas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais estudado, principalmente por sua utilização na preparação de pães e bebidas. No entanto, aos poucos, a atenção vem sendo direcionada para as demais espécies desse grupo. Atualmente, as leveduras são utilizadas nos mais diversos segmentos industriais, tais como os têxteis, farmacêutico, químico, de alimentos, petroquímica, entre outras. A capacidade das leveduras produzirem enzimas tem sido investigada incansavelmente nesses organismos, mas recentemente a acumulação de lipídeos também tem despertado grande atenção pelos microbiologistas.

Nesse sentido, entram em cena os óleos microbianos ou SCOs, sigla que inglês significa *single cell oils*. O emprego desses óleos visa diminuir a competição da indústria de alimentos com a oleoquímica, e de biocombustíveis. Para a indústria, eles apresentam diversas vantagens tais como perfis semelhantes aos óleos comercializados, facilidade em replicação de forma controlada, e a redução dos impactos ambientais causados pelas extensas plantações de grãos com a finalidade de obtenção de óleos vegetais.

Pelo fato de o estado de Roraima possuir riquezas naturais ainda longe de serem totalmente exploradas, principalmente pelos microbiologistas, há necessidade de aprofundar o conhecimento sobre o estudo dos óleos microbianos, e nesse caso, das leveduras ocorrentes e a capacidade destas em produzir óleos com características compatíveis aos que as indústrias utilizam. Isso agregará mais dados ao perfil do potencial biotecnológico desses microrganismos.

Outra realidade é o acúmulo de lixo e a falta de planejamento na gestão desses resíduos, que embora discutida em conferências internacionais, estão longe de serem

solucionados. A casca de arroz que está entre os maiores resíduos agroindustriais produzidos no planeta, e que tem como principal forma de descarte, a queima, configura-se como um dos resíduos mais gerados no Estado de Roraima pelo fato de haver produção o ano inteiro, e consequentemente, geração de subprodutos, dentre estes a casca de arroz.

A busca por uma alternativa para a utilização desse resíduo industrial, a partir do seu emprego como fonte de carbono para as leveduras oleaginosas foi uma das propostas da presente pesquisa, para desta forma, eliminar o resíduo gerado pelo beneficiamento de arroz, a casca; e fabricar produtos com valor agregado, neste caso, o óleo microbiano. Além disso, levando em consideração que boa parte das pesquisas têm se concentrado nas regiões sul e sudeste, e que nenhum microrganismo e substrato local tenham sido testados nesta linha, a presente pesquisa foi pioneira em Roraima. Assim, o trabalho teve duas perguntas norteadoras: Existem leveduras oleaginosas na Coleção de Culturas do PRONAT/UFRR? Cascas de arroz podem ser utilizadas como fontes de carbono na Biotecnologia?

A pesquisa teve como objetivo geral utilizar casca de arroz na produção de óleo microbiano a partir de leveduras amazônicas oleaginosas, tendo como objetivos específicos: levantar informações sobre a produção de arroz irrigado e descarte dos resíduos gerados em Roraima; obter açúcares fermentáveis por meio da hidrólise das cascas de arroz; avaliar a capacidade de acumulação de lipídeos por leveduras depositadas na Coleção do Laboratório de Microbiologia do PRONAT-UFRR; determinar a biomassa, o rendimento lipídico e o teor lipídico dos óleos produzidos por meio convencional; testar a capacidade de produção de óleo microbiano utilizando casca de arroz hidrolisada como fonte de carbono; determinar a biomassa, o rendimento lipídico e o teor lipídico produzidos por casca de arroz hidrolisada como fonte de carbono; e, caracterizar os ácidos graxos presentes nos óleos extraídos

De acordo com as “Normas para apresentação de trabalhos técnico-científicos da UFRR, aprovado pela Resolução nº08/2017-CEPE/UFRR, que permite a estruturação de tese utilizando artigos científicos, esta Tese foi construída em três artigos, os quais estão dispostos de forma ordenada, seguindo os objetivos, para uma melhor compreensão dos temas que vão ser abordados ao longo da mesma. No primeiro artigo, apresenta-se a avaliação da necessidade de buscar novas alternativas para a utilização das cascas de arroz, onde, por meio de análise documental e visitas técnicas, foi realizada uma estimativa de geração de resíduos agroindustriais e forma de descarte do mesmo na cidade de Boa Vista/RR. Este artigo foi encaminhado a Revista Ibero-americana de Ciências Ambientais (RICA), que possui Qualis B1.

No segundo artigo, encontra-se consolidado o protocolo para obtenção do mosto com

a concentração de açúcares ideal para a fermentação de leveduras. Foram testadas a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática das cascas de arroz, utilizando o amido residual do processo de descasque como fonte de carbono. Este artigo foi encaminhado a Revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, que possui Qualis A2.

O terceiro artigo discorre sobre as leveduras oleaginosas e a necessidade de aperfeiçoar a produção do óleo microbiano para que possa concorrer com os demais óleos comercializados, para isso, incluindo os resíduos agroindustriais no processo de fermentação. Além disso, neste artigo foram selecionadas as leveduras oleaginosas e um protocolo de produção ótima para cada cepa testada. Este artigo foi encaminhado a Revista *Biotechnology Advances*, que possui Qualis A1.

2 ARTIGO 1: Rizicultura em Roraima e o gerenciamento dos resíduos

Autores: *Andreia da Silva Alencar*
Lindemberg de Matos Galvão
Marcos José Salgado Vital
Adriana Flach

RIZICULTURA EM RORAIMA E O GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS

Resumo

O Brasil permanece se destacando mundialmente na produção de arroz em casca. No entanto, vale destacar que durante o processo de beneficiamento, ocorre a geração de alguns resíduos, dentre estes, a casca do arroz, que representa aproximadamente 20% do total do arroz em casca produzido. Portanto, o objetivo desse estudo é identificar a produção de arroz irrigado e a destinação dos resíduos provenientes do processo de beneficiamento de arroz em Boa Vista, capital do Estado de Roraima. Por meio de uma metodologia qualiquantitativa, com visitas às beneficiadoras e pesquisa documental, foi possível realizar a atualização dos dados de produção e identificar a destinação da casca de arroz em três beneficiadoras situadas no município. Desse modo, observou-se que, em geral, as empresas incineram as cascas de arroz resultantes do processo de beneficiamento, utilizando como combustível para a etapa da secagem do arroz, além de venderem a terceiros para ser utilizado em trabalhos pastoris e o excedente é descartado no aterro sanitário. Sendo assim, faz-se necessário buscar outras destinações que sejam economicamente viáveis e ambientalmente saudáveis para o aproveitamento deste resíduo, os quais possuem um grande potencial no setor industrial, tornando o ciclo do arroz em Roraima menos poluente, efetivamente sustentável e ainda mais rentável, agregando um maior valor ao produto.

Palavras - chave: Arroz irrigado. Cascas de arroz. Beneficiadoras. Brique. Boa Vista.

INTRODUÇÃO

Um dos principais produtos agrícolas de Roraima, o arroz é considerado um dos alimentos mais cultivados e consumidos no mundo. O plantio do arroz está presente em mais de 100 países e atende as necessidades de consumo de, aproximadamente, dois terços da população mundial. O setor tem participado de forma crescente na composição do Produto Interno Bruto (PIB), do país e das regiões produtoras, como é o caso de Roraima. A produção de arroz no Estado até a década de 1980 era tipicamente de sequeiro (lavrado); a mudança para plantio irrigado visou eliminar os efeitos da estiagem no ciclo de produção no modelo anterior e para conter pragas e doenças que geravam perdas significativas na produção do arroz. Desde então, predomina o plantio irrigado em várzeas, com técnicas e tecnologias usadas pelos Estados produtores do sul do país (FEITOSA et al., 2016).

Cordeiro et al. (2010) relatam que o cultivo de arroz no Estado é realizado duas vezes ao ano, 70% no período seco (setembro a março) e o restante no período chuvoso (abril a agosto). O sistema de produção é desenvolvido por cerca de 20 produtores que cultivam em média 600 hectares/ano, sendo as maiores lavouras com áreas acima de 1.000 hectares/ano. Apesar de tamanha importância e de ser considerada uma das principais atividades agrícolas, poucas são as publicações com relato histórico e análise do cultivo do arroz em Roraima.

Quando se fala na franca expansão das atividades econômicas dos últimos anos, ocorre um grande debate sobre os impactos causados ao meio ambiente. Isto porque não há como se preocupar com a necessidade de introduzir a sustentabilidade neste contexto, haja vista que tudo que é produzido foca ao consumo e, por conseguinte, gera a eliminação da produção que sobra e a transformação desta nos mais

diversos tipos de resíduos sólidos (COSTA, 2015). Desta forma, com o crescimento da população mundial verifica-se uma maior demanda de alimentos, e conseqüentemente são geradas grandes quantidades de resíduos agrícolas, que normalmente são jogados em rios ou lançados em depósitos a céu aberto, acarretando em contaminação do meio ambiente e prejuízos à saúde humana, principalmente quando tais resíduos são depositados em áreas urbanas (CORDEIRO et al., 2007).

A casca de arroz entra neste cenário por ser um dos resíduos agroindustriais mais abundantes, pelo elevado volume gerado e por sua baixa densidade. E dentre os principais cereais, é o que produz maior percentual de cinzas, seguido por bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, folha de milho e folhas de sorgo (MEHTA, 1992). Além disso, quando descartada de forma inadequada, o acúmulo de camadas de casca desencadeia um processo de decomposição anaeróbica, produzindo gases poluentes como o metano e o óxido nitroso, que são danosos à camada de ozônio. Já as cinzas, por possuírem uma elevada quantidade de carbono residual, quando descartadas diretamente sob o solo são altamente poluentes, e em contato com os lençóis freáticos. Outro malefício causado pelas cinzas é a doença silicose que ataca os pulmões ao inalar com certa freqüência este resíduo (COSTENARO et al., 2003; FOLETTO et al., 2005).

A NBR 10004 (ABNT, 2004) conceitua resíduos sólidos como resíduos nos estados sólido e semissólido, que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. A Lei n. 12.305/2010 determina que a gestão e gerenciamento de resíduos sólidos são de responsabilidade do poder público municipal e prescreve sanções em caso de descumprimento (BRASIL, 2010). Nesse sentido, dentre os diversos problemas locais com resíduos sólidos, cumpre destacar o mais atual que a capital vem enfrentando: a questão do despejo dos resíduos sólidos no aterro sanitário que já se encontra saturado e ocasiona danos ambientais, que podem ocasionar diversos tipos de doenças por ser próximo à habitações urbanas (COSTA, 2015).

Além disso, o aterro sanitário municipal construído em 2002 está a menos de cento e cinquenta metros das margens do Igarapé Wai Grande, afluente do Rio Branco, principal rio do Estado, e que apresenta exaustão e saturação de resíduos sólidos tais como: resíduos domésticos, entulhos de construção civil, galhadas. Estes estão dispostos de forma inadequada em toda a área do aterro, propiciando diversos impactos ambientais no solo, ar e lençol freático (FALCÃO et al., 2012).

Com base nisso, há uma preocupação com os resíduos gerados durante o beneficiamento do arroz que, neste caso, por ser um volume exorbitante, tenderia a aumentar o problema, caso as empresas não buscassem novas formas de reaproveitar as cascas de arroz. A Lei n° 416/2004, em seu artigo 90, prevê que as empresas instaladas e que venham se instalar no Estado são responsáveis pelo acondicionamento, armazenamento, coleta, transporte, transferência, tratamento e disposição final de seus resíduos, sendo passíveis de responsabilidade ao dano causado ao meio ambiente, incluindo no processo de dano ambiental, os transportadores e receptores dos resíduos (RORAIMA, 2004).

Nesse sentido, pretendeu-se levantar informações sobre a produção de arroz irrigado e descarte dos resíduos gerados em Roraima, buscando novas formas de utilização para o material lignocelulósico, a fim de agregar valor e reduzir danos ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Segundo Gil (2010), a metodologia das pesquisas científicas pode ser classificada e definida conforme sua abordagem, finalidade e procedimentos técnicos empregados, sendo dividida em qualitativa e quantitativa. Dentre as metodologias de pesquisa que apresentam abordagem qualitativa, o estudo de caso, a etnografia e a pesquisa documental configuram-se como aqueles comumente utilizados, apesar de sua flexibilidade não excluírem outras possibilidades de estratégias (GODOY, 1995). Enquanto que na pesquisa quantitativa, a coleta de dados é realizada através de questionários que apresentam variáveis distintas, cujas análises são geralmente apresentadas através de tabelas e gráficos (FACHIN, 2006).

Desta forma, o presente estudo foi realizado na cidade de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, assumindo uma definição qualiquantitativa, pois apesar de não empregar ferramental estatístico para a análise do problema, utilizou-se de quantificações e percentuais para tanto, fazendo uso também da observação e da descrição do objeto de estudo. A fração qualitativa foi do tipo descritiva e exploratória, visando descrever a produção de arroz e a forma de descarte dos resíduos produzidos pelas beneficiadoras, para assim, observar e analisar os dados, sem nenhuma interferência do pesquisador.

Quanto aos procedimentos técnicos, esta pesquisa classifica-se como documental e observacional realizada por visitas técnicas às beneficiadoras, à associação dos arroseiros, à EMBRAPA/RR e à ADERR. Segundo Andrade (2009), pesquisa descritiva é aquela pesquisa em que os fenômenos/dados são estudados sem serem manipulados pelo pesquisador; e exploratória é aquela que proporcionar maiores informações sobre determinado assunto ainda pouco abordado.

RESULTADOS

PRODUÇÃO DE ARROZ IRRIGADO EM RORAIMA

A Tabela 1 apresenta os dados nacionais de área colhida, produção de arroz e a produtividade de arroz irrigado de 2015 a 2018, e uma estimativa até agosto de 2019 (CONAB, 2018). Excluindo os dados de estimativa, nos últimos três anos tabulados, Roraima teve uma média de 11.100 hectares de área colhida, com produção de 78.100 toneladas de arroz em casca e produtividade de 7.058,3 Kg.ha⁻¹ (CONAB, 2018).

Desta forma, em produção (Área x Produtividade), Roraima é o quarto maior produtor de arroz irrigado (em várzeas), devido a área plantada ser de apenas 10.000 ha (em média), perdendo apenas para Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins. No entanto, em produtividade (kg produzidos por ha), Roraima é o terceiro, ficando atrás apenas de Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Estes dados tornam a geração dos resíduos bem como sua forma de descarte fatores passíveis de análise científica.

Tabela 1 – Agronegócio do arroz no Brasil

REGIÃO/UF	ÁREA (ha)				PRODUTIVIDADE (t/ha)				PRODUÇÃO (t)			
	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 ⁽¹⁾	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 ⁽¹⁾	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 ⁽¹⁾
NORTE	110.6	122.4	124.7	122.9	5,799	5,970	5,478	5,637	641.3	730.7	683.1	692.9
RR	8.6	12.3	12.3	10.4	7,023	7,077	7,075	7,075	60.4	87.0	87.0	73.6
PA	4.9	5.1	5.6	5.6	4,000	4,433	3,446	4,733	19.6	22.6	19.3	26.5
TO	97.1	105.0	106.8	106.9	5,781	5,915	5,401	5,545	561.3	621.1	576.8	592.8
NORDESTE	17.1	15.9	21.2	15.1	5,260	5,732	5,697	5,614	90.1	91.1	114.0	84.8
MA	1.8	1.4	3.8	2.5	3,700	5,020	4,500	4,833	6.7	7.0	17.1	12.1
PI	5.9	5.2	5.3	4.7	4,212	4,453	4,478	4,478	24.9	23.2	23.7	21.0
CE	-	0.6	0.1	0.4	-	5,900	5,500	6,440	-	3.5	0.6	2.6
RN	1.0	1.0	1.1	0.8	2,931	3,766	3,945	3,354	2.9	3.8	4.3	2.7
PE	0.3	0.2	0.4	0.4	4,500	4,000	5,259	8,150	1.4	0.8	2.1	3.3
AL	3.0	2.8	5.8	2.4	5,720	6,220	6,500	6,090	17.2	17.4	37.7	14.6
SE	5.1	4.7	4.0	3.9	7,255	7,540	7,125	7,310	37.0	35.4	28.5	28.5
CENTRO-OESTE	16.0	41.3	35.0	35.0	4,753	5,532	5,489	5,229	76.0	228.5	192.1	183.0
MT	2.0	10.9	5.8	7.7	4,000	3,815	3,659	2,772	8.0	41.6	21.2	21.3
MS	14.0	15.5	14.3	10.7	4,860	6,000	5,700	5,800	68.0	93.0	81.5	62.1
GO	-	14.9	14.9	16.6	-	6,300	6,000	6,000	-	93.9	89.4	99.6
SUDESTE	13.9	9.0	8.9	8.3	3,399	4,429	4,501	5,669	47.3	39.9	40.1	47.1
MG	5.5	1.3	1.3	0.9	2,580	6,043	5,577	6,631	14.2	7.9	7.3	6.0
SP	8.4	7.7	7.6	7.4	3,935	4,157	4,317	5,552	33.1	32.0	32.8	41.1
SUL	1,242.7	1,267.9	1,244.0	1,165.8	6,853	7,893	7,827	7,391	8,515.7	10,006.9	9,736.4	8,616.2
PR	19.3	19.8	19.7	20.2	5,533	7,704	6,324	6,737	106.8	152.5	124.6	136.1
SC	147.4	147.4	146.7	144.5	7,139	7,638	7,850	7,550	1,052.3	1,125.8	1,151.6	1,091.0
RS	1,076.0	1,100.7	1,077.6	1,001.1	6,837	7,930	7,851	7,381	7,356.6	8,728.6	8,460.2	7,389.1

⁽¹⁾ Estimativa em agosto/2019.

