

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE SOFTWARE PARA AQUISIÇÃO DE
DADOS E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS EM PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA E CULTIVO CELULAR**

WILERSON STURM

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Processos Biotecnológicos. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Dario Eduardo Amaral Dergint

CURITIBA

2009

WILERSON STURM

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE SOFTWARE PARA AQUISIÇÃO DE
DADOS E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS EM PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA E CULTIVO CELULAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Processos Biotecnológicos. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Dario Eduardo Amaral Dergint

CURITIBA

2009

À minha filha, Bianca, fonte inesgotável de motivação. Aos meus pais, Walter e Walkiria, pelo incentivo aos meus estudos. Aos meus irmãos, Wederle e Walirene, e a todos os meus familiares e amigos pela demonstração sempre presente de certeza no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação, confiança e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Dario Eduardo Amaral Dergint pela co-orientação e colaboração neste e outros projetos de vida.

Ao Professor Dr. Jose Angel Rodriguez-Leon cujas informações foram indispensáveis desde o início deste trabalho e pela participação na banca de defesa.

Aos Professores Doutores Julio Cesar de Carvalho e Luciana Porto de Souza Vandenberghe pelas sugestões e críticas que promoveram melhorias nesta pesquisa.

Ao Professor Doutor Willibaldo Schmidell Netto, por tão gentilmente aceitar participar da banca de defesa desta tese.

Aos, então, estagiários Alysson Hikaru Shirai e Deiva Canali Navarro Vieira Magalhães pelo empenho e interesse.

À Michele Rigon Spier, Cristine Rodrigues, Andrea Policastro Canuto, Luiz Gustavo Lacerda, Eduardo B. Sydney e Ivo A. Borghetti pela amizade e auxílio prestado durante a realização dos trabalhos.

Aos amigos, Syonara Fernandes, Ellen de Souza Marquez, Alexandre Meira de Vasconcelos, Walmor Cardoso Godoi, José Carlos Bucholdz, Marilda Munaro, Lígia de Oliveira Franzosi e Scheyla Zeck, pela companhia e incentivo em todos os momentos.

Ao grupo de amigos, cujo líder Luciano Borges Nogueira e também, em especial, Luis Mauricio Trevisan e Laertes Adamovicz, mantiveram sempre o otimismo perante meus desafios, faço em nome destes o meu agradecimento a todos os membros.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de doutorado.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pela estrutura necessária à realização desta pesquisa.

A luta pela verdade deve ter precedência sobre todas as outras.

Albert Einstein.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Apresentação.....	15
1.2 DEFINIÇÃO DO OBJETIVO GERAL	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.3 Definição dos Objetivos Específicos.....	18
1.4 ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 sensores	22
2.1.1 Sensores de Oxigênio.....	22
2.1.2 Sensores de Gás Carbônico	23
2.1.3 Sensor de Vazão.....	23
2.1.4 Sensor de umidade relativa do ar	24
2.1.5 Sensor de temperatura.....	24
2.1.6 Suporte para sensores.....	24
2.2 controladores.....	25
2.3 Biorreatores	27
2.3.1 Biorreator Tipo Coluna.....	28
2.3.2 Biorreator Tipo Tambor Horizontal.....	29
2.3.3 Biorreator Tipo Tanque Agitado.....	29
2.4 discussão sobre os recursos utilizados	29
2.5 Conclusão deste capítulo	30
3 DESENVOLVIMENTO de FERRAMENTAS de SOFTWARE APLICADAS aos PROCESSOS	32

3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.1 Recursos Utilizados	32
3.1.2 Estrutura do Programa FERSOL2.....	33
3.1.2.1 Dados de entrada.....	33
3.1.2.2 Sequência de Processamento.....	34
3.1.2.3 Dados de saída	35
3.1.3 Métodos Matemáticos	35
3.1.4 Métodos Numéricos Utilizados em Cada Etapa.....	36
3.1.4.1 Cálculo das integrais relacionadas aos processos	37
3.1.4.2 Método iterativo para ajuste da curva de crescimento da biomassa.....	38
3.1.4.3 Filtragem dos dados de entrada.....	40
3.1.4.4 Filtragem por Transformada de Fourier	40
3.1.4.5 Filtragem por Média Móvel.....	41
3.1.4.6 Filtragem por Savitzky-Golay	41
3.1.5 Cálculo dos Parâmetros do Processo.....	42
3.2 IMPLEMENTAÇÃO do software FERSOL2.....	43
3.2.1 Desenho da Interface Principal.....	43
3.2.2 Biblioteca Gráfica.....	45
3.3 Implementação do sistema de aquisição de dados.....	46
3.3.1 Determinação das variáveis de entrada.....	46
3.3.2 Gravação de valores.....	47
3.3.3 Interface de demonstração dos valores atuais	48
3.4 Conclusão deste capítulo	48
4 APLICAÇÃO DA FERRAMENTA EM PROCESSO COM BACTÉRIA.....	50
4.1 Processo de produção de goma xantana	50
4.2 Microrganismo utilizado neste processo	51
4.3 Fermentação em colunas de Raimbault	51
4.4 Análise de Biomassa por Método Experimental	52
4.5 Resultados obtidos com as ferramentas de Software	53
4.6 Discussão dos resultados deste processo	56
4.7 Conclusão deste capítulo	57
5 APLICAÇÃO EM PROCESSO COM FUNGO	59
5.1 Processo de produção de Fitase.....	59
5.2 Microrganismo utilizado neste processo	60
5.3 Fermentação em Biorreator tipo coluna	60

5.4	Análise de Biomassa pelo Método de extração de ergosterol.....	60
5.5	Resultados estimados pelas ferramentas de Software.....	61
5.5.1	Valores Obtidos pelo Sistema de Aquisição	61
5.6	Discussão dos resultados deste processo	65
5.7	Conclusão deste capítulo	66
6	APLICAÇÃO EM PROCESSO COM MUDANÇA DE ESCALA.....	68
6.1	Processo de mudança de escala.....	68
6.2	Microrganismo utilizado neste processo	68
6.3	Fermentação em Biorreator tipo tambor horizontal	69
6.4	Análise de Biomassa pelo Método de extração de ergosterol.....	69
6.5	Resultados Apresentados pelas ferramentas de Software.....	69
6.5.1	Valores Determinados pelo Sistema de Aquisição	69
6.5.2	Resultados de Biomassa Estimada pelo Programa	73
6.5.3	Outros Resultados Apresentados pelo Programa.....	74
6.6	Discussão dos resultados deste capítulo	76
6.7	Conclusão deste capítulo	77
7	APLICAÇÕES PARCIAIS DAS FERRAMENTAS	79
7.1	Processo de Crescimento de células vegetais.....	79
7.1.1	Organismo Utilizado neste Processo	79
7.1.2	Biorreator Desenvolvido para Células Vegetais BIB.....	80
7.1.3	Resultados Obtidos com o Sistema de Aquisição.....	81
7.1.4	Conclusão	82
7.2	processo de cultivo de microalga em manípueira.....	83
7.2.1	Microalga Utilizada neste Processo	83
7.2.2	Biorreator Utilizado no Cultivo da <i>Chlorella minutissima</i>	84
7.2.3	Resultados Obtidos pelo Sistema Instalado	84
7.2.4	Conclusão	86
7.3	Processo de cultivo de microalga em MBM.....	87
7.3.1	Microalga Utilizada neste Processo	87
7.3.2	Biorreator utilizado para cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	88
7.3.3	Resultados Obtidos com o Sistema de Aquisição.....	88
7.3.4	Conclusão desta Seção	90

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
8.1	QUANTO AOS OBJETIVOS	93
8.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
8.3	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SUPORTE PARA OS SENSORES.....	25
FIGURA 2 - PAINEL FRONTAL DOS CONTROLADORES.....	26
FIGURA 3 - SISTEMA COMPLETO ADAPTADO AO BIORREATOR TIPO COLUNA	27
FIGURA 4 - BIORREATOR TIPO COLUNA DE RAIMBAULT	28
FIGURA 5 - INDICAÇÃO DE ÁREA DE INTEGRAÇÃO.....	37
FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DOS TRAPÉZIOS	38
FIGURA 7 – INTERFACE DE ENTRADA DE DADOS.....	44
FIGURA 8 – INTERFACE PARCIAL DE APRESENTAÇÃO DE PARÂMETROS	45
FIGURA 9 - EXEMPLO DE GRÁFICO GERADO PELO PROGRAMA.....	46
FIGURA 10 – INTERFACE DE AQUISIÇÃO DE DADOS	47
FIGURA 11 – CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	53
FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	54
FIGURA 13 – ESTIMATIVA DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA PELO SOFTWARE	55
FIGURA 14 – VAZÃO MONITORADA DURANTE O PROCESSO	61
FIGURA 15 – OXIGÊNIO CONSUMIDO.....	62
FIGURA 16 – GÁS CARBÔNICO PRODUZIDO	62
FIGURA 17 – COEFICIENTE RESPIROMÉTRICO	63
FIGURA 18 – BIOMASSA ESTIMADA PELO PROGRAMA.....	63
FIGURA 19 – COMPARAÇÃO ENTRE BIOMASSA ESTIMADA E MEDIDA	64
FIGURA 20 – BIOMASSA ESTIMADA E MEDIDA EM DOIS EIXOS	64
FIGURA 21 – ATIVIDADE DE FITASE E CRESCIMENTO DA BIOMASSA	66
FIGURA 22 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 1 KG	70
FIGURA 23 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 2 KG	70
FIGURA 24 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 10 KG	71
FIGURA 25 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 1 KG.....	71
FIGURA 26 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 2 KG.....	72
FIGURA 27 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 10 KG.....	72
FIGURA 28 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 1KG	73
FIGURA 29 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 2KG	73
FIGURA 30 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 10KG	74
FIGURA 31 - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE DA ENZIMA E BIOMASSA	76
FIGURA 32 - ESQUEMA DO REATOR.....	80
FIGURA 33 - CICLO DE RESPIRAÇÃO E FOTOSSÍNTESE NO CONSUMO DE O ₂	82
FIGURA 34 - CONSUMO DE OXIGÊNIO EM G/H.....	84
FIGURA 35 - PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO EM G/H	85
FIGURA 36 - COMPARAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO E CONSUMO DE GASES	85
FIGURA 37 - VAZÃO DE CO ₂ NA ENTRADA DO REATOR EM ML/MIN	89
FIGURA 38 - CONSUMO DE OXIGÊNIO EM G/H.....	89
FIGURA 39 – PRODUÇÃO DE CO ₂ EM G/H	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADO DA CONTAGEM DE UFC/ML.....	52
TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ESTIMATIVA.....	54
TABELA 3 – PARÂMETROS DO PROCESSO CALCULADOS PELO PROGRAMA.....	55
TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS.....	63
TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE DA ENZIMA E BIOMASSA.....	65
TABELA 6 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 1 KG.....	74
TABELA 7 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 2 KG.....	75
TABELA 8 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 10 KG.....	75
TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS SOFTWARES.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPU	- Unidade Central de Processamento
DOS	- Disk Operating System – Sistema de Operação por Disco
FES	- Fermentação em Estado Sólido
PID	- Proporcional Integral e Derivativo

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	- Significado correspondente à simbologia
μ	- Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
$Y_{x/o}$	- Coeficiente de rendimento de biomassa em relação ao oxigênio (g/g)
m	- Coeficiente de manutenção ($\text{g O}_2 / \text{g biomassa h}$)
Δt	- Intervalo de Tempo (h)
X	- Valor de Biomassa (g)

RESUMO

Na produção de determinadas substâncias de interesse comercial, através de processos biotecnológicos, um dos meios mais utilizados é a fermentação. Este processo se divide em fermentação submersa, como na produção de vinhos, cachaças e álcool, por exemplo, e em fermentação em estado sólido. Na fermentação em estado sólido algumas peculiaridades dificultam a medição de certas variáveis, pois se trata de ambiente heterogêneo. Para o acompanhamento e controle deste processo é necessária a medição da biomassa, ou seja, qual a massa dos microrganismos produzida, bem como sua evolução durante o processo. Uma forma de medição é a estimativa da biomassa através da respirometria: medindo-se quanto de oxigênio está sendo consumido e quanto gás carbônico está sendo produzido é possível estimar a massa de microrganismos. Hoje este procedimento é realizado através de cromatógrafo gasoso, acoplado a um sistema de aquisição de dados, equipamento que torna o processo bastante caro. Este trabalho apresenta uma alternativa mais acessível, bem como a incorporação de recursos atuais da informática, o uso de sensores para as diversas variáveis como temperatura, vazão, percentuais de oxigênio e gás carbônico, ligados a um sistema de aquisição de dados desenvolvido para a monitoração e posterior controle deste processo. Com os dados medidos torna-se possível a utilização de outra ferramenta de software aperfeiçoada para a estimativa de crescimento da biomassa, bem como o levantamento de parâmetros peculiares ao processo como velocidade específica de crescimento, coeficientes de manutenção e produção, os quais caracterizam o processo e permitem uma análise mais aprofundada do seu desempenho. Para a validação das ferramentas foram realizados experimentos envolvendo microrganismos diferentes, com o intuito de abranger melhor os possíveis processos. O acompanhamento de processos com fungos, bactérias, células vegetais e microalgas permitiu avaliar a validade do sistema frente aos diferentes comportamentos de diversos microrganismos utilizados em fermentação, tanto submersa quanto em estado sólido e em cultivo celular.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido; Sistema de Aquisição de Dados; Ferramentas de Software.

ABSTRACT

In the production of certain substances of commercial interest, by biotechnological processes, one of the most used is the fermentation. This process is divided in submerged fermentation, as in the production of wine, cachaça and alcohol, for instance, and in solid-state fermentation. In solid-state fermentation some peculiarities raise difficulties to measure certain variables, because it is a heterogeneous environment. To monitor and control this process it is necessary to measure the biomass, i.e. what is the mass of microorganism, as well as its evolution during the process. One way to measure is the estimated biomass by respirometry: measuring how much oxygen is being consumed and the carbon dioxide is being produced it is possible to estimate the mass of microorganisms. Today this procedure is performed through a gas chromatograph coupled to a data acquisition system which makes the process very expensive. This work presents a low cost alternative, and the incorporation of current resources of informatics, the use of sensors for different variables such as temperature, flow, percentages of oxygen, and carbon dioxide, linked to a data acquisition system developed for monitoring, and subsequent, control this process. With the measured data it is possible to use another software tool improved for the estimation of biomass growth and the determination of some parameters peculiar to the process as the specific growth rate, maintenance and production coefficients, which characterize the process and allow a more thorough analysis of its performance. For the validation of the tools were carried out experiments involving different microorganisms, in order to better embrace the possible processes. Monitoring processes with fungi, bacteria, algae and plant cells, it allows evaluating the validity of the system, facing the different behaviors of several microorganisms used in fermentation, both submerged and solid state and in cell cultures.

Key words: Solid-state fermentation; Acquisition Data System; Software tools.

1 INTRODUÇÃO

Neste primeiro capítulo apresenta-se, de forma sucinta, o tema deste trabalho. Depois são apresentados os objetivos, tanto geral quanto específicos e, finalmente, é apresentada a estrutura geral do trabalho com a organização dos capítulos.

