



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ELIÉLSON RAFAEL BARROS

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS PELA
LEVEDURA *RHODOTORULA MUCILAGINOSA***

**SUMÉ - PB
2019**

ELIÉLSON RAFAEL BARROS

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS PELA
LEVEDURA *RHODOTORULA MUCILAGINOSA***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientador: Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes.
Co-Orientador: Eng. Willyan Araújo da Costa.**

**SUMÉ - PB
2019**

B277m Barros, Eliélson Rafael.

Modelagem e simulação da produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula Mucilaginosa*. / Eliélson Rafael Barros. - Sumé - PB: [s.n], 2019.

45 f.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes; Co-Orientador: Willyan Araújo da Costa.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Lipídios - produção. 2. Modelagem e simulação – produção de lipídeos. 3. Levedura - *Rhodotorula Mucilaginosa* . 4. Mandioca – manipueira. 5. Modelagem de Bioprocessos. 6. Método da Runge-Kutta. I. Nunes, Bruno Rafael Pereira. II. Costa, Willyan Araújo da. III. Título.

CDU: 60 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

ELIÉLSON RAFAEL BARROS

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS PELA
LEVEDURA *RHODOTORULA MUCILAGINOSA***

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
coordenação do curso de Engenharia de
Biotecnologia e Bioprocessos, do Centro de
Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da
Universidade Federal de Campina Grande,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

BANCA EXAMINADORA

Bruno Rafael Pereira Nunes

Prof. Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes
Orientador – UAEB/CDSA/UFCG

Willyan Araújo da Costa

Eng. Willyan Araújo da Costa
Coorientador - CT/UFRN

George do Nascimento Ribeiro

Prof. Dr. George do Nascimento Ribeiro (CDSA/UFCG)
Examinador – UAEB/CDSA/UFCG

Fabiana Pimentel Macedo de Farias

Profa. Dra. Fabiana Pimentel Macedo de Farias (CDSA/UFCG)
Examinadora – UATEC/CDSA/UFCG

AGRADECIMENTOS

A minha jornada tem sido longa e cheia de descobertas, encontros, cheia de saudade, incertezas e horizontes. Hoje percebo o quanto foi grande minha evolução, ao decorrer de todos esses anos, fruto dos meus esforços, muita dedicação, noites mal dormidas e apenas um propósito: fazer valer à pena todas as escolhas que eu fiz!

Certamente, estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Portanto, desde já, peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte dos meus pensamentos e de minha enorme gratidão.

Gostaria de deixar registrado o meu reconhecimento à minha família, amigos e professores; eles são o substrato sobre o qual se erguem minhas construções, e sempre foram a inspiração e o combustível dos meus desafios.

Queria agradecer grandemente, a minha querida mãe, Elizete Rafael, que sempre lutou, tanto quanto eu, que sempre fez dos meus sonhos os dela, se doou, e sempre acreditou, mais que qualquer outro, no meu sucesso. A ti, minha mãe, deixo toda minha gratidão. Te amo muito!

Ao meu companheiro e grande amigo, Pio Magno, que é uma pessoa maravilhosa e que admiro muito, sempre estava ao meu lado nessa reta final, me dando forças e me incentivando bastante para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

As minhas queridas irmãs Eliene Rafael, Neiliane Rafael, Katiúcia Rafael, Eliane Rafael e Kátia Rafel. E aos meus irmãos Eliedson Rafael, Paulo Edson e Joniedson Rafael, por todo apoio e ajuda em todos esses anos de graduação e por sempre acreditarem na minha capacidade de concretizar meus sonhos, que também são deles.

Aos meus amigos de longa data, que conquistei durante a graduação, Lucas Rodolfo, Darlyson Guimarães, Ana Carla, Aislla Raianny, Maysa Bernardino, Jaqueline Siqueira, Yasmin Azevedo, Jurema Suelen, Camila Joyce, Luana Queiroz, Isadora Fernandes e Monalisa Farias, a vocês deixo todo carinho e afeto. Adoro vocês!

Aos meus orientadores Prof. Dr. Bruno Nunes e Willyan da Costa, por toda ajuda, sabedoria e paciência com que me guiaram durante todo o tempo de desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos que conquistei no “FF”, Hialle Henrique, Milene Ferreira, Samuel Vinícius e Júlio César, que são pessoas maravilhosas e tenho um carinho enorme e, que, nos momentos de descontração conseguimos dar várias risadas e nos divertimos bastante juntos. Adoro vocês!

Ao meu grande amigo Newton Carlos, que me ofereceu muita assistência durante o desenvolvimento do trabalho, sem ele, teria sido tudo mais difícil.

À professora Glauciane Danusa, que compartilhou seus conhecimentos com maestria, se mostrou sempre preocupada e prestativa em âmbitos além dos acadêmicos, sendo um exemplo durante esses anos, me inspirando e me motivando a buscar sempre mais.

Ao pessoal do Laboratório de Bioengenharia - UFPB (Labio), especialmente a professora Sharline Florentino, que me acolheu de braços abertos, para que eu pudesse desenvolver meu estágio supervisionado.

Ao pessoal do Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas (LBA) – UFPB, especialmente ao professor Clóvis, que concedeu o laboratório para que eu pudesse realizar alguns experimentos e análises.

Ao Josevan da Silva, pela concessão de uso de seus dados experimentais, artigos e dissertação, base para culminância desse trabalho.

À Coordenação do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, pela cooperação.

Enfim, a todos os que contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Objetivou-se por meio do presente estudo realizar a modelagem e simulação para o processo de produção de lipídios utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Considerou-se a produção a partir da fração líquida remanescente do processamento das raízes (conhecida popularmente como manipueira) da mandioca (*Manihotesculenta* Crantz). As simulações foram realizadas mediante um planejamento composto central (2^2), sendo as variáveis independentes as concentrações iniciais de células (X_0) e de substrato (S_0) durante 120 horas. O método de Runge-Kutta de quarta ordem também foi utilizado para a resolução das equações diferenciais durante a simulação das condições iniciais do processo, a fim de avaliar os efeitos sobre as variáveis dependentes, produtividades em células (P_X) e em lipídios (P_L). Para todas as condições testáveis um aumento na concentração inicial de substrato (S_0), estimulou o crescimento celular (P_X) e a produtividade de lipídios (P_L). A produtividade em biomassa variou de 0,012 a 0,083 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e em lipídios variou de 0,90 a 6,34 $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Dentro das condições estudadas em que os ensaios foram realizados, o ensaio 4, apresentou as maiores produtividades, e as condições do ensaio 7, foram as que proporcionaram as menores produtividades, sendo, portanto, a concentração de 2,00 g.L^{-1} de células e 40,00 g.L^{-1} de substrato a condição mais indicada para a geração de biomassa e de lipídios. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos na simulação, verificou-se que a manipueira mostrou ser um bom substrato para o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e para a produção de lipídios.

Palavras-Chave: Biomassa. Fermentação. Resíduo agroindustrial. Runge-Kutta.

ABSTRACT

This study aimed to model and simulate the lipid production process using *Rhodotorulamucilaginoso* yeast. The production from the liquid fraction remaining from the processing of the roots (popularly known as manipueira) of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) was considered. The simulations were performed through a central composite design (2^2), and the independent variables were the initial cell (X_0) and substrate (S_0) concentrations for 120 hours. The fourth order Runge-Kutta method was also used to solve the differential equations during the simulation of the initial process conditions in order to evaluate the effects on dependent variables, cell (P_X) and lipid (P_L) productivity. For all testable conditions an increase in initial substrate concentration (S_0) stimulated cell growth (P_X) and lipid productivity (P_L). The yield in biomass ranged from 0.012 to 0.083 g/L.h and in lipids ranged from 0.90 to 6.34 mg/L.h. Within the testable conditions under which the tests were performed, test 4 showed the highest yields, and the conditions of test 7, were the ones that provided the lowest productivity. Therefore, the concentration of 2.00 g/L cells and 40.00 g/L substrate is the most suitable condition for biomass and lipid generation. Thus, from the results obtained in the simulation, it was found that the manipueira tree proved to be a good substrate for the growth of *Rhodotorulamucilaginoso* yeast and for lipid production.

Keywords: Biomass. Fermentation. Agro-industrial waste. Runge-Kutta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação entre o conhecimento do processo, a estatística e o bom senso, no momento da definição do planejamento experimental mais adequado e na análise dos resultados.....	24
Figura 2 - Fluxograma representativo das etapas que foram executadas no trabalho...	26
Figura 3 - Representação do processo conduzido em um reator batelada.....	28
Figura 4 - Etapas para a resolução das Equações (33), (37) e (41) pelo método Runge-Kutta de 4ª ordem	31
Figura 5 - Comportamento cinético para os ensaios de 1 (a) a 9 (i), obtidos por simulação, a partir das condições iniciais propostas no planejamento experimental.....	34
Figura 6 - Diagramas de Pareto para os efeitos padronizados em $p = 0,05$, para as repostas produtividade de células (Px) (a) e produtividade de lipídios (PL) (b).....	37
Figura 7 - Diagramas de superfície de resposta em função das concentrações iniciais de substrato e de células para produtividade em biomassa ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) (a) e em lipídios ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$) (b)	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis reais e codificados das variáveis independentes, concentração de células (X_0) e de substrato (S_0).....	32
Tabela 2 - Condições iniciais aplicadas, concentrações e produtividades de células e de lipídios obtidos na simulação do processo.....	36
Tabela 3 - Análise de variância para o modelo de regressão da produtividade em biomassa e lipídios, obtida a partir dos ensaios simulados nas condições do planejamento composto central.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1	LIPÍDIOS.....	13
3.2	CLASSIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS.....	13
3.3	OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR VIA BIOTECNOLÓGICA.....	14
3.4	LEVEDURA DO GÊNERO RHODOTORULA NA OBTENÇÃO DELIPÍDIOS.....	15
3.5	MODELAGEM DE BIOPROCESSOS.....	17
3.6	MÉTODO DA RUNGE-KUTTA.....	19
3.7	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA EQUAÇÃO DE MONOD.....	26
4.2	FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA E LIPÍDIOS.....	27
4.3	MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DO PROCESSO.....	27
4.3.1	Células.....	29
4.3.2	Produto.....	30
4.3.3	Substrato.....	30
4.4	SIMULAÇÃO NO EXCEL PELO MÉTODO DE RUNGE-KUTTA DE 4 ^a ORDEM.....	31
4.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.6	RESPOSTAS ANALISADAS.....	33
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	33
5	RESULTADOS.....	34
6	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

Devido a intensa atividade industrial e ao aumento da produtividade na obtenção de produtos, milhões de toneladas de resíduos agroindustriais são gerados em todo mundo. Entretanto, a grande maioria desses resíduos não possuem um descarte adequado, sendo rejeitados de forma incorreta no meio ambiente e conseqüentemente, podendo causar desequilíbrio nos ecossistemas. A produção de substâncias de interesse, gerados a partir destes resíduos, torna-se uma alternativa viável para agregação de valor e redução dos impactos ambientais causados por estes, quando descartados inadequadamente ao meio ambiente. A produção de lipídios, usando microrganismos, a partir de substratos de baixo custo, podem ser aplicadas para o aproveitamento deste material (SILVA *et al.*, 2018).