Fonte: Conab (2018)

AGROINDÚSTRIAS DE ARROZ IRRIGADO E O BENEFICIAMENTO DO ARROZ EM RORAIMA

A Tabela 2 apresenta o nome fantasia das empresas registradas como beneficiadoras, marcas comercializadas pelas respectivas empresas e o tipo de grão vendido, conforme dados obtidos pela Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima. São seis beneficiadoras, as principais beneficiadoras, em um total de 18 marcas comercializadas dos tipos 1 e 3, além de marcas fora de Tipo.

Tabela 2. Beneficiadoras registradas na Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima.

BENEFICIADORA	MARCA	TIPO
1 Faccio Alimentos LTDA	Faccio	Tipo 1
	Integral	Tipo 1
	Dona Elly	Fora de Tipo
2 G. Faccio	Prato Chic	Tipo 1
	Safrinha	Fora de Tipo
3 Casarin e Ferrari LTDA	Tropical	Tipo 1
	Do Norte	Fora de Tipo
	Rio Branco	Fora de Tipo
4 Itikawa Ind. e Com. LTDA	Itikawa Gold	Tipo 1
	Integral	Tipo 1
	Oriental	Tipo 1
	Mais Sabor	Fora de Tipo
5 M. H. Ferronato cia LTDA	Tia Maria	Tipo 1
	Garimpeiro	Tipo 3
6 Ivo Barili Ind. e Com. LTDA	Tio Ivo	Tipo 1
	Integral	Tipo 1
	Macuxi	Tipo 3
	Popular	Fora de Tipo

Das seis beneficiadoras, apenas três aceitaram receber a visita técnica e ceder os dados necessários ao desenvolvimento da presente pesquisa: Itikawa Ind. e Com. LTDA, Ivo Barili Ind. e Com. LTDA, e M. H. Ferronato cia LTDA. A Tabela 3 dispõe dos dados obtidos na visita técnica e análise documental realizada nas beneficiadoras. Pode-se notar que com a demarcação da Raposa Serra do Sol e a retirada dos arrozeiros, houve uma migração dos fazendeiros para áreas vizinhas ao município de Pacaraima, além do estabelecimento de fazendeiros na Guyana Inglesa, país vizinho às áreas de plantio. As beneficiadoras visitadas servem a quatro arrozeiros, beneficiando em torno de 13.000 toneladas de arroz sem casca ao ano proveniente de sete fazendas.

Na indústria, o grão passa por várias etapas até atingir as condições necessárias à comercialização. Inicialmente, o arroz é colhido no ponto ideal de colheita que é determinado basicamente pelo aspecto da panícula, pela duração de estádios de desenvolvimento da cultura e pelo teor de umidade dos grãos (entre 18% e 27%). Admite-se uma observação visual cuidadosa para determinar, com bastante precisão, o momento mais favorável para a colheita. O maior rendimento é obtido quando, aproximadamente, dois terços superiores do ráquis estão amarelecidos, ocorrendo o curvamento da panícula (Figura 1A).

Chegando às beneficiadoras, o arroz é colocado em moegas onde ocorre a pré-limpeza, que é realizada através de uma peneira, onde ocorre a retenção das impurezas mais grosseiras como talos da planta, pedras, terra, pedaços dos sacos de estopa que foram usados no transporte do grão, entre outros

(Figura 1B). Na sequência, é realizada a secagem, onde se utilizam ar e calor em equilíbrio para que os grãos estejam na umidade correta, finalizando o processo com a transferência dos grãos para o silo de espera, até que o arroz seja beneficiado (Figura 1C).

Figura 1. Início do beneficiamento do arroz. (A) arroz recém chegado à beneficiadora. (B) entrada do arroz no sistema de beneficiamento. (C) Fornos e Silos de espera.



Na etapa de beneficiamento propriamente dita, ocorre uma nova limpeza utilizando peneiras de crivo menor para retirar algum material que não foi retido na pré-limpeza. Em seguida, ocorre o descascamento do arroz, separando o arroz integral da casca. Para isso, utiliza-se um mecanismo que utiliza dois roletes de borracha girando em direções opostas e com velocidades diferentes. Neste momento que o arroz integral é classificado em inteiro ou quebrado. Após o descasque, o produto é encaminhado ao brunidor de arroz, um equipamento que irá lixar o arroz utilizando um sistema de pedras abrasivas, transformando-o de arroz em estado integral para arroz branco, através retirada do farelo.

Na etapa seguinte, o arroz é polido retirando o farelo que ainda permanece impregnando no grão, e então, passado por duas peneiras: de marinheiro e de gesso, e uma selecionadora, onde ocorre a classificação dos grãos de arroz, separando os grãos inteiros que possuem valor comercial dos grãos quebrados. Os subprodutos são separados em maior quantidade nesta etapa, sendo a quirera, o farelo de arroz e o arroz quebrado, os mais abundantes. Por fim, os grãos são embalados, são montados fardos e, então, encaminhados ao mercado local ou exportados. Os demais subprodutos e resíduos são armazenados nas beneficiadoras para comercialização ou descarte.

Tabela 3. Dados de origem, produção e destino dos resíduos do arroz irrigado beneficiado em Roraima.

INFORMAÇÕES	BENEFICIADORAS		
	A	B	C
Locais de origem dos grãos	Amajari e Bonfim	Amajari, Bonfim e Normandia	Cantá e Guyana Inglesa
Quantidade de arrozeiros que utilizam a beneficiadora	02	01	01
Quantidade média de arroz beneficiado ao mês	500 toneladas	504 toneladas	400 toneladas
Produtos e subprodutos gerados	• Arroz integral • Arroz quebrado • Farelo de arroz • Quirera de arroz • Casca	• Arroz integral • Arroz ¾ • Xerem fino • Xerem grosso • Cuim • Casca	• Arroz integral • Arroz ¾ • Cuim • Xerem • Casca
Destino das cascas de arroz	• Aterro sanitário • Estábulo de animais • Sítios • Fornalhas	• Fornalha (combustível) • Fornecimento das cinzas às hortas e olarias	• Fornalhas • Venda à terceiros

DESTINO DOS RESÍDUOS

Todas as beneficiadoras observadas utilizam as cascas nas fornalhas, como fonte de energia (Figuras 2A). Uma das empresas otimizou o processo utilizando um equipamento que compacta o resíduo e o transforma em briquete, semelhante à pedaços de troncos de árvore, para posteriormente ser utilizada nas fornalhas, no processo de secagem dos grão (Figuras 2B e 2C). No entanto, mesmo com a utilização das cascas como combustível, as beneficiadoras não conseguem utilizar todo o resíduo, necessitando dar outros destinos para que não fique acumulado na própria beneficiadora (Figura 3).

Figura 2. Utilização das cascas pelas beneficiadoras locais. (A) cascas utilizadas in natura nas fornalhas. (B) máquina de fabricar briquete. (C) briquete.



A casca excedente é cedida para olarias ou para utilização como adubo por hortas. Donos de estábulos e sítios utilizam como cama para seus animais. Uma das beneficiadoras comercializam à terceiros, outra transforma em cuim para que seja incluído na ração de animais. O resíduo que não tem nenhum dos destinos anteriores é descartado no aterro sanitário.

As beneficiadoras visitadas geram, ao ano, cerca de 3.370 toneladas de cascas. Isso gera diversas reflexões sobre os efeitos que a deposição incorreta deste subproduto pode ocasionar ao meio ambiente. Em muitos lugares, os produtores têm pouco ou nenhum conhecimento dessas desvantagens. Cabe ao pesquisador apontar a problemática e ir mais além, indicando medidas que consigam ser aceitas por essas pessoas, e que beneficiem tanto ao meio ambiente como ao produtor/beneficiador. Estas alternativas, para

serem adotadas rapidamente, devem ser economicamente viáveis e ambientalmente corretas, caso contrário, irá estacionar na fase de planejamento.

Figura 3. Volume de cascas após o beneficiamento.



INDICATIVOS DE UTILIZAÇÃO

Na indústria do arroz, a produção de casca pode ser rentável para a indústria, podendo ser empregado em diversos setores, especialmente as cinzas, pelo alto teor de sílica que apresenta. Desse modo, o ideal tanto do ponto de vista econômico quando ambiental é buscar uma forma de utilizar os resíduos de forma completa. Ferro et al. (2017) relatam que as cinzas das cascas de arroz, por possuir 96% de dióxido de silício, podem substituir o talco, como carga, na indústria automotiva, mais especificamente na fabricação de autopeças, o que pode contribuir para a diminuição de possíveis problemas ambientais.

Fonseca et al. (2016) ao avaliar a influência da concentração inicial da solução padrão, pH e tempo de contato na adsorção de cromo hexavalente (Cr VI) pela casca de arroz, demonstraram que as soluções de pH 2 obtiveram as maiores quantidades adsorvidas, com remoção máxima de 78,4% de cromo hexavalente na solução padrão de concentração de 1 ppm, após uma hora de contato, podendo ser utilizada na descontaminação da água por metais pesados.

Alves et al. (2018) verificaram a aplicação das cinzas das cascas de arroz na produção de argamassa. Por meio de análises dessa cinza, percebeu-se que ela é rica em sílica e possivelmente pozolânica. A partir disso, buscou-se incorporá-la em misturas de argamassa no lugar de frações mássicas de cimento Portland (5, 10, 15 e 20%) e comparar a resistência à compressão das misturas fracionadas com a argamassa padrão. Foram realizados ensaios buscando caracterizar a cinza como material pozolânico e leve, como análise microestrutural, de infravermelho, colorimétrica, densidade e granulometria. Posteriormente, foram realizados ensaios de compressão, de expansibilidade e de pasta normal para determinar as mudanças obtidas ao incorporá-la ao cimento. Os ensaios mostraram uma menor expansibilidade com a adição de cinza e um aumento na resistência à compressão para composições em torno de 10% de massa.

Outro emprego das cinzas é na produção do silicato de sódio, pois é um processo caro e requer alto consumo energético, sendo fabricada a uma temperatura próxima de 1400 °C a partir de areia e carbonato de sódio, gerando a emissão de gases como dióxido de carbono, nitrogênio e enxofre. A cinza da casca de arroz torna-se uma opção interessante para produção do silicato alternativo por possuir alto teor de sílica amorfa, podendo ser dissolvida em solução alcalina, o que é favorecido pelo fato da casca do arroz ser o principal resíduo vegetal na produção de cinza quando realizado o processo de incineração. A sílica amorfa proveniente do resíduo é dissolvida em uma solução alcalina, onde ocorre o aumento do teor de sílica, tornando-se uma solução altamente reativa, e quimicamente similar ao silicato de sódio comercial (TCHAKOUTÉ, 2016).

DISCUSSÃO

Feitosa et al. (2016) afirmam que Roraima que devido a demarcação de terras indígenas que reduziu as áreas de plantio do arroz, o Estado perdeu o segundo lugar de produtor nacional. No que tange a produtividade, a posição de Roraima mostra-se promissora, pois segundo Saath et al. (2018), diante das restrições sobre a expansão do uso de terra para uso agropecuário no Brasil, a ampliação da produtividade se apresenta como um caminho necessário para a ampliação da oferta. Sendo exatamente o crescimento da produtividade que permitiu elevar a oferta acima da demanda mundial de alimentos no período pós-revolução tecnológica no campo (FAO, 2013).

Há dez anos, esses números eram superiores: faziam parte da Cadeia Produtiva, 14 agroindústrias que comercializam 27 marcas de arroz (BRAGA et al., 2009). Isso mostra uma expressiva redução ocasionada pela demarcação, o que levou os produtores a migrarem para outros espaços e recomeçar, muitas vezes, do zero e seguindo novas dinâmicas de plantação, colheita e processamento. Não foi possível verificar quais os subsídios ofertados pelo poder público aos arrozeiros, tendo em vista, a importância da produção do grão em nível nacional.

Na natureza, as cascas de arroz têm um lento processo de decomposição natural, gerando um grande impacto ao meio ambiente quando seu descarte é realizado sem nenhum planejamento, ainda mais que as beneficiadoras, em sua maioria, estão localizadas próximas aos centros urbanos, como no caso das beneficiadoras desta pesquisa. De acordo com Walter et al. (2008), cerca de 20% de toda produção total de arroz corresponde a sua casca. Considerando os dados de produção de arroz em casca para Roraima nos últimos anos, que foi de 78.100 toneladas, em média, houve a geração de 15.620 toneladas de cascas, que sem um destino ou descarte adequado, vira um resíduo, poluindo o meio ambiente.

Lima et al. (2013) avaliando as concepções dos trabalhadores sobre o uso de agrotóxicos em projetos de irrigação em Tocantins, demonstraram que há uma dificuldade para a proteção dos ecossistemas naturais principalmente pelos diferentes entendimentos a respeito dos valores e da importância entre os indivíduos de culturas diferentes que desempenham funções distintas nos ambientes.

Assim, os agricultores, de modo geral, adotam medidas de acordo com suas necessidades para produção e conseqüentemente geração de renda, sem ter a dimensão da problemática. A busca por alternativas que façam com que cada produção seja utilizada o máximo possível, auxilia na minimização dos impactos ocasionados pelo uso acentuado dessas substâncias tão nocivas. Haja em vista, que Tocantins é um exemplo de grande produtor de arroz irrigado. Sendo assim, os indicativos de utilização da cascas de arroz que tratados neste trabalho são de grande importância, tanto para produções industriais, quanto em escala menor, por agricultores familiares.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível verificar que a cadeia produtiva do arroz em Roraima permanece consolidada ao longo dos anos, indo desde a produção do grão, passando pelo beneficiamento até a completa distribuição do produto final. O processo de beneficiamento é realizado de forma mecanizada na capital do Estado, com o aproveitamento dos subprodutos e dos resíduos. No entanto, o volume de cascas geradas não tem sido totalmente utilizado, resultando no despejo em aterros e meio ambiente. O trabalho permitiu trazer novas possibilidades de utilização do resíduo, já empregada em outros locais, para que os agricultores locais possam tornar o agronegócio do arroz ainda mais sustentável, fechando o ciclo de produção de forma correta, agregando valor ao resíduo gerado e contribuindo para a qualidade ambiental.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT, pelo apoio; aos responsáveis pelas beneficiadoras de arroz Tia Maria, Tio Ivo e Itikawa por terem fornecido os dados necessários ao desenvolvimento deste trabalho; à EMBRAPA, na pessoa do Dr. Antonio Carlos Centeno Cordeiro pelo fornecimento de informações técnicas.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. C. A.; COLLARES, M. G. V.; SILVA, G. O. R.; PEREIRA, M. C.; SILVA, N. C. L.; NEVES, P. H. A. S. Extração de Sílica Residual Proveniente da Casca de Arroz e Aplicação na Produção de Argamassa. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 127-136, 2018.