1.1 APRESENTAÇÃO

A maioria dos autores concorda que a história dos processos de fermentação no estado sólido (FES) teve sua origem há milênios. Existem relatos, na Ásia, sobre a produção de queijos empregando cepas do fungo *Penicillium rouquefortii* mais de cem anos antes de Cristo. Os egípcios, cerca de 2000 anos a.C., já empregavam a FES para a elaboração do pão. O processo para a produção de molho de soja já era utilizado na China 1000 anos antes da era cristã e a sua composição essencial é mantida sem grandes alterações até hoje. Já no início do século XX foi documentada a produção, até então inédita, de enzimas por este método para aplicação na indústria cervejeira. Na década de 40, do século passado, houve grande estudo e desenvolvimento destes processos principalmente com o advento da produção de penicilina, já com a criação de biorreatores para fermentação submersa ou líquida. Quanto aos processos de FES alguns poucos trabalhos foram descritos e, somente a partir dos anos 70, houve um crescimento vigoroso no estudo destes, com sua caracterização dentro de normas científicas e não mais de forma simplesmente descritiva, principalmente devido a vantagens observadas na FES comparada à fermentação submersa.

No Brasil, desde 1986, a Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - DEBB, através dos Laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia I e II da Universidade Federal de Paraná (UFPR), vem desenvolvendo diversos projetos visando a utilização de produtos e subprodutos agrícolas e agroindustriais empregando a técnica da FES para a produção de diferentes biomoléculas de interesse comercial. Alguns resultados deste trabalho são: Enriquecimento protéico e transformação de subprodutos da agroindústria, produção de enzimas, produção de ácidos orgânicos, bioaromas, biopesticidas,

hormônios vegetais, goma xantana, polissacarídeos de interesse comercial e vários outros.

De maneira geral pode-se definir os processos de FES como o crescimento de microrganismos sobre materiais úmidos na ausência, ou quase ausência, de água em estado livre. Neste sentido existem diversas peculiaridades na FES, consideradas ora como vantagem ora como desvantagem quando comparada aos processos de fermentação líquida ou submersa, tais como: sistema é heterogêneo comparado com a homogeneidade que se obtém nos processos líquidos agitados; os microrganismos aderem à superfície fermentativa (matriz sólida) sendo difícil sua separação da mesma; os metabólitos produzidos mediante estes processos ficam mais concentrados; podem ser incluídos nas denominadas tecnologias limpas, devido a sua baixa interferência no meio ambiente em comparação aos processos submersos.

Independentemente das vantagens e desvantagens que se relatam para o processo de FES, existem algumas dificuldades de caracterização e controle do processo. Ainda nos dias de hoje os trabalhos publicados em relação aos processos de FES apresentam respostas, embora válidas, baseadas principalmente em resultados empíricos ou globais, devido às dificuldades de medição e modelagem desses processos heterogêneos. Neste sentido os processos de fermentação submersa oferecem uma possibilidade de caracterização muito mais desenvolvida, até o momento, que os processos de fermentação sólida. Conceitos completamente aceitos na fermentação submersa como cinética de crescimento, rendimentos, transferência e demanda de oxigênio, coeficiente de manutenção, transferência de calor etc., relacionados não somente com a fisiologia microbiana, mas com o desenvolvimento de qualquer processo tecnológico, têm sido menos estudados nos sistemas de fermentação sólida. Assim, a determinação das variáveis biotecnológicas dos processos é insuficiente quanto à caracterização global do sistema. Neste sentido a maioria dos trabalhos limita-se a descrever a seleção de meios e condições de cultivo, teor de umidade, temperatura e pH, devido às dificuldades de homogeneização e, portanto, de medição desses parâmetros nos sistemas sólidos.

A respeito dos diferentes métodos empregados para determinar a velocidade específica de crescimento (μ), que constitui um parâmetro que pode ser considerado como chave de qualquer processo fermentativo ou de crescimento celular, os mesmos incluem desde medições diretas por contagem celular, com prévia agitação da amostra no caso de bactérias e leveduras (Christen et al, 1994), estimativas indiretas da biomassa através do teor de proteína ou de outro constituinte celular do microrganismo empregado (Raimbault, 1981; Okasaki et al., 1980; Matchman et al., 1985), até medições do O_2 consumido e do CO_2 produzido (Carrizalez et al., 1981; Koba et al., 1986).

Tudo parece indicar que o método de estimativa da velocidade específica de crescimento (μ), a partir da velocidade de consumo de oxigênio ou produção de CO_2 , é o mais indicado devido a duas questões fundamentais (Pandey et al., 2001):

- Nem o estado fisiológico do microrganismo, nem o estado físico-químico do sistema se alteram pelo manuseio das amostras;

- As medições do consumo de O_2 e produção de CO_2 representam o comportamento global do sistema, evitando possíveis imprecisões de amostragem de um sistema heterogêneo como da FES.

Este último método, indicado acima, tende a se tornar o mais usual e tem permitido o acúmulo e processamento dos dados nos sistemas de FES (Saucedo-Castañeda et al., 1990; Auria et al., 1990).

Quanto ao processamento dos dados da FES e a obtenção dos respectivos parâmetros biotecnológicos, foi criado um método que permite, através das medições de O_2 e CO_2 nestes processos, determinar parâmetros importantes como a velocidade específica de crescimento (μ) e estimar os coeficientes de rendimento em relação ao oxigênio ($Y_{x/o}$) e de manutenção (m) da cepa empregada (Sato et al., 1983; Rodríguez León et al., 1988). Devido a dificuldades de cálculo matemático, o coeficiente de manutenção não podia ser estimado até aquele momento. O problema foi resolvido mediante o uso de um programa de computador (FERSOL) desenvolvido por (Rodríguez León et al., 1988). Também, deve-se esclarecer que todos estes cálculos e, conseqüentemente, o programa de computador desenvolvido servem igualmente para as estimativas e processamento de dados dos processos de fermentação submersa (Rodríguez León et al., 2003). De posse

destes parâmetros torna-se possível uma comparação entre os comportamentos de diversos processos.

Este trabalho visa apresentar alternativas de solução para as dificuldades de medição, monitoramento e posterior análise dos principais parâmetros que caracterizam cada processo de FES, permitindo uma comparação entre eles.

1.2 DEFINIÇÃO DO OBJETIVO GERAL

As dificuldades de medição indicadas anteriormente acarretam na falta de dados para desenvolver as diferentes etapas do processo tecnológico como, por exemplo, um adequado balanço de matéria e de energia, critérios de controle no sistema, critérios de otimização de parâmetros, como a velocidade específica de crescimento e a produtividade do sistema entre outros, e todos os que conduzam a um balanço econômico ótimo do processo assim como constituir os critérios de reprodutibilidade e controle do mesmo.

1.2.1 Objetivo Geral

Mesmo em se tratando de objetivo geral, neste trabalho é possível separá-lo em duas partes para melhor entendimento: o uso de sensores, controladores e sistema de aquisição de dados como fonte de informação sobre o comportamento do processo e o posterior processamento destes, gerando os parâmetros que permitam uma análise comparativa. Assim, o objetivo geral é:

- Propor uma metodologia de análise e avaliação aplicável a diversos processos, e respectivos microrganismos, através do uso de sistema de aquisição de dados, sensores e ferramenta computacional.

1.3 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esta seção busca especificar as diversas etapas necessárias para que se cumpra o objetivo geral determinado acima. De acordo com (LIPTÁK, 2006; STURM et al. 2008), um sistema de controle pode ser dividido em quatro grandes partes, a saber: sensores, atuadores, estratégia de controle e rede industrial de interconexão. Conforme Smith (2004), ainda há uma lacuna na disponibilidade de sensores para determinadas variáveis químicas envolvidas nos processos de fermentação, assim

uma busca foi realizada no sentido de melhor adaptação dos sensores existentes às necessidades encontradas. Algumas das variáveis envolvidas podem ser de difícil controle e até mesmo impossíveis de se controlar através das estratégias convencionais de controle, devido ao fato de pertencerem ao comportamento dos próprios microrganismos, como por exemplo, a velocidade de consumo de oxigênio.

Desta forma foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- Pesquisar e especificar sensores adequados aos processos de fermentação a serem avaliados;
- Desenvolver um sistema de aquisição direcionado para o processo de FES;
- Desenvolver um software para estimativa de crescimento de biomassa e levantamento dos parâmetros característicos do processo de FES, utilizando dados gravados pelo sistema de aquisição;
- Realizar testes em processos de fermentação e de cultivo celular, com o respectivo processamento de dados e análise.

O programa de aquisição de dados foi desenvolvido sobre plataforma de uso industrial, de modo que as condições ambientais e elétricas fossem contempladas quando do uso no ambiente de laboratório.

Para o programa de estimativa de biomassa e geração de outros parâmetros do processo, foi utilizado como base um programa chamado FERSOL (Rodríguez León et al., 1988). O novo programa é chamado no âmbito deste trabalho como FERSOL2, cujo desenvolvimento buscou incluir características e vantagens dos sistemas mais atuais.

A aplicação do sistema com todos os seus recursos e também algumas possibilidades parciais, tanto em processos de fermentação, como em alguns outros de interesse para o programa de pós-graduação, foi realizada com o intuito de variar as condições de uso deste sistema. A avaliação de reatores diferentes, com microrganismos e substratos diversos e com a produção de vários produtos, teve como objetivo a demonstração da versatilidade da solução como um todo.

1.4 ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Devido à natureza deste trabalho, considerando que cada capítulo trata de um processo diferente, esta seção expõe a ordem e breve conteúdo de cada

capítulo, de modo que possa orientar a leitura de acordo com interesses específicos.

O Capítulo 2 descreve os diversos materiais e recursos necessários para a realização da pesquisa. Sensores e suas principais especificações, bem como recursos mecânicos para sua adaptação aos diversos processos são descritos. Em seguida é feita uma rápida exposição dos tipos de reatores utilizados e elementos acessórios para seu correto funcionamento.

O Capítulo 3 explica os recursos usados para o desenvolvimento dos programas de computador. As soluções, em termos de métodos matemáticos e de cálculo numérico, são discutidas e também quanto às decisões necessárias relacionadas à interface e plataforma de programação, sempre com o intuito de tornar os programas mais “amigáveis” e com uma maior vida útil nos sistemas atuais.

O Capítulo 4 trata da primeira aplicação das ferramentas de uma forma completa, ou seja, com a aquisição de dados feita pelo programa próprio e a posterior análise dos dados com a respectiva comparação com outros métodos de determinação, com o objetivo de encaminhar a validação dos programas desenvolvidos.

O Capítulo 5 mostra também uma aplicação completa, utilizando o sistema como um todo no monitoramento e análise de comportamento de processo para produção da enzima fitase, em um cultivo de Fungo com o substrato polpa cítrica.

No Capítulo 6 é descrita mais uma aplicação completa, porém o uso da ferramenta, com todos seus recursos, foi feito como auxílio na determinação do comportamento e caracterização do processo durante o procedimento de mudança de escala de produção. O sistema foi adaptado a três reatores com tamanhos diferentes, com análise de cada um e posterior avaliação em conjunto como demonstração da validade do procedimento de aumento de escala.

Para demonstrar o grau de versatilidade do sistema, bem como auxiliar outras pesquisas na determinação de comportamento de processos diversos, o Capítulo 7 mostra aplicações do sistema frente a outros processos que não fermentação em estado sólido. Embora com o uso parcial dos recursos disponíveis pelo sistema, as variáveis monitoradas e analisadas puderam ser usadas com

sucesso na determinação de comportamentos destes processos ou mesmo caracterização de alguns de seus parâmetros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são descritas as características dos sensores e controladores, presentes no sistema de aquisição de dados, bem como os recursos físicos necessários para a realização dos experimentos como biorreatores, colunas e suportes para os sensores, incluindo demais acessórios. As características e métodos referentes aos programas de aquisição de dados, FERSOL2 e demais parâmetros são abordados no capítulo 3.

2.1 SENSORES

Sensores são dispositivos que transformam alguma variação de uma grandeza em um sinal elétrico mensurável, conforme (MITCHELL et al. 2006; STURM, 2004). Neste trabalho os sensores foram adaptados para uso nos processos aqui descritos.

2.1.1 Sensores de Oxigênio

Para que se pudesse atingir os objetivos deste trabalho, uma pesquisa inicial frente aos fornecedores de sensores e controladores foi realizada, mantendo como base de decisão as especificações mais adequadas, vida útil e, finalmente, o investimento financeiro.

Para a determinação da quantidade de oxigênio consumido em cada um dos processos, foram utilizados dois sensores de medição deste gás, um para medição de percentual na entrada do processo, outro instalado na saída. A diferença entre os valores percentuais destes sensores resultou no valor percentual consumido pelos microrganismos presentes no processo. Os sensores utilizados foram do modelo O2-A2 fornecidos pelo fabricante Alpha Sense® (ALPHASENSE, 2009). Usados em conjunto com circuito de amplificação, apresentam sinal variando de 4 mA a 20 mA, sinal padrão industrial (LIPTÁK, 2006; STURM et al. 2008). O sinal varia conforme o percentual de oxigênio se modifica desde 15% até 25%, respectivamente. Com o uso de controladores para a aquisição deste sinal, a resolução foi estabelecida em centésimos de percentual.

Estes sensores funcionam através do processo chamado de bateria metal-ar (ALPHASENSE, 2006), onde a reação de oxidação em um eletrodo metálico gera um sinal elétrico proporcional ao percentual de oxigênio presente no ar.

2.1.2 Sensores de Gás Carbônico

Para a determinação posterior da massa de gás carbônico consumido ou gerado pelos processos, foram utilizados dois sensores, de modo semelhante ao descrito na seção anterior, um instalado na entrada e outro na saída do processo, sendo a diferença entre os resultados o valor de interesse. O modelo GMT 221 fornecido pelo fabricante Vaisala (VAISALA, 2006) funciona através da interferência entre dois feixes de infravermelho de comprimentos de onda ligeiramente diferentes (STURM et al. 2008; MEIJER, 2008). O resultado é gerado através de um sinal padrão de saída de 4 mA a 20 mA, numa faixa de atuação entre 0 e 20% de Gás Carbônico. A resolução deste sinal é de 0,006%, porém o controlador ao qual este é conectado possui uma resolução de 0,01%, desta forma limitando a este último valor.

2.1.3 Sensor de Vazão

Para o cálculo das massas gasosas através dos sinais proporcionais ao percentual presente de cada um dos gases de interesse, é necessária a medição de vazão. O sensor utilizado foi o modelo GFM da Aalborg (AALBORG, 2006). Para esta grandeza foi necessário utilizar dois sensores com faixas de atuação em diferentes escalas, um respondendo na faixa entre 0 e 100 mL/min e outro entre 0 e 200 L/min. Quando do uso em reatores do tipo coluna de Raimbault com volume de 250 mL, o modelo adequado foi o primeiro, pois as vazões usadas seriam muito pequenas frente ao fundo de escala do segundo modelo, o que acarretaria em dificuldades de calibração, bem como o acréscimo de erros nos resultados. Para o uso em reatores do tipo tambor, tanto com capacidade de 2 kg quanto de 10 kg, o modelo com maior escala demonstrou melhor adaptação, principalmente pelas grandes diferenças na necessidade de aeração entre os tipos de reatores. Os sensores funcionam através do princípio de dispersão térmica (STURM et al. 2008; LIPTÁK, 2006). Para minimizar os erros decorrentes de flutuações de pressão, este

sensor utiliza um método de escoamento entre dois capilares, sempre com fluxo laminar, calculando posteriormente o valor de vazão real, levando em conta a lei dos gases ideais e sem a necessidade de medições auxiliares de temperatura antes e depois do sensor, o que seria indispensável considerando que a pressão dos gases sofre variações, seja por condições de bombeamento, seja por mudanças na perda de carga do próprio reator durante o processo. A exatidão deste sensor é de 1,5% no mínimo, frente ao valor de fundo de escala.