Dentre os diversos resíduos que são gerados pela agroindústria, é possível destacar a fração líquida remanescente do processamento das raízes da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), conhecido popularmente como manipueira. Este líquido, de aspecto leitoso e coloração amarelo claro, pode ser obtido após as raízes, sadias, limpas e secas serem prensadas. A manipueira possui uma composição nutricional rica em minerais, como fósforo, potássio, magnésio, podendo ser utilizada como fertilizante, além de ser boa fonte de açúcares, amidos, proteínas, linamarina, sais e nitrogênio, tornando-a um material favorável ao crescimento de microrganismos podendo ser utilizada em bioprocessos (SILVA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2012).

Na biotecnologia, as leveduras são os microrganismos mais utilizados, principalmente, pela sua facilidade de cultivo e por apresentarem um excelente histórico com relação à segurança de cultivo. Algumas coleções de espécies de leveduras e fungos filamentosos são bastante estudados por produzirem quantidades relativamente altas de óleos e gorduras. Essas leveduras oleaginosas desempenham um alto crescimento celular e produção lipídica, e podem utilizar uma vasta variedade de fontes de carbono residual, como os resíduos agroindustriais de baixo custo. Dentre estes microrganismos, destacam-se as leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, por apresentarem ampla distribuição na natureza e possuir uma incrível capacidade de adaptação a ambientes extremos (SILVA *et al.*, 2016).

Uma das preocupações dos pesquisadores no desenvolvimento dos processos tem sido a obtenção dos melhores resultados, buscando a redução de custos. A modelagem e simulação matemática são ferramentas bastante utilizadas para compreender o comportamento cinético de crescimento de microrganismos, ao qual pode-se avaliar o consumo de substratos e

formação de produtos, como também otimizar alguns parâmetros cinéticos de processos em escala laboratorial, mantendo as condições nutricionais e ambientais controladas. Além disso, a modelagem é capaz de assegurar com um certo nível de precisão o comportamento de crescimento de microrganismos. O crescimento celular e o consumo de substratos são baseados em modelos clássicos como de Droop e Monod sob condições fotoautótroficas e heterotróficas. (GONÇALVES, 2019).

Diante do exposto, o presente trabalho aborda a modelagem matemática, simulação e otimização da produção de lipídios pela levedura do gênero *Rhodotorula mucilaginosa* em substrato da manipueira, visto que este resíduo possui grande disponibilidade na região Nordeste, custo relativamente baixo e pelo fato de que não é utilizado na produção de alimentos (Mas, pode ser utilizado de outras formas: adubação, extrato defensivo de culturas agrícolas, etc.). Além disso, a modelagem e otimização deste processo vai de encontro à necessidade de se instaurar uma via biotecnológica para obtenção desse tipo de produto, assegurando o aproveitamento do resíduo da mandioca, e que agregue valor à biomassa resultante de rejeitos vegetais que são descartados no meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a modelagem e a simulação para o processo de produção de lipídios utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as condições iniciais de processo por meio da aplicação de um planejamento experimental do composto central.
- Resolver os balanços de massa para o processo em estudo, aplicando o método de Runge-Kutta de quarta ordem e o software Excel®, aplicando os parâmetros cinéticos obtidos por Silva *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2016).
- Avaliar o comportamento cinético dos processos simulados para um tempo de 120 horas.
- Realizar a análise estatística dos dados, avaliando a influência das concentrações iniciais de células e de substrato sobre as produtividades em células e em produto.
- Realizar a otimização do processo, por meio dos dados obtidos a partir da simulação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LIPÍDIOS

Os lipídios podem ser compreendidos como qualquer molécula de origem biológica solúveis em solventes apolares (ZORN, 2017). De acordo com Botham e Mayes (2012), os lipídios são considerados um grupo heterogêneo de compostos. Entretanto, apresentam características comuns, como não solubilidade na presença da água e solubilidade em solventes apolares, como: éter, clorofórmio, óleos em geral, os esteroides e as ceras.

Assim, os lipídios podem exercer funções bioquímicas e fisiológicas, de extrema importância para o organismo animal, como armazenar energia de forma eficiente, atuar como isolantes, que permitem a condução de impulsos nervosos e prevenir a perda de calor, agir como camada de proteção dos tecidos e do corpo e ajudar no processo de absorção de vitaminas (SANTANA *et al.*, 2017).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS

Segundo Botham e Mayes (2012), as moléculas de lipídios possuem uma classificação baseada em suas propriedades físicas. Desta forma, os lipídios podem ser classificados principalmente como simples (gorduras e ceras), complexos (fosfolipídios e glicolipídios) e precursores e derivados de lipídios. No Quadro 1, estão apresentadas as definições de lipídios de acordo com a sua classificação.

Quadro 1 – Classificação dos lipídios.

Lipídios simples
São ésteres de ácidos graxos que possuem vários álcoois em sua estrutura molecular
Gorduras
São ésteres de ácidos graxos com glicerol. A gordura no estado líquido é denominada de óleo.
Ceras
São ésteres de ácidos graxos com álcoois monohidroxilicos
Lipídios complexos
São ésteres de ácidos contendo outros grupos além de um álcool e de um ácido graxo na sua estrutura molecular
Fosfolipídios
São lipídios que contém, além de ácidos graxos e um álcool, um resíduo de ácido fosfórico. Frequentemente, podem apresentar bases nitrogenadas e outros substituintes, como exemplo, nos glicerofosfolipídios o álcool é o glicerol e nos esfingofosfolipídios o álcool é a esfingosina
Glicolipídios
São lipídios que possuem um ácido graxo, esfingosina e carboidrato
Precusores e derivados de lipídios
Nesse grupo estão incluídos: ácidos graxos, glicerol e esteróis, aldeídos graxos e corpos cetônicos, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e hormônios.

Fonte: BOTHAM e MAYES (2012).

Com base nos grupos que foram descritos anteriormente, destacam-se os ácidos graxos e seus derivados, ceras, fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingosinas), esfingolipídios (contêm moléculas do aminoálcool esfingosina) e os isoprenóides (são moléculas formadas por unidades repetidas de isopreno, um hidrocarboneto ramificado de cinco carbonos), que estão constituídos nos esteroides, vitaminas lipídicas e terpenos (BOTHAM e MAYES, 2012).

3.3 OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Devido ao seu grande potencial na obtenção de produtos biotecnológicos, os microrganismos oleaginosos têm recebido bastante atenção por conta da sua alta produtividade de lipídios, podendo acumular este produto em cerca de 20 a 25% da sua biomassa celular (LIMA, 2015).

Algumas coleções de espécies de leveduras e fungos filamentosos são bastante estudadas por produzirem quantidades relativamente altas de óleos e gorduras. Os lipídios que

são produzidos a partir destes microrganismos e os seus ácidos graxos começaram a despertar interesse nos pesquisadores desde o final do século XIX (DEE KUMAR, 2005; DE e VERMA, 2011).

Na maioria das vezes, os lipídios que estão presentes em microrganismos são armazenados como fonte de reserva de energia. Isso acontece quando o crescimento deles se torna limitado devido à falta de nitrogênio e outros nutrientes, dessa forma, a reserva lipídica é utilizada para suprir algumas necessidades durante o crescimento (PINZI e DOURADO, 2012).

Certas espécies de fungos podem armazenar até 80% de lipídios em relação ao seu peso seco, tendo a família *Mortierella* sp. como exemplo. O acúmulo de óleos presente em microrganismos oleaginosos, apresentam a mesma composição dos ácidos graxos. Levando em consideração que pode haver algumas condições limitantes que impeçam o crescimento, esse fator irá depender do meio de cultivo ao qual o microrganismo foi inserido. Essa característica pode estar presente em alguns gêneros de leveduras, como: *Rhodospirium*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Trichosporon* e determinados fungos (*Mortierella*, *Cunninghamella*) (KOUTINAS e PAPANIKOLAU, 2011; MENG et al., 2009).

Os óleos que são obtidos por microrganismo podem substituir os óleos vegetais e animais para as indústrias oleoquímicas, uma vez que a produção destes não está condicionada à sazonalidade e às intempéries ambientais, como no caso da produção a partir de vegetais. Alguns segmentos industriais que utilizam óleos como insumos são as indústrias de produtos farmacêuticos, de cosméticos, tintas entre outras, por isso os óleos microbianos apresentam um grande valor de agregação (KOUTINAS et al., 2014).

Assim, diversos estudos vêm sendo realizados para determinar o potencial de aproveitamento de algumas coleções de fungos na produção de lipídios.

3.4 LEVEDURAS DO GÊNERO *Rhodotorula* NA OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

Alguns gêneros de leveduras oleaginosas desempenham um alto crescimento celular e produção lipídica, e podem utilizar uma vasta variedade de fontes de carbono residual, entre as quais podemos citar os resíduos agroindustriais de baixo custo, como o melaço. Essas leveduras podem gerar um acúmulo de lipídios de 20 a 70% de sua biomassa de células, quando são inseridas em um meio de cultivo que apresente condições de excesso de carbono controlado e limitação de nitrogênio (HASSAN et al., 1993; MEESTERS et al., 1996).

As leveduras consideradas como oleaginosas, são bastante promissoras devido ao seu alto potencial de produção de lipídios, essa característica tem sido o foco de muitas pesquisas. Dessa forma, estas leveduras possuem algumas vantagens na produção de lipídios em comparação com outros tipos de microrganismos oleaginosos, dentre as quais o seu menor tempo de cultivo, que proporcionam uma taxa de crescimento maior, e conseqüentemente uma maior produção. Além disso, podem se adaptar a vários tipos de substratos, tais como a glicose, xilose, sacarose, frutose, acetato, glicerol e águas residuais (WIEBE *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2015).