ANDRADE, M. M. de.. **Introdução à metodologia do trabalho científico**: elaboração de trabalhos na graduação, 9 ed. São Paulo: Atlas, 2009.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10004**. Resíduos sólidos – Classificação, ABNT: Rio de Janeiro, 2004.

BRAGA, R. M.; CORDEIRO, A. C. C.; MARIANO, F. S.; MARIANO, F. S. Mercado varejista de arroz em Boa Vista, Roraima. **Documento 18**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009.

BRASIL. **Lei n. 12.305/2010: institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília: Senado Federal, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Arroz irrigado – Brasil: Série Histórica de Produção, ONLINE**, 2018.

CORDEIRO, A. C. C.; MEDEIROS, R. D. DE. Evolução do Cultivo e Custo de Produção do Arroz Irrigado em Roraima. **Comunicado Técnico 47**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2010.

CORDEIRO, L. DE N. P.; HENRIQUES, A. C. A.; SOUZA, P. S. L. Contribuição ao estudo de aproveitamento da cinza do caroço do açaí como material pozolânico. In: 49º Congresso Brasileiro do Concreto – CBC 2007, Bento Gonçalves, **Anais**. Bento Gonçalves: CBC, 2007.

COSTA, B. C. A. Os resíduos sólidos e o desenvolvimento regional sustentável em Boa Vista – RR. **Revista Eletrônica EXAMÃPAKU**, Boa Vista, v. 8, n. 2, p. 57-74, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1983-9065ex.v8i2.3110>

COSTENARO, F. C.; LIBORIO, J. B. L. Efeito da adição de cinza e sílica da casca de arroz em concretos. In: 45º CONGRESSO BRASILEIRO DE CONCRETO, Vitória, **Anais**. Vitória: IBRACON, 2003.

FACHIN, O. **Fundamentos de Metodologia**. 5 ed. São Paulo: Saraiva, 2006.

FALCÃO, M. T.; BUÁS, A. I. C.; PINHEIRO, M. N. M.; OLIVEIRA, S. K. S. Impactos ambientais no igarapé Wai Grande em Boa Vista - Roraima decorrentes da influência do aterro sanitário. **Revista Geonorte**, Manaus, v. 3, n. 4, p. 199-207, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.21170/geonorte.2012.V.3.N.4>

FAO, Fao statistical yearbook. world food and agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome. n. 307, 2013.

FEITOSA, M. A.; DOS SANTOS, I. C.; PEREIRA, R. S. Cultivo do Arroz em Roraima: sustentabilidade e inovação. **Revistas Espacios (online)**, [s. l.], v. 37, n. 16, p. 1-13, 2016.

FERRO, W. P.; SILVA, L. G. A.; WIEBECK, H. Uso da cinza da casca do arroz como carga em matrizes de poliamida 6 e poliamida 6.6. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 17, n. 3, p. 240-243, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282007000300014>

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR, U. L.; JAHN, S.L. Applicability of Rice Husk Ash, **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 1055–1060, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600021>

FONSECA, H. C.; FONSECA, S. C.; PEREIRA, C. A. F. Uso da cinza da casca de arroz na adsorção de cromo hexavalente. **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v. 8, n. 1, p. 16-21, 2016.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 5 ed., São Paulo: Atlas, 2010.

GODOY, A. S. A pesquisa qualitativa e sua utilização em administração de empresas. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, n. 35, v. 4, p. 65-71, 1995.

LIMA, R. A. M.; PARENTE, T. G.; MALVASIO, A. Concepções dos trabalhadores sobre o uso de agrotóxicos em projetos de irrigação, Lagoa da Confusão – TO, Brasil. **Gaia Scientia**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1-14, 2013.

MEHTA, P. K. **Rice husk ash - A unique supplementary cementing material**. In: *Advances in Concrete Technology*. Ed. V.M. Malhotra, Canmet, Canada: Ottawa, p. 407- 431, 1992.

RORAIMA. **Lei n. 416/2004**. Dispõe sobre a Política Estadual de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos e dá outras providências. Boa

Vista: DOE, 2004.

SAATH, K. C. O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 195-212, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>

TCHAKOUTÉ, H. K.; RÜSCHER, C. H.; KONG, S.; LEONELLI, C. Geopolymer binders from metakaolin using sodium waterglass from waste glass and rice husk ash as alternative activators: A comparative study. **Construction and Building Materials**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 276–289, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.03.184>

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400049>

2.1 NORMAS DA REVISTA IBERO-AMERICANA DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS (RICA)



As normas de submissão são requisitos básicos para aceitação de trabalhos a serem publicados em qualquer uma das revistas da CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica. Admitem-se dois tipos de trabalhos acadêmicos: artigos ou notas científicas. Para cada um dos tipos de trabalhos admitidos os autores deveram observar requisitos de estrutura, formatação, citações e referências.

Não são aceitos autores que não tenham cadastro e currículo ativo na **Plataforma Lattes** (<http://lattes.cnpq.br>) do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (CNPQ) ou no **ORCID** (<https://orcid.org/>). Os pesquisadores brasileiros só poderão receber bolsas de estudo da CAPES e do CNPQ com estes cadastrados efetivados. O link para o **LATTES** deve ser inserido no campo URL, e o link para o **ORCID** deve ser inserido no campo ORCID do sistema de submissão.

1.1. ESTRUTURA

1.1.1. Seção Artigos

Na seção Artigos serão publicados artigos originais ou de revisão. Artigos originais são aqueles que apresentam temas e abordagem originais, enquanto artigos de revisão são aqueles que melhoram ou atualizam significativamente as informações de trabalhos anteriormente publicados. A estrutura do artigo, entre 10 e 20 laudas¹, deve conter os elementos pré-textuais, os textuais no formato IRMRDC (Introdução, Revisão, Metodologia, Resultados, Discussão e Conclusões) para trabalhos com resultados de campo, ou IMDTC (Introdução, Metodologia, Discussão Teórica e Conclusões) para pesquisas de revisão teórica sem resultados de campo, e ainda os elementos pós-textuais, como segue:

Elementos pré-textuais: título, subtítulo (se houver), nome e biografia dos autores (**apenas no sistema, pois na fase de submissão, devem ser excluídos do arquivo em Word ou Open Office**), resumo, palavras-chave (3 a 5), tradução para o inglês do título, subtítulo, resumo (abstract) e palavras-chave (keywords);

- **Elementos textuais (IRMRDC) para pesquisas com resultado de campo:**

1. Introdução: contextualização histórica, fundamentação e delimitação do assunto, objetivos

e justificativas;

2. **Revisão teórica:** parte opcional que deverá ser concisa e clara e pode ser dividida em subseções ou capítulos;

3. **Metodologia** (ou materiais e métodos): elaborada de forma que permita a replicabilidade da pesquisa;

4. **Resultados:** preferencialmente usando figuras, gráficos, tabelas, quadros, claros e legíveis, para proporcionar posterior discussão e comparação com outras pesquisas;

¹ Os editores poderão admitir trabalhos maiores que 20 laudas, a critério da necessidade de publicação do mesmo.

5. **Discussão:** explicação ou comparação dos resultados, no mesmo trabalho ou com outras pesquisas semelhantes;

6. **Conclusões:** opinião ou reflexão pessoal sobre o assunto, bem como proposituras de cunho científico.

• **Elementos textuais (IMDTC) para pesquisas de revisão teórica sem resultados de campo:**

1. **Introdução:** contextualização histórica, fundamentação e delimitação do assunto, objetivos e justificativas;

2. **Metodologia** (ou materiais e métodos): elaborada de forma que permita a replicabilidade da pesquisa;

3. **Discussão Teórica:** explicações ou comparações resultantes da discussão teórica, dividida em subseções ou capítulos;

Conclusões: opinião ou reflexão pessoal sobre o assunto, bem como proposituras de cunho científico.

• **Elementos pós-textuais:** referências (ver item 9).

O manuscrito deve ser iniciado com o **Título**, que deve ser conciso e informativo, com no máximo 15 palavras, todo em maiúsculas, negrito e centralizado. Os subtítulos incluídos no texto devem ser em maiúsculas, não numerados e alinhados à esquerda. Não deverão ser colocados os dados dos autores para preservar o sigilo da avaliação por pares cegas.

Logo após o Título, inserir o **Resumo**, que deve ter caráter informativo, apresentando as ideias mais importantes do trabalho, escrito em espaçamento simples, em um único parágrafo que deverá ter entre 200 e 400 palavras. Incluir, ao final, de 03 (três) até 05 (cinco) **Palavras-chave**. Na continuidade, o autor deverá traduzir para a língua inglesa o Título, o Resumo e as Palavras-chave, nomeando a tradução para o inglês de **Abstract** e **Keywords**, respectivamente.

Nas Referências, **as obras/autores devem ter sido citadas no texto** do trabalho e devem obedecer às dispostas no final deste documento, que foram constituídas com base nas orientações da **ABNT**, bem como as orientações no final deste documento. Trata-se de uma listagem dos livros, artigos e outros elementos de autores efetivamente utilizados e referenciados ao longo do artigo. **Não podem existir referências sem as devidas citações, e vice-versa.**

1.1.2. Seção Notas Científicas (Estudos de Caso)

Na seção Notas Científicas serão publicados relatos e estudos de caso que não se adequam à seção de artigos pelo caráter simplificado, mas que devem conter no mínimo a estrutura apresentada abaixo. A estrutura da Nota Científica no formato IRDC (Introdução, Relato, Discussão e/ou Considerações Finais, incluindo pré e pós-textuais) deverá ter até 10 laudas, e compreende:

- **Elementos pré-textuais:** título, subtítulo (se houver), nome e biografia dos autores (**apenas no sistema, pois na fase de submissão, devem ser excluídos do arquivo em Word ou Open Office**), resumo, palavras-chave (3 a 5), tradução para o inglês do título, subtítulo, resumo (abstract) e palavras-chave (keywords);
- **Elementos textuais (IRDC):**
 1. **Introdução:** contextualização histórica, fundamentação e delimitação do assunto, objetivos e justificativas;
 2. **Relato:** preferencialmente usando textos, figuras, gráficos, tabelas, quadros, claros e legíveis, para proporcionar clareza no estudo do caso;
 3. **Discussão:** explicação ou comparação dos resultados, no mesmo trabalho ou com outras pesquisas semelhantes; **e/ou**
 4. **Considerações Finais:** opinião ou reflexão pessoal sobre o assunto, bem como proposituras de cunho científico.
- **Elementos pós-textuais:** referências (ver item 9).

1.1.3. Seção Registro de Obras Artísticas (fotografias, músicas, poesias, poemas, sonetos etc.)

Na seção Registro de Obras Artísticas (exclusiva da revista Social Evolution) serão publicadas **individualmente** ou em **acervo (máximo 20 obras)**: fotografias, músicas, poesias, poemas, sonetos e similares, que devem conter no mínimo a seguinte estrutura:

- **Elementos pré-obra:** título da obra ou do acervo (neste caso apresentar o título junto a cada obra do acervo), apresentação da obra ou acervo, palavras-chave.
- **Obra:** inserir no arquivo de word ou open office, a obra ou conjunto de obras (acervo) a

ser registrado (fotografias, músicas, poesias, poemas, sonetos e similares). Se a opção de registro for por acervo, as obras contidas precisam ter similaridade.

7. FORMATAÇÃO

O manuscrito deve ser editado em Microsoft Word ou Open Office, sendo formatado em tamanho A4 (210 x 297 mm), texto na cor preta e fonte **Calibri, tamanho 11** para o texto geral, e tamanho 10 para citações longas, legendas de figuras, tabelas e referências. Todas as margens do manuscrito (superior, inferior, esquerda e direita) devem ter 2,0 cm.

Os manuscritos deverão ter espaçamento entre linhas de 1,5, contendo espaçamento entre parágrafos, e estes, em alinhamento justificado e com recuo especial da primeira linha de 1,25. As notas de rodapé, as legendas de ilustrações e tabelas, e as citações textuais longas devem ser formatadas em espaço simples de entrelinhas. Os resumos, em qualquer uma das seções, deverão manter espaçamento simples em um único parágrafo e alinhamento justificado.

Ilustrações e fotografias podem ser coloridas ou em escala cinza. As ilustrações que compreendem tabelas, gráficos, desenhos, mapas e fotografias, lâminas, plantas, organogramas, fluxogramas, esquemas ou outros elementos autônomos devem aparecer sempre que possível na própria folha onde está inserido o texto a que se refere.

8. CITAÇÕES

Citações são informações extraídas de outra fonte, e podem ser classificadas em: **citação direta** (quando é feita a partir de uma transcrição literal, ou seja, palavra por palavra, de trecho do texto do autor da obra consultada); **citação indireta** (quando são inseridas de forma não-literal, ou seja, ideias pertencentes ao autor ou a diversos autores); **citação de citação** (é aquela citação, direta ou indireta, de uma obra original a que não se teve acesso, mas que se teve conhecimento por citação existente em outra obra, desta vez com acesso efetivo).

8.1. Citações diretas

Na forma direta devem ser transcritas entre aspas, quando ocuparem até três linhas impressas, onde devem constar o autor, a data e opcionalmente a página, conforme o exemplo: “Sabe-se que há muito tempo o ser humano vem causando alterações na natureza e que algo urgente precisa ser feito no sentido de minimizar os efeitos provenientes dessa ação danosa” (NEIMAN, 2005).

As citações de dois ou mais autores sempre serão feitas com a indicação do sobrenome do primeiro autor seguindo por “et al.”, conforme o exemplo: Sato et al. (2005) afirmam que “a EA situa-se mais em areias movediças do que em litorais ensolarados”.

Quando a citação ultrapassar três linhas, deve ser separada com um recuo de parágrafo de 4,0 cm, em espaço simples no texto, com fonte 10, conforme o exemplo:

Severino (2002) entende que:

A argumentação, ou seja, a operação com argumentos, apresentados com objetivo de comprovar uma tese, funda-se na evidência racional e na evidência dos fatos. A evidência racional, por sua vez, justifica-se pelos princípios da lógica. Não se podem buscar fundamentos mais primitivos. A evidência é a certeza manifesta imposta pela força dos modos de atuação da própria razão.

8.2. Citação indireta

A citação indireta, denominada de conceitual, reproduz ideias da fonte consultada, sem, no entanto, transcrever o texto. Esse tipo de citação pode ser apresentado por meio de paráfrase, que se caracteriza quando alguém expressa a ideia de um dado autor ou de uma determinada fonte. A paráfrase, quando fiel à fonte, é geralmente preferível a uma longa citação textual, mas deve, porém, ser feita de forma que fique bem clara a autoria. Não se faz necessário constar o número da página, pois a paráfrase pode ser uma síntese de um pensamento inteiro.

8.3. Citação de citação

Evitar utilizar material bibliográfico não consultado diretamente, mas se imprescindível, referenciar através de “citado por”. A citação de citação deve ser indicada pelo sobrenome do autor seguido da expressão “citado por” e do sobrenome da obra consultada, em minúsculas, conforme o exemplos:

- Freire (1988, citado por SAVIANI, 2000)
- (FREIRE, 1988, citado por SAVIANI, 2000)

9. REFERÊNCIAS

Entende-se por referências bibliográficas o conjunto de elementos que permitem a identificação, no todo ou em parte, de documentos impressos ou registrados em diversos tipos de materiais. As referências bibliográficas são uma lista de fontes consultas e citadas ao longo do corpo do trabalho, estas devem ser listadas em ordem alfabética de autor, alinhadas a esquerda, em tamanho 9, espaço simples entre linhas, e duplo entre as referências. Em nossa plataforma, e conseqüentemente em todos os periódicos da mesma, as referências seguem as orientações da ABNT.

ATENÇÃO: as obras que tiverem registro internacional do tipo DOI da CrossRef devem ter obrigatoriamente ao final o número de registro, como segue no exemplo abaixo:

SILVA, C. E.; PINTO, J. B.; GOMES, L. J.. Ecoturismo na Floresta Nacional do Ibura como potencial fomento de sociedades sustentáveis. **Revista Nordestina de Ecoturismo**, Aracaju, v.1, n.1, p.10-22, 2008. DOI: <http://doi.org/10.6008/ESS1983-8344.2008.001.0001>

ATENÇÃO: O “et al.” só pode ser utilizado nas CITAÇÕES e não nas REFERÊNCIAS, onde deve constar obrigatoriamente o nome de todos os autores.