2.1.4 Sensor de umidade relativa do ar

Com o intuito de monitorar a variação de umidade relativa do ar, na saída dos processos, foi utilizada uma sonda modelo RHT-DM, fornecida pelo fabricante Novus (NOVUS, 2006), com a condição de medição desde 0 a 100%, com um sinal de saída de 4-20mA, a dois fios, suportando uma temperatura de trabalho entre -20°C e 80°C. A base de funcionamento deste sensor é uma sonda capacitiva, conforme Sturm (2004).

2.1.5 Sensor de temperatura

Para a medição de temperatura e, em alguns processos o seu controle, foi utilizado um sensor do tipo Pt100. Esta escolha foi baseada na grande faixa de utilização deste tipo de sensor, bem como sua rápida resposta associada à grande linearidade (MEIJER, 2008; STURM et al., 2008). Para que se obtenha um sinal, este sensor foi ligado a um controlador modelo N1100 (NOVUS, 2006b), o qual permite a leitura com resolução de um décimo de grau Celsius, com erro máximo de 0,2% da faixa medida.

2.1.6 Suporte para sensores

Os sensores de gás e umidade foram adaptados em um tubo de PVC, de modo que o ar fosse aplicado através do sensor de vazão, passando obrigatoriamente por este tubo. No interior do tubo forma-se uma “atmosfera” com os gases de saída, onde os respectivos sensores medem sua concentração. Para a medição ou controle de temperatura, o Pt100 foi adaptado o mais diretamente

possível em contato com o processo, com o intuito de minimizar eventuais erros. A Figura 1 mostra parte destes sensores instalados no suporte.



FIGURA 1 - SUPORTE PARA OS SENSORES

2.2 CONTROLADORES

Na concepção do sistema como solução para o monitoramento e controle de um bioprocessamento, foi feita a opção pelo uso de controladores de processos, ao invés de indicadores tão somente. Com estes equipamentos torna-se possível atuar nas grandezas quando da necessidade de causar modificações em seus valores a fim de manter o resultado final próximo do pré-determinado. Algumas das variáveis monitoradas não são passíveis de controle, como por exemplo, o consumo de oxigênio, dependente apenas do comportamento do processo. A opção pelos controladores permite, ainda, a substituição e troca de qualquer dos instalados por outro, em caso de sobra de recursos, bem como a menor necessidade de equipamentos de reposição, em termos de modelos e fabricantes diferentes,

padronizando a instalação. O modelo utilizado foi o controlador N1100 da Novus (NOVUS, 2006b). Este modelo permite controlar variáveis pela estratégia PID (Proporcional, Integral e Derivativo), avançada (STURM et al. 2008). Com mostrador indicando, simultaneamente, o valor atual do processo e o pré-determinado, pode facilitar o acompanhamento visual da grandeza pelo usuário. A decisão por este modelo levou em consideração características como a entrada programável, para diversos sinais padrão industriais, facilitando a conexão com os sensores, a saída disponível para atuação tanto como um simples liga-desliga, quanto com sinais analógicos, além da presença, neste caso indispensável, de uma porta de comunicação padrão RS 485, para a conexão em rede dos controladores junto ao programa de supervisão.



FIGURA 2 - PAINEL FRONTAL DOS CONTROLADORES

De modo que se pudesse minimizar o cabeamento entre os controladores conectados neste sistema foi utilizado uma rede industrial baseada no protocolo MODBUS, com nível físico definido pela RS485 (LIPTÁK,2006; STURM et al. 2008b). Nestes controladores é que foram conectados os respectivos sensores.

A Figura 2 mostra o painel frontal dos controladores instalados em suporte portátil para adaptação aos processos.

2.3 BIORREATORES

Para a realização dos experimentos tratados neste trabalho, foram utilizados principalmente três tipos de biorreatores: o tipo coluna de Raimbault para volumes menores e o tipo tambor horizontal para volumes maiores de material sólido e o tipo tanque agitado para processos utilizando microalgas. A Figura 3 mostra o aspecto final do sistema conectado a um reator do tipo coluna, incluindo a adaptação para os sensores, controladores e computador para o sistema de aquisição de dados de forma esquemática.

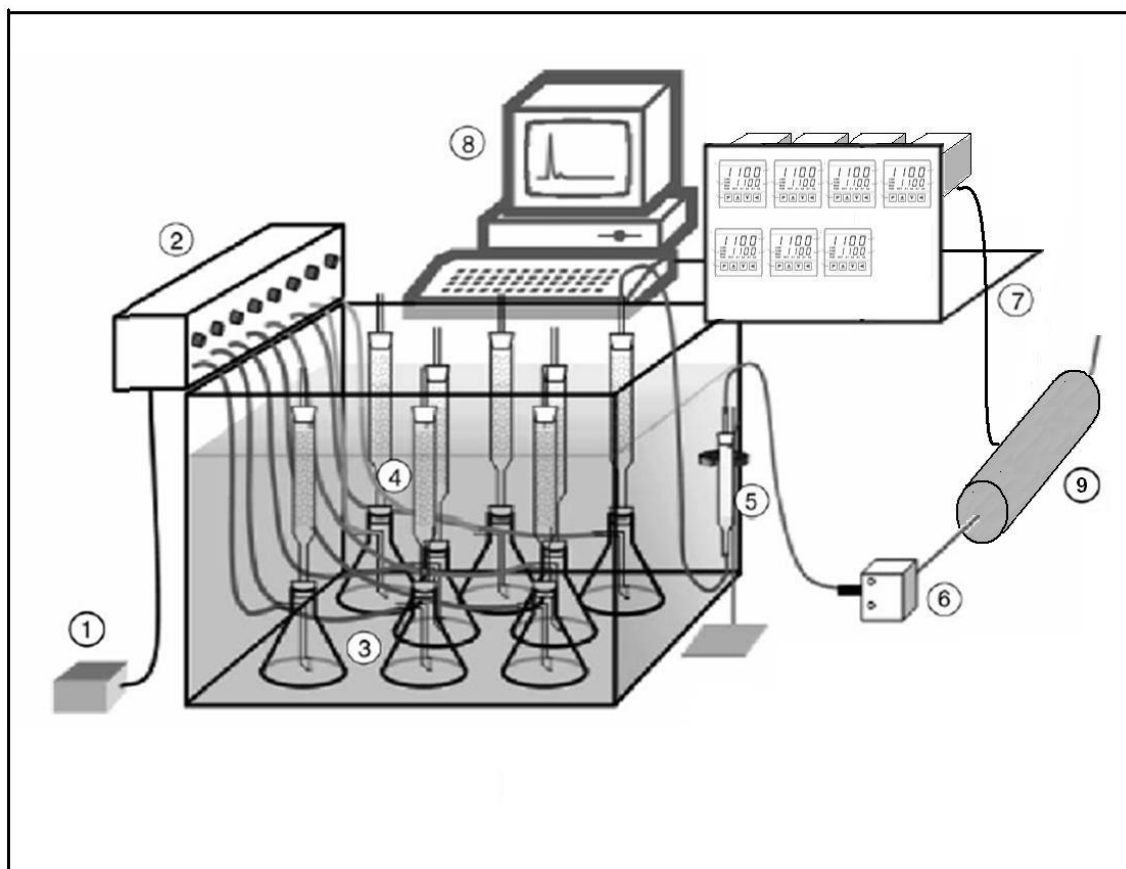


FIGURA 3 - SISTEMA COMPLETO ADAPTADO AO BIORREATOR TIPO COLUNA

FONTE: Adaptado de Carvalho et al. (2006).

Na Figura 3 as indicações numéricas significam: 1) Bomba de ar; 2) Sistema de distribuição de ar; 3) Umidificadores; 4) Colunas de fermentação, imersas em banho de água com temperatura controlada; 5) Filtro; 6) Sensor de vazão; 7) Suporte para os controladores; 8) Computador com sistema de aquisição de dados e controle; 9) Base cilíndrica para adaptação dos sensores de CO₂, O₂, umidade e temperatura dos gases de saída.

2.3.1 Biorreator Tipo Coluna

Para os processos de fermentação em estado sólido, em volumes relativamente pequenos, foi utilizado o reator tipo coluna, descrito por Raimbault e Alazard (1980).



FIGURA 4 - BIORREATOR TIPO COLUNA DE RAIMBAULT

As colunas de vidro com 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento foram acopladas a uma cuba de vidro com água, na qual foram instalados os aquecedores e sensor de temperatura, permitindo manter a temperatura homogênea entre as colunas. Nesta cuba podem ser instaladas até oito colunas, com a possibilidade de

retirada individual, sem que haja perturbações nas colunas restantes no processo. A Figura 4 mostra o aspecto final da montagem.

2.3.2 Biorreator Tipo Tambor Horizontal

Para os processos onde foi necessário uma capacidade maior de material sólido, até a ordem de 10 kg, foram utilizados biorreatores do tipo Tambor Horizontal, com a possibilidade de agitador interno para movimentação do material durante o processo de fermentação, bem como a presença de entradas e saídas para a circulação de gases (PANDEY et al. 2001). Devido ao maior volume gasoso também foi utilizado um compressor de ar, de modo a manter a vazão na ordem de grandeza necessária. O biorreator tinha sempre o mesmo volume, o que mudava era a quantidade de suporte/substrato empregado, com diferentes alturas de leito. Neste caso reatores com diferentes quantidades de substrato e respectivas diferenças na altura do leito foram utilizados, dependendo do processo em estudo.

2.3.3 Biorreator Tipo Tanque Agitado

Nos processos envolvendo o estudo de crescimento e demais variáveis em microalgas, o reator utilizado foi do tipo Tanque Agitado (ROUSSOS et al. 2003). Neste caso o crescimento do microrganismo se dá em meio líquido, diferindo neste quesito dos anteriores. Da mesma forma, porém, os gases de entrada e saída foram medidos juntamente com o valor de vazão, de modo a permitir o cálculo das massas gasosas envolvidas no metabolismo das microalgas.

2.4 DISCUSSÃO SOBRE OS RECURSOS UTILIZADOS

Para o desenvolvimento dos experimentos, os recursos disponíveis foram suficientes e as especificações dos sensores estiveram dentro das tolerâncias necessárias, haja vista que tanto a faixa de atuação, quanto a resolução se mostraram aceitáveis e sempre superiores às necessidades das grandezas durante os experimentos. A única exceção foi em relação ao sensor de vazão, no caso do seu uso em vazões muito próximas do valor mínimo da escala, apresentando

desvios especificados na mesma ordem de grandeza da vazão necessária. Neste caso a aquisição de sensores com outras faixas de aplicação será necessária.

Para o caso de se utilizar o sistema para outros processos foi feita a especificação e instalação de sensores e controladores para outras grandezas, não somente as utilizadas com mais frequência nos processos fermentativos. Assim, sensores de umidade relativa do ar e temperatura de saída, incluindo os respectivos controladores, estão disponíveis para uso. Com o intuito de abranger futuras necessidades, ou se adequar a outros processos, estes recursos podem ser alterados ou substituídos, de acordo com os requisitos do experimento.

A escolha dos sensores de oxigênio mostrou-se adequada, principalmente sob o ponto de vista de investimento inicial comparado com os recursos disponíveis. O sensor utilizado é eletroquímico, cujo investimento foi de US\$ 100,00 por peça, comparando-se diretamente com sensores de funcionamento baseado em infravermelho, cujo investimento seria na ordem de US\$ 1200,00 por peça, foi feita a escolha. Em trabalhos futuros a utilização de outros sensores com outras bases de funcionamento podem ser passíveis de teste, devido ao tempo de vida útil em sensores do tipo eletroquímico, determinado em cerca de dois anos no modelo adquirido.

2.5 CONCLUSÃO DESTE CAPÍTULO

Devido à concepção inicial do sistema como um todo, este se mostrou portátil e adaptável a diversos reatores, assim os processos puderam ser monitorados mesmo em escalas diferentes, bem como em reatores cuja base de funcionamento é bastante diferente. Desde pequenas colunas até reatores com vários quilogramas de material, o resultado foi obtido sem que fosse necessária grande alteração, exceto no caso do sensor de vazão. Para colunas de Raimbault as vazões utilizadas foram da ordem de 60mL/min, enquanto que para reatores do tipo tambor horizontal esta grandeza passou para a ordem de até 10L/min, neste caso sendo necessária a troca de sensores para adequação de faixa de utilização. Desta forma, o sistema mostrou-se bastante versátil, qualidade indispensável diante da grande variedade de processos e reatores utilizados nos estudos biotecnológicos.

A sobra de recursos iniciais, como grandezas monitoráveis e número expansível de controladores, foi administrada com o intuito de dar maior longevidade à utilização do sistema. Considerando que haja uma evolução constante e aumento gradativo de necessidades, que poderiam não ser previsíveis logo no início da especificação de recursos, a solução técnica mostra flexibilidade suficiente para melhor atender a estas possíveis necessidades. Esta decisão mostrou-se importante quando da análise de consumo de oxigênio medido nos processos de microalgas e também no cultivo de células vegetais, pois seu resultado apresentou dependência do valor de umidade relativa, o qual já estava sendo previamente medido. A disponibilidade do sensor de umidade permitiu a correção dos desvios nas medições de oxigênio.

Ainda nesta mesma linha de raciocínio, todos os sensores e controladores foram especificados para uso com sinais elétricos padrão dentro das aplicações industriais, permitindo, desta forma, a sua adaptação com outros sistemas, bem como a modificação de escala, passando por plantas piloto até industriais. A escolha de sinais padrão também traz a vantagem de substituição de sensores por outros modelos e, até mesmo, de outros fabricantes, sem necessidade de troca de controladores, por serem disponíveis numa vasta gama de produtos comerciais e fabricantes diferentes.

3 DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE SOFTWARE APLICADAS AOS PROCESSOS

Este capítulo descreve os procedimentos adotados para o desenvolvimento do Programa de Computador para Cálculo e Análise dos Parâmetros determinantes nos processos fermentativos, FERSOL2. Os principais parâmetros gerados por este programa, fundamentais para o entendimento do processo fermentativo, são os valores da velocidade específica de crescimento, coeficiente de manutenção, e rendimento do processo. Através dos gráficos gerados é possível realizar outras análises como, por exemplo, a duração da fase lag.

Após a breve descrição dos métodos utilizados é feita uma discussão sobre os resultados obtidos, seja por observação direta ou por comparação com os resultados de outro programa mais antigo, Fersol (Rodriguez Leon et al, 1988). Este capítulo pretende, ainda, demonstrar o uso e resultados obtidos paralelamente com o sistema de aquisição de dados, o qual pode ser utilizado de forma independente da necessidade de processamento para obtenção de estimativa de biomassa. Os resultados com base em processos de produção que utilizam diversos microrganismos são expostos, seguidos de comentários relacionados ao desempenho do sistema frente aos resultados esperados com base teórica, nos capítulos seguintes.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os recursos utilizados, os equipamentos e ferramentas computacionais. Uma descrição dos métodos matemáticos escolhidos, e sua motivação, é exposta com o intuito de esclarecer sua escolha.