De acordo com Chuck *et al.* (2014), a levedura do gênero *Rhodotorulaglutinis*, que foi promissora nos testes para obtenção de lipídios, pode armazenar de forma simultânea uma quantidade grande de lipídios e carotenoides nas suas células, os quais podem ser utilizados como matéria-prima para geração de outros coprodutos, tais como biodiesel, biolubrificante e combustível de aviação. Ademais, as substâncias carotenoides, presentes nas leveduras oleaginosas, são bastante usadas como precursores da produção de vitamina A, e servem como suplementação para outros produtos antioxidantes, utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (GONG *et al.*, 2019).

Apesar disso, nas últimas décadas, alguns cientistas buscaram por estudos que otimizassem a produção de lipídios pela levedura do gênero *Rhodotorulaglutinis*, para isso, no meio de cultivo, não fizeram adição de nitrogênio e limitaram a quantidade de fosfato, e ainda, buscaram pela adição de uma mistura de minerais oleaginosos para o crescimento da levedura (ZHU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018).

De acordo com Zhu *et al.* (2012), a estratégia da privação de nitrogênio e fosfato limitado para melhorar a produção de lipídios foi estudada com o avanço e desenvolvimento da tecnologia ôhmica e a técnica de espectrometria de massa. Entretanto, foram feitos testes com a irradiação por lâmpadas LED e o uso dessa técnica mostrou-se bastante eficiente no crescimento celular, produção de lipídios e carotenoides. Os testes desenvolvidos aplicaram diferentes tipos de irradiação, como também variaram sua intensidade e a condição de irradiação no crescimento do microrganismo e produção de lipídios na levedura do gênero *Rhodotorulaglutinis* (IENES e ZHANG, 2011; YEN e YANG, 2012; ZHANG *et al.*, 2014).

Já em outra pesquisa, foram desenvolvidas análises para investigar possíveis estresses oxidativos na levedura do gênero *Rhodotorulaglutinis* possivelmente gerado pelos métodos de irradiação. Mais tarde, os resultados que foram gerados mostraram que o ciclo do ácido tricarbóxico, que ocorre na via biossintética dos carotenoides e triglicerídeos tiveram uma regulação considerável, devido ao estímulo da irradiação. Logo, o mecanismo de resistência

ao estresse oxidativo aplicando a irradiação no gênero *Rhodotorulaglutinis* mostrou-se bastante eficiente para melhorar, ao mesmo tempo, a produção de lipídios e de carotenoides (GONG *et al.*, 2019).

O uso de irradiação para promoção de estresse oxidativo é viável, menos nos métodos de cultivo que buscam a sustentabilidade econômica na produção de lipídios por leveduras oleaginosas. Nesses casos, são aplicados diferentes tipos de matérias-primas de baixo custo e que possuam fontes de nutrientes em abundância que já foram exploradas. Embora existam inúmeros tipos de substratos de baixo custo, a biomassa lignocelulósica possui maior abrangência por ser uma excelente fonte de cultivo para leveduras oleaginosas (POONTAWEE *et al.*, 2017).

Nesse sentido, vários projetos de interesse sustentável, buscando a utilização de matérias-primas renováveis, onde incluem-se açúcares orgânicos e outros subprodutos, como glicerol e águas residuais, serviram como aplicação na produção de lipídios por leveduras (PATEL *et al.*, 2015; KARAMEROU *et al.*, 2016).

Patelet *al.* (2015), realizaram o estudo da produção de lipídios usando diferentes fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis, avaliando o efeito sinérgico em diferentes tipos de substratos, sendo encontrado um acúmulo de triglicerídeos na levedura do gênero *Rhodotorulakratochvilovae*.

Portanto, a espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, tem uma ampla distribuição na natureza. Tem a capacidade de sintetizar vários substratos naturais e artificiais (FELL *et al.*, 1998). Além disso, possui uma incrível capacidade de adaptação a ambientes extremos (DE SILONIZ *et al.*, 2002; LAHAV *et al.*, 2001; RUSSO *et al.*, 2006). A *Rhodotorula mucilaginosa* é caracterizada pela sua coloração de “salmão vermelho” de suas colônias, resultado do acúmulo de pigmentos carotenoides/lipídios de interesse industrial, como torularodina, toruleno e b-caroteno (LIBKIND *et al.*, 2006). Existem características fenotípicas, tanto bioquímicas como fisiológicas, que distinguiria *R. mucilaginosa* do restante das espécies de leveduras.

3.5 MODELAGEM DE BIOPROCESSOS

Tendo em vista que em alguns processos podem ocorrer comportamentos oscilatórios, o desenvolvimento de modelos matemáticos apropriados que permitam melhorar o sistema de simulação, otimização e implementação de malhas de controle é algo de extrema importância (BOARETO, 2012).

Além do mais, os sistemas de fermentação estão suscetíveis às mudanças anormais que podem ocorrer devido às condições operacionais. Dessa forma, para garantir uma excelente conversão do produto, é necessário assegurar que as condições dentro do biorreator permaneçam em total controle durante todo o processo fermentativo. Nos sistemas em escala industrial, os operadores responsáveis pelos processos fazem uso de todo seu conhecimento e experiência para identificar possíveis problemas, durante a operação, e assim, corrigi-los quando houver necessidade. No entanto, a importância de um controle eficiente em um processo fermentativo é essencial, pois o desempenho irá depender do equilíbrio do sistema. Assim, para uma fermentação ter um índice de conversão maior, o processo necessita está livre de maiores perturbações. Logo, quanto antes o problema for detectado, menor será a influência sobre o processo (LENNOX *et al.*, 2000; MONTAGUE e LENNOX, 2000; VENKATASUBRAMANIAN *et al.*, 2003).

De acordo com Boareto (2012), a modelagem matemática de processos, não depende da área de concentração, seja ela química, biologia, físico-química, bioquímica, engenharia, psicologia, entre outras.

Os autores Schwaab e Pinto (2007) explicam que o uso de um modelo tem por objetivo descrever de forma aproximada o que ocorre na realidade. Essa forma aproximada do modelo é comumente baseada em um conjunto de observações na fase experimental, que podem ser alteradas por erros de medidas. Então, para o entendimento de um modelo, nem todas as variáveis podem ser manipuladas ou obter medidas de forma exata nos experimentos. Logo, os erros que aparecem podem ser considerados como incertezas experimentais.

O estudo da modelagem matemática permite prever o comportamento dinâmico e estacionário de muitos processos, principalmente em condições que ainda não foram testadas de forma empírica, sendo assim, minimizando os custos operacionais do processo e determinando sua condição de ideal (BONOMI e SCHMIDELL, 2001; INGHAM *et al.*, 2007; JANEZKO *et al.*, 2014).

A utilização das equações do balanço de massa e energia, tornam-se fundamentais no desenvolvimento e na simulação de processos, pois quando juntas representam relações entre as taxas de transferência de calor e massa, taxas de reação química e algumas alterações das propriedades que o sistema possa sofrer ao decorrer do processo (Ingham *et al.*, 2007; JANEZKO *et al.*, 2014).

Aplicando estes conceitos aos processos fermentativos, é possível afirmar que a modelagem matemática tenta representar, por meio de equações, os balanços de massa para cada componente presente nos biorreatores, levando em consideração a complexidade das

transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas ocorrem(SOUZA JÚNIOR, 2017).

3.6 MÉTODO DE RUNGE-KUTTA

Os métodos de Runge-Kutta pertencem a uma família de métodos matemáticos para aproximar numericamente a resolução de uma Equação Diferencial Ordinária (EDO), sendo assim, para muitos processos, a modelagem e simulação matemática compreendem a solução de Equações Diferenciais Ordinárias (AGUIRRE, 2004).

Estes métodos foram desenvolvidos pelos matemáticos alemães Carl David Runge (1858-1927) e Martin Wilhelm Kutta (1867-1944) e de acordo com Sterza e Brandi (2016), este método é provavelmente um dos mais populares e o de quarta ordem é um dos mais utilizados para obter soluções aproximadas de valor inicial. Cada método de Runge-Kutta consiste em comparar um polinômio de Taylor apropriado para eliminar o cálculo das derivadas, fazendo-se várias avaliações da função a cada passo (VALLE, 2012).

No entanto, para Aguirre (2004) e Souza Júnior (2017) quando ocorrem falhas na execução e validação deste método, faz-se necessário verificar se o modelo empregado é válido ou não para o determinado processo, ou seja, o método deve atender as características requeridas para a execução do processo. Nesse contexto, validar um modelo é fundamental e a forma mais usual de se observar é fazendo-se uma comparação dos dados obtidos com os dados calculados, verificando assim, se o modelo é realmente capaz de ser executado.

Como mencionado anteriormente, que o método da Runge-Kutta é determinado partir da Série de Taylor, sua expressão matemática está descrita na Equação (1), conforme proposto por Souza Júnior (2017).

$$y_{i+1} = y_i + \emptyset(x_i, y_i, h) \cdot h \quad (1)$$

Em que:

$\emptyset(x_i, y_i, h)$ é denominada função incremento, interpretada como uma inclinação média sobre o intervalo.

Logo, esta função pode ser expressa através da Equação (2):

$$\phi(x_i, y_i, h) = a_1 k_1 + a_2 k_2 + \dots + a_n k_n$$

$$k_1 = f(x_i, y_i)$$

$$k_2 = f(x_i + p_1 h, y_i + q_{11} k_1 h)$$

$$k_3 = f(x_i + p_2 h, y_i + q_{21} k_1 h + q_{22} k_2 h)$$

$$k_n = f(x_i + p_{n-1} h, y_i + q_{(n-1)1} k_1 h + q_{(n-1)2} k_2 h + \dots + q_{(n-1)(n-1)} k_{n-1} h) \quad (2)$$

O Método de Runge-Kutta de segunda ordem, também denominado Método de Heun, ou Euler modificado, pode ser derivado a partir das Equações (3, 4 e 5).

$$y_{i+1} = y_i + (a_1 k_1 + a_2 k_2) \cdot h \quad (3)$$

$$K_1 = f(x_i, y_i) \quad (4)$$

$$k_2 = f(x_i + p_1 h, y_i + q_{11} k_1 h) \quad (5)$$

No entanto, os valores das suas constantes a_1 , a_2 , p_1 e q_{11} devem ser determinados e para isso deve-se seguir as seguintes etapas.