De forma genérica as referências devem ter os seguintes elementos: autor (quem?); título (o que?); edição; local de publicação (onde?); editora; e data de publicação da obra (quando?). Seguem orientações específicas para listagem de referências de alguns tipos mais usuais de obras consultadas:

a) periódicos (artigos de revistas científicas)

ARAÚJO, P. C.; CRUZ, J. B.; WOLF, S. M.; RIBEIRO, T. V. A. R.. Empreendedorismo e educação empreendedora: confrontação entre a teoria e a prática. **Revista de Ciência da Administração**, Florianópolis, v.8, n.15, p.45-67, 2006.

TAYRA, F.; RIBEIRO, H.. Modelos de indicadores de sustentabilidade: síntese e avaliação crítica das principais experiências.

Saúde e Sociedade, São Paulo, v.15, n.1, p.84-95, 2006.

SILVA, C. E.; PINTO, J. B.; GOMES, L. J.. Ecoturismo na Floresta Nacional do Ibura como potencial fomento de sociedades sustentáveis. **Revista Nordestina de Ecoturismo**, Aracaju, v.1, n.1, p.10-22, 2008.

b) livros

MARCONI; M. A.; LAKATOS, E. M.. **Técnicas de pesquisa:** planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisas, elaboração, análise e interpretação de dados. 6 ed. São Paulo: Atlas, 2007.

KAPLAN, R. S.; NORTON, D. P.. **A estratégia em ação:** balanced scorecard. 26 ed. Rio de Janeiro: Elseiver, 1997.

QUIROGA, R.. **Indicadores de sostenibilidad ambiental y de desarrollo sostenible:** estado del arte y perspectivas. Santiago do Chile: CEPAL, 2001.

SEGNESTAM, L.; WINOGRAD, M.; FARROW, A.. **Desarrollo de indicadores:** lecciones aprendidas de América Central. Washington: CIAT-BM-PNUMA, 2000.

c) capítulos de livro

BOO, E.. O planejamento ecoturístico para áreas protegidas. In: LINDBERG, K.; HAWKINS, D. E.. **Ecoturismo:** um guia para planejamento e gestão. São Paulo: Senac São Paulo, 1999. p.65-80.

PEDRINI, A. G.. A educação ambiental no ecoturismo brasileiro: passado e futuro. In:

SEABRA, G.. **Turismo de base local**: identidade cultural e desenvolvimento regional. João Pessoa: EDUFPB, 2007. p.30-56.

d) anais de eventos

SILVA, C. E.. Ecoturismo no Horto Florestal do Ibura como potencial fomento de sociedades sustentáveis. In: ENCONTRO PARANAENSE DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL, 9. **Anais**. Guarapuava: Unicentro, 2006.

PAIVA JÚNIOR, F. G.; CORDEIRO, A. T.. Empreendedorismo e o espírito empreendedor: uma análise da evolução dos estudos na produção acadêmica brasileira. In: ENCONTRO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PROGRAMAS DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ADMINISTRAÇÃO, 27. **Anais**. Salvador: UFBA, 2002.

e) revistas de notícias

NILIPOUR, A. H.; BUTCHER, G. D.. Manejo de broilers: las primeras 24 horas. **Industria Avicola**, Mount Morris, v.46, n.11, p.34-37, nov. 1999.

f) teses, dissertações e monografias

CARVALHO, F.. **Práticas de planejamento estratégico e sua aplicação em organizações do terceiro setor**. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BETTIOL JÚNIOR, A.. **Formação e destinação do resultado em entidades do terceiro setor**: um estudo de caso. Tese (Doutorado em Ciências Contábeis) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

g) leis ou normas jurídicas

BRASIL. **Lei n.11428 de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Brasília: DOU, 2006.

SERGIPE. **Decreto n.13713 de 14 de junho de 1993**. Institui a criação da Área de Proteção Ambiental Morro do Urubu. Aracaju: DOE, 1993.

h) documentos governamentais ou empresariais

BRASIL. **Diretrizes e prioridades do plano de ação para implementação da Política Nacional da Biodiversidade**. Brasília: MMA, 2006.

PETROBRAS. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**: campos de petróleo e gás 2008. Rio de Janeiro: CENPES, 2009. MMA; MEC. **Coletivos jovens de meio ambiente**: manual orientador. Brasília: Dreams, 2005.

OBSERVAÇÃO RELEVANTE: a CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica, através de seus selos editoriais, não é contrária a utilização de materiais coletados na internet, inclusive a maioria de nossos trabalhos são divulgados e publicados neste meio. No entanto

para referenciar estes materiais, os autores deverão utilizar um dos itens anteriores, se não for possível fazer referência nas formas acima citadas, a mesma não será válida.

É proibida a utilização dos itens “Disponível em: <http://site.com>” e “Acessado em: DD/MM/AAAA”, conforme exemplo abaixo:

MMA; MEC. **Coletivos jovens de meio ambiente**: manual orientador. Brasília: Dreams, - 2005. Disponível em: <http://site.com>. Acessado em: DD/MM/AAAA.

3 ARTIGO 2: Production of fermentable sugars from rice husks by enzymatic and acid hydrolysis

***Autores:** Andréia da Silva Alencar*

Joselma Pedrosa da Silva

Pedro Aurélio Costa Lima Pequeno

Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

Ana Paula Folmer Correa

Marcos José Salgado Vital

Adriana Flach

PRODUCTION OF FERMENTABLE SUGARS FROM RICE HUSKS USING ENZYMATIC AND ACID HYDROLYSIS

Andréia da Silva Alencar^{a*}, Joselma Pedrosa da Silva^a, Pedro Aurélio Costa Lima Pequeno^a,
Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos^b, Ana Paula Folmer Correa^a, Marcos José Salgado Vital^{a,c},
Adriana Flach^{a,d}

*Corresponding author: andreiaalencar87@gmail.com (+55 95 99152-4662).

- a. Postgraduate Program in Natural Resources at the Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.
- b. Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.
- c. Center for Biodiversity Studies, Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.
- d. Department of Chemistry, Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.

Highlights

The biotransformation of residues into fermentable sugars is economically viable.
Acid hydrolysis of biomass generates polluting residues.
Enzymatic hydrolysis reduces environmental impacts.
Rice husk is hydrolyzed in fermentable sugars.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass for obtaining biofuels and other products via microbial fermentation is a promising approach. Rice (*Oryza sativa* L.) has worldwide importance, and its husks are one of the most abundant agricultural wastes in the world. Because of their abundance and low cost, rice husks may be a promising raw material in fermentative processes. The aim of this research was to evaluate the hydrolysis of rice husks produced in Roraima, Brazil, via a factorial experiment. Total reducing sugar was used as a response variable. Acid hydrolysis presented the highest total reducing sugar yield and a total reducing sugar concentration of 163.71 g.kg⁻¹ and 33.97 g.L⁻¹, respectively. These results were obtained using intact husks, a sulfuric acid concentration of 1.5% and a solid:liquid ratio of 1:8. Time was not a significant factor. Enzymatic hydrolysis presented the highest total reducing sugar yield and total reducing sugar concentration of 91.57 g.kg⁻¹ and 19.00 g.L⁻¹, respectively, which was obtained using triturated husks. Therefore, subsequent efforts should be employed to establish hydrolysis processes that may be used in rice processing industries.

Keywords: α -amylase, *Aspergillus oryzae*, lignocellulosic waste, *Oryza sativa*, reducing sugar, sulfuric acid.

1. INTRODUCTION

From an environmental as well as from an economical point of view, the use of biomass for developing new products such as biofuels, vegetable oils and biogas is a promising strategy, mainly because it allows sustainable production and avoids inadequate discard of waste. In the near future, different kinds of biomass will be an important source of energy and raw material for numerous economic activities (Mota et al., 2017). The growing need to become more environmentally friendly has increased the use of agro-industrial wastes for biofuel production. Lignocellulosic biomass, such as sugarcane bagasse, wood wastes and rice husks have been highlighted, mainly because of their high availability and renewable nature (Singh et al., 2014).

Rice (*Oryza sativa* L.) is a globally important crop. For the same year, Brazil produced 237.7 million tons (Santos Júnior, 2018), and is the greatest producer of rice outside of Asia (Otonelli and Grings, 2017). Because of its abundance, rice husk is commonly burned, producing ash, environmental pollution and creating health problems for the human population. Another common destination for this waste is disposal in rivers, directly or indirectly, which results in eutrophication and greenhouse gas production (Della et al., 2006; Foletto et al., 2005).

The husks correspond to 20-33% of rice gross weight and are composed of cellulose (~29%), hemicelluloses (~29%), lignin (~24%) and some amount of protein, extractives, inorganics and starch (~18%), according to Abaide et al. (2019) and Potumarthi et al. (2013). Its hydrolysis may be performed using diluted acids or enzymatic complexes, according to the purpose of the hydrolysate. Enzymatic hydrolysis normally requires rigorous control of temperature and pH, while acid hydrolysis is relatively low cost, though requires neutralization after processing (Li et al., 2014; Pereira Jr. et al., 2008).

Acid hydrolysis is the breaking of the amorphous regions of cellulose by the addition of acid under specific conditions. The acid acts quickly on polymers of cellulose, releasing monomeric sugars, and because of this, the reaction must be controlled (Silva and D'almeida, 2009). The acid may be diluted or concentrated, and the breaking of lignocelluloses occurs in two stages, because of differences between hemicellulose and cellulose. In the first stage, the hemicellulose is broken, according to pretreatment conditions, and in the second stage, high temperatures must be used with the aim of hydrolyzing the cellulose fraction (Silva et al., 2010).

Despite some advantages, acid hydrolysis produces pollution in the form of solid waste and by-products, such as furfural, ketones, acetic acid, di-phenols, phenyl-propane and derivatives that may inhibit the microbial fermentation of the hydrolysate (Aguiar and Menezes, 2000; Irwin et al., 1993; Ogeda and Petri, 2010). Acid hydrolysis has been less used than enzymatic hydrolysis mainly because of the specificity of enzymes, which results in a hydrolysate with better defined physicochemical properties (Severo et al., 2010).

Because of the aforementioned reasons, enzymatic saccharification has been more commonly used in studies that aim to reduce costs in the long term, when compared to acidic processes that generate polluting residues and, in most cases, products that end up inhibiting further fermentation. The use of enzymes reduces the requirement for high temperatures, organic solvents and extreme conditions of pH, besides resulting in a high purity hydrolysate and reducing the environmental footprint (Cherry and Fidantsef, 2003).

Enzymatic hydrolysis of cellulose is performed by cellulases, an enzymatic complex that acts by cleaving glycosidic bonds, and releasing oligosaccharides, cellobiose and glucose (Meyabadi et al., 2014). The main variables that affect the enzymatic hydrolysis are the type and concentration of enzyme, pH, temperature and time of treatment (George et al., 2011).

Therefore, the aim of this research was to evaluate the effect of the concentration of sulfuric acid on acid hydrolysis and α -amylase during enzymatic hydrolysis of rice husks, with the aim of aggregating value to by-products of the rice processing industry.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Lignocellulosic waste

The rice husks (*Oryza sativa* L.), used as substrate in this research work, were ceded by rice processing industry in the municipality of Boa Vista, Roraima state, Brazil. For hydrolysis assays, intact or triturated (particle size < 2mm) husks were used and were stored at room temperature until the start of the experiments.

2.2 Acid hydrolysis

In accordance with Hickert et al. (2013), rice husks were mixed with sulfuric acid at different concentrations and stored at room temperature for 24 h. After this time, the hydrolysis assays were evaluated using a factorial experiment ($2^3 + 3c$). A total of 11 assays were performed, as described in Table 1. The following aspects were evaluated: (factors) solid: liquid ratio, acid concentration (%) and time (min) of heat shock (121 °C), and the total reducing sugar concentration [TRS] (g.L⁻¹) was the response variable.

Table 1. Acid hydrolysis assays detailing use of the factorial experiment.

Assay	Solid:Liquid Ratio	Acid concentration (%)	Time (min)
1	1:6	0.5	40'
2	1:6	0.5	80'
3	1:6	1.5	40'
4	1:6	1.5	80'
5	1:10	0.5	40'
6	1:10	0.5	80'
7	1:10	1.5	40'
8	1:10	1.5	80'
9 (c)	1:8	1.0	60'
10 (c)	1:8	1.0	60'
11 (c)	1:8	1.0	60'

Key: (c) = central points.

After heat shock, the liquid content was separated by compression (10 tons) and pH was adjusted to 5.0 by adding Ca (OH)₂. The precipitate salt and solid waste from the assays were discarded.

2.3 Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was performed as described by Ferreira et al. (2013), using freeze-dried α -amylase of *Aspergillus oryzae* (Granotec do Brasil S.A.) at pH 5.0 (sodium acetate buffer 0.025M) and at 40 °C in a water bath with horizontal shaking (Dubnoff type).

The hydrolysis was evaluated using a factorial experiment ($2^3 + 3c$), being factors: substrate concentration (%), enzyme concentration (%) and time of reaction. Total reducing sugar concentration (g.L^{-1}) was the response variable. Complete details are presented in Table 2.

Table 2. Enzymatic hydrolysis assays detailing the experimental design.

Assay	Substrate concentration (%)	Enzyme concentration (%)	Time (hours)
1	16	3	36
2	16	3	12
3	16	1	36
4	16	1	12
5	4	3	36
6	4	3	12
7	4	1	36
8	4	1	12
9 (c)	10	2	24
10 (c)	10	2	24
11 (c)	10	2	24

Key: (c) = central points.

2.4 Total reducing sugar concentration and yield

Total reducing sugar concentrations ($[\text{TRS}]$, g.L^{-1}) were determined using the Di-Nitro Salicylic Acid (DNS) method (Miller, 1959), with modifications. In a microtube, 20 μL of diluted (10^{-1}) sample was mixed with 180 μL of distilled water and 300 μL of DNS solution. After being boiled for 5 min, 1500 μL were added and absorbance at 540 nm was evaluated. The $[\text{TRS}]$ (g.L^{-1}) was calculated according to the standard curve “ $\text{ABS} = [\text{TRS}] \cdot 0.064 + 0.017$ ” ($R^2 = 0.999$).

Total reducing sugar yield (Y_{TRS} , g.kg^{-1}) was calculated according to Hernández-Salas et al. (2009), with adaptations, using the formula “ $Y_{\text{TRS}} = ([\text{TRS}]_{\text{H}} \cdot V_{\text{H}}) / m_{\text{W}}$ ”, $[\text{TRS}]_{\text{H}}$ being the total reducing sugar concentration (g.L^{-1}) of the hydrolysate, V_{H} the recovered volume (L) of hydrolysate and m_{W} the mass (kg) of biomass used in the assay.

2.5 Statistical analysis

The factorial experiment and the difference between intact and trituated husks were analyzed using ANOVA ($\alpha = 0.05$) using the software R (R Core Team, 2018). Significant effects were represented in conditional graphs, which show the relationship between the dependent variable and a given independent variable while keeping the remaining independent variables constant (Breheny and Burchett, 2017).

3. RESULTS

3.1 Acid hydrolysis

The assays using intact rice husk resulted in [TRS] from 14.83 to 33.97 g.L⁻¹, while triturated rice husk presented [TRS] from 7.41 to 16.98 g.L⁻¹, and thus presented significant difference ($p= 0.0002$). The total reducing sugar yield varied from 35.73 g.kg⁻¹, for triturated husk, to 163.71 g.kg⁻¹ for intact husk. Complete results of acid hydrolysis and yield are presented in Table 3.

Table 3. Complete results of total reducing sugar concentrations [TRS (g.L⁻¹)] and total reducing sugar yield [Y_{TRS} (g.kg⁻¹)] of each assay using intact and triturated rice husk for acid hydrolysis.

Assay	[TRS]		Y_{TRS}	
	Intact husk	Triturated husk	Intact husk	Triturated husk
1	17.39	8.70	83.81	41.90
2	18.33	9.17	88.34	44.17
3	31.04	15.52	149.59	79.80
4	33.97	16.99	163.71	81.86
5	14.83	7.42	71.47	35.73
6	18.04	9.02	86.94	43.47
7	29.29	14.65	141.16	70.58
8	16.18	8.09	77.98	38.99
9(c)	13.45	13.45	129.59	64.80
10(c)	14.47	14.47	139.47	69.73
11(c)	13.49	13.49	130.02	65.01

Key: (c)= Central points.