3.1.1 Recursos Utilizados

Como base para o desenvolvimento deste projeto, foi tomado o software Fersol, desenvolvido em 1987, utilizando a metodologia apresentada por Rodriguez Leon et al, 1988. Esta ferramenta foi criada para uso em sistema operacional DOS da Microsoft®. Atualmente os equipamentos de informática proporcionam maior

disponibilidade de espaço em memória e, principalmente, em capacidade de processamento, os quais foram levados em consideração quando da tomada de decisão sobre a escolha da plataforma de programação. O código do antigo programa não pôde ser lido devido à perda dos arquivos gravados em meios magnéticos já obsoletos. Devido a esta perda, os algoritmos foram todos elaborados com base nas técnicas mais atuais, mantendo apenas algumas das funções usadas na versão anterior.

Após análise de disponibilidade, investimento e longevidade, que em informática e computação se traduz em tempo de obsolescência, optou-se pelo uso de programação na linguagem C Sharp, dentro da plataforma DotNet® da Microsoft®. Esta escolha levou em consideração a atualização dos recursos, a possibilidade de uso deste programa em sistema operacional Windows e também em Linux, com o intuito de atender melhor as instituições e usuários, tornando-o menos dependente do sistema operacional em uso. Como outros recursos avaliados na escolha podem ser citados: velocidade na implementação, grau de dependência do sistema operacional, facilidade de obter programadores habilitados, flexibilidade de programação por ser orientada a objeto e intensidade de uso da CPU (STURM et al. 2008b).

3.1.2 Estrutura do Programa FERSOL2

Após análise dos requisitos para o adequado funcionamento do programa, foi determinada a estrutura deste, visando a facilidade de entrada de dados, incluindo a compatibilidade com o programa de aquisição de dados, as etapas de processamento e finalmente a forma de apresentação de resultados e arquivos de saída de dados. Estes recursos foram implementados de modo que o FERSOL2 fosse mais compatível com outros programas comerciais, bem como para torná-lo mais amigável por parte dos pesquisadores usuários.

3.1.2.1 Dados de entrada

Os dados necessários de entrada, para o posterior processamento e geração de resultados são: biomassa medida inicial e final, valor do intervalo de tempo entre

as medições, Δt , e a sequência de valores de consumo de oxigênio, em gramas, ou consumo de substrato, para o caso de fermentação submersa.

No início do processo de entrada de dados, o usuário deve decidir entre fermentação em estado sólido ou submersa. Os valores de biomassa inicial e final são indispensáveis nesta versão, porém é possível que sejam informadas biomassas intermediárias e, neste caso, o usuário deve decidir qual o percentual de erro máximo permitido na aproximação das estimativas pelo programa.

Para facilitar o uso é possível digitar os valores diretamente na interface de entrada ou abrir arquivo externo já gravado. Este recurso permite inserir diretamente valores já armazenados em arquivos de formato txt, compatível com MS Word® e csv compatível com MS Excel® e outros programas comerciais e de código aberto.

3.1.2.2 Sequência de Processamento

Depois de feita a entrada de dados o programa cria automaticamente a curva de crescimento de biomassa, de acordo com método descrito à frente na seção 3.1.4.2. Este método permite estimar o próximo valor de biomassa com base no valor anterior, no consumo de oxigênio e no valor do coeficiente de manutenção inicial que, para o início do processo iterativo de ajuste é considerado um valor desprezível. Após finalizada a sequência de estimativa de biomassa é feita uma comparação entre o valor final estimado e o valor final medido já informado como dado de entrada. Através de processo iterativo é feito o ajuste desta curva pela variação do coeficiente de manutenção até que os valores inicial e final estejam próximos o suficiente, condição determinada pelo erro percentual máximo informado pelo usuário. Os critérios de parada para o método iterativo são o erro percentual máximo entre as biomassas e o número máximo de iterações, ambos ajustáveis pelo usuário.

Quando a curva de estimativa de crescimento da biomassa já está ajustada, é gerada a curva logarítmica de crescimento da biomassa. Sobre esta curva logarítmica são localizados automaticamente o primeiro e o último ponto de linearidade, os quais determinam a fase logarítmica de crescimento da biomassa e a região onde a maioria dos parâmetros é calculada. O critério de parada para a

determinação da região linear é ajustado inicialmente para um desvio padrão, porém este valor pode ser modificado pelo usuário de acordo com a necessidade e também com relação ao grau de não-linearidade da curva gerada. Para auxiliar nesta tarefa o programa gera gráficos, tanto da biomassa quanto da curva logarítmica, permitindo uma localização aproximada visualmente. Com base na curva logarítmica e na sua região linear os parâmetros do processo são calculados, como a velocidade específica de crescimento, μ , o valor de produção $Y_{x/o}$ e o coeficiente final de manutenção, m .

3.1.2.3 Dados de saída

O programa FERSOL2 permite a gravação de todos os testes e experimentos, para posterior uso. Como dados de saída, são gerados gráficos, valores em forma de tabela tanto de oxigênio consumido quanto de biomassa estimada, valores dos parâmetros do processo, μ , $Y_{x/o}$ e m , primeiro e último pontos de linearidade e método de filtragem de dados quando aplicável.

Para permitir novas avaliações posteriores, são gerados arquivos gravados em formato txt e csv, conforme citados anteriormente.

3.1.3 Métodos Matemáticos

Existem diversas publicações indicando métodos para determinar a velocidade específica de crescimento (μ), parâmetro chave para o entendimento de qualquer processo fermentativo ou de crescimento celular, como por exemplo: medições diretas por contagem celular, com agitação da amostra no caso de bactérias e leveduras (CHRISTEN et al, 1994), estimativas indiretas da biomassa através da análise do teor de proteína ou de outro constituinte celular do microrganismo empregado (RAIMBAULT, 1981; OKASAKI et al., 1980) e medições da quantidade de oxigênio consumido e do gás carbônico produzido (NISHIO et al., 1979; KOBAYASHI et al., 1986). Este último método demonstra ser o mais indicado para a estimativa da velocidade específica de crescimento (μ) nos processos em estado sólido, a partir da velocidade de consumo de oxigênio ou produção de gás carbônico, pois o estado fisiológico do microrganismo e o estado físico-químico do sistema não se alteram pelo manuseio das amostras e, ainda, as medições do

consumo e produção destes gases representam o comportamento global do sistema, minimizando eventuais imprecisões de amostragem de um sistema heterogêneo como no caso da Fermentação em Estado Sólido. Este método vem sendo utilizado nos últimos anos e tem permitido o acúmulo e processamento dos dados nos sistemas de Fermentação em Estado Sólido (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008; SPIER et al., 2009; SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; AURIA et al., 1990).

Através da entrada de uma lista dos valores de oxigênio consumido, diretamente pela interface do programa ou gravado em arquivo, o programa avalia os resultados iniciais e finais do desenvolvimento da biomassa, ajustando a curva de oxigênio através de métodos numéricos, para a resolução numérica das equações diferenciais e das integrais que descrevem os balanços de materiais inerentes aos processos fermentativos. Caso haja algum valor indicativo de erro, é possível aplicar uma filtragem por Transformada de Fourier, Média Móvel e Savitzky-Golay (CERQUEIRA et al., 2000), retirando os valores que podem ser provenientes de falhas de medição ou, ainda, ruídos de natureza elétrica, antes da realização dos cálculos e estimativas.

Existe a necessidade de se considerar diversos critérios sobre a escolha e uso do método de filtragem, pois, se algumas condições não estiverem bem determinadas, o resultado poderia descaracterizar o gráfico de entrada, gerando erros pela eliminação de valores que deveriam ser considerados úteis, impedindo a reconstrução da curva verdadeira (CERQUEIRA et al., 2000).

Além de determinar a velocidade específica de crescimento (μ) o programa permite estimar parâmetros biotecnológicos importantes como os coeficientes de rendimento em relação ao consumo de oxigênio (Y_{xo}) e de manutenção (m) da cepa empregada (SATO et al., 1983; RODRÍGUEZ LEÓN et al., 1988). Os cálculos e o programa desenvolvido servem também para o processamento de dados dos processos de fermentação submersa (RODRÍGUEZ LEÓN et al., 2003).

3.1.4 Métodos Numéricos Utilizados em Cada Etapa

O programa utiliza em cada fase de cálculo o método que demonstrou maior adequação à natureza dos problemas de acordo com as descrições que seguem.

3.1.4.1 Cálculo das integrais relacionadas aos processos

As funções que representam o comportamento dos processos de fermentação são, em geral, utilizadas em notação de derivadas, seja em relação ao tempo ou em relação a outras grandezas, como, por exemplo, a biomassa. Desta forma a solução pode passar pelo processo de integração destas funções como demonstrado em PANDEY et al., 2001.

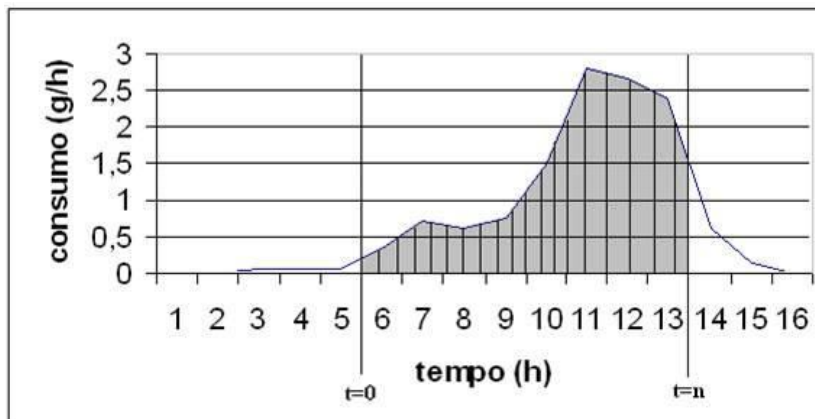


FIGURA 5 - INDICAÇÃO DE ÁREA DE INTEGRAÇÃO

Para o cálculo da integral indicada na Equação (1), que representa o consumo total de oxigênio pelo processo, foi utilizado o método da regra do trapézio (ETTER e INGBER, 2007), pois se trata de uma solução das mais usuais em problemas de engenharia, haja vista que os valores de oxigênio foram medidos em intervalos iguais de tempo, ou seja, tornam-se uma sequência de diferenças numéricas nestes intervalos, permitindo o uso do método. A Figura 5 mostra um exemplo indicando a área a ser integrada pelo método.

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{dO_2}{dt} dt \quad (1)$$

A Figura 6 mostra um exemplo de como foram determinados os limites dos trapézios utilizados neste método de integração.

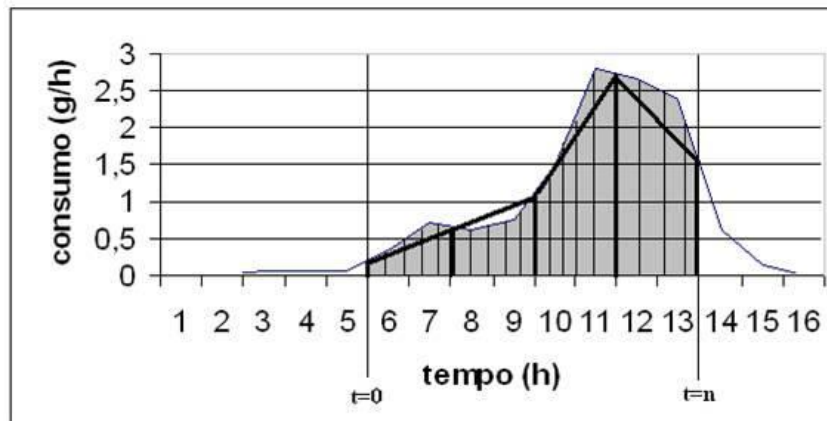


FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DOS TRAPÉZIOS

Deve-se considerar que os intervalos de tempo tomados pelo sistema de aquisição de dados, descrito na seção 3.3, sejam pequenos o suficiente para que não haja qualquer variação significativa no comportamento do processo, de modo que este método seja suficientemente exato.

3.1.4.2 Método iterativo para ajuste da curva de crescimento da biomassa

Conforme Pandey et al. (2008) o equilíbrio fisiológico de consumo de oxigênio é composto da seguinte forma: o valor total consumido é a soma da massa de oxigênio empregado na produção da biomassa com a massa empregada nos processos endógenos. Assim, parte desta massa é empregada na reprodução das células e parte para a sua manutenção. Este balanço de massas pode ser representado pela Equação (2) abaixo:

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{\Delta O_2 \text{reprodução}}{\Delta t} + \frac{\Delta O_2 \text{manutenção}}{\Delta t} \quad (2)$$

Considerando termos mais diretamente relacionados à cinética do processo a equação pode ser escrita (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008):

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \frac{\Delta X}{\Delta t} + mX \quad (3)$$

Através da integração de ambos os membros desta equação é possível extrair o termo referente à biomassa X , ou seja, ΔX como $(X_n - X_0)$, onde X_n representa a biomassa num determinado tempo e X_0 a biomassa medida no início do processo. Isolando e reagrupando os demais termos a função pode ser rerepresentada como na Equação (4) abaixo.

A curva de crescimento da biomassa é estimada através dos valores de entrada de consumo de oxigênio, de modo que o valor seguinte é gerado com a utilização do resultado da iteração anterior conforme Sturm et al. (2008b). Desta forma a função gerada é contínua, ou seja, não há um valor onde esta não esteja definida em todo o tempo de duração do processo. Esta função é apresentada segundo Pandey et al. (2001) como exposta na Equação (4), na qual, para facilitar sua leitura, foi inserido o termo indicado como $a = m \cdot Y_{x/o} \cdot \Delta t$ e onde X_n representa o valor de biomassa estimado em cada valor de tempo, X_0 o valor inicial desta e $Y_{x/o}$ o coeficiente de rendimento biomassa por oxigênio.

$$X_n = \frac{\left\langle Y_{x/o} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right\} + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right\rangle}{\left(1 + \frac{a}{2} \right)} \quad (4)$$

Em se tratando de uma função contínua, e levando em conta o fato de que a variação do coeficiente de manutenção (m) gera uma mudança nos valores subsequentes, o método usado para ajuste da curva aos valores medidos foi o da Bisseção (BASSANEZI, 2002). Assim, após um ciclo completo de repetição da função, o valor final de biomassa estimada é comparado ao valor medido de biomassa, caso esta diferença não esteja dentro de um intervalo pré-determinado de tolerância, o ciclo se repete com um novo valor arbitrado para o coeficiente de manutenção (m). O número arbitrado para (m) estará no ponto médio entre as iterações anteriores, assim o resultado tende a oscilar em torno do valor final de biomassa, com um grau de convergência bastante rápido para a função aqui tratada. Cabe lembrar que o valor de $Y_{x/o}$ não foi utilizado no método iterativo por ter

sido determinado pelos valores experimentais totais de biomassa e oxigênio consumido.

Existe a possibilidade de entrada de dados com valores intermediários de biomassa medida, pois este procedimento depende do processo a ser analisado com o programa. Os valores intermediários são tratados pelo mesmo método, porém com intervalos menores contendo o valor estimado anterior e o novo valor medido.