Inicialmente expande-se (y_{i+1}) , (Equação (3)) em uma série de Taylor, considerando-se que o termo $(a_1 k_1 + a_2 k_2) = f(x_i, y_i)$, o que gera a Equação (6):

$$y_{i+1} = y_i + f(x_i, y_i) \cdot h + f'(x_i, y_i) \frac{h^2}{2!} \quad (6)$$

Em seguida, determina-se a $f'(x_i, y_i)$, Equação (7), com o auxílio da regra da cadeia, e ao substituí-la na Equação (4), encontra-se a Equação 8:

$$f'(x_i, y_i) = \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{\partial f}{\partial y} \cdot \frac{dy}{dx} \quad (7)$$

$$y_{i+1} = y_i + f(x_i, y_i) \cdot h + \left(\frac{\partial f}{\partial x} + \frac{\partial f}{\partial y} \cdot \frac{dy}{dx} \right) \frac{h^2}{2!} \quad (8)$$

Em seguida são realizadas manipulações algébricas, considerando as Equações (3) e (8) equivalentes, e expandindo-se a expressão obtida em série de Taylor encontra-se a Equação 9:

$$f(x_i + p_1 h, y_i + q_{11} k_1) = f(x_i, y_i) + p_1 h \frac{\partial f}{\partial x} + q_{11} k_1 h \frac{\partial f}{\partial y} + O(h^2) \quad (9)$$

Fazendo a substituição em (3), temos a Equação (10):

$$y_{i+1} = y_i + a_1 h f(x_i, y_i) + a_2 h f(x_i, y_i) + a_2 p_1 h^2 \frac{\partial f}{\partial x} + a_2 q_{11} h^2 f(x_i, y_i) \frac{\partial f}{\partial y} + O(h^3) \quad (10)$$

Dessa forma, podemos rearranjar os termos da Equação (10), obtendo-se a Equação (11):

$$y_{i+1} = y_i + [a_1 f(x_i, y_i) + a_2 f(x_i, y_i)]h + [a_2 p_1 \frac{\partial f}{\partial x} + a_2 q_{11} f(x_i, y_i) \frac{\partial f}{\partial y}]h^2 + O(h^3) \quad (11)$$

Assim, por intermédio de comparações dos termos das equações (8) e (11), obtemos a seguinte relação:

$$(a_1 + a_2 = 1); (a_2 p_1 = 1/2); (a_2 q_{11} = 1/2)$$

Determinando os valores das constantes, temos:

$$a_1 = a_2 = 1/2$$

$$p_1 = q_{11} = 1$$

Assim, percebemos que as expressões que determinam o método de Runge-Kutta de segunda ordem estão descritas a seguir, nas Equações (12), (13) e (14):

$$y_{i+1} = y_i + \left(\frac{1}{2}k_1 + \frac{1}{2}k_2\right) \cdot h \quad (12)$$

$$k_1 = f(x_i, y_i) \quad (13)$$

$$k_2 = f(x_i + h, y_i + k_1 h) \quad (14)$$

Damesma forma que foi determinado o Método de Runge-Kutta de segunda ordem, pode-se realizar a determinação para ordens de graus mais elevados. A seguir, encontram-se as equações de terceira ordem:

$$y_{i+1} = y_i + \left[\frac{1}{6}(k_1 + 4k_2 + k_3)\right] \cdot h \quad (15)$$

$$K_1 = f(x_i, y_i) \quad (16)$$

$$k_2 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}k_1 h\right) \quad (17)$$

$$k_3 = f(x_i + h, y_i - hk_1 + 2hk_2) \quad (18)$$

Da mesma maneira que se obteve as equações para método de Runge-Kutta de terceira ordem, podemos executar para o modelo de Runge-Kutta de quarta ordem, descrito abaixo:

$$y_{i+1} = y_i + \left[\frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)\right] \cdot h \quad (19)$$

$$k_1 = f(x_i, y_i) \quad (20)$$

$$k_2 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}hk_1\right) \quad (21)$$

$$k_3 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}hk_2\right) \quad (22)$$

$$k_4 = f(x_i + h, y_i + hk_3) \quad (23)$$

3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

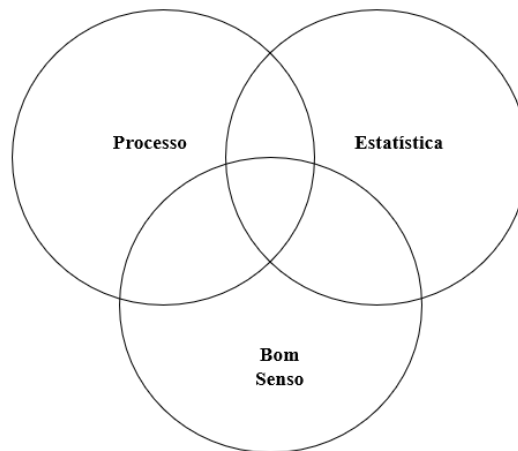
A grande necessidade da otimização de produtos e processos, sempre buscando menos custos e tempo, a produtividade e qualidade dos produtos, em meio a outros objetivos, tem levado muitos profissionais de diferentes áreas a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Box *et al.*, (1978) explicam que a metodologia do planejamento fatorial, quando associada à análise de superfícies de respostas é uma ferramenta de extrema importância na teoria estatística, que garantem informações seguras sobre o processo, sendo que o uso dessa ferramenta reduz de forma significativa o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro.

Apesar desta metodologia ter sido proposta por Box na década de 50, somente nos últimos anos ela passou a ser estudada e se tornou bastante usual. Uma pesquisa científica, disponível na base de dados do *Food Science and Technology Abstracts* (FSTS), revelou que nas últimas décadas houve um aumento crescente e exponencial no número de artigos que utilizaram análises de superfície de respostas, e conseqüentemente, o planejamento experimental. Contudo, para atingir os objetivos desejados com o uso dessa metodologia, é necessário que haja uma interação entre o processo, a estatística e o bom senso, tanto da equipe responsável pela montagem dos experimentos, quanto pelas equipes responsáveis pelas análises estatísticas e a estratégia dos resultados (RODRIGUES *et al.*, 2009)

A Figura 1, representa a interação entre os três pilares necessários para que a utilização da metodologia empregada seja feita de maneira correta.

Figura 1 – Interação entre o conhecimento do processo, a estatística e o bom senso, no momento da definição do planejamento experimental mais adequado e na análise dos resultados.



Fonte: RODRIGUES *et al.*(2009).

É importante ressaltar, que a utilização de softwares para simulação de alguns dados, sem muito conhecimento de fundamentos da metodologia, pode ser considerado um risco e levar o usuário a resultados extrapolados (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Segundo Rodrigues *et al.*, (2009), o planejamento experimental possui um vasto campo de aplicabilidade, sendo assim, abaixo estão resumidas algumas aplicabilidades do planejamento experimental:

O desenvolvimento de um novo produto ou processo é de extremo interesse, por isso, para sua obtenção, isso depende de inúmeras variáveis. Contudo, o planejamento depende dos experimentos que devem ser feitos para determinar, e, até mesmo quantificar, quanto as variáveis interferem nos resultados desejados, esta etapa é fundamental para que os resultados que serão obtidos sejam confiáveis. Nesse caso, podemos considerar que no desenvolvimento de produtos e processos os procedimentos de tentativas e erros são imprescindíveis.

É bastante comum tais ideias serem aplicáveis à otimização de processos e produtos que já se encontram no mercado e sempre buscam a satisfação do consumidor. Obter os dados quantificados dos efeitos das variáveis do processo utilizando as técnicas do planejamento experimental, possibilita o acesso a informações sobre as respostas desejadas, esse tipo de característica é de fundamental importância para a área de implementação de controle de processos.

Como exemplo, podemos citar a influência da temperatura num determinado processo. É um dos fatores que precisa ser controlado, a quantificação da faixa de temperatura ao qual se mantém estável durante todo o processo é fundamental para a definição de estratégia de

controle: caso a resposta seja satisfatória, ou seja, se o processo permanece numa faixa razoável de temperatura, então a implementação de um controlador de temperatura é suficiente, torna o processo mais econômico e o objetivo é alcançado. Ocorrendo o contrário, se a temperatura for alterada, causa desestabilidade no processo e é necessário um controlador avançado.

Com o objetivo de aprimorar as metodologias analíticas, o planejamento experimental vem sendo muito utilizado, por exemplo, melhora a performance das análises em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*): maior resolução dos picos de cromatografia, assim, ocorre a minimização de uso de reagentes caros que envolvem metodologias analíticas, sem prejuízo na qualidade dos resultados.

O uso do planejamento experimental ajuda na redução no número de experimentos e/ou repetições e melhora a qualidade da informação por meio dos resultados. Isso gera uma possível diminuição do trabalho, conseqüentemente, do tempo e custo. O pesquisador deverá investir algum tempo no planejamento do processo e no estudo das variáveis presentes no processo, colhendo informações na literatura, para fazer escolha do melhor método para a realização dos ensaios o qual possa agregar melhor qualidade ao produto.

Os métodos são analisados simultaneamente. Logo, podemos verificar e quantificar os efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores que interessam o pesquisador. Em determinados processos onde ocorrem a interação desses fatores, podemos citar um exemplo clássico: o parâmetro tempo/temperatura. Assim, se fizermos a análise separadamente de cada um deles, dificilmente a condição de otimização não será atingida, devido não conseguirmos a interação entre eles.

É possível fazer a otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo. Essa é a vantagem que mais se destaca dentro do planejamento fatorial. Assim, variáveis como rendimento, produtividade e pureza podem ser maximizadas, já as variáveis custo e contaminação, dentre outras, pode ser minimizada de forma individual ou simultânea.