The results of ANOVA ($R^2= 0.85$) indicate that there are no significant interactions between the factors, and the factor “time” has not significant effect ($p= 0.5357$). The highest values for [TRS] were obtained when using “solid: liquid ratio” of 1:8 ($p= 0.01632$), “acid concentration” of 1.5% ($p= 0.0004$) and intact husks, as presented in figure 1.

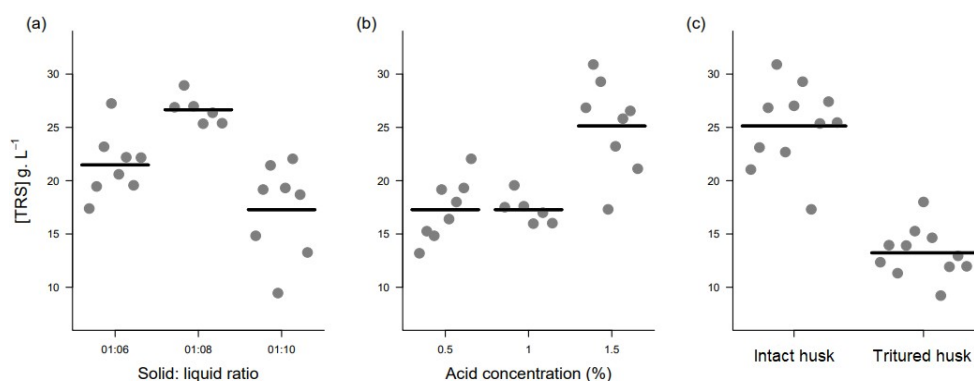


Figure 1. Total reducing sugar concentration ([TRS], g.L⁻¹) of acid hydrolysis according to solid: liquid ratio (a), acid concentration (b) and state of rice husk (intact/tritured) (c).

3.2 Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis presented [TRS] from 0.00 to 19.00 g.L⁻¹, and ANOVA ($R^2= 0.90$) and analysis indicated significant effects of “substrate concentration” ($p= 0.0369$), “enzyme

concentration” ($p= 0.0000$) and “time” ($p= 0.0001$). Triturated husks presented the highest [TRS] value when compared to intact husks ($p= 0.0008$). Furthermore, a significant interaction was identified between “substrate concentration” and the state of the husk ($p= 0.0101$). The highest [TRS] values were obtained using triturated husks, with a substrate concentration of 0.1%, enzyme concentration of 0.03% and 36-hour reaction time. Complete results are presented at Table 4 and Figure 2.

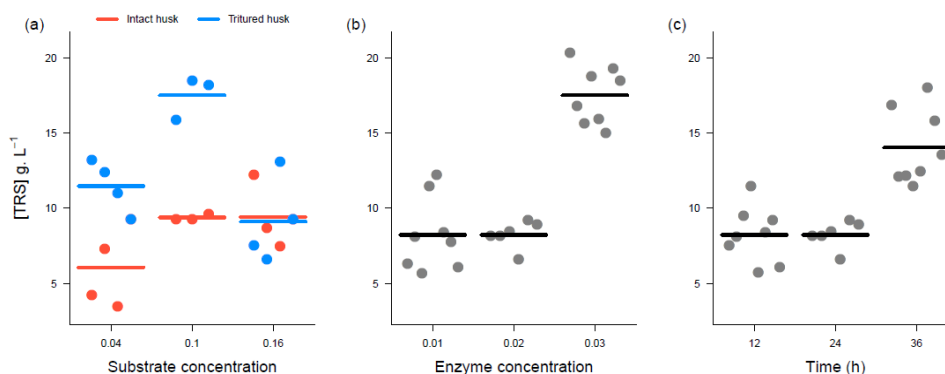


Figure 2. Total reducing sugar concentration ([TRS], g.L^{-1}) according to “substrate concentration” and “state of husk”, “enzyme concentration” (b) and “time” (c).

Table 4. Complete results of total reducing sugar concentration ([TRS], g.L^{-1}) and total reducing sugar yield (Y_{TRS} , g.kg^{-1}) of each assay using intact and triturated rice husks for enzymatic hydrolysis.

Assay	[TRS]		Y_{TRS}	
	Intact husk	Triturated husk	Intact husk	Triturated husk
1	18.00	13.30	84.51	64.10
2	8.70	6.60	41.93	31.81
3	4.00	9.60	18.74	46.27
4	0.00	0.00	0.00	0.00
5	10.00	19.00	49.87	91.57
6	7.30	12.40	35.18	59.76
7	0.00	7.50	0.00	36.14
8	0.00	0.00	0.00	0.00
9(c)	1.40	2.10	6.75	31.81
10(c)	1.90	5.50	9.16	44.34
11(c)	0.30	6.30	1.45	42.89

Key: (c)= Central points.

4. DISCUSSION

When using 0.5% of H_2SO_4 for rice husk hydrolysis, Ang et al. (2013) obtained $7.2 \pm 0.3 \text{ g.L}^{-1}$ of [TRS], close to the level obtained in our study under the same conditions. Kim et al. (2014) obtained 43.8 g.L^{-1} of [TRS] using sulfuric acid, but observed that when the acid concentration or length of treatment time was increased, the [TRS] was decreased because of the conversion of D-xylose into furfural, which could explain the low values of [TRS] obtained in this study when using triturated rice husks. The mechanical rupture of the fibers, which occurs during trituration, aids in the exposure of the biomass to sulfuric acid and leads

to oxidation of the sugars and conversion into furfural and hydroxy-methyl-furfural. This was not observed when using intact rice husks.

Sukumaran et al. (2009) evaluated the best reaction time for enzymatic hydrolysis of rice husks; highest [TRS] was reached at 48 hours of reaction. In this study, a preliminary assay (data not shown) indicated that [TRS] had not increased at 48 hours, and the maximum values were reached at 36 hours. This may have occurred because the enzyme used, α -amylase, has expected low specificity for lignocellulosic wastes.

According to Ferreira et al. (2013), treatments using acid have the disadvantage of the need for neutralization of the product. The using of sulfuric acid requires the addition of a strong base, such as calcium hydroxide, resulting in calcium sulfate as precipitate salt and turning the hydrolysate into a high osmolarity medium. Therefore, it can reduce the total reducing sugar yield and compromise the fermentability of this substrate. Furthermore, as a solid waste, rice husks continue to be a toxic waste, and require an adequate destination. However, the solid waste from enzymatic hydrolysis may be more easily used for other purposes in agricultural activities.

Current global climatic changes create a need for productive processes that are environmentally friendly. Thus, industries should provide adequate destination for solid wastes, which at the same time do not increase production costs (Busch and Ribeiro, 2009; Lorenzett et al., 2012). The most adequate hydrolysis process must be chosen according to the characteristics of the rice industry and the purpose of the resulting hydrolysate. According to Silva e Almeida (2009), the rice industry has to seek alternative destinations for the husks, such as use as biomass in power plants and in other activities, in order to close the rice production cycle.

5. CONCLUSION

Acid hydrolysis of rice husks was shown to be more efficient when using intact husks, since they released a hydrolysate with a total reducing sugar concentration and yield close to other alternative lignocellulosic substrates used for fermentation.

The enzymatic hydrolysis method used in this experiment was proved to be efficient for obtaining a hydrolysate with a low total reducing sugar concentration, but with a total reducing sugar yield close to that obtained from optimized processes. Furthermore, this hydrolysate may be used for specific purposes, and is a low toxicity solid waste after hydrolysis.

Subsequent efforts should be employed to establish hydrolysis processes that may be used in other substrates besides those from the rice processing industry.

DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Granotec do Brasil S.A. for the donation of the enzyme, and Arroz Tropical Ltda., Tia Maria Ltda., Tio Ivo Ltda. and Arroz Itikawa Ltda for the donation of the rice husks.

Funding: This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

Abaide ER, Ugalde G, Di Luccio M, Moreira RFPM, Tres MV, Zabot GL, Mazutti MA (2019). Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode. *Bioresource Technology*. 272: 510-520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.075>

Aguiar CL, Menezes TJB (2000). Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 18(1): 57-70. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v18i1.1125>

Ang TN, Ngoh GC, Chua ASM (2013). Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk. *Bioresource Technology* 135 (1) 116-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.045>

Breheny P, Burchett W (2017). Visualizing regression models using visreg. *The R Journal* 9(2): 56-71. <https://journal.r-project.org/archive/2017/RJ-2017-046/index.html>.

Busch SE, Ribeiro H (2009). Responsabilidade Socioambiental Empresarial: revisão da literatura sobre conceitos. *INTERFACEHS – Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente* 4(2): 1-26.

Cherry JR, Fidantsef AL (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 14 (4): 438-443. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)

Della VP, Hotza D, Junkes JA, Oliveira APN (2006). Comparative study of silica obtained from acid leaching of rice husk and the silica obtained by thermal treatment of rice husk ash. *Química Nova* 29(6) 1175-1179. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000600005>

Ferreira SM, Caliar M, Soares Júnior MS, Beleia ADP (2013). Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 15(4): 383-390. <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev154/Art1547.pdf>

Foletto EL, Hoffmann R, Hoffmann RS, Portugal Jr. UL, Jahn, SL (2005). Applicability of rice husk ash. *Química Nova*. 28(6) 1055-1060. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000600021>

George J, Ramana KV, Bawa AS, Siddaramaiah (2011). Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48(1): 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.013>

Hernández-Salas JM, Villa-Ramírez MS, Veloz-Rendón JS, Rivera Hernández KN, González-César RA, Plascencia-Espinosa MA, Trejo-Estrada SR (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*. 100(1): 1238-1245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>

Hickert LR, Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub MAZ (2013). Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technology*. 143(1): 112-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.123>

Irwin DC, Spezio M, Walker LP, Wilson DB (1993). Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering*. 42(8): 1002-1013. <https://doi.org/10.1002/bit.260420811>

Kim I, Lee B, Park J, Choi S, Han J (2014). Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw. *Carbohydrate polymers*. 99(1): 563–567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.092>

Li M, Zheng Y, Chen Y, Zhu X (2014). Biodiesel production from waste cooking oil using a heterogeneous catalyst from pyrolyzed rice husk. *Bioresource Technology*. 154 (1) 345–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.070>

Lorenzetti DB, Neuhaus M, Schwab NT (2012). Waste management and the rice beneficiation industry. *Revista Gestão Industrial*. 08(1): 219-232. <http://dx.doi.org/10.3895/S1808-04482012000100011>

Meyabadi TF, Dadashian F, Sadeghi GMM, Asl HEZ (2014) Spherical cellulose nanoparticles preparation from waste cotton using a green method. *Powder Technology* 261(1): 232-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.04.039>

Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*. 11(1): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Moscon JM, Priamo WL, Bilibio D, Silva JRF, Souza M, Lunelli, Foletto EL, Kuhn RC, Cancelier A, Mazutti MA (2014). Comparison of conventional and alternative technologies for the enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3(1): 149-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.008>

Mota KIA, Rodrigues LBO, Santana NB, Segundo GSA (2017). Biomass production from biomass: prospecting patents in Brazil. *Revista GEINTEC*. 7(4): 4089-4099. <https://doi.org/10.7198/geintec.v7.i4.817>

Ogeda TL, Petri DFS (2010). Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova*. 33(7): 1549-1558. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

Otonelli J, Grings TC (2017). Rice production in the micro-regions of the Rio Grande do Sul state: evolution, specialization and concentration. *Desenvolvimento em questão*. 15(40): 230-257. <http://dx.doi.org/10.21527/2237-6453.2017.40.230-257>

Pereira Jr. N, Couto MAPG, Santa Anna LMM (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In *Series on Biotechnology*. Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro 2(1). <http://www.ladebio.org.br/download/series-em-biotecnologia-vol-ii-lignocellulosic-biomass.pdf>

Potumarthi R, Baadhe RR, Nayak P, Jetty A (2013). Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochaete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. *Bioresource Technology* 128(1): 113–117.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.030>

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, <https://www.R-project.org>

Santos Júnior SRG. Análise mensal - Arroz. CONAB, Relatório técnico, mar. 2018. 10p.

Severo MG, Moraes K, Ruiz WA (2010). Enzymatic modification on rice flour seeking the production of resistant starch. *Química Nova* 33(2): 345-350.
<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200021>

Silva AS, Inoue H, Endo T, Yano S, Bon EP (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 101(19):7409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.008>

Silva DJ, D'Almeida MLO (2009). Cellulose whisker. *O papel* 70(7): 34-52.
http://revistaopapel.org.br/noticiaanexos/1311883542_1b4f1881c01129ce934b0cb4b4ebb9ab_343315426.pdf

Singh A, Bajar S, Bishnoi NR (2014). Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel*. 116(1) 699-702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.072>

Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. *Renewable Energy*. 34(2): 421-424. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.05.008>

3.1 ENGLISH REVISION CERTIFICATE



REVISION CERTIFICATE

I hereby certify that the manuscript “**Production of fermentable sugars from rice husks using enzymatic and acid hydrolysis**” was revised by me and that by being a native English speaker and by holding a degree in Portuguese Language and a post-graduate degree in English, and as a professional translator and reviewer, I am qualified to carry out such work.

Matthew Miller

December 2nd, 2022**CNPJ 46.323.444/0001-69****MATTHEW MILLER TRANSLATION AND REVISION SERVICES**

Av. Constantino Nery, 233, Centro, Manaus, AM – CEP: 69010-160 CNPJ: 46.323.444/0001-69- Insc. Municipal: 54266501 – Insc. Estadual: Isento
Fone: (92) 99119-6547 – E-mail: matthewmiller1970@hotmail.com

3.2 NORMAS DA REVISTA BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY



BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

Official journal of the [International Society of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology \(ISBAB\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology is the official journal of the International Society of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (ISBAB). The journal publishes high quality articles especially in the science and technology of biocatalysis, bioprocesses, agricultural biotechnology, biomedical biotechnology, and, if appropriate, from other related areas of biotechnology. The journal will publish peer-reviewed basic and applied research papers, authoritative reviews, and feature articles.

The scope of the journal encompasses the research, industrial, and commercial aspects of biotechnology, including the areas of: biocatalysis; bioprocesses; food and agriculture; genetic engineering; molecular biology; healthcare and pharmaceuticals; biofuels; genomics; nanotechnology; environment and biodiversity; and bioremediation.

Abstract

A concise and factual abstract is required. For a full-length article or review this has a maximum length of 250 words, and for a Short Communication this has a maximum length of 150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Article structure

Page numbering

The article pages should be sequentially numbered to assist in article processing and the refereeing process.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a

concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- Highlights
- All figure captions
- All tables (including title,

description, footnotes) Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web).

For any further information please visit our customer support site at

<https://service.elsevier.com>.

4 ARTIGO 3: Amazonian Yeasts Able to Produce Lipids Using Rice Husks Hydrolysate as Carbon Source

Autores: Andréia da Silva Alencar

Cecília Maria Bezerra de Araújo

Joselma Pedrosa da Silva

Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

Ana Paula Folmer Correa

Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa

Marcos José Salgado Vital

Adriana Flach

AMAZONIAN YEASTS ABLE TO PRODUCE LIPIDS USING RICE HUSKS HYDROLYSATE AS CARBON SOURCE

Andréia da Silva Alencar^{a*}, Cecília Maria Bezerra de Araújo^b, Joselma Pedrosa da Silva^c, Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos^c, Ana Paula Folmer Correa^a, Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa^b, Marcos José Salgado Vital^{a,d}, Adriana Flach^{a,b}

*Corresponding author: andreiaalencar87@gmail.com (+55 95 99129 2327).

Affiliations:

- a. Postgraduate Program in Natural Resources at the Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.
- b. Department of Chemistry, Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.
- c. Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.
- d. Center for Biodiversity Studies, Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil.