3.1.4.3 Filtragem dos dados de entrada

Para que o usuário possa filtrar os dados de entrada de consumo de oxigênio, foram incluídos três métodos diferentes, Transformada de Fourier, Média Móvel e Savitzky-Golay. Esta variedade tem o objetivo de permitir que o pesquisador retire dados que não estão diretamente relacionados com o comportamento do processo em estudo, ou seja, alguns pontos podem ser considerados como “outliers” (pontos espúrios que podem ser causados por ruído ou interferência), ou “pontos fora da curva” (CERQUEIRA et al. 2000). Estes dados podem ser gerados por erros de medição, ruídos provenientes da rede elétrica, variações no andamento do processo de ordem prática ou manual, entre outros. Cada um dos filtros será explicado nas seções seguintes.

3.1.4.4 Filtragem por Transformada de Fourier

A filtragem pela Transformada de Fourier consiste na aplicação desta transformada, indicada na Equação (5), ao gráfico que representa os valores experimentais. Este procedimento gera o equivalente do gráfico no chamado domínio das freqüências, ou seja, o espectro de freqüências $F(w)$ (BRACEWELL, 2000).

$$F(w) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\lambda) e^{i\lambda w} d\lambda \quad (5)$$

Onde λ representa o comprimento de onda, relacionado à freqüência, e w é a própria freqüência do sinal que, anteriormente, poderia ser representado como $F(x)$ onde x seria o tempo. Depois de obtido o gráfico em função das freqüências, é aplicado um filtro passa-baixa, este filtro corta as regiões da curva que resultaram

em altas frequências, normalmente geradas por ruídos provenientes dos instrumentos (CERQUEIRA et al., 2000). Para retornar ao chamado domínio do tempo é aplicada a transformada inversa de Fourier, dada pela Equação (6), resultando no gráfico original, porém retirados os pontos considerados fora da curva.

$$F(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(w)e^{-i\lambda w} dw \quad (6)$$

3.1.4.5 Filtragem por Média Móvel

Conforme Hellerstein et al. (2004), em sistemas computacionais, geralmente os pontos fora da curva apresentam valores em torno da média geral dos dados coletados experimentalmente. Desta forma, o filtro por média móvel utiliza o resultado da média aritmética dos valores da vizinhança do ponto fora da curva como novo resultado, ou seja, o ponto é substituído pelo valor da média entre os pontos laterais, normalmente avaliados dentro de um intervalo pré-determinado, formado por um número ímpar de pontos (CERQUEIRA et al., 2000). Embora seja um método relativamente simples de implementar, não gera um bom resultado quando aplicado a gráficos que apresentam picos muito estreitos, pela perda da relação com o gráfico original devida a distorções.

3.1.4.6 Filtragem por Savitzky-Golay

De acordo com Rosenthal e Gilliam (2003), o filtro de Savitzky-Golay é bastante utilizado em sistemas de espectrometria e pouco conhecido em outras áreas. Este método suaviza o gráfico, retirando possíveis pontos espúrios, através da substituição destes por outros estimados por um polinômio que interpola um determinado intervalo em torno do “outlier”. A interpolação é geralmente feita pelo método dos mínimos quadrados e o resultado é bastante superior ao obtido pela média móvel, pois cada região do gráfico é analisada por uma função que considera todos os pontos e as respectivas tendências de comportamento.

3.1.5 Cálculo dos Parâmetros do Processo

O programa FERSOL2 calcula os parâmetros do processo depois de determinados os valores relacionados aos totais de biomassa produzida e oxigênio consumido, bem como a curva logarítmica da biomassa. Para o cálculo do valor da velocidade específica de crescimento foi utilizada a relação (7) indicada a seguir:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

Reagrupando os elementos:

$$\mu \cdot dt = \frac{dX}{X} \quad (8)$$

Integrando ambos os membros:

$$\int_{t_i}^{t_f} \mu \cdot dt = \int_{X_i}^{X_f} \frac{dX}{X} \quad (9)$$

O resultado da equação final (10) será:

$$\mu(t_f - t_i) = \ln(X_f) - \ln(X_i) \quad (10)$$

Da equação (10) é isolado o valor da velocidade específica, onde:

t_f = Último ponto de linearidade da curva logarítmica de biomassa;

t_i = Primeiro ponto de linearidade da curva logarítmica de biomassa;

X_f = Respective valor de biomassa na curva logarítmica ao valor de t_f ;

X_i = Respective valor de biomassa na curva logarítmica ao valor de t_i ;

Para a determinação do valor do coeficiente de manutenção, foi utilizada a equação (3) rerepresentada abaixo para facilitar a leitura:

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \frac{\Delta X}{\Delta t} + mX \quad (3)$$

Isolando m tem-se a equação (11):

$$m = \frac{\frac{\Delta O_2}{\Delta t} - \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{\Delta X}{\Delta t}}{X} \quad (11)$$

Para o cálculo da produção de biomassa por oxigênio consumido a equação (12) foi utilizada após determinados seus valores totais:

$$Y_{x/o} = \frac{X_f - X_i}{O2_{cons}} \quad (12)$$

Onde:

X_f = Biomassa final em gramas;

X_i = Biomassa inicial em gramas;

$O2_{cons}$ = Quantidade total de oxigênio consumido em gramas.

Estes são os principais parâmetros apresentados como resultados de saída do programa, de modo que se possa caracterizar e acompanhar o andamento de um processo fermentativo.

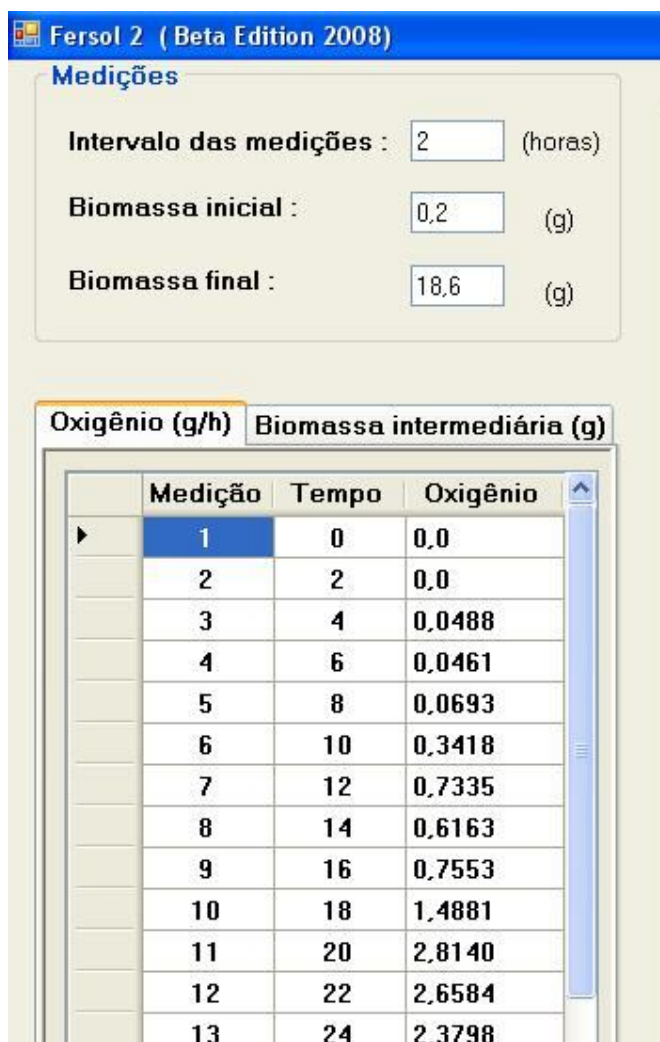
3.2 IMPLEMENTAÇÃO DO SOFTWARE FERSOL2

Esta seção expõe as atividades relacionadas ao projeto do programa, bem como da interface deste, demonstrando a nova interface gráfica e os recursos apresentados.

3.2.1 Desenho da Interface Principal

Utilizando os recursos gráficos da linguagem de programação escolhida, foi desenhada a interface principal do novo programa, a Figura 7 mostra a parte desta interface onde os dados iniciais são inseridos. Como requisito básico, esta nova interface permite a visualização de todos os principais parâmetros calculados, bem como indicação de qualquer alteração, com os parâmetros apresentados na mesma tela. Isto foi feito de modo que não haja perdas de informação quando o número total de leituras ultrapassa um determinado limite imposto de linhas em cada tela,

como acontecia no passado em programas para DOS®. Nesta mesma tela é possível abrir, salvar, alterar e exibir propriedades de cada arquivo de leituras, os arquivos de entrada e de saída podem ser salvos como arquivo de texto ou como arquivo CSV (*comma separated values*) de acordo com a necessidade do usuário, permitindo sua abertura para análise em outros programas como no Microsoft Excel, por exemplo.



Medição	Tempo	Oxigênio
1	0	0,0
2	2	0,0
3	4	0,0488
4	6	0,0461
5	8	0,0693
6	10	0,3418
7	12	0,7335
8	14	0,6163
9	16	0,7553
10	18	1,4881
11	20	2,8140
12	22	2,6584
13	24	2.3798

FIGURA 7 – INTERFACE DE ENTRADA DE DADOS

A Figura 8 mostra um exemplo de valores dos parâmetros calculados, já com uma breve explicação do significado de cada um.

Além destas interfaces parciais, o programa permite a visualização de todos os valores estimados de biomassa, incluindo a possibilidade de criação de gráficos,

tanto dos valores de entrada quanto dos resultantes de seu processamento, como crescimento da biomassa e seu equivalente logarítmico.

<p>VELOCIDADE ESPECÍFICA (μ): É a velocidade específica da região linear [1/h];</p> <p>COEFICIENTE DE MANUTENÇÃO (m): É o coeficiente de manutenção de todo o processo [g Oxigênio/(g Biomassa x h)];</p> <p>PRIMEIRO PONTO DE LINEARIDADE : É o ponto onde começa a região linear;</p> <p>ÚLTIMO PONTO DE LINEARIDADE : É o ponto onde termina a região linear;</p> <p>COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R^2): É o coeficiente de explicação da região linear da curva de biomassa logarítmica.</p>																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parâmetro</th> <th>Resultado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>▶ Coeficiente de rendimento</td> <td>0,72459</td> </tr> <tr> <td>Velocidade específica (μ)</td> <td>0,20071</td> </tr> <tr> <td>Coeficiente de manutenção (m)</td> <td>0,04907</td> </tr> <tr> <td>Primeiro ponto de linearidade</td> <td>Tempo após 2 horas</td> </tr> <tr> <td>Último ponto de linearidade</td> <td>Tempo após 28 horas</td> </tr> <tr> <td>Coeficiente de determinação (R^2)</td> <td>0,97655</td> </tr> <tr> <td>Filtragem</td> <td>Nenhum</td> </tr> </tbody> </table>	Parâmetro	Resultado	▶ Coeficiente de rendimento	0,72459	Velocidade específica (μ)	0,20071	Coeficiente de manutenção (m)	0,04907	Primeiro ponto de linearidade	Tempo após 2 horas	Último ponto de linearidade	Tempo após 28 horas	Coeficiente de determinação (R^2)	0,97655	Filtragem	Nenhum
Parâmetro	Resultado																
▶ Coeficiente de rendimento	0,72459																
Velocidade específica (μ)	0,20071																
Coeficiente de manutenção (m)	0,04907																
Primeiro ponto de linearidade	Tempo após 2 horas																
Último ponto de linearidade	Tempo após 28 horas																
Coeficiente de determinação (R^2)	0,97655																
Filtragem	Nenhum																

FIGURA 8 – INTERFACE PARCIAL DE APRESENTAÇÃO DE PARÂMETROS

3.2.2 Biblioteca Gráfica

Durante o desenvolvimento do atual projeto, foi pesquisada uma nova biblioteca gráfica, além da oferecida pela Linguagem C Sharp®, pois esta demonstrava também algumas limitações quanto à transferência para outros programas externos, os quais já foram resolvidos e estão completamente funcionais na versão atual do programa. Estes gráficos podem ser abertos em uma nova janela, permitindo que sejam transferidos para outros programas como Excel, Word e outros, facilitando a geração de documentação, relatórios e publicação dos resultados obtidos, conforme exemplo exposto na Figura 9, onde está mostrada a curva de entrada de oxigênio e, sobreposta a esta, a mesma sequência já filtrada, facilitando a análise dos resultados. Além do gráfico dos valores de entrada, o

programa permite gerar gráficos de diversos parâmetros cruciais para a análise do processo como um todo, como a evolução da biomassa diretamente ou em forma logarítmica.

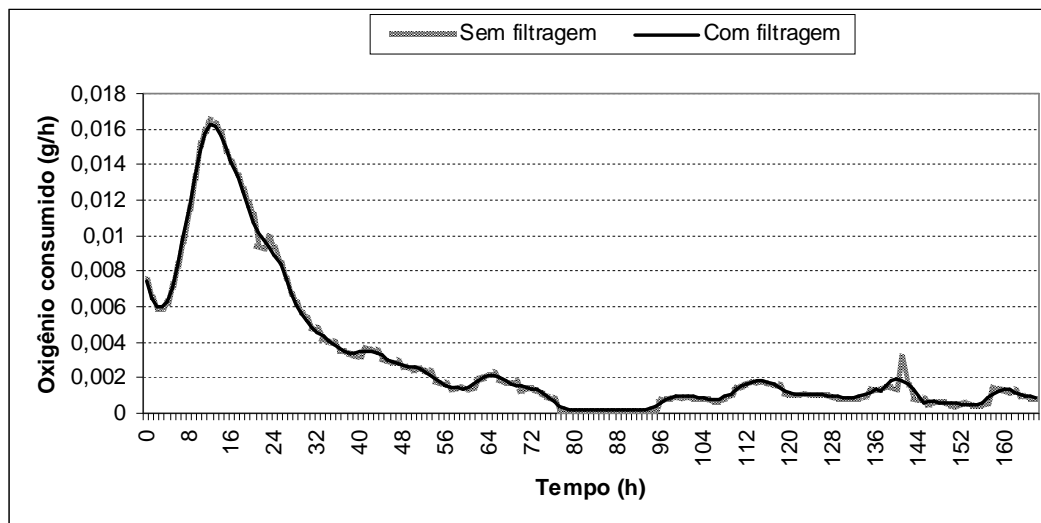


FIGURA 9 - EXEMPLO DE GRÁFICO GERADO PELO PROGRAMA

Os recursos apresentados pelos novos gráficos como variação nas escalas, por exemplo, serão úteis para análise posterior dos resultados, bem como estimativas de comportamento do processo.

3.3 IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Esta seção mostra o desenvolvimento do programa para aquisição de dados, através de rede industrial, Modbus (STURM et al. 2008) e uso de plataforma de desenvolvimento Laquis® (LCDS, 2009).

3.3.1 Determinação das variáveis de entrada

De acordo com os sensores especificados para o sistema de aquisição, as variáveis foram escolhidas de forma que permitisse sua utilização em uma variedade mais ampla de processos (STURM et al. 2008). Cada sensor foi conectado a um controlador de processos, que por sua vez foi ligado à rede de comunicação que leva os sinais ao microcomputador com o programa de aquisição. Para verificação da respirometria foi utilizado um sensor de vazão, dois sensores de

percentual de oxigênio, sendo um na entrada do biorreator e outro na saída, e um de gás carbônico. Sensores de umidade relativa e temperatura também compõem o sistema de forma auxiliar.