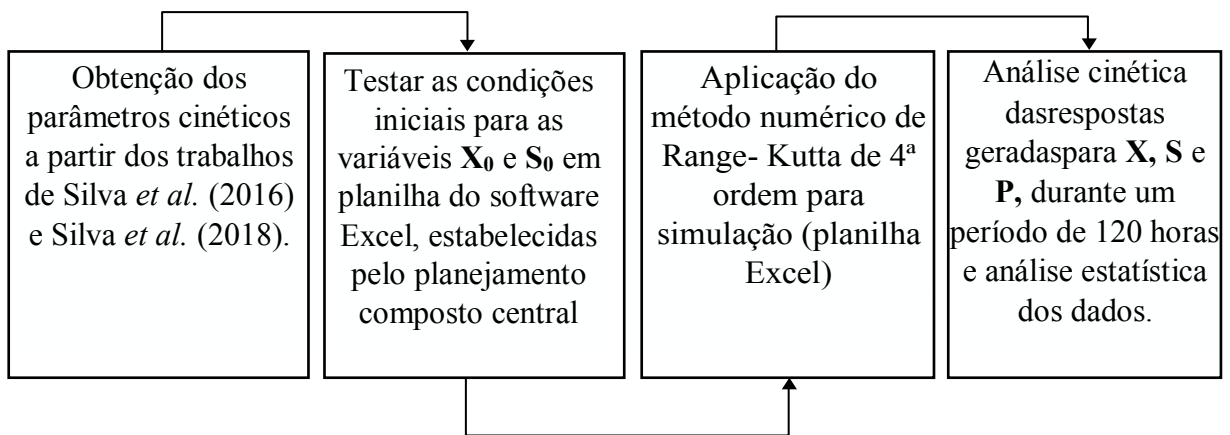
Outra grande vantagem do planejamento experimental, é permitir calcular e avaliar o erro experimental. Essa etapa é fundamental para especificar o nível de confiança estatística, o qual podemos ter noção de dados sobre a produtividade e do resultado desejado. Não é aconselhável confiar em um resultado isolado. Dessa forma, é indicado fazer a repetição do processo, se o resultado persistir “n” vezes e observar se o resultado não se altera. Logo, estaremos em uma posição confortável para identificar se houve uma variação muito drástica no processo.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se da modelagem e simulação do processo de produção de lipídios utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* na presença da fração líquida remanescente do processamento das raízes da mandioca (*ManihotesculentaCrants*), como substrato, tomando-se como base os dados obtidos por Silva *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2018).

As etapas que foram executadas para realização deste trabalho, após a dedução do modelo matemático, estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma representativo das etapas que forma executadas no trabalho.



Fonte: Adaptação de SOUZA JÚNIOR, (2017).

4.1 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA EQUAÇÃO DE MONOD

Os parâmetros cinéticos utilizados foram os obtidos por Silva *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2018), partindo do modelo proposto por Monod para se determinar a velocidade específica de crescimento de microrganismos, apresentada na Equação (24) abaixo:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (24)$$

Em que:

μ é a taxa do crescimento celular (h^{-1});

$\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa máxima de crescimento celular (h^{-1});

S é a concentração do substrato limitante (kg/m^3);

K_s é a constante de saturação de Monod.

4.2 FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA E LIPÍDIOS

Estes parâmetros também são importantes, pois relacionam a quantidade de células e de lipídios produzidos com o teor de substrato consumido. Com isso, é possível verificar a influência de um parâmetro sob o outro.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa celular ($Y_{x/s}$ (g/L.h)) e substrato em produto ($Y_{p/s}$ (mg/L.h)) foram os mesmos determinados por Silva *et al.*, (2018), e podem ser determinados aplicando as Equações (25) e (26).

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} = Y_{x/s} = -\frac{(d_x/d_t)}{(d_s/d_t)} \quad (25)$$

$$Y_{p/s} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} = Y_{p/s} = -\frac{(d_p/d_t)}{(d_s/d_t)} \quad (26)$$

Em que:

X_0 e X são as concentrações inicial e final da biomassa de células em g.(L.h)⁻¹

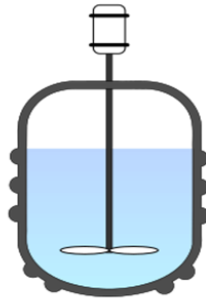
P_0 e P são as concentrações inicial e final do produto em mg.(L.h)⁻¹

S_0 e S são as concentrações inicial e final de substrato em g.(L.h)⁻¹

4.3 MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DO PROCESSO

A metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida baseada em um processo reacional de fermentação conduzido em um reator batelada operando de maneira descontínua, conforme exposto na Figura 3.

Figura 3 - Representação do processo conduzido em um reator batelada.

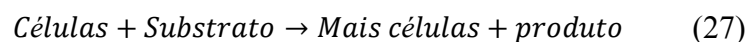


Fonte: O autor (2019).

Por se tratar de um sistema operando em batelada, é possível afirmar que não existe entrada ou saída de reagentes ou produtos durante a reação, sendo toda a mistura removida do biorreator ao final do processo (FOGLER, 2014).

O sistema em batelada, ilustrado na Figura 3, pode ser representado pelo modelo matemático, obtido através dos balanços materiais para os componentes envolvidos, associados aos parâmetros cinéticos do processo.

De modo a simplificar o modelo, será considerado que no meio reacional encontra-se presente apenas um nutriente e que os produtos formados são as próprias células e os lipídios. Assim sendo, temos a seguinte equação, que pode representar o processo reacional:



Partindo da equação geral do balanço molar em um reator batelada e fazendo as considerações adequadas, pode-se obter a equação de projeto correspondente a partir da Equação 28:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Velocidade de} \\ \text{acúmulo de} \\ \text{substrato} \\ \text{g/h} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidade de} \\ \text{geração/consumo} \\ \text{de substrato} \\ \text{g/h} \end{array} \right] \quad (28)$$

Assim, sendo a equação de projeto de um reator batelada pode ser dada pela Equação (29):

$$\frac{dC_j}{dt} = r_j \quad (19)$$

Em que C_j representa a concentração e r_j a taxa de reação associados ao componente j .

No processo reacional em questão, deseja-se observar o comportamento das células, do substrato e do produto formado, tornando-se necessário a aplicação de um balanço material para todos os componentes do processo.

4.3.1 Células

Aplicando a Equação (29), para descrever o comportamento das células, durante o processo, temos:

$$\frac{dX}{dt} = r_g \quad (30)$$

O termo r_g corresponde à velocidade de crescimento celular, expresso em $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. A lei mais comumente utilizada para expressar a velocidade de crescimento de novas células, é a equação de *Monod* para crescimento exponencial.

$$r_g = \mu \cdot X \quad (31)$$

Substituindo a Equação (31) na Equação (30), temos:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (32)$$

O termo X refere-se à concentração celular ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e a velocidade específica de crescimento, medida em s^{-1} , é expressa pelo termo μ . Esta, por sua vez, pode ser expressa matematicamente pela Equação (24), que inserida na Equação (32), resulta em:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X \quad (33)$$

4.3.2 Produto

Seguindo o mesmo procedimento, a expressão que representa o balanço de massa para o produto do processo reacional em estudo é dada pela Equação (34):

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (34)$$

O termo da velocidade de formação do produto, representado por r_P , pode ser dado por:

$$r_P = r_g \cdot Y_{P/X} \quad (35)$$

Manipulando as Equações anteriores, é possível obter a seguinte equação:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X \quad (36)$$

Que combinada a Equação (32), resulta na Equação (37), que descreve a variação da concentração de produto em relação ao tempo:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (37)$$

4.3.3 Substrato

De forma semelhante, pode-se obter o balanço de massa para o substrato, representado matematicamente pela Equação (38)

$$\frac{dS}{dt} = r_S \quad (38)$$

Neste ponto é importante ressaltar que a velocidade de consumo do substrato, representada pelo termo r_S , é resultado da sua utilização para o crescimento celular e para formação do produto, sendo expressar pela Equação (39):

$$r_S = Y_{S/X} \cdot r_g + Y_{S/P} \cdot r_P \quad (39)$$

Que pode ser reescrita, na seguinte forma:

$$r_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X + \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot r_P \quad (40)$$

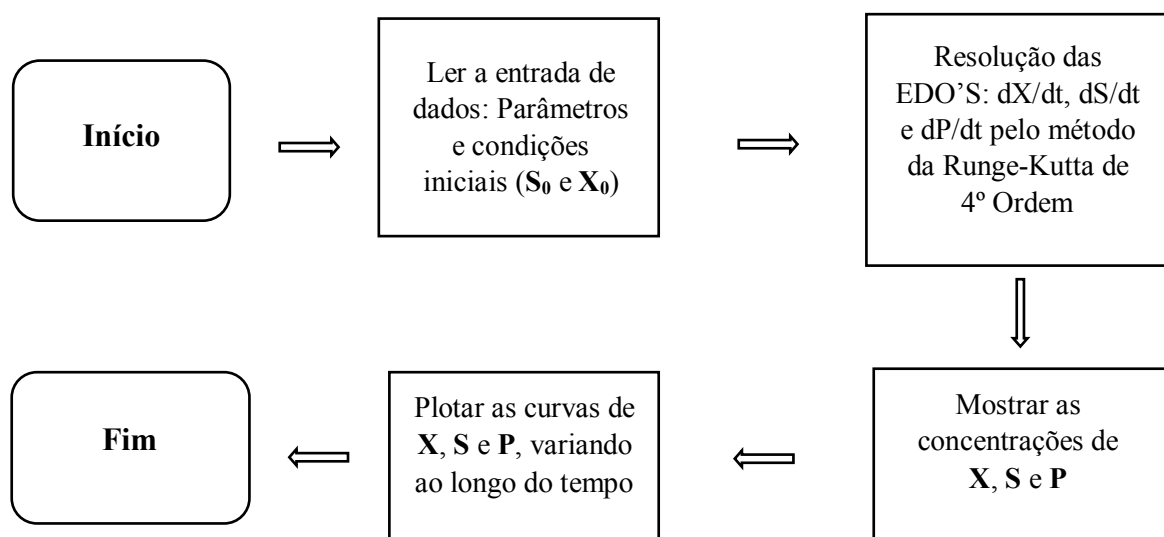
Dessa forma, combinando as equações anteriores, obtém-se a Equação (41), que representa o comportamento dinâmico da concentração de substrato para o processo em estudo:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (41)$$

4.4 SIMULAÇÃO NO EXCEL PELO MÉTODO DE RUNGE-KUTTA DE 4ª ORDEM

Para a simulação do processo durante 120 horas, para diferentes condições iniciais, a partir da resolução das Equações (33), (37) e (41), aplicou-se o método de Runge-Kutta de quarta ordem, utilizando-se o *software* Excel[®]. A Figura 4, apresenta as etapas seguidas para a resolução destas equações.

Figura 4 – Etapas para a resolução das Equações (33), (37) e (41) pelo método Runge-Kutta de 4ª ordem.



Fonte: Adaptação de SOUZA JÚNIOR (2017).

4.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES INICIAIS APLICANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As simulações foram realizadas utilizando-se um planejamento composto central (2^2), sendo as variáveis independentes as concentrações iniciais de células (X_0) e de substrato (S_0). Este método é usado como estratégia na utilização de otimização estatística de determinados processos, por tratar-se de um método relativamente simples e eficiente.

Na Tabela 1, encontram-se os valores reais e codificados dos fatores, concentrações iniciais de células e de substrato, utilizados na simulação do processo a fim de avaliar os efeitos sobre as variáveis dependentes, produtividades em células (P_X) e em lipídios (P_L).