ABSTRACT

Microbial lipids had attracted, recently, some attention as promising feedstock for obtaining biofuels and other added value chemical compounds. In this context, the production of yeasts single-cell oil (YSCO) by oleaginous yeasts, using industrial and lignocellulosic wastes as carbon source, is an alternative to reduce the costs of production and environmental pollution. The aim of this research was to select strains of oleaginous yeasts and evaluate the fatty acids profiles under different cultivation conditions. Nine strains previously isolated and preserved in culture's collection from Laboratório de Microbiologia (PRONAT, UFRR, Brazil) were reactivated and cultured in medium containing glucose PA and different nitrogen supplements. Others medium composed of Rice Husks Acid Hydrolysate (RHAH) or Rice Husks Enzymatic Hydrolysate (RHEH) were used as alternative carbon source. The microbial oil was extracted from the biomass and fatty acids were derivatized and analyzed by Gas Chromatography (GC). Highest lipid content were obtained when using glucose PA, but poly-unsaturated fatty acid concentration increased when RHEH was provided as carbon source. These results indicates the high potential of RHEH as substrate for obtaining poly-unsaturated fatty acid, and subsequent efforts must to establish this bioprocess.

Keywords: Fatty Acids, Biotechnology, Gas Chromatography, Microbial Oil.

1. Introduction

All eukaryotic and some Gram-positive bacteria accumulate tri-acyl-glycerol in intracellular compartments, with similar structure for all cell types, about 6 to 8 percent of dry weight, mainly for plasmatic membrane composition (Mlicková et al., 2004; Schulze et al. 2014). When the percentage corresponds to more than 20 percent of dry weight, the microorganism is defined as oleaginous. Among the yeasts, some of these may reach until 70 percent of the dry weight corresponding to lipids, named microbial oil or Yeast Single-Cell Oil (YSCO), according to Angerbauer et al. (2007).

Microbial oil presents different biotechnological applications, and may be used in various by-products. The using of yeasts has some advantages, mainly because these microbes present highest growth rates, are more commonly used in fermentative processes and are

minimally affected by environmental conditions, as microalgae (Ageitos et al., 2011; Leiva-Candia et al., 2014).

Oleaginous microorganisms, including yeast, bacteria, filamentous fungi and microalgae, share the special feature of producing over 20% of dry biomass lipids as carbon storage reserves with similar fatty acid compositions with vegetable oils. Among the yeasts, only 5% of all known species are considered oleaginous (Leiva-Candia et al., 2014 and Meng et al., 2009). The genera *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus* and *Lipomyces* have remarkable potential, accumulating up to about 70% of their dry lipid biomass, using glucose as carbon source (Leiva-Candia et al., 2014; Hu et al., 2009; Schulze et al., 2014).

Microbial lipid accumulation has as main factor the Carbon:Nitrogen ratio ($C:N_R$), being as greater the $C:N_R$, as greater will be the lipid accumulation. Furthermore, other factor may affect lipid accumulation, as carbon source, nitrogen supply (organic or inorganic), pH, temperature and aeration. The most common carbon source is pure glucose, but various studies has been dedicated to use others sources available in plant biomass and agro industrial wastes (Hou, 2008; Papanikolaou et al., 2003; Zhu; Whu, 2008).

According to Hungenholtz and Smid (2002), microbial oil can have many uses, such as nutraceutical applications, biodiesel production and antimicrobial activity. The term “nutraceutical” is defined as a wide variety of foods and nutritional components applied to promote health.

To reduce the costs of microbial oil, other sources of carbon instead of glucose have been explored. Agricultural and industrial wastes have been reported to be used as carbon source for oil accumulation in yeast (Li, Du, Liu, 2008). Some *Cryptococcus* strains are recognized as good lipid producers, especially *C. curvatus*, which has been widely studied in fermentations using different substrates, such as sorghum bagasse hydrolysate (Liang et al., 2012), wheat straw hydrolysate (Yu et al., 2011), glucose (Zhang et al., 2011) and crude glycerol (Thiru; Sankh; Rangaswamy, 2011).

The aim of this work was to select wild-type strains of oleaginous yeasts, evaluating the fatty acids profiles obtained from different culture conditions, using glucose or rice husks hydrolysates as carbon sources.

2. Material and Methods

2.1 Yeasts Strains

Were used nine yeasts previously isolated from soils samples obtained in Parque Nacional do Viruá, Caracaraí city, Roraima state, Brazil (01°30'36"N, 60°42'59"W) and preserved in the culture's collection of Laboratório de Microbiologia / PRONAT / UFRR – Brazil, being three isolates of *Cryptococcus podzolicus* (VR520, VR535 and VR558), two of *Candida pseudointermedia* (VR544 e VR545), one of *Rhodotorula mucilaginosa* (VR543) and three of *Yarrowia sp.* (VR546, VR 547 and VR571). *Saccharomyces cerevisiae* (CBS 1171) and *Yarrowia lipolytica* (QU 21) were used as negative and positive control, respectively.

2.2 Yeasts Reactivation and Pre-inoculum Preparation

For reactivation, the isolates, preserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, were cultured in plates containing GYMP Agar (Glucose 20 g.L^{-1} , Yeast Extract 5 g.L^{-1} , Malt extract 10 g.L^{-1} , NaHPO_4 2 g.L^{-1} , Agar 20 g.L^{-1}), incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h (Kurtzman; Fell, 1998). The pre-inoculum was prepared in tubes containing 10 mL of GYMP broth, standardized for absorbance 0,8 ($\lambda=600$

nm), corresponding to $2,0 \times 10^8$ cells/mL, incubated at 28°C and 200 rpm for 18h (Bussamara et al., 2010).

2.3 Conventional Culture Medium

Conventional culture medium was prepared with glucose PA as carbon source (100 g.L⁻¹), nitrogen source (1 g.L⁻¹), monobasic potassium phosphate (1 g.L⁻¹), and magnesium chloride hexahydrate (0,5 g.L⁻¹), autoclaved at 121 °C. for 15 minutes. To compare whether there is any change in the lipid yield and fatty acids profiles of the YSCO obtained, three nitrogen sources were tested separately: peptone, yeast extract and ammonium sulfate.

2.4 Rice Husks Hydrolysates Preparation

Rice Husks Hydrolysates were obtained by two different methods: acid hydrolysis (RHAH) and enzymatic hydrolysis (RHEH). Rice Husks were obtained from four processors located in Boa Vista city, Roraima State, Brazil. The wastes collected at each site were stored in bags, transported to the laboratory, where the composite sample was prepared, by weighing the residue obtained from each beneficiary, forming the substrate. After this step, the residues were triturated (particle size: 2 mm) and then the rice husks hydrolysates were prepared according to Alencar et al. (2019). Total Reducing Sugar concentration was determined according to Miller (1959).

2.5 Yeast Single-Cell Oil Obtention

The pre-inoculum content was transferred to Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 90 mL of conventional culture medium or Rice Husks Hydrolysate, totalizing 100 mL in each assay. The flasks were incubated at 25°C, 150 rpm for 96 h, according to da Rosa et al. (2014, 2015). After this, each flask content was centrifuged (3000 rpm, 5 min), frozen at -30 °C for 48h, lyophilized and final biomass determined (g.L⁻¹).

The YSCO was extracted according to Folch et al. (1957), with modifications. The lyophilized biomass was submerged in methanol: chloroform (1:2) for 24h, and then submitted to ultrasound for 30 min. After centrifuged (3000 rpm, 5 min), the liquid phase was concentrated using nitrogen gas and dried in silica desiccator until constant weight was observed.

The YSCO yield (%) was determined by the formula “ $Y_Y = \{[YSCO](g.L^{-1})/[final\ biomass](g.L^{-1})\} * 100$ ”, according to Kraisintu, Yongmanitchai, Limtong,(2010).

2.6 Qualitative analysis

The obtained YSCO were analyzed by thin layer chromatography (TLC) to verify the presence of triglycerides and free fatty acids, using soybean oil and oleic acid, respectively as standards. After derivatization, the reaction was confirmed by the same technique verifying the conversion of microbial oils to methyl esters, being included as standard methyl esters obtained from soybean oil. All samples eluted on GF254 silica chromatographs in a solvent mixture composed of hexane, ethyl ether and acetic acid in 8: 2: 0.1 ratios. The results were obtained by visualization in UV light, (254 and 365nm), and by revelation using phosphomolybdic acid solution in methanol (1.25%), followed by heating to 150 °C.

2.7 Fatty Acids Profiles Determination

A gas chromatograph with flame ionization detector (Shimadzu, model GC-2010) was used for the analysis of methyl esters solutions (5mg.mL⁻¹). Separation was performed using a fused silica capillary column (Omegawax 250 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, EUA Supelco). The injector temperature was 260°C, the GC oven temperature program started at 50°C (hold time 2 min), heated to 220 °C at 4 °C min⁻¹, and the final temperature was maintained for 35 min. Fatty acids were quantified and identified using a standard composed of 37 FAME Mix Components (Supelco).

2.8 Statistic Analysis

To evaluate the best yieldsof biomass and YSCO in conventional medium, was performed an ANOVA ($\alpha = 0.05$) for each strain. To verify the best yields in medium containing rice husks, the “t” test was performed for each strain, using the “R software” (R Core Team, 2018).

3. Results and Discussion

3.1 Microbial Biomass and YSCO Production in Conventional Medium

The results of microbial biomass, YSCO production and respective yields in media composed of glucose PA with different nitrogen sources are shown in table 1.

Y. lipolytica QU21 was used as positive control because it has already been evaluated in previous work by Poli et al. (2013), where the highest yield was 26.5% using ammonium sulfate as nitrogen source and extraction was performed with maceration using liquid nitrogen followed by ultrasound treatment.

Table 1 – Final microbial biomass, YSCO and yield for each strain in medium composed of glucose PA and different nitrogen sources.

<i>Yeast strain</i>	Nitrogen source	Biomass g/L	YSCO g/L	Yield %
<i>Y. lipolytica</i> (Positive control)				
QU21	Peptone	11.04±0.21	3.64±0.24	33
	Ammonium Sulfate	16.81±0.4	2.28±0.14	14
	Yeast Extract	14.73±0.27	2.31±0.12	16
<i>S. cerevisiae</i> (Negative control)				
CBS1171	Peptone	6.2±0.36	0.0±0.00	0
	Ammonium Sulfate	3.01±0.18	0.0±0.00	0
	Yeast Extract	10.28±0.5	0.0±0.00	0
<i>Cr. podzolicus</i>				
VR520	Peptone	9.12±0.29	1.21±0.1	13
	Ammonium Sulfate	9.41±0.22	1.31±0.15	14
	Yeast Extract	13.21±0.1	1.4±0.14	11
VR535	Peptone	12.79±0.16	0.85±0.17	7
	Ammonium Sulfate	15.6±0.08	0.93±0.15	6
	Yeast Extract	19.09±0.16	1.38±0.02	7
VR558	Peptone	6.68±0.18	1.11±0.12	16
	Ammonium Sulfate	16.37±0.12	1.17±0.12	7
	Yeast Extract	20.09±0.16	1.48±0.14	7

<i>R. mucilaginosa</i>				
VR543	Peptone	10.91±0.13	2.12±0.18	19
	Ammonium Sulfate	11.39±0.20	1.12±0.16	10
	Yeast Extract	15.44±0.21	0.73±0.12	5
<i>C. pseudointermedia</i>				
VR544	Peptone	9.17±0.12	0.98±0.05	11
	Ammonium Sulfate	8.19±0.23	1.23±0.08	15
	Yeast Extract	8.16±0.18	1.16±0.14	15
VR545	Peptone	21.77±0.12	1.33±0.08	6
	Ammonium Sulfate	20.15±0.18	0.47±0.1	2
	Yeast Extract	17.87±0.22	1.64±0.18	9
<i>Yarrowia sp.</i>				
VR546	Peptone	13.89±0.17	0.64±0.08	4
	Ammonium Sulfate	16.15±0.22	0.6±0.17	4
	Yeast Extract	17.72±0.18	3.23±0.16	18
VR547	Peptone	12.81±0.16	1.79±0.12	14
	Ammonium Sulfate	10.45±0.23	2.09±0.12	20
	Yeast Extract	12.41±0.18	2.56±0.14	21
VR571	Peptone	8.16±0.25	1.53±0.17	18
	Ammonium Sulfate	16.2±0.21	0.84±0.14	5
	Yeast Extract	8.2±0.14	1.84±0.14	22

Only by this protocol was possible to obtain yields greater than 20 percent of the dry weight. From the analysis of the data presented in table 1 it can be affirmed that the nitrogen source affects the YSCO production, which associated with the tested extraction method made it possible to establish a new protocol to optimize the oil production by the strain, with yield reaching 33%.

The negative control, *S. cerevisiae* CBS1171, did not produce sufficient oil concentrations to calculate yield, and it was possible to verify only the natural production of cell membrane fatty acids and triglycerides by TLC. According to the literature, this species does not produce any intracellular lipid droplets (Vorapreeda et al., 2012).

Highest biomass production was reached by the strain VR545 (*C. pseudointermedia*) using peptone as nitrogen source, with concentration on average of 21.77 g.L⁻¹. The highest YSCO production using the conventional medium was 3.6 g.L⁻¹ for the control strain QU21 (*Y. lipolytica*) with the same nitrogen source. However, by the values of YSCOyield, were considered oleaginous strains: QU21, VR547 and VR571, all of the genus *Yarrowia*, in the presence of different sources of organic nitrogen, with yields between 20 and 33%. *R. mucilaginosa* strain VR543 with 19% yield may be a promising oleaginous microorganism using other protocols for intracellular lipid accumulation, such as: inclusion of new carbon and / or nitrogen sources, temperature, pH, aeration, among others.

Statistical analysis (table 4, supplementary material) indicates the influence of nitrogen sources tested with significance level <0.05. Yeast extract had a significant influence on other sources in the biomass production of CBS 1171 (negative control) strains of *Cr. podzoliccus* (VR520, VR535 and VR558), *R. mucilaginosa* (VR543) and *Yarrowia sp.* (VR546 and VR547). Peptone influenced the biomass growth of *C. pseudointermedia* (VR544 and VR545) and *Yarrowia sp.* (VR547). Ammonium sulfate influenced the growth of QU21 and *Yarrowia sp.* (VR571).

Regarding to YSCO production, yeast extract had a significant influence for *C. pseudointermedia* (VR545) and *Yarrowia sp.* (VR546, VR547 and VR571). Peptone influenced YSCO production by the strains QU21 (positive control), *C. pseudointermedia* (VR545), *R. mucilaginosa* (VR543) and *Yarrowia sp.* (VR571). Ammonium sulphate had influence only with *C. pseudointermedia* (VR544), and none of the sources tested had a significant influence when compared to the others on oil production by *Cr. podzolicus* (VR520, VR535 and VR558), meaning there was no preference of strains for a specific nitrogen source.

In this study, was possible to verify that the new strains evaluated, which are of genera described in the literature as a source of oleaginous species, some of them are capable to accumulating greater than 20% of their dry weight in lipids and may be promising sources of YSCO.

3.2 YSCO production using Rice Husks Hydrolysate

The results of biomass, YSCO and yields using rice husk acid (RHAH) and enzymatic (RHEH) hydrolysate are presented at table 2.

Table 2 – Final biomass, YSCO final concentration and yield for each strain according to the of rice husk hydrolysate (RHH).

Yeasts	RHH	Biomass (g.L ⁻¹)	YSCO (g.L ⁻¹)	Yield (%)
<i>Y. lipolytica</i> (Positive Control)				
QU21	Acid	8.23±0.42	0.37±0.01	5
	Enzymatic	9.93±0.45	0.96±0.01	10
<i>S. cerevisiae</i> (Negative Control)				
CBS 1171	Acid	13.23±1.02	0.01±0.06	0
	Enzymatic	3.3±0.4	0.02±0.05	0
<i>Cr. podzolicus</i>				
VR520	Acid	19.6±0.66	0.7±0.21	4
	Enzymatic	8.3±0.3	0.3±0.11	4
VR535	Acid	20.5±0.26	0.6±0.24	3
	Enzymatic	8.7±0.36	0.2±0.13	2
VR558	Acid	18.63±0.21	0.6±0.27	3
	Enzymatic	17.73±0.95	1.9±0.4	11
<i>R. mucilaginosa</i>				
VR543	Acid	22.77±0.15	0.9±0.32	4
	Enzymatic	16.07±0.21	0.4±0.09	3
<i>C. pseudointermedia</i>				
VR544	Acid	6.27±0.6	0.4±0.15	6
	Enzymatic	12.33±0.55	0.52±0.08	4
VR545	Acid	17.57±0.35	0.5±0.18	3
	Enzymatic	11.63±0.15	1.4±0.41	12
<i>Yarrowia sp.</i>				
VR546	Acid	15.77±1.06	0.4±0.29	3
	Enzymatic	7.9±0	0.4±0.02	5
VR547	Acid	8.57±0.35	0.5±0.30	6

VR571	Enzymatic	15.8±0.3	1.0±0.07	6
	Acid	15.9±0.5	0.7±0.17	4
	Enzymatic	8.77±0.06	0.5±0.1	6

In these assays, the positive control showed much lower oil productivity when compared to the results presented in Table 1, but in medium using RHEH the result was higher than that obtained with RHAH. Highest biomass production was reached by strain VR543 (*R. mucilaginosa*) using RHAH, with an average of 22,8 g.L⁻¹. However, the highest YSCO production was 1,9 g.L⁻¹, reached by the strain VR558 (*Cr. podzolicus*) cultured in RHEH.