3.3.2 Gravação de valores

As variações dos percentuais de consumo de oxigênio, ou produção, bem como de gás carbônico não sofrem variações expressivas em pequenos intervalos de tempo (PANDEY et al. 2001), assim o programa foi ajustado, praticamente para todos os processos testados, para uma nova aquisição e gravação de valores a cada quinze minutos, o que demonstrou ser mais do que o suficiente para análise do comportamento do processo em estudo.

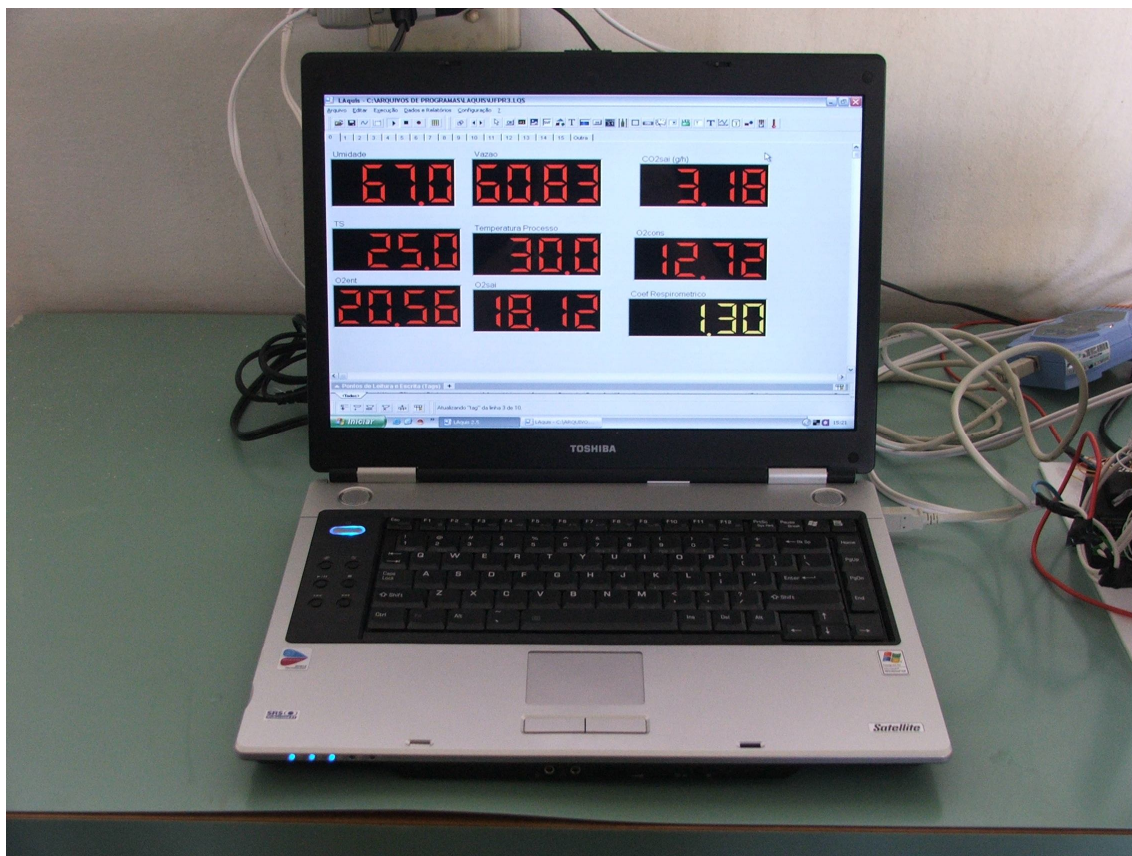


FIGURA 10 – INTERFACE DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Para um acompanhamento mais adequado, uma variável virtual foi criada para demonstrar o valor, em tempo real, do coeficiente respirométrico, ou seja, a taxa de consumo de oxigênio dividida pela taxa de produção de gás carbônico,

quando do uso do sistema para um processo típico de cultivo aeróbio. O programa Laquis[®] permite a gravação de todos os valores e sua recuperação pode ser exportada para outros programas como, por exemplo, Excel ou Word.

3.3.3 Interface de demonstração dos valores atuais

A Figura 10 mostra a interface do software de aquisição de dados, já com a identificação de cada variável medida, sendo processada pelo microcomputador ligado à rede de comunicação.

Os valores gravados por este programa foram aplicados diretamente no FERSOL2, cujos parâmetros foram tratados em seção anterior.

3.4 CONCLUSÃO DESTE CAPÍTULO

A utilização da plataforma de programação DOTNET da Microsoft[®] demonstrou versatilidade adequada para a solução dos problemas que se apresentaram durante o desenvolvimento do programa.

O novo programa demonstrou um grau de convergência bastante superior ao antigo, que serviu como base inicial de comparação, mas devido à maior velocidade de processamento, o programa atual é capaz de realizar milhares de iterações a mais que o antigo, porém em menos tempo, neste sentido o programa antigo permitia até 200 iterações, enquanto que o FERSOL2 é ajustado inicialmente para 100.000 iterações. Para a realização de 200 iterações o programa antigo consome cerca de três segundos, a versão atual realiza seu total de iterações em tempo menor que um segundo, mensurável apenas pela estimativa dada pelo processamento. Os limites mais abrangentes do sistema atual permitem que os critérios de parada dos métodos repetitivos possam ser mais rigorosos, gerando graus de aproximação entre valores esperados e obtidos bem mais precisos (THISTED, 1988). Apenas como exemplo, foi executado um experimento com o programa antigo e o mesmo grupo de dados foi aplicado ao FERSOL2, o resultado de biomassa final teve um erro de ajuste de 0,13% para o programa antigo e 0,001% para o atual, corroborando com as afirmações anteriores.

A versão do programa utilizado como base, Fersol, apresentava limitações quanto à geração de gráficos, principalmente quanto à resolução e escalas,

dificultando a sua análise e, ainda, era impossível transferir estes gráficos para outros recursos externos ao programa. Conforme discutido em seção anterior, a geração de gráficos com melhor resolução permite tirar melhores conclusões quanto aos resultados que estes representam. O uso de nova biblioteca gráfica criou a possibilidade de cópia para a área de transferência, ou seja, permite que estes gráficos sejam copiados para dentro de outros programas, gerando maior praticidade na divulgação de resultados obtidos com o auxílio deste software, bem como geração de tabelas diretamente dos gráficos, para análise por outros métodos.

Os resultados numéricos e seus gráficos associados serão demonstrados e discutidos nas próximas seções, quando da exposição do desempenho do sistema, como um todo, para a análise de diversos processos.

4 APLICAÇÃO DA FERRAMENTA EM PROCESSO COM BACTÉRIA

Este capítulo visa apresentar os resultados da aplicação do sistema de aquisição de dados, juntamente com o programa FERSOL2, num processo que utiliza como microrganismo a bactéria *Xanthomonas campestris* para produção de goma xantana, através de FES. Apresenta também os resultados em forma de tabelas e gráficos do desempenho do programa comparado à técnica experimental de avaliação de biomassa.

4.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

A goma xantana, um polissacarídeo de valor comercial devido a suas excelentes propriedades reológicas conforme Lima *et al.* (2001), incluindo sua estabilidade à temperatura e compatibilidade com vários ingredientes que compõem alimentos, possui grande utilização na indústria, sendo usada principalmente como estabilizante, emulsionante e espessante (MAUGERI FILHO, 2001). Este produto é considerado atóxico e aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA desde 1969, como aditivo em alimentos. No Brasil, a adição da goma xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei no. 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (MAUGERI FILHO, 2001). Além da indústria alimentícia, a goma xantana pode ser também utilizada como aditivo para tintas e óleos automotivos, produtos cosméticos e farmacológicos, em materiais têxteis e outros.

A produção é tradicionalmente feita através de fermentação submersa, porém neste trabalho foi utilizada FES como alternativa, visando solucionar problemas ligados ao aumento da viscosidade do meio, o que prejudica a transferência de oxigênio, acarretando em perdas no rendimento final do processo (LO *et al.*, 1997). A produção de goma xantana por FES foi utilizada por Stredanski e Conti (1999), porém com grãos de malte, bagaço de maçã, bagaço de uva e cascas de frutas cítricas como substrato no processo. Neste trabalho a fermentação foi realizada com o uso de resíduos, os bagaços de cana-de-açúcar e de mandioca com o intuito de baixar os custos e produzir uma maior quantidade de goma, devido à redução das limitações de transferência de massa ocasionadas pela viscosidade do

polissacarídeo disperso no meio, as quais estão presentes de forma mais sensível em fermentação submersa.

4.2 MICRORGANISMO UTILIZADO NESTE PROCESSO

Para este processo foi utilizada a bactéria *Xanthomonas campestris*, cepa LPB01, disponível no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR (LPB), e cedida pelo Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Indústria Química (INTEC), de Santa Fé, Argentina.

4.3 FERMENTAÇÃO EM COLUNAS DE RAIMBAULT

As colunas receberam aeração forçada, com vazão de 20 mL/min, monitorada por sensor de vazão. Foram mantidas mergulhadas em banho com temperatura controlada a 28°C por 7 dias. Em cada coluna foi adicionado em torno de 50 g de bagaço de cana e 16 g de bagaço de mandioca. A umidade utilizada neste experimento foi de 84%, correspondente à capacidade de absorção da mistura dos bagaços.

Para a realização das análises de produção deste processo, uma coluna foi retirada do banho a cada dia e, então, providenciada a análise da quantidade de goma produzida. Para esta análise, foi adicionada água deionizada ao conteúdo do frasco e posteriormente esta mistura foi submetida ao agitador mecânico (Ultra-Turrax) por 20 minutos e então filtrada em tecido de nylon para eliminação das partículas sólidas maiores. A solução foi filtrada novamente, a vácuo, com uso de papel de filtro. O líquido produzido foi diluído e centrifugado a 8000 g por 20 minutos em centrífuga refrigerada (marca Hitachi, modelo Himac CR21E) a 15°C, para eliminação de biomassa e demais sólidos em suspensão. Na solução resultante foram adicionados 3 volumes de etanol, para a precipitação da goma xantana diluída no meio. A goma precipitada foi filtrada novamente, a vácuo, em papel de filtro seco a 70°C por 24h, resfriado em dessecador e pesado. O conjunto formado pela goma mais o filtro também foi seco na mesma temperatura por 24h, resfriado e pesado. A diferença entre as duas medidas forneceu a quantidade de goma presente no volume.

A quantificação dos gases consumidos, O₂, e produzidos, CO₂, foi feita através do sistema de aquisição eletrônico, para posterior análise respirométrica.

4.4 ANÁLISE DE BIOMASSA POR MÉTODO EXPERIMENTAL

Decidiu-se pela retirada de uma coluna por dia, ao longo dos sete dias de duração do teste, para análise de quantidade de biomassa, para comparação final com o sistema automático. Desta forma a curva de crescimento da biomassa por este processo apresentou apenas sete pontos. O conteúdo de cada coluna foi extraído com 200 mL de água deionizada, auxiliado por agitador mecânico. Para minimizar a presença de contaminantes este procedimento foi realizado numa câmara de fluxo, caso contrário uma contaminação poderia comprometer a contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônias). Após esta extração, foi tomada uma amostra de 1 mL, a qual foi diluída em 9 tubos, cada um contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, por diluições sucessivas, obtendo-se tubos com as seguintes concentrações: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹. Os tubos contendo as diluições 10⁻⁸ e 10⁻⁹ foram utilizados para plaqueamento: tomou-se 1 mL da amostra de cada tudo e transferindo-a em Placa de Petri contendo meio de cultura sólido. Em seguida, em cada uma destas placas, foi feita a homogeneização, com uma alça de Drigalski, de forma a espalhar as bactérias. Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. Decorrido esse tempo, foi feita a contagem das colônias presentes em cada placa, em câmara de Neubauer. A Tabela 1 apresenta o resultado desta contagem.

TABELA 1 - RESULTADO DA CONTAGEM DE UFC/ML

Tempo (horas)	Contagem em UFC/mL x 10 ¹³
0	0,08
24	3
75	4
123	6
166	7

4.5 RESULTADOS OBTIDOS COM AS FERRAMENTAS DE SOFTWARE

Esta seção apresenta os resultados obtidos através do uso de *software* de aquisição de dados, (STURM et al. 2008b), e a posterior aplicação ao programa de FERSOL2 e demais parâmetros do processo. Conforme descrito, os sensores, já calibrados para as faixas de atuação de cada grandeza do sistema, foram conectados a controladores, os quais enviaram os dados para o sistema de aquisição. Somente para este processo os sensores utilizados para medição de gás carbônico foram por processo eletroquímico, modelo CO2-A1 do fabricante Alphasense Limited®, os quais apresentam como resultado um sinal em tensão elétrica cuja variação é logarítmica em relação ao resultado do percentual no gás. Para não tornar os arquivos gravados muito grandes o programa foi ajustado para uma aquisição a cada quinze minutos, devido ao fato de não haverem grandes mudanças no comportamento do processo neste período de tempo, assim os resultados apresentados quanto aos gases envolvidos na respirometria estão expostos nas Figuras 11 e 12.

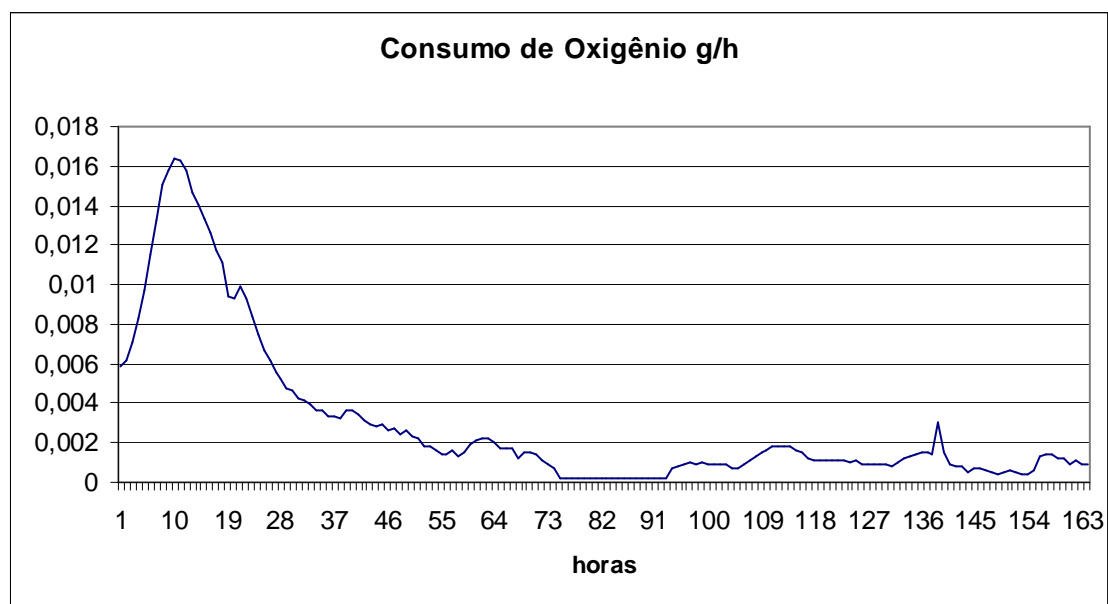


FIGURA 11 – CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

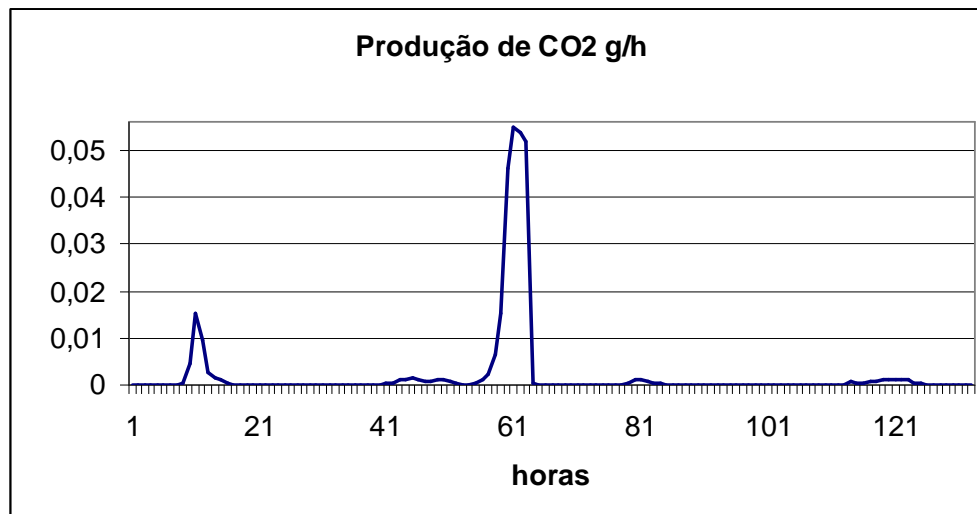


FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

A partir dos valores gravados pelo sistema de aquisição, foi calculada a massa de oxigênio consumida durante o processo, levando em consideração os resultados simultâneos de produção de gás carbônico.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ESTIMATIVA

Tempo (dias)	Tempo (horas)	Contagem em UFC/mL x 10 ¹³	Estimativa pelo Software em UFC/mL x 10 ¹³
0	0	0,08	0,08
1	24	3	3,85
3	75	4	5,96
5	123	6	6,44
7	166	7	7,01

A Tabela 2 apresenta os valores de biomassa estimados pelo programa, comparados aos medidos por método experimental.