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis independentes, concentração de células (X_0) e de substrato (S_0).

Ensaio	Concentração inicial de células	Concentração inicial de substrato
	(X_0)	(S_0)
1	1,00 (-1,0)	10,00 (-1)
2	1,00 (-1,0)	40,00 (+1)
3	2,00 (+1,0)	10,00 (-1)
4	2,00 (+1,0)	40,00 (+1)
5	0,79 (-1,4)	25,00 (0,0)
6	2,21 (+1,4)	25,00 (0,0)
7	1,50 (0,0)	3,79 (-1,4)
8	1,50 (0,0)	46,21 (+1,4)
9	1,50 (0,0)	25,00 (0,0)

Fonte: O Autor (2019).

A etapa de simulação, variando as condições iniciais conforme estabelecido no planejamento composto central, possibilitou a geração de dados que permitiram avaliar o comportamento cinético do processo em relação as concentrações de células, substrato e produto, para um período de 120 horas de processo. A análise desse comportamento torna-se mais facilitada quando apresentada em gráficos, que foram construídos utilizando o *software* Origin 8.0®.

4.6 RESPOSTAS ANALISADAS

Ao término da simulação foram avaliadas as produtividades em biomassa e em produto. Estes parâmetros cinéticos indicam a velocidade média de crescimento microbiano (P_X), e de produção de lipídios (P_L). Através dos mesmos, a taxa de evolução do crescimento microbiano e da produção de lipídios é observada e que foram determinados pelas Equações (42) e (43), onde o subscrito (0) indica o valor da variável no ponto de partida do processo.

$$P_X = \frac{(X - X_0)}{t} \quad (42)$$

$$P_L = \frac{L - L_0}{t} \quad (43)$$

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

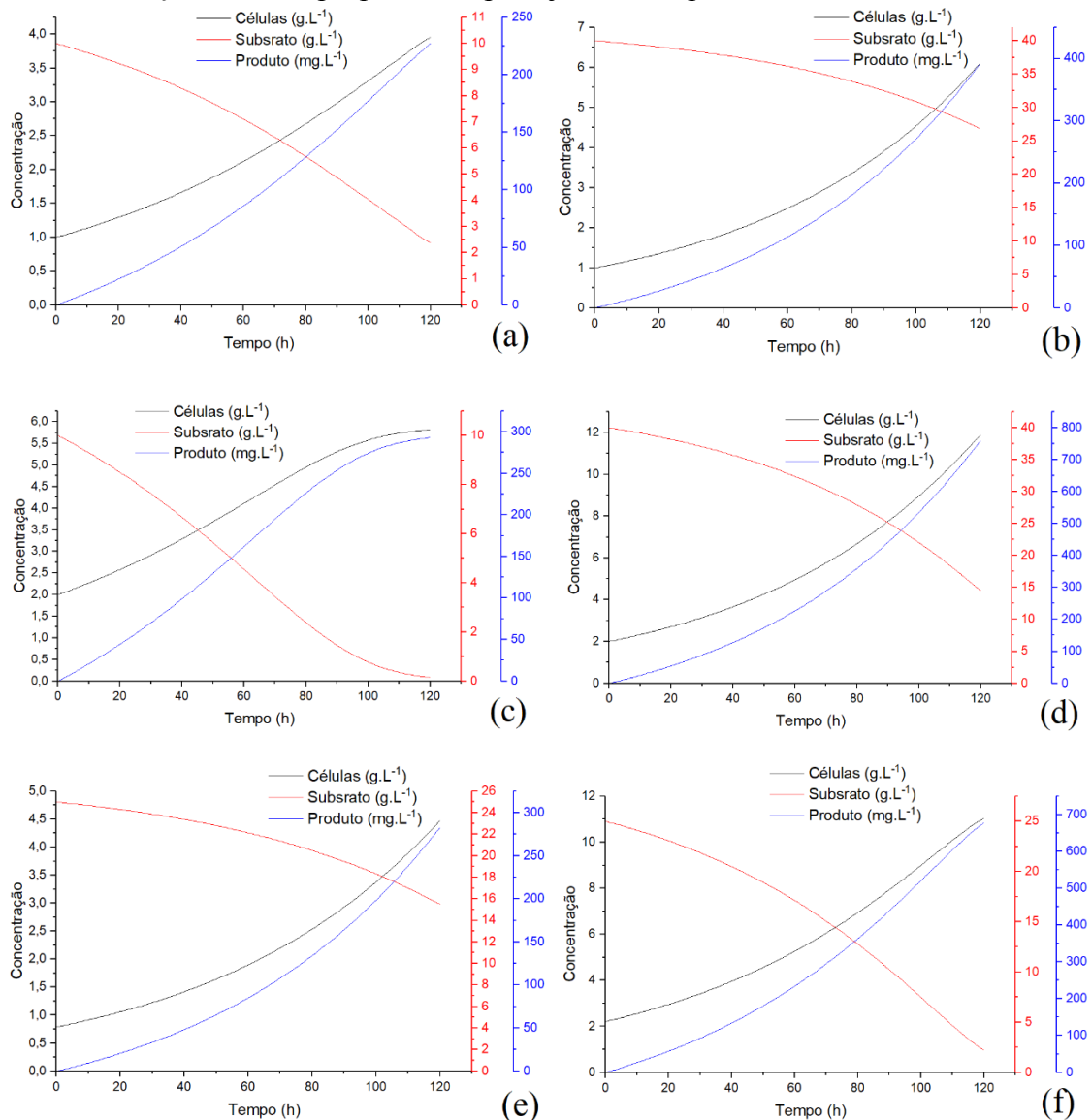
Para realização da análise estatística dos resultados obtidos, visando propor as condições ótimas para a realização do processo, utilizou-se o software Statistica®, para a configuração dos dados.

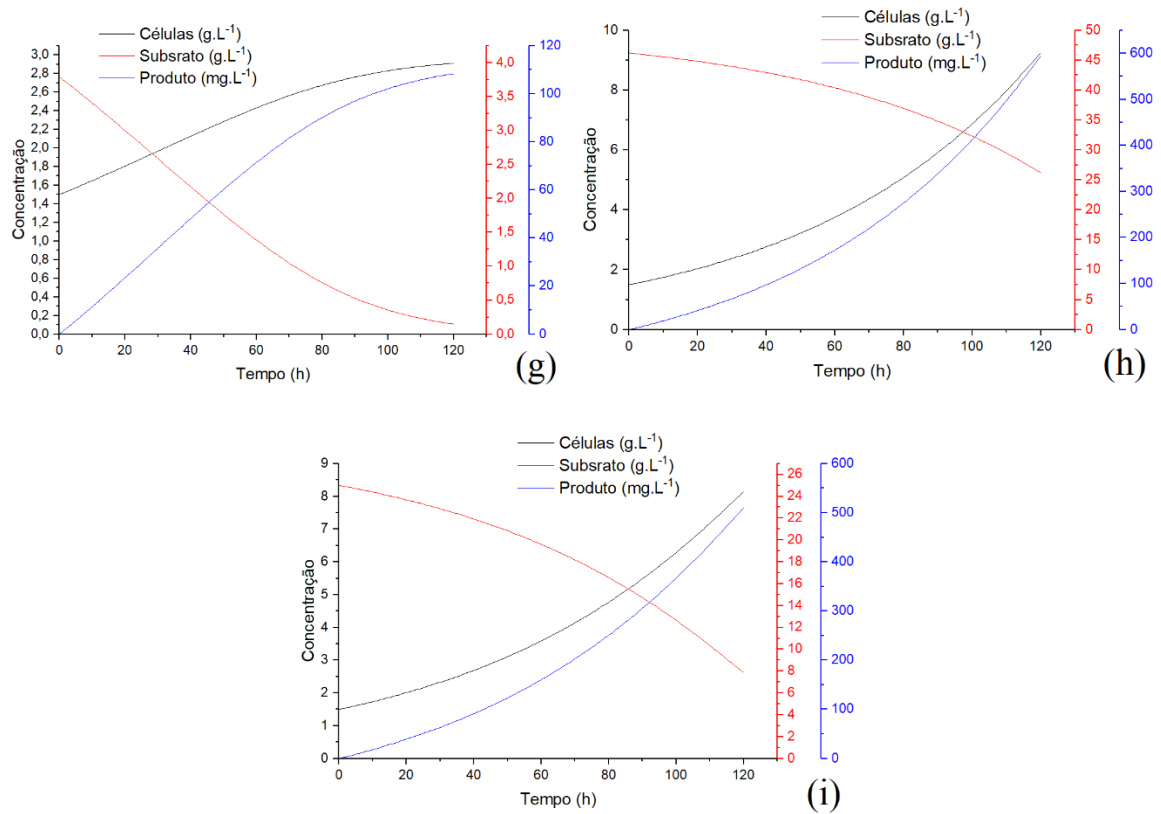
5 RESULTADOS

Como descrito na metodologia, as simulações utilizando o método de Runge-Kutta foram realizadas utilizando-se as condições iniciais determinadas no planejamento composto central para dois fatores, sendo as variáveis independentes as concentrações iniciais de células (X_0) e de substrato (S_0), resultando em 9 ensaios.

Na Figura 5 são apresentados os resultados obtidos após a simulação, em que as curvas de (a) a (i) representam o comportamento cinético do processo fermentativo, para todos os ensaios apresentados na Tabela 2, por um período de 120 horas.

Figura 5 – Comportamento cinético para os ensaios de 1 (a) a 9 (i), obtidos por simulação, a partir das condições iniciais propostas no planejamento experimental.





Fonte: O autor (2019).

Avaliando as curvas presentes na Figura 5, pode-se observar que para todas as condições testadas o perfil das concentrações é bastante semelhante, havendo o decréscimo na quantidade de substrato em detrimento da geração do produto e do aumento na concentração celular, sendo este o comportamento esperado ao aplicar os parâmetros cinéticos da equação de Monod. Júnior (2015) aplicou a modelagem matemática em um processo químico, abordando o comportamento dinâmico das concentrações de biomassa, substrato e produto ao longo de um ciclo de fermentação e verificou que ocorreu uma redução da quantidade do substrato desde o início da reação até aproximadamente 25 minutos do processo, atingindo seu valor mínimo após esse período. Simultaneamente, o autor observou que houve uma produção de biomassa em relação ao valor inicial na qual pode ser obtida uma pequena quantidade de produto, e os componentes atingiram um valor constante permanecendo assim durante o restante do tempo.