The highest yields were 10%, 11% and 12% for the strains QU21, VR558 and VR545, respectively, using RHEH as carbon source. However, none of the strains reached YSCO productivity higher than 20%, including yeasts that were considered oleaginous when cultured in conventional medium. Enshaeieh et al. (2012), testing the influence of rice bran on the production of biomass and YSCO by strains of *Rhodotorula sp.* and *Candida sp.*, found biomass of 18,16 g.L⁻¹ and 17,70 g.L⁻¹, with yields of YSCO about 29% (5,45g.L⁻¹ and 4,25 g.L⁻¹, respectively). Liang et al. (2014) evaluated lipid production by *Cr. curvatus* in hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse after pretreatment with sulfuric acid and obtained biomass yields of 10,8 g.L⁻¹ and YSCO yield of 40%.

Statistical analysis (table 5, supplementary material) indicates the significance of the alternative methods tested. The RHAH had a significant influence on biomass production by most strains: CBS 1171 (negative control), *Cr. podzolicus* (VR520 and VR535), *C. pseudointermedia* (VR545), *R. mucilaginosa* (VR543) and *Yarrowia sp.* (VR546 and VR571). The RHEH resulted in better biomass yields when tested for the strains QU21, *C. pseudointermedia* (VR544) and *Yarrowia sp.* (VR547). There was no preference of *Cr. podzolicus* (VR558) by specific type of hydrolysate.

However, when YSCO production in RHEH was evaluated, this substrate had the best influence on the yield of most strains: QU21 (positive control), *C. pseudointermedia* (VR544 and VR545), *Cr. podzolicus* (VR558) and *Yarrowia sp.* (VR546, VR547 and VR571). Only *R. mucilaginosa* (VR543) and *Cr. podzolicus* (VR520) had higher YSCO yield when using RHAH. The strain *Cr. podzolicus* (VR535) showed no selectivity for any of the hydrolysates tested.

The yeasts behavior in the present research, when compared to the production in conventional and alternative medium, was similar to that observed by Silva et al.(2018) when evaluating the effect of the concentration of manipueira, cassava processing residue, on biomass and YSCO production by *R. mucilaginosa*, obtaining 4.1; 6.95; 5.77 g.L⁻¹ of biomass and 13,33%; 7,71% and 8,47% of YSCO yield in 50%, 75% and 100% of manipueira cultures, respectively. In the cultivation performed in conventional medium, there was the production of 9.39 g.L⁻¹ of biomass and 41.92% of YSCO.

3.4 Fatty Acids Profiles

The fatty acids profiles obtained in conventional medium using different nitrogen sources are shown in Table 3. Most of the yeasts produced mostly oleic acid (C18:1) and secondly palmitic acid (C16:0). Expressive production of stearic acid (C18:0) and linoleic acid (C18:2) was also observed for all strains.

Poli et al.(2013) obtained fatty acid methyl esters (FAME) of QU21 strain composed of myristic acid (C14:0), myristoleic acid (C14:1), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), heptadecanoic acid (C17:1), stearic acid (C18:0) and oleic acid (C18:1), however

there is no specification of relative percentages of each component. In the present research, this strain produced palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0) and oleic acid (C18:1) as main content. Heptadecanoic acid (C17:1) was observed only when ammonium sulfate was used as nitrogen source. In addition, new acids were produced by the strain, such as linoleic acid (C18:2) in all tests with the control strain, and docosaexanoic acid (C22:6), DHA, when peptone was used as a nitrogen source.

When analyzing the table 3, is remarkable that most of fatty acids have between 16 and 18 atoms of carbon, some having less or more than this range, but with low relative intensity. Most of the assays produced unsaturated fatty acids with high added value. In various samples, the ratio omega 6:omega 3 series is in the range.

Most of strains, when cultured using glucose PA as carbon source, produced mainly oleic acid (C18:1), followed by palmitic acid (C16:0), and remarkable stearic (C18:0) and linolenic acid (C18:2). The percentage of oleic acid decreased when RHAH was provided for the strains VR544, VR545, VR546 and VR558. Furthermore, this fatty acid was not detected to the strains VR520 (A) and VR547 (A). Despite of this, for these last cases, was detected the di-homo- γ -linolenic acid (C20:3).

The analysis by TLC of the extracts obtained in these assays indicated the presence of compounds not from the group of triglycerides, fatty acids and esters, leading to a high percentage of not identified compounds when compared to GC / FAME patterns. In the assays using RHEH and peptone, the resulting fatty acids profile was close to that resulting from the medium composed of glucose and peptone, with greatest percentages of oleic acid (C18:1), palmitic acid (C16:0) and linolenic acid (C18:2).

The strains of *Cr. podzolicus*, when cultured in glucose PA, despite of nitrogen supply, produced the same fatty acids, varying only the relative abundance. The strain VR558 presented low percentage of not identified compounds. For the strain VR520(A), C18:1 was not detected, but C20:3 presented relative abundance of 11%. The percentage of unsaturated fatty acids presented elevated values. The only previous report of oleaginous potential for this specie is from the work of Schulze et al. (2014), that obtained C18:1 (55.1 and 59.4%) and C16:0 (18.4 and 20.1%) when evaluating the influence of glucose and xylose in lipids accumulation using peptone as nitrogen source.

Liang et al. (2010) using glycerol as carbon source and NH₄Cl as nitrogen source for *Cr. curvatus* ATCC 20509, obtained the same fatty acids profile identified in this work. Thiru, Sankh and Rangaswamy (2011), evaluating the lipid accumulation by *Cr. curvatus* and its conversion to biodiesel, obtained high percentage of C18:1, followed by C16:0, C18:0 and C18:2, highlighted the unprecedented evaluation of strains from Brazil.

Table 3 – Fatty acids profiles accumulated according to the strain and to different substrate

Y. lipolytica (C +)																									
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3
QU21 (P)					16.6	12.1			5.4	51	11.8						1.3	1.8	100	76.2	22	1.3	11.8	51	9:1
QU21 (S)					19.2	6.8		1.3	8.5	40.9	4.3							19	100	53.3	27.7	0	4.3	40.9	0
QU21 (Y)					17.9	13			5.8	51.2	10.7							1.4	100	74.9	23.7	0	10.7	51.2	0
QU21 (A)			1.4		28.4	6.1	0.8		7.9	15.8	16.9	2.2		6.6				13.9	100	47.6	38.5	2.2	23.5	15.8	11:1
QU21 (E)					19.4	11.8		1	6.2	35.4	20.4					2.8		3	100	68.6	28.4	0	20.4	35.4	0
Cr. podzolicus																									
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3
VR520 (P)	1				28.4	3.8			9.3	40.6	14.2	1.7						1	100	60.3	38.7	1.7	14.2	40.6	8:1
VR520 (S)	1.2		1.1		19.6	11.9		1	2.8	44.2	12.9	3.6						1.7	100	73.6	24.7	3.6	12.9	44.2	4:1
VR520 (Y)	1		0.3		29.8	3.6	0.3		11.1	38.5	10.8	1						3.6	100	53.9	42.5	1	10.8	38.5	10:1
VR520 (A)		3	9	2	39		3		9			4		11				20	100	20	60	4	11	0	3:1
VR520 (E)					21.2	0.7			12.4	49.6	11.9	4.2							100	66.4	33.6	4.2	11.9	49.6	3:1
VR535 (P)	1		1		20.7	9.2	1		9	47	9.1			1				1	100	66.3	32.7	0	10.1	47	0
VR535 (S)			0.7		16	14.2		2.5	3.8	54.5	7.1							1.2	100	78.3	20.5	0	7.1	54.5	0
VR535 (Y)					23.9	11.4		1.3	8.8	42.5	9.6							2.5	100	64.8	32.7	0	9.6	42.5	0
VR535 (A)				2	35.4	10.2			10.7	26.5	9.2			2.9				3.1	100	50.8	46.1	0	12.1	26.5	0
VR535 (E)					24.5	12.6			6.4	37.2	19.3								100	69.1	30.9	0	19.3	37.2	0
VR558 (P)	1		0.6		30.1	4	0.3		9.5	39	13.9	1.6							100	58.5	41.5	1.6	13.9	39	9:1
VR558	1.2				31.4	9.4			3.8	29.3	20.8	4.1							100	63.6	36.4	4.1	20.8	29.3	5:1

(S) VR558 (Y) VR558 (A) VR558 (E)	1		1		26.2	4	1		8.4	44	13.1	1.3						100	62.4	37.6	1.3	13.1	44	10:1	
		2			41.5				11.5	1.5		4.5		14.5			24.5	100	22.5	53	4.5	14.5	1.5	3:1	
					24.7	10.8			7	31.2	21.3						5	100	63.3	31.7	0	21.3	31.2	0	
R. mucilaginosa																									
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3
VR543 (P)	1.3		0.7		26.5	1.2	1.4	0.9	8.2	29.5	13.3	4		0.7	9.4			2.9	100	59	38.1	4	23.4	29.5	6:1
VR543 (S)	1.2				23				4	51.6	8.6	8.8					1.5	1.3	100	70.5	28.2	10.3	8.6	51.6	1:1
VR543 (Y)	1.5				25	2.1			2.1	44.1	19.5	3.4					1.2	1.1	100	70.3	28.6	4.6	19.5	44.1	4:1
VR543 (A)			1		25.8	8.7			8.9	45.7	9.9								100	64.3	35.7	0	9.9	45.7	0
VR543 (E)					23				5.7	48.6	18.9	3.8							100	71.3	28.7	3.8	18.9	48.6	5:1
C. pseudointermedia																									
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3
VR544 (P)	0.8		0.6		25.6	6.5			4.8	41.2	19	1.5							100	68.2	31.8	1.5	19	41.2	13:1
VR544 (S)	1.6		2.5		46.6	1.7	2.4	1.6	9.2	6.4	5.2	4.3			9.5	3.1		5.9	100	28.7	65.4	4.3	14.7	6.4	3:1
VR544 (Y)	1.5		0.9		23.2	10.8			1	37.4	19.8	3.1						2.3	100	71.1	26.6	3.1	19.8	37.4	6:1
VR544 (A)			1		32.5	7	1	1	7.5	27.6	12.3	1		4.6				4.5	100	53.5	42	1	16.9	27.6	17:1
VR544 (E)	1				26		5.5		11.9	40.6	15								100	55.6	44.4	0	15	40.6	0
VR545 (P)	1.4		1		27.5	6.4			2.5	40.2	17.4							3.6	100	64	32.4	0	17.4	40.2	0
VR545 (S)	1.2				29.7	4.3			5.5	32.5	19.7	5.9			1.2				100	63.6	36.4	5.9	20.9	32.5	3:1
VR545 (Y)	3.3		1.3		35.9	7.2			6.3	30	11.7	1.4			1.5			1.4	100	51.8	46.8	1.4	13.2	30	9:1
VR545			1		33.9	4.3	1		6.3	24.9	15.5	1.9		7.2				4	100	53.8	42.2	1.9	22.7	24.9	12:1

(A) VR545 (E)					26.9	6				13	35.7	18.4							100	60.1	39.9	0	18.4	35.7	0
Yarrowia sp.																									
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3
VR546 (P)					16.6	12.2			3.5	53.4	12.2							2.1	100	77.8	20.1	0	12.2	53.4	0
VR546 (S)					12.1	10.7		3.3	2.9	63.6	7.4								100	85	15	0	7.4	63.6	0
VR546 (Y)					17.8	13.4			4.1	51.7	11.1							1.9	100	76.2	21.9	0	11.1	51.7	0
VR546 (A)			2.4		29.9	4.8			7.7	11	7.9	4.5		10.6				21.2	100	38.8	40	4.5	18.5	11	4:1
VR546 (E)			1.3		18.7	1.1			11.7	49.8	12.6	3.4	1.4						100	66.9	33.1	3.4	12.6	49.8	4:1
VR547 (P)					20.7	10.6		0.5	7.3	43.7	11.2					1.1		4.9	100	66	29.1	0	11.2	43.7	0
VR547 (S)					14	17.1			3.2	57.5	6.1							2.1	100	80.7	17.2	0	6.1	57.5	0
VR547 (Y)					22.3	12.2		0.7	6.5	50.4	7.9								100	71.2	28.8	0	7.9	50.4	0
VR547 (A)			1.5		42.3				15.2			4.5		13.4				23.1	100	17.9	59	4.5	13.4	0	3:1
VR547 (E)					21.2	8.8			10.5	34.4	22					3.1			100	65.2	34.8	0	22	34.4	0
VR571 (P)					15.6	11.4			3.8	54.8	10.5						1.7	2.2	100	78.4	19.4	1.7	10.5	54.8	6:1
VR571 (S)					12.7	12		1.3		63.7	9.1							1.2	100	86.1	12.7	0	9.1	63.7	0
VR571 (Y)					17.6	13.6			5.2	50.3	12.1							1.2	100	76	22.8	0	12.1	50.3	0
VR571 (A)					16.7	12.1			5.4	51.2	11.8					1.3		1.5	100	75.1	23.4	0	11.8	51.2	0
VR571 (E)					24.4	10.7			3.9	33.3	25.2	2.5							100	71.7	28.3	2.5	25.2	33.3	10:1
	C14:0	C14:1	C15:0	C15:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20	C20:3	C20:4	C24	C22:6	n.i.	Σ	ΣINS	ΣSAT	Σω3	Σω6	Σω9	ω6/ω3

The strain *R. mucilaginosa* (VR543) presented the greatest variety of fatty acids when peptone was provided as nitrogen source, indicating the preference for organic nitrogen source and making possible the using of natural sources for stimulating the lipidic accumulation. In this assay, is remarkable the accumulation of 9.4% of arachidonic acid - AA (C20:4), by the omega-6 family. According to Hou (2008), the AA is used as precursor of biomolecules involved in inflammatory response, reproductive functions, immunological responses and arterial pressure regulation. However, its high costs and relative scarcity limits its application, being necessary the research for alternative sources.

Hao et al. (2016) evaluated ways to optimizing the production of AA for *Mortierella alpina* and verified that over-expressing the loci G6PD2 and ME2, by genetical manipulation, is possible to increase this production, demonstrating the synergic activity of these genes in the poly-unsaturated fatty acids production. In this work, a significant percentage of AA was obtained without genetical manipulation, indicating the promising potential of VR543 to produce AA demanding only adjusts in the nitrogen source.

Regarding to the production of oleic acid by *R. mucilaginosa* (VR543), the highest relative abundance was obtained when using ammonium sulfate. Besides this, relative abundance of C18:2 was decreased and C18:3 was increased. These are remarkable results because C18:2 is by the omega-3 family, while 18:3 is by omega-6 family.

Other fatty acids obtained in low percentage were di-homo- γ -linolenic acid (C20:3) and docosa-hexaenoic acid (C22:6), respectively from omega-3 and omega-6 family. Khot and Ghosh (2017) verified the potential for biodiesel production using a strain of *R. mucilaginosa* using xylose from sugarcane bagasse as carbon source and yeast extract and ammonium sulfate as nitrogen source. These authors observed a high relative abundance of mono-unsaturated fatty acids (35-55%, 18:1 and 16:1), applicable to best quality ignition, oxidative stability and flow properties in low temperature for biodiesel.