Para uma visualização facilitada, a Figura 13 mostra o crescimento da biomassa total durante todo o processo. Os resultados estão apresentados em UFC/mL x 10¹³ para facilitar a leitura. Os resultados de contagem manual são inteiros, exceto o valor em tempo zero que foi modificado em sua escala somente,

enquanto os estimados apresentam casas decimais devido ao método de cálculo utilizado.

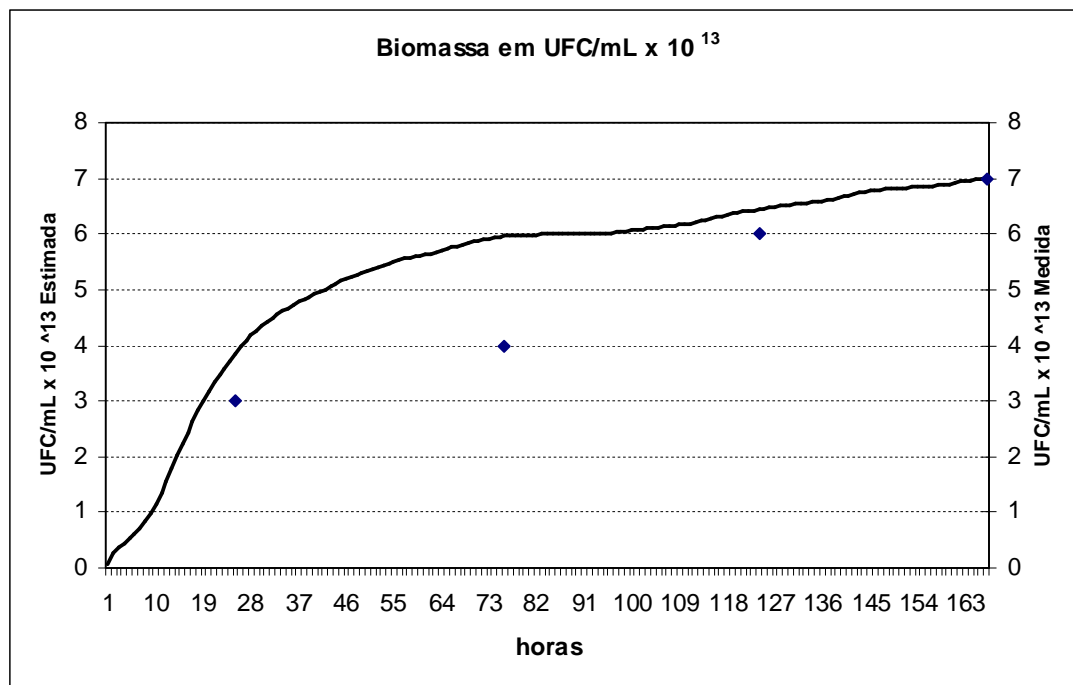


FIGURA 13 – ESTIMATIVA DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA PELO SOFTWARE

A Tabela 3 apresenta os parâmetros calculados pelo *software* a partir dos dados de crescimento da biomassa.

TABELA 3 – PARÂMETROS DO PROCESSO CALCULADOS PELO PROGRAMA

Parâmetro	Valor (unidade)
$Y_{x/o}$	13,7009 (UFC/mL x 10 ¹³ /g O ₂)
(μ)	0,00469 (h ⁻¹)
(m)	0,00047(g O ₂ /UFC/mLx10 ¹³ .h)
(R ²)	0,8097
Filtragem	Nenhum

Neste caso especificamente, a biomassa não foi calculada em massa para que se pudesse comparar ao método manual de contagem, assim os valores foram inseridos no programa em UFC/mL e o rendimento, ou produção, $Y_{x/o}$, indicado acima deve ser considerado como UFC/mL x 10¹³ por grama de oxigênio. Este

resultado não é adequado para comparação com outros processos onde os valores são expressos em gramas de biomassa por grama de oxigênio, pois os valores numéricos serão provavelmente bastante diferentes. O valor indicado de velocidade específica de crescimento (μ), durante a fase exponencial, e coeficiente de manutenção também foram afetados por esta mudança de valores.

4.6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DESTE PROCESSO

A comparação entre os valores de crescimento de biomassa obtidos pelo método de contagem experimental de UFC/mL e o apresentado pelo programa demonstram algumas diferenças que, se analisadas diretamente, parecem ser relativamente grandes. Cabe analisar, porém, que o método experimental considera contagem em números inteiros de UFC/mL e o programa, através de método iterativo, busca o ajuste da curva de crescimento, com resultados apresentados por números racionais com várias casas decimais, devido ao algoritmo de cálculo. A diferença perceptível na maioria dos resultados está na ordem de décimos, ou seja, a contagem experimental não poderia expressar da mesma forma, de modo que a estimativa pelo programa mostrou-se bastante coerente, com um coeficiente de determinação, R^2 , de 0,8097 bastante adequado quando consideradas as diferenças numéricas.

O gráfico de crescimento da biomassa apresenta de forma clara as fases deste processo, com destaque para a fase exponencial, onde a maioria dos cálculos relativos aos parâmetros do processo é calculada.

O fato de inserir os valores na forma de UFC/mL e não em massa resultou e valor numericamente grande, como sendo 13,7 (UFC/mL $\times 10^{13}$ /g O_2) para o rendimento $Y_{x/o}$, se comparado a outros processos com estimativa realizada sobre o valor dado em gramas. Da mesma forma o valor da velocidade específica de crescimento, μ indicado como 0,00469 (h^{-1}) pode parecer baixo, em se tratando de bactéria como microrganismo analisado, cabendo levar em consideração a diferença de unidades.

O uso de sensor eletroquímico de CO_2 demonstrou algumas desvantagens devido ao sinal gerado ser logarítmico, ou seja, pequenas variações neste sinal acarretaram em diferenças grandes no resultado, proporcional a produção deste

gás pelo processo. O gráfico demonstrou um comportamento constante na produção de CO_2 , com valor praticamente desprezível, exceto nas proximidades do tempo de 10 horas a partir do início e também próximos de 60 horas, desta vez de forma mais expressiva. Embora fosse esperável uma sequência crescente nos primeiros dias, conforme gráfico do consumo de O_2 , os valores de pico de produção de CO_2 foram próximos dos respectivos picos de consumo de oxigênio, ocorridos em torno de 10 horas e 60 horas. Mesmo estando estes valores praticamente sincronizados, a ordem de grandeza na produção de gás carbônico apresentou desvios incoerentes com o comportamento esperado teoricamente. Estes desvios seriam relacionados aos erros gerados pelo sinal logarítmico, bem como sua ordem de grandeza, dada em mV, ser bastante susceptível a interferência de ruídos elétricos provenientes do próprio ambiente onde o sistema estava instalado. Os valores utilizados pelo FERSOL2 foram os de consumo de oxigênio, que apresentaram um comportamento adequado frente aos objetivos deste experimento. O gráfico de CO_2 foi aqui apresentado apenas para acompanhamento de sua evolução durante o processo, embora não seja possível seu uso diretamente para o cálculo de coeficiente respirométrico, haja vista que a ordem de grandeza não parece adequada, mesmo depois de considerados todos os erros provenientes de temperatura e demais aproximações. Este resultado motivou a substituição destes sensores por outros de diferente base de funcionamento. Com o uso posterior de sensor de CO_2 por infravermelho, nos demais processos, os resultados tornaram-se mais próximos do que se esperava com base na literatura.

4.7 CONCLUSÃO DESTE CAPÍTULO

Este capítulo apresentou os resultados relacionados ao primeiro processo analisado pelo novo sistema, desta forma foi incluído como indicador de algumas pequenas modificações, implementadas no sistema, com o intuito de minimizar os problemas.

Tanto o sistema de aquisição de dados, incluindo os sensores, controladores, rede de comunicação e *software* supervisor, como o programa FERSOL2, demonstraram coerência nos resultados e relativa praticidade na manipulação dos dados representativos do comportamento do processo. A utilização do sistema para

avaliação do processo mostrou-se confiável quando comparado ao método manual de medição e contagem relativa ao montante de biomassa gerada. Os valores apresentados estão bastante próximos entre si, considerando a contagem experimental e os estimados automaticamente, o que pode motivar sua utilização como ferramenta de análise, principalmente pela redução de tempo e recursos materiais e humanos necessários.

5 APLICAÇÃO EM PROCESSO COM FUNGO

Neste capítulo estão expostos os resultados da aplicação da ferramenta computacional num processo utilizando como microrganismo o fungo *A. niger* FS3 para produção da enzima fitase, por fermentação em estado sólido. Apresenta como complemento os resultados relacionados à avaliação de crescimento da biomassa estimada em comparação direta com a respectiva produção de fitase.

5.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FITASE

A produção de enzimas vem promovendo o crescimento dos estudos e aplicações dentro da área biotecnológica, sendo que este mercado movimentava cerca de dois bilhões de dólares, em termos internacionais, por ano (BINOD et al, 2008). Dentro deste contexto, a comercialização de fitase estaria na ordem de duzentos milhões de dólares (GREINER e KONIETZNY, 2006).

A fitase (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase) pode ser encontrada nos tecidos animais e vegetais, em diversas espécies de fungos e bactérias. Esta enzima hidrolisa o ácido fítico em inositol e fosfato inorgânico (SILVA e TRUGO, 1996). Hidrolisando os resíduos de fosfato do ácido fítico, a enzima diminui a forte afinidade do fitato por certos minerais (SANDBERG e ANDERSON, 1988). Nas matérias-primas, de origem vegetal, utilizadas na alimentação animal como grãos de cereais, sementes oleaginosas e legumes, grande parte do fósforo mineral está armazenada na forma de ácido fítico, o qual não é degradado pelos animais monogástricos, como porcos, galinhas e peixes (PANDEY et al. 2001). Desta forma, a fitase, além de promover uma melhor digestão de alguns dos componentes nos animais monogástricos, aproveitando fósforo mais adequadamente, também reduz a quantidade deste elemento excretado pelo animal, reduzindo, assim, a poluição provocada pelo excesso deste no meio ambiente.

A forma comercialmente mais adequada de produção de fitase é a síntese efetuada pela membrana celular de microrganismos como bactérias e leveduras, entretanto os fungos são os mais utilizados (PANDEY et al. 2001). O processo de produção utilizava inicialmente o método de fermentação submersa, porém a

fermentação no estado sólido (FES) tem despertado grande interesse, devido aos bons rendimentos apresentados.

5.2 MICRORGANISMO UTILIZADO NESTE PROCESSO

Para a produção da enzima foi utilizado o fungo *A. niger* FS3, isolado a partir de amostras de solo conforme Spier et al. (2008), após ter sido mantido para crescimento em PDA durante oito dias a 30°C.

5.3 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR TIPO COLUNA

A fermentação em estado sólido foi desenvolvida em biorreator tipo coluna de vidro. Cada coluna com as medidas de 20 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro. Como substrato foi utilizado polpa cítrica com granulação entre 0,8 mm e 2,0 mm fornecidas pela indústria Cargill (Brasil). Para o experimento foram lançadas dez colunas com 85 g de meio cada, com temperatura mantida em 30°C pelo sistema de medição e controle, através da imersão das colunas em água, na qual se encontrava o sensor de temperatura. O meio fermentado foi avaliado após 96 horas para verificação de atividade de fitase.

5.4 ANÁLISE DE BIOMASSA PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL

Este método é baseado na presença de Ergosterol, como um dos elementos constituintes da membrana celular do microrganismo. Desta forma pode ser usado como meio de medição indireta da biomassa, porém está sujeito a desvios neste valor causados pela interferência de outros elementos do substrato, geralmente heterogêneo (TEREBIZNIK e PILOSOF, 1999).

Para a determinação de biomassa real foram retiradas amostras de 1 g de substrato fermentado de cada uma das colunas do reator. A análise das amostras foi feita com base no método descrito por Carvalho et al. (2006). O preparo inicial foi feito pela adição de 4 mL de etanol e 2 mL de hidróxido de sódio, NaOH 2M, à amostra de 1 g, a qual foi incubada em banho com água durante uma hora a 70°C. Depois de decorrido este tempo foi adicionado 4 mL de ácido clorídrico, HCl 1M, e a amostra foi agitada. Foi realizada nova adição de 2 mL de KHCO₃ 1M e 4 mL de

n-hexano e nova agitação, após a qual foi feita centrifugação a 4536 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado, após evaporação do solvente e adição de 4 mL de n-hexano por 3 minutos. Uma última centrifugação, por 2 minutos, foi feita depois de acrescentado 2 mL de n-hexano. Os extratos obtidos por este processo foram analisados por um HPLC (*High performance liquid chromatography*) Varian ProStar com coluna tipo C18 e ajuste em 282 nm.

5.5 RESULTADOS ESTIMADOS PELAS FERRAMENTAS DE SOFTWARE

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos através do uso do *software* e a comparação com o método descrito na seção anterior como indicação de validade das estimativas feitas pelo programa e um dos métodos mais usuais de determinação de biomassa.

5.5.1 Valores Obtidos pelo Sistema de Aquisição

Para o cálculo das massas de oxigênio e gás carbônico, foi mantida uma vazão média de 67,7 mL por minuto na aeração das colunas. A Figura 14 mostra o comportamento desta variável durante o período de fermentação.