Como apresentado no desenvolvimento do modelo matemático, que representa o comportamento dinâmico do processo de geração de lipídios pela levedura do gênero *Rodhotorula mucilaginosa* na presença da manipueira, o substrato é utilizado como fonte de nutrientes para o desenvolvimento do microrganismo, o que gera o aumento da concentração

celular, e, conseqüentemente, da concentração do produto, conforme se encontra em todas as curvas presentes no gráfico 1, sendo observadas variações de acordo com os valores aplicados como condições iniciais. A tendência é que ao término do processo, após 120 horas, a concentração de substrato se aproxime de zero, para valores de concentração inicial de substrato inferiores a 10 g/L.

O delineamento composto central determinou os fatores independentes que tiveram maior influência na produção de lipídios e de biomassa. Na Tabela 2, encontram-se os valores para as concentrações finais de células (X) e de produto (P), após a simulação, considerando 120 horas de processo, que foram utilizados na determinação da produtividade em células (P_X) e em lipídios (P_L).

Tabela 2 –Condições iniciais aplicadas, concentrações e produtividades de células e de lipídios obtidos na simulação do processo.

Ensaio	X_0 (g.L ⁻¹)	S_0 (g.L ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	P(mg.L ⁻¹)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_L (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	1,000	10,000	3,964	227,430	0,025	1,895
2	1,000	40,000	6,110	392,027	0,043	3,267
3	2,000	10,000	5,818	292,919	0,032	2,441
4	2,000	40,000	11,911	760,409	0,083	6,337
5	0,790	25,000	4,478	282,910	0,031	2,358
6	2,210	25,000	11,053	678,401	0,074	5,653
7	1,500	3,790	2,911	108,281	0,012	0,902
8	1,500	46,210	9,262	595,483	0,065	4,962
9	1,500	25,000	8,149	510,134	0,055	4,251

Fonte: O autor (2019).

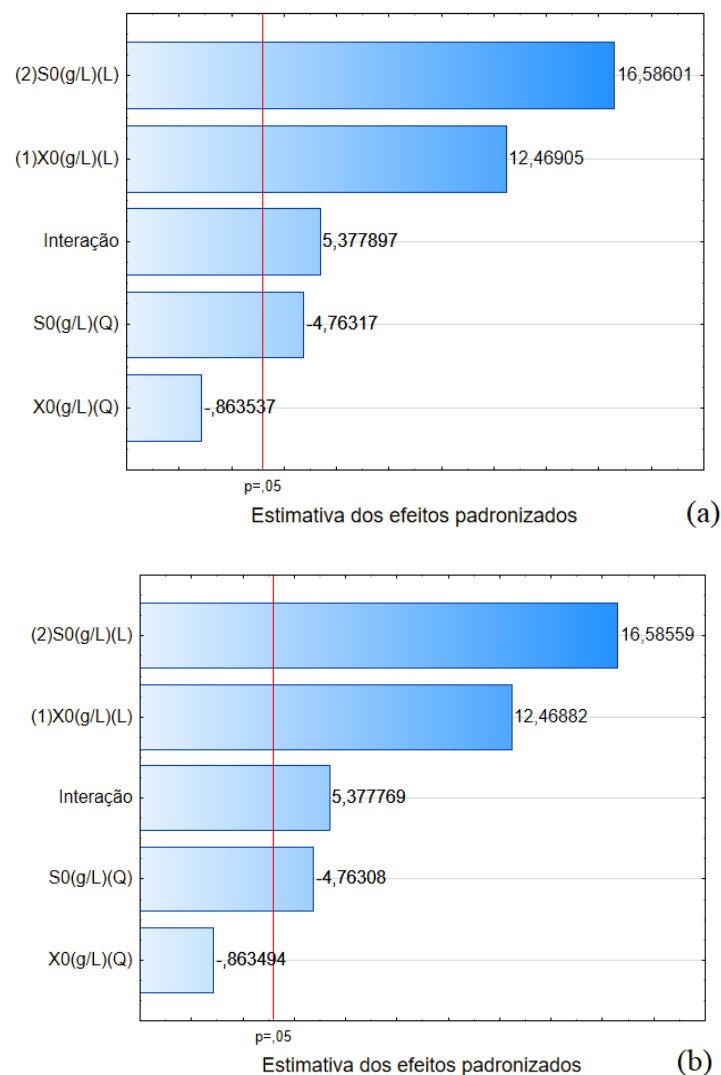
Onde, X_0 (concentração inicial de células); S_0 (concentração inicial de substrato); X (produção de células em (g.L⁻¹)); P (produtividade de células em (mg.L⁻¹)); P_X (produtividade final de células); P_L (produtividade final de lipídeos).

A concentração final de células apresentou variação de 2,911 a 11,911 g/L. Sendo a maior concentração final obtida no ensaio 4, simulado para uma concentração inicial de células de 2,00 g/L, e 40,000 g/L de substrato, sendo obtida para esta mesma condição, a maior concentração final de produto (760,409 mg/L). Com isso, como o tempo foi o mesmo para todos os ensaios, a máxima produtividade, para ambos os produtos avaliados, também foi

obtida no ensaio 4, sendo alcançados 0,083 g/L.h em células e 6,337 g/l.h em lipídios. Os mínimos foram obtidos no ensaio 7, que utilizou um meio contendo uma concentração inicial de 1,500 g/L de células e 3,790 g/L de substrato.

Os resultados experimentais obtidos foram utilizados para estimar os principais efeitos das variáveis e suas interações. Na Figura 6, estão apresentados os diagramas de Pareto, obtidos para as variáveis de respostas produção de células (Px) e lipídios (PL), gerados a partir do planejamento fatorial.

Figura 6 –Diagramas de Pareto para os efeitos padronizados em $p = 0,05$, para as repostas produtividade de células (Px) (a) e produtividade de lipídios (PL) (b).



Fonte: O autor (2019).

Segundo Silva Júnior et al. (2020) o gráfico de Pareto expressa visualmente a interação das variáveis independentes sobre as dependentes, de acordo com sua significância e regressão. A magnitude dos efeitos é representada por barras dispostas horizontalmente e sua significância estatística, ao nível de 95% de confiança, é representada pela linha perpendicular as barras ($p = 0,05$).

Ao avaliar a Figura 6, percebe-se que apenas o termo quadrático em relação a concentração celular inicial não apresenta efeito sobre as duas respostas em análise. Verifica-se ainda que a variável concentração inicial de substrato (S_0), foi a que apresentou a maior influência estatística sobre as produtividades. Este efeito foi positivo, significando que quanto maior o valor dessa variável, melhor vai ser a produtividade.

Os modelos quadráticos completos gerados a partir desses resultados foram testados quanto à adequação pela análise de variância (ANOVA), e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise de variância para o modelo de regressão da produtividade em biomassa e lipídios, obtida a partir dos ensaios simulados nas condições do planejamento composto central.

Fonte	Produtividade em Células (g.L^{-1})		
	SQ	GI	MQ
Regressão	0,004585	5	0,000917
Resíduos	0,000028	3	0,000009
Total	0,004614	8	-
F_{modelo}		98,02	
R²		0,994	
Fonte	Produtividade em Lipídios (mg.L^{-1})		
	SQ	GI	MQ
Regressão	26,989738	5	5,397947642
Resíduos	-	3	0,05507
Total	-	8	-
F_{modelo}		98,01	
R²		0,994	

Nota: SQ = soma quadrática; GI = graus de liberdade; MQ = média quadrática; $F_{5,3} = 9,01$

Fonte: O autor (2019).

O modelo para produtividade de células (P_x) possui valores satisfatórios para o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,994$) e é significativo no nível de 5%. O valor de F de 98,02 é maior que $F_{5,3}(9,01)$ em uma região de rejeição com um nível 95% que é $p < 0,05$; assim, esse modelo pode ser utilizado para prever os resultados das condições estudadas.

Segundo Sousa *et al.* (2012) o coeficiente de determinação (R^2) quantifica a qualidade do ajuste pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total da resposta.

O modelo para produtividade de lipídios (P_L) também apresentou valores satisfatórios para o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,994$) sendo significativo no nível de 5%. O valor de F de 98,01 também é muito maior que $F_{5,3}(9,01)$ em uma região de rejeição com um nível 95% que é $p < 0,05$; assim, esse modelo também pode ser utilizado para prever os resultados da produtividade de lipídios nas condições estudadas.

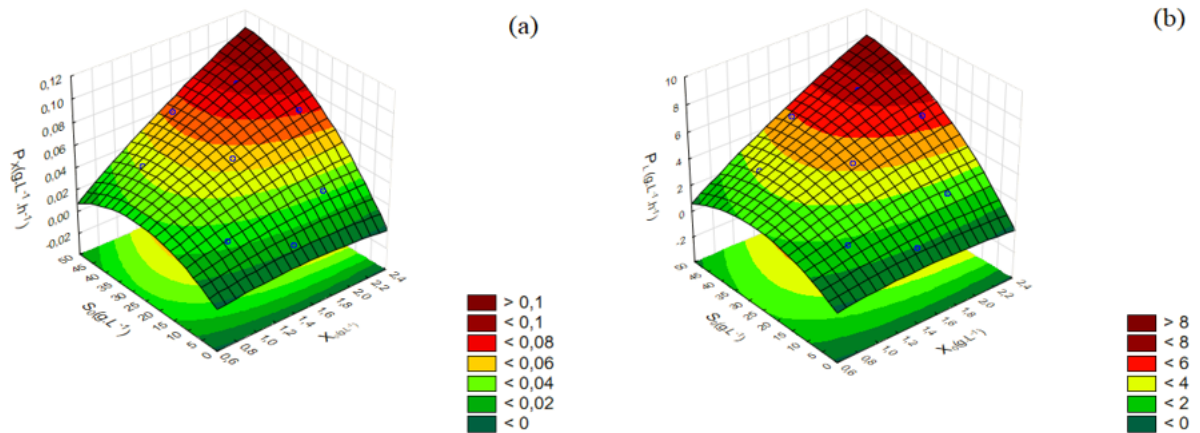
Os modelos matemáticos, para os níveis codificados, obtidos após a análise de variância, para as respostas produtividade em células e em lipídeos são dados, respectivamente, pelas Equações 44 e 45.

$$P_x = 0,554 + 0,013X_0 + 0,018S_0 - 0,009S_0^2 + 0,008X_0S_0 \quad (45)$$

$$P_L = 4,25 + 1,03X_0 + 1,38S_0 - 0,66S_0^2 + 0,63X_0S_0 \quad (46)$$

Desta forma, os modelos de regressão foram empregados para desenvolver a superfície de resposta mostrados na Figura 7, no qual, foram construídas de forma a representar a influência das concentrações iniciais de substrato e de células para produtividade em biomassa ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e em lipídios ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Figura 7 -Diagramas de superfície de resposta em função das concentrações iniciais de substrato e de células paraproductividadeem biomassa ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) (a) e em lipídios ($\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$) (b).