The strains of *C. pseudointermedia* VR544 (S), VR544 (A), VR545 (Y) and VR545 (A) produced mostly C16:0. VR544 (S) produced significant C20:4 percentage (9.5%), reduced C18:2 percentage and C24:0 production. The latter was not produced for this species in the other experiments. Rosa et al. (2014) found that the fatty acid profile by *C. zeylanoides* QU 33, using different nitrogen sources, was mainly composed of:oleic acid (C18:1), followed by linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0) and α -linolenic acid (C18:3). The authors also observed the presence of medium chain saturated fatty acids such as myristic acid (C14:0) and pentadecanoic acid (C15:0) at low concentrations in organic media, which differs from the present study which found medium chain acids when ammonium sulfate was provided as nitrogen source. Furthermore, these authors did not report the occurrence of C20:4 and C24:0.

The strains of *Yarrowia* sp. presented the same fatty acids profiles for all the nitrogen sources evaluated, being produced mainly:palmitic acid, palmitoleic acid, heptadecanoic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, docosaenoic acid and lignoceric acid. Papanikolaou et al. (2003), cultivating *Y. lipolytica* in medium composed of stearin (derived from animal fat), glycerol and glucose, obtained mainly lauric (C12:0), miristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids, profile close to cocoa butter.

In a review paper, Carsanba, Papanikolaou and Erten (2018) reinforce the necessity of reduce the costs of process to increase the production of microbial oils, and endorse the potential of *Y. lipolytica*, mainly because it capability to use different substrates, as hydrophilic as hydrophobic, as acid as alkaline and high salinity culture medium. These authors conclude that the subsequent efforts must to be concentrated in this specie because its ability to grow in various culture conditions.

In this work, peptone was the nitrogen source that resulted in most diverse fatty acid profile in most of the evaluated strains when using glucose as carbon source, being chosen as

nitrogen supply to the other assays using rice husks hydrolysates. This result corroborates with Rosa et al. (2014), that obtained highest YSCO yield when using peptone in a C:N ratio of 200:1.

The most remarkable results in this work were: the production, by all the evaluated genera, of di-homo- γ -linolenic acid (C20:3) when using RHAH; the production by strains of *Yarrowia* of lignoceric acid (C24:0), as wild-type, as positive control in RHAH and arachidonic acid (C20:4) when using synthetic medium.

When comparing the fatty acids profiles of QU21, is remarkable the difference in the percentages of oleic acid (C18:1) when using RHAH (15.8%), RHEH (35.4%) and glucose (51.2%). Beside this, were observed the fatty acids C15:0, C15:1, C17:0 and C17:1 in all substrates. This is an important result because, according to Sousa et al. (1998), fatty acids with odd carbon number are rare, occurring only in little quantity in plants.

Palmitoleic acid (C16:1) is an unsaturated fatty acid omega 7, and has been reported as efficient against obesity (Yang et al., 2011) and to prevent cardiac and cerebral disease (Matsunaga et al., 1995). According to Schulze et al. (2014), fatty acids profiles rich in oleic acid may be used to biodiesel production, palmitic and linolenic acid are applicable to using in cosmetical industry, and palmitoleic acid is suitable to medical applications.

Rosa et al. (2014), studying *C. zeylanoides* QU 33, obtained low lipid accumulation when compared to oleaginous strains, but even in this situation, the highest YSCO yield was obtained when using peptone as nitrogen source, and stated that QU 33 may be used in future as model organism to understand the metabolism of lipids in not oleaginous yeasts.

By this way, face to the advances of discovering new oleaginous species and strains, new tools of genetic engineering may be developed as promoters, terminators, integration sites, episomal vectors and systems based on CRISPR, necessary to increase the potential of lipid production and fatty acids profiles of interest using different substrates. The domestication of these newborn systems may to lead the industrial using of these new strains for biochemical platforms (Yaguchi, Rives, Blenner, 2017).

4. Conclusion

This work evaluated the using of different nitrogen sources on the biomass and YSCO production when glucose was provided as carbon source, allowing the selection of strains with oleaginous potential. Regarding to the fatty acids profiles, is remarkable the production of arachidonic acid (C20:4) by a wild-type strain of *Rhodotorula mucilaginosa* using not optimized protocols. The using of rice husk enzymatic hydrolysate as substrate presented results close to the using of glucose.

In all evaluated conditions, were obtained fatty acids applicable to biodiesel production, medical and cosmetical industry. Subsequent efforts must to evaluate the production of these fatty acids by these strains in enlarged scale, with special attention to the use of rice husk enzymatic hydrolysate as substrate.

Disclosure of conflict of interest

The authors declare having not conflict of interest with any financial support agency.

Acknowledgments

The authors are too grateful for Granotec do Brasil S.A., because for donating the enzyme; Arroz Tropical Ltda., Tia Maria Ltda., Tio Ivo Ltda. and Arroz Itikawa Ltda because for donating rice husks.

Special thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), because for financial support.

References

- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P., Vila T.G., 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90:1219-1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M., 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99: 3051-3056. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.045>.
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., Erten, H., 2018. Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowialipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38(8):1230-1243. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>.
- Da Rosa, P.D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., Valente, P., 2014. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiologica*. 59(6):477-484. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0325-3>.
- Da Rosa, P.D., Mattanna, P., Valente, P., 2015. Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio. *Brazilian Journal of Biosciences*. 13(2):79-83. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3175>.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Madani, M., 2012-2013. Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *Journal of Cell and Molecular Research*. 4 (2): 68-75.
- Enshaeish, M., Abdoli, A., Madani, M., Bayat, M., 2015. Recycling of lignocellulosic waste materials to produce high-value products: single cell oil and xylitol. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12:837-846.
- Ferreira, S.M., Caliari, M., Soares Júnior, M.S., Beleia, A.D.P., 2013. Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 15(4): 383-390.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/226/1/497.citation>.
- Hao, G., Chen, H., Gu, Z., Zhang, H., Chen, W., Chen, Y.Q., 2016. Metabolic Engineering of *Mortierella alpina* for Enhanced Arachidonic Acid Production through the NADPH-Supplying Strategy. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(11): 3280-3288. <https://doi.org/10.1128/AEM.00572-16>.
- Hickert, L.R., Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., 2013. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technology*. 143: 112-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.123>.

- Hou, C.T., 2008. Production of arachidonic acid and dihomo- γ -linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:501–506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.128>.
- Hungenholtz, J., Smid, E.J., 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 497- 500.
- Joseph, J.D., Ackman, R.G., 1992. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 75(5): 488-506.
- Ghosh, D., 2017. Lipids of *Rhodotorula mucilaginosa* IPL32 with biodiesel potential: Oil yield, fatty acid profile, fuel properties. *Journal of Basic Microbiology*. 57: 345–352. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201600618>.
- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., Limtong, S., 2010. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhododsporidium toruloides* DMKU3-TK16. *Natural Science*. 44:436-445.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4ed. Amsterdam: Elsevier. 847p.
- Leiva-Candia, D.E., Pinzi, S., Redel-Macías, M.D., Koutinas, A., Webb, C., Dorado, M.P., 2014. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*. 123:33-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.054>.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (eds). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1987. 224p.
- Li, Q., Du, W., Liu, D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:749–756. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1625-9>.
- Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., Blackburn, J.W. 2010. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology*. 101:7581-7586. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.061>.
- Liang, Y., Tang, T., Umagiliyage, A.L., Siddaramu, T., McCarroll, M., Choudhary, R., 2012. Utilization of sorghum bagasse hydrolysates for producing microbial lipids. *Applied Energy*. 91:451–458. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.10.013>.
- Liang, Y.N., Jarosz, K., Wardlow, A.T., Zhang, J., Cui, Y., 2014. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse following dilute acid pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 173:2086–2098.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Miura, Y., Yamazaki, T., Furuya, H., Sode, K., 1995. Screening of marine cyanobacteria for high palmitoleic acid production. *FEMS Microbiology Letters*. 133(1–2):137–141. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07874.x>.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 11: 426-428.
- Mlíčková, K., Roux, E., Athenstaedt, K., D'Andrea, D.G., Chardot, T., Nicaud, J., 2004. Lipid accumulation, lipid body formation, and Acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7):3918-3924. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3918-3924.2004>.

- Papanikolaou, S., Muniglia, S., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I., 2003. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology*. 46: 124-130. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3833-3>.
- Poli, J.S., Dallé, P., Senter, L., Mendes, S., Ramirez, M., Vainstein, M.H., Valente, P., 2013. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU 21: an alternative vegetable oils. *Brazilian Journal of Biosciences*. 11(2):203-208. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2524>.
- Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudszuck, T., Ochsenreither, K., Syldatk, C., & Neumann, A., 2014. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts - *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express*. 4(24):1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0024-0>.
- Silva, J., Silva, F.L.H., Santos, S.F.M., Ribeiro, J.E.S., Medeiros, L.L.M., Ferreira, A.L.O., 2018. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. *Brazilian Journal of Food Technology*. 21: 1-6.
- Sitepu, I.R., Garay, L.A., Sestric, R., Levin, D., Block, D.E., German, J.B., Boundy-Mills, K.L., 2014. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 32(7):1336-1360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>.
- Smith, V.J., Desbois, A.P., Dyrinda, E.A., 2010. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, 8:1213- 1262. <http://doi.org/10.3390/md8041213>.
- Souza, N., Matsushita, M., Visentainer, J.V., 1998. Ácidos graxos: Estrutura, Classificação, Nutrição e Saúde. 2(2):102–107.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Ohkuma, M., Shima, J., 2014. *Cryptococcus terricolais* a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific Reports*. 4 (4776): 1-6. <http://doi.org/10.1038/srep04776>.
- Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V., 2011. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource Technology*. 102: 10436–10440.
- Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S., Laoteng, K., 2012. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology*. 158: 217–228. <http://doi.org/10.1099/mic.0.051946-0>.
- Yang, Z.H., Miyahara, H., Hatanaka, A., 2011. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-A(y) mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids in Health and Disease*. 10(120): 1-8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-120>.
- Yaguchi, A., Rives, D., Blenner, M., 2017. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance. *AIMS Microbiology*, 3(2):227-247. <http://doi.org/10.3934/microbiol.2017.2.227>.
- Yu, X.C., Zheng, Y.B., Dorgan, K.M., Chen, S.L., 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*. 102, 6134–6140. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.081>.
- Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., JIN, Y., Gao, X., Chen, Q., Guan, J., Wang, Z., 2011. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of

raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*. 102:4573–4579. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.115>.

Zhu, L.Y., WU, H., 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99: 7881- 7885.

Supplementary Material

Statistical analysis

Table 4 – Statistical analysis of different nitrogen sources in medium composed of glucose as carbon source.

Yeasts / Strains	Compound	Nitrogen source		
		Peptone vs Yeast extract	Ammonium sulfate vs Yeast extract	Ammonium sulfate vs Peptone
QU21	Biomass	0	4.00E-04	0
	YSCO	2.00E-04	0.9816	2.00E-04
CBS 1171	Biomass	0	0	1.00E-04
	YSCO	NO	NO	NO
VR 544	Biomass	0.0013	0.9831	0.0015
	YSCO	0.1498	0.6622	0.0483
VR545	Biomass	0	0	1.00E-04
	YSCO	0.0624	1.00E-04	4.00E-04
VR543	Biomass	0	0	0.0418
	YSCO	1.00E-04	0.0536	6.00E-04
VR520	Biomass	0	0	0.2968
	YSCO	0.278	0.6867	0.6867
VR535	Biomass	0	0	0
	YSCO	0.0061	0.0134	0.7442
VR558	Biomass	0	0	0
	YSCO	0.0272	0.0588	0.8053
VR546	Biomass	0	1.00E-04	0
	YSCO	0	0	0.9275
VR547	Biomass	0.0953	0	0
	YSCO	8.00E-04	0.0101	0.0588
VR571	Biomass	0.9696	0	0
	YSCO	0.1021	4.00E-04	0.0032

NO: Not observed, YSCO: Yeast Single-Cell Oil.

Table 5 – Statistical analysis when rice husks hydrolysates were provided as carbon source.

Yeasts / Strains	Compound	Kind of hydrolysate		P
		RHAH	RHEH	
QU21	Biomass	8.23	9.93	0.0087
	YSCO	0.37	0.96	2.00E-04
CBS1171	Biomass	13.23	3.3	1.00E-04
	YSCO	0.01	0.02	0.1161
VR520	Biomass	19.6	8.3	0
	YSCO	0.83	0.33	0.0106
VR535	Biomass	20.5	8.7	0
	YSCO	0.53	0.34	0.1242
VR558	Biomass	18.63	17.73	0.1825
	YSCO	0.03	1.92	0
VR543	Biomass	22.77	16.07	0
	YSCO	0.93	0.38	3.00E-04
VR544	Biomass	6.27	12.33	2.00E-04
	YSCO	0.02	0.52	4.00E-04
VR545	Biomass	17.57	11.63	0
	YSCO	0.02	1.4	1.00E-04
VR546	Biomass			
	YSCO	0.01	0.41	0
VR547	Biomass	8.57	15.8	0
	YSCO	0.02	1.02	0
VR571	Biomass	15.9	8.77	0
	YSCO	0.01	0.06	2.00E-04

RHAH: Rice Husk Acid Hydrolysate; RHEH: Rice Husk Enzymatic Hydrolysate; YSCO: Yeast Single-Cell Oil

4.1 NORMAS DA REVISTA BIOTECHNOLOGY ADVANCES

BIOTECHNOLOGY ADVANCES



Research Reviews



**AUTHOR
INFORMATION PACK**

Biotechnology Advances is a review journal which considers all aspects of the multidisciplinary field. The scope includes biotechnology principles and applications in industry, agriculture, medicine, environmental concerns and regulatory issues. Authoritative articles on current developments and future trends in biotechnology are empathized. Submissions of appropriate manuscripts are invited. A wide audience of scientists, engineers and others is addressed: students, instructors, researchers, practitioners, managers, governments and related stakeholders. Special issues are published on selections of presentations at recent relevant conferences as arranged with the organizations. Special issues are also produced to review areas of biotechnology which are inadequately covered in a focused and/or timely manner in regular issues, as arranged with invited guest editors.

Article structure

The corresponding author should ensure that the text structure for section heading and subheadings is correct.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the review. Provide an adequate background of the review.

Results and discussion

Include an appropriate amount of detailed surveys of the literature and other relevant materials such as patents, reports and books, under various related sections and subsections to address the review objectives.

Conclusions

The main conclusions of the review may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university,

college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Accession numbers

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the type of accession number together with the actual number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the electronic copy, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version

- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not: Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low Supply files that are too low in resolution Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by

including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviation sources

Journal names should be abbreviated according to:

Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php> CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published

articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author: E-mail address Full postal address Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded Keywords All figure captions All tables (including title, description, footnotes) Further considerations Manuscript has been "spellchecked" and "grammar- checked" References are in the correct format for this journal All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

5 CONCLUSÕES

Roraima permanece entre os maiores produtores de arroz irrigado do país;

O volume de cascas resultante do beneficiamento do grão possui grande potencial para ser utilizado na produção de novos produtos, agregando valor ao resíduo gerado e contribuindo para a qualidade ambiental;

A hidrólise ácida de cascas de arroz é mais eficiente ao usar cascas intactas, liberando um hidrolisado com concentração total de açúcares redutores e rendimento próximo a outros substratos lignocelulósicos alternativos usados para fermentação;

A hidrólise enzimática utilizada neste trabalho de pesquisa é eficiente para obter um hidrolisado com menor concentração total de açúcar redutor, mas com rendimento total de açúcares redutores próximo ao resultado de processos otimizados e com baixa toxicidade;

Em condições convencionais, as leveduras de linhagens selvagens do gênero *Yarrowia* acumularam lipídios intracelulares com rendimento semelhantes ao rendimento lipídico de leveduras oleaginosas;

Os perfis de ácidos graxos de *Rhodotorula mucilaginosa* produziu ácido araquidônico (C20:4) utilizando protocolos não otimizados;

Em condições alternativas, a utilização do hidrolisado enzimático da casca de arroz como substrato apresentou resultados próximos ao uso da glicose;

Em todas as condições avaliadas, foram obtidos ácidos graxos aplicáveis à produção de biodiesel, na indústria médica e cosmética;

Deve-se estabelecer processos de hidrólise que podem ser usados ao lado das indústrias de processamento de arroz.

E por fim, novos estudos visando avaliar a produção desses ácidos graxos por essas cepas em escala ampliada, com atenção especial ao uso do hidrolisado enzimático da casca de arroz como substrato devem ser considerados.