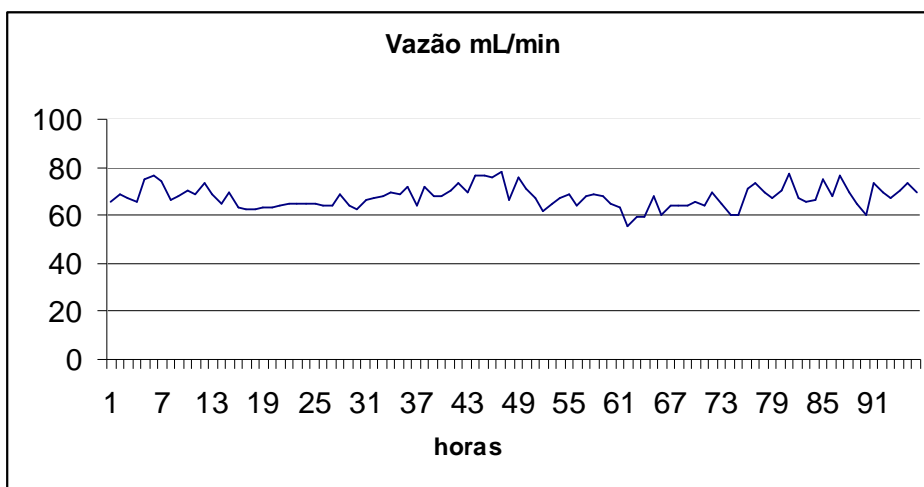


FIGURA 14 – VAZÃO MONITORADA DURANTE O PROCESSO

O processo, de acordo com o metabolismo do fungo, consome oxigênio e produz gás carbônico. Através dos sensores, os valores gerados pela emissão de gases de entrada e saída do biorreator estão apresentados nas Figuras 15 e 16. Para que a estimativa de biomassa possa ser feita, deve haver uma relação entre a

produção de CO_2 e o consumo de O_2 , o chamado coeficiente respirométrico. O comportamento deste parâmetro está demonstrado na Figura 17, mostrando a estabilidade das trocas gasosas promovidas pelo processo. O valor médio do coeficiente respirométrico foi 1,16 quando calculado em moles, considerando que este valor deveria ficar próximo de 1 para processos desta natureza.

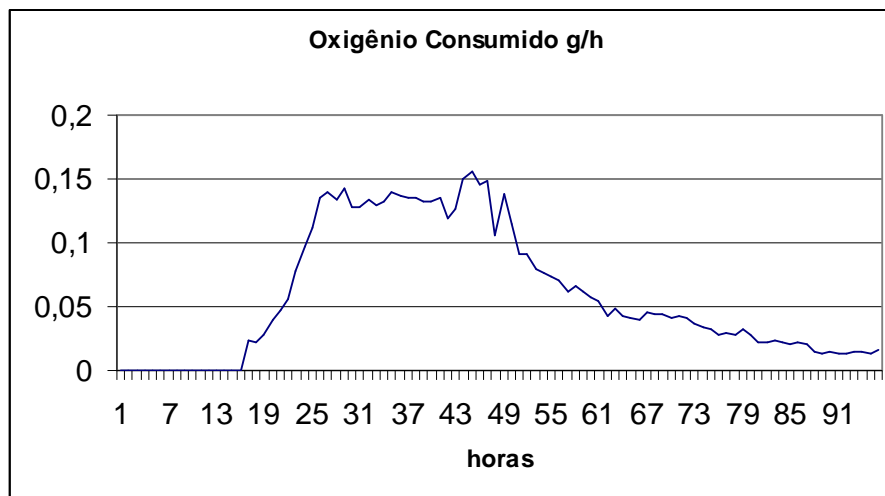


FIGURA 15 – OXIGÊNIO CONSUMIDO

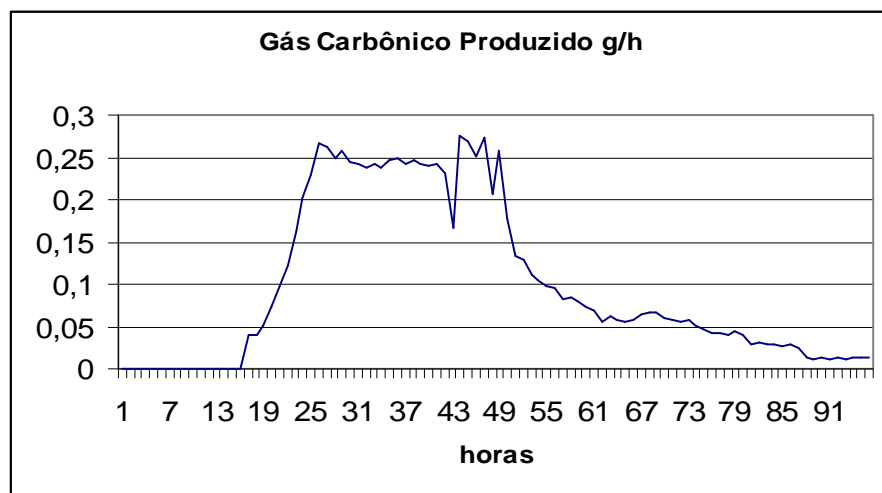


FIGURA 16 – GÁS CARBÔNICO PRODUZIDO

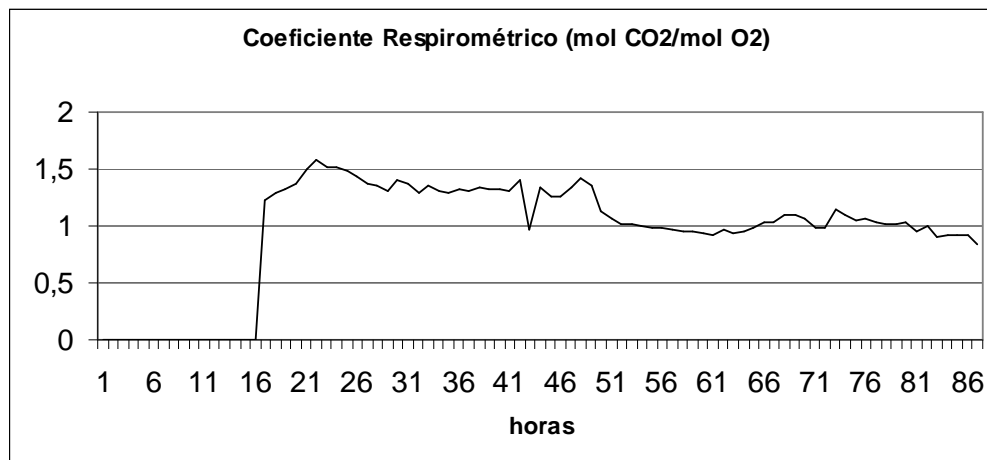


FIGURA 17 – COEFICIENTE RESPIROMÉTRICO

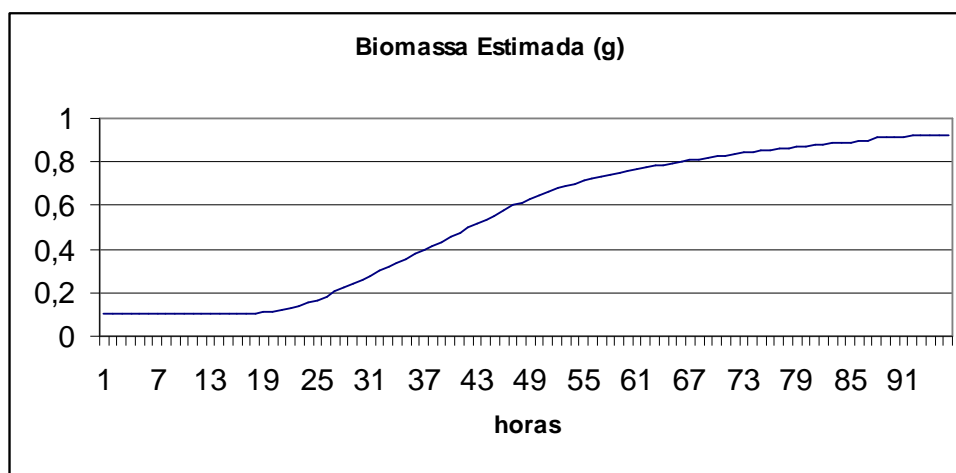


FIGURA 18 – BIOMASSA ESTIMADA PELO PROGRAMA

A Tabela 4 mostra os valores comparativos entre as biomassas estimadas e medidas.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

Tempo (h)	Biomassa Estimada(g)	Biomassa Medida(g)	Erro (%)
0	0,103	0,103	0,03
24	0,162	0,250	34,98
48	0,623	0,589	5,71
72	0,839	0,815	2,97
96	0,921	0,922	0,08

Para o processo de determinação por ergosterol, foram tomadas amostras no início da fermentação, no final e a cada 24 horas.

Para facilitar a visualização a Figura 19 reapresenta os valores comparativos de biomassas entre os métodos. A correlação entre os conjuntos de valores foi calculada em 0,994. Este valor seria igual a 1 se ambos os gráficos tivessem comportamento idêntico.

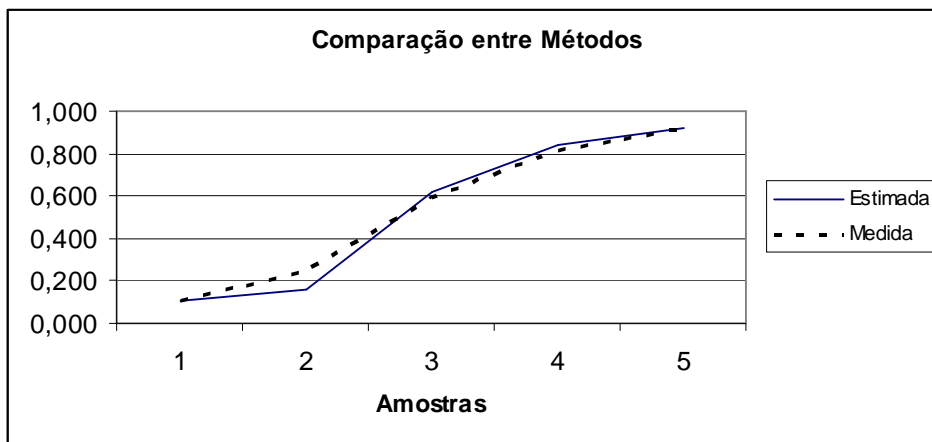


FIGURA 19 – COMPARAÇÃO ENTRE BIOMASSA ESTIMADA E MEDIDA

Da mesma forma a Figura 20 mostra a comparação com os valores de biomassa estimada e medida em eixos diferentes, mostrando um coeficiente de determinação R^2 de 0,988.

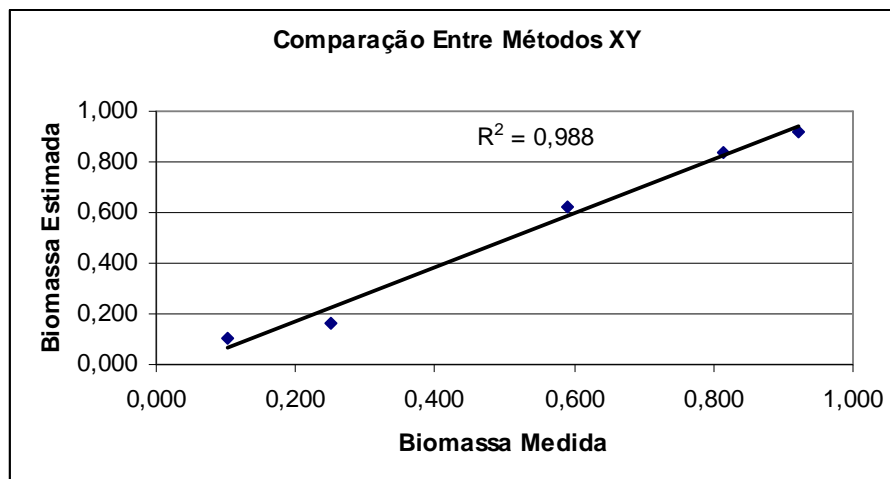


FIGURA 20 – BIOMASSA ESTIMADA E MEDIDA EM DOIS EIXOS

5.6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DESTE PROCESSO

Durante o processo de fermentação foram colhidas amostras e determinadas as biomassas. Os dados medidos foram comparados aos estimados, com uma correlação bastante expressiva e com coeficiente de determinação $R^2 = 0,988$, demonstrando a coerência dos métodos aplicados pelo programa para a geração destes valores. De posse dos valores medidos, a velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada conforme Spier (2008). O valor deste parâmetro foi idêntico ao gerado pelo *software*, ou seja, ($\mu = 0,05h^{-1}$), corroborando com os métodos utilizados no programa para a determinação da região linear, segmento do gráfico onde esta velocidade é calculada, e demais métodos envolvidos.

A Tabela 5 mostra os valores de biomassa estimada e os valores de atividade de fitase e para melhor visualização deste comportamento a Figura 21 mostra as curvas de cada um. De acordo com Spier (2008) a atividade de fitase é associada ao crescimento da biomassa. Esta característica pôde ser observada pelos dados relacionados ao processo, indicados na Figura 21. Para validar este item, a correlação entre conjuntos foi calculada em 0,993 e, ainda como confirmação, as velocidades específicas foram determinadas em $0,05 h^{-1}$ para a biomassa e $0,08 h^{-1}$ para a atividade de fitase. Estes resultados mostram a grande relação entre a atividade da enzima e o crescimento da biomassa.

TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE DA ENZIMA E BIOMASSA

Tempo (h)	Atividade Fitase (U/gds)	Biomassa estimada (gds)
0	0	0,1027
6	0	0,1027
12	0,95	0,1027
24	10,18	0,1622
36	20,15	0,3909
48	48,1	0,623
60	67,96	0,7624
72	77,64	0,8394
84	84,19	0,8897
96	89,83	0,9209

Através do programa foi estimado o valor do coeficiente de manutenção, o qual apresentou valor de 0,08 (gO₂ / g de biomassa hora), compatível com o processo de fermentação com fungos.

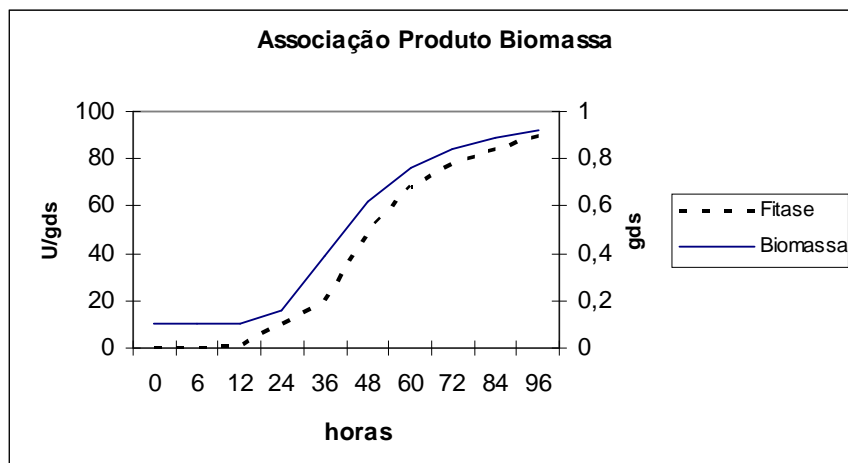


FIGURA 