Fonte: O autor (2019).

A análise da Figura 7(a) mostra que os maiores valores para produtividade em biomassa ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) ocorreram na região de coloração mais escura da superfície, onde as variáveis de entrada concentrações iniciais de substrato (S_0) e de células (X_0) apresentam as maiores concentrações. Ao avaliar a Figura 7(b) que representa a superfície de resposta para a produtividade de lipídios ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$), percebe-se comportamento semelhante ao obtido para produtividade em biomassa.

Assim, é possível afirmar que a melhor condição na região estudada para produção de biomassa e lipídios foi na faixa de 2,00 a 2,400 g/L de células e 40,00 a 45,000 g/L de substrato. Nessas condições, obteve-se uma produção total máxima de lipídios de $6,337\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ após 120 horas de fermentação.

6 CONCLUSÕES

Os modelos obtidos mostraram-se, significativos e preditivos, podendo ser utilizados para prever o comportamento cinético do processo, permitindo avaliar o crescimento celular e produção de lipídeos.

O método de Runge-Kutta de quarta ordem, utilizado para a simulação do processo, durante 120 horas, a partir das condições iniciais, mostrou-se eficiente, pois para todas as 9 condições simuladas foi possível verificar um comportamento cinético condizente com o apresentado na literatura.

O estudo proposto e executado pela simulação apresentada neste trabalho mostrou-se eficiente em representar o comportamento metabólico da levedura *Rhodotorulamucilaginos* por meio do modelo de Monod, e a aplicação do planejamento composto central permitiu definir a influência dos fatores sobre as respostas, bem como a melhor condição para a produção de bioativos lipídicos.

Dentro das condições em que os ensaios foram realizados, o ensaio 4, apresentou as maiores produtividades, sendo, portanto, a concentração de 2,00 g/L de células e 40,00 g/L de substrato a condição ideal para a produtividade de biomassa e de lipídios.

REFERÊNCIAS

- BOARETO, A. J. M.; *Modelagem matemática híbrida cibernética / neural do processo contínuo de produção de etanol por Zymomonas mobilis*. 2012. 249f. Tese (Doutorado em Ciência em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ.
- BONOMI, A.; SCHMIDEELL, W. *Processos Fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
- BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Lípidos de Importância Fisiológica. In: MURRAY, R. K.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W.; WEIL, P. ANTHONY (dir.), *Harper Bioquímica Ilustrada*. 29 ed McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A., 2012, pp. 140-151, ISBN: 978-0-07-176576-3.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for Experimenters: Na introduction to designs, data analysis and model building*. Wiley. New York, 1978.
- CHUCK, C. J.; LOU-HING, D.; DEAN, R.; SARGEANT, L. A.; SCOTT, R. J.; JENKINS, R. W. Extração e síntese simultânea de micro-ondas de éster metílico de ácidos graxos da levedura oleaginosa *Rhodotorulaglutinis*. *Revista Energia*, v.69, p.446–454, 2014.
- DE, B. K.; KUMAR, T. Production and optimization of polyunsaturated fatty acids in some fungi of *Aspergillus* and *Mucor* Genus. *Journal Oil Technology Assocn. of India.*, v.37, p.8-13, 2005.
- DE, B. K.; VERMA, S. Characterization of lipids and fatty acids of the soil derived fungus *Cladosporium* sp. *Grasas y Aceites*, n. 62, v. 2, p. 213-220, 2011.
- DE SILONIZ, PAYO, M. I.; CALLEJO, E. M.; MARQUINA, M. A.; Peinado, J. M. Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. *FEMS Microbiol Lett*, p. 233-7, 2002.
- DROOP, M. R. R. Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 48, n. 3, p. 689–733, 1968.
- DUARTE, A. S.; SILVA, Ê. F. F.; ROLIM, M. M.; FERREIRA, R. F. A. L.; MALHEIROS, S. M. M.; ALBUQUERQUE, F. S. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012.
- FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN.; HARRISON, F. C. In: Kurtzman C. The Yeast, A Taxonomic Study. Florida, *Elsevier Science Publishers*. 1998, p. 800-27.
- FIDLER, N. A.; KOLETZKO, B.; SAUERWALD. T. U. Single cell oils production and application. p.37-45, 1999. Disponível em: <<http://www.bfro.uni-lj.si/zbornik.74>>.
- GONÇALVES, C. F. Modelagem, simulação e otimização de cultivos autotróficos de *Pseudoneochloris marina* em fotobiorreatores airlift. 113f. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

- GONG, G.; LIU, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Análise de metabolismo multi-ômico na irradiação e estresse oxidativo induzido por *Rhodotorulaglutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.103, p.361 – 374, 2019.
- HASSAN M, B. P. J.; GRANGER, L. M.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichumcurvatum* grown in single stage continuous culture. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, v.40, p.483-488, 1993.
- INGHAM, J.; DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; PRENOSIL, J. E.; SNAPE, J. B. **Chemical Engineering Dynamics**, New York: VHC Publishers INC, 2007.
- KARAMEROU, E. E.; THEODOROPOULOS, C.; WEBB, C. Uma abordagem de biorrefinaria para a miniprodução de óleo microbial a partir de glicerol por *Rhodotorulaglutinis*. *Biomass and Bioenergy*, v.89, p.113-122, 2016.
- KOUTINAS, A. A.; PAPANIKOLAOU, S. **Biodiesel production from microbial oil**. In: LUQUE, R.; CAMPELO, J.; CLARK, J. H. editors. Handbook of biofuels production – processes and technologies. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p. 177–98, 2011.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LAHAV, R.; FARELEIRA, P.; NEJIDAT, A.; ABELIOVICH, A. The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *MicrobEcol*, n. 43. p. 388-96, 2002.
- LENNOX, B.; HIDDEN, H. G.; MONTAGUE, G. A.; KORNFELD, P. R.; GOULDING, P. R. Application of multivariate statistical process control to batch operations. *Computers and Chemical Engineering*, 24, 291–296, 2000.
- LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. R. Biomass and carotenoid pigments production by Patagonian native yeasts. *World J Microbiol Biotechnol.* n. 22, p. 687-92, 2006.
- MEESTERS, P. A. E. P., HUIJBERTS, G. N. M., EGGINK, G. (1996). **High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source**. *Appl. Microbiol Biotechnol* 45:575–579.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, n.1, p.1–5, 2009.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 3, p. 371–394, 1949.
- MONTAGUE, G. A.; LENNOX, B. **Multivariate statistical process control hones a batch**. *InTech*, p.42–44, 2000.
- PATEL, A.; PRUTHI, V.; SINGH, R.; PRUTHI, P. A. Efeito sinérgico de fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis aumentam o acúmulo de TAG em levedura oleaginosa *Rhodospidiumkratochvilovae*HIMPA1. *Bioresour Technol.*, v.188, p.136-144, 2015.

PINZI, S., DORADO, M. P. **Feedstocks for advanced biodiesel production**. In: LUQUE, R.; MELERO, J. A. editors. *Advances in biodiesel production: processes and technologies*. Cambridge, UK: Woodhead publishing, p. 69–90, 2012.

POONTAWEE, R.; YONGMANITCHAI, W.; LIMTONG, S. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry*, v.53, p.44 – 60, 2017.

RODRIGUES, M. I; LEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. 2ª Edição. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 1 – 4. 355p.

RUSSO, G.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J. P.; VAN BROOCK, M. Levaduras de un ambiente acuático ácido: Lago Caviahue – Río Agrío. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 2006. p, 167-75.

SANTANA, A.; CRISTINA, M.; RODRIGUES, H. F.; JULIANA; CAVALI, J.; BULCÃO, F. A.; LUCAS. Lipídeos: classificação e principais funções fisiológicas. *Revista Eletrônica de Veterinaria*, v. 18, n. 8, p. 1-14, 2017.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, E-papers Serviços Editoriais, 2007, 462p.

SILVA JÚNIOR, J. F.; SANTIAGO, A. M.; GALDINO, P. O.; SANTOS, N. C.; BARROS, S. L.; MARSIGLIA, W. I. M. L.; ALMEIDA, R. L. J. Application of osmoconvective dehydration for the technological use of banana bark. *Research, Society and Development*, v.9, n.1, e103911808, 2020.

SILVA, J.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; RIBEIRO, J. E. S.; MEDIEROS, L. L.; FERREIRA, A. L. O. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorulamucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.21, e.2017145, 2018.

SILVA, J.; SILVA, F. L. H.; RIBEIRO, J. E. S.; MADRUGA, M. S.; MEDEIROS, L. L.; FERREIRA, A. L. O. Biotechnological production of lipids by *Rhodotorulamucilaginosa* using cassava wastewater. *X CIGR Section VI International Symposium Food: the treethat sustains life*, 2016.

SOUSA, C. A. B.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.16, n.7, p. 790-794, 2012.

SOUZA JÚNIOR, E. F. S. **Modelagem e simulação fenomenológica de biorreator para a produção de xilitol a partir de sisal (*agave sisalana*) em meio com *candidaguilliermondii***. 78f. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017.

STERSA, R. L.; BRANDI, A. C. Comparação entre métodos numéricos: Runge-Kutta de quarta ordem e previsor-corretor. *Revista Eletrônica Paulista de Matemática*, v.7, p.12-22, 2016.

VALLE, K. N. F. **Métodos numéricos de Euler e Runge-Kutta**. 2012. 40 f. Monografia (Especialização) - Programa de Pós-graduação em Matemática Para Professores Com Ênfase em Cálculo, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

VENKATASUBRAMANIAN, V.; RENGASWAMY, R.; YIN, K.; KAVURI, S. N. A review of process fault detection and diagnosis Part I: Quantitative model-based methods. *Computers and Chemical Engineering*, v.27, p.293-311, 2003.

WIEBE, M. G.; KOIVURANTA, K.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Produção de lipídios em lotes e culturas descontínuas de *Rhodotorulaloides* 5 e carboidratos de carbono. *BMC Biotechnology*, v.12, n. 26, p.1-10, 2012.

ZORN, S. M. F. E. **Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas**. 124f. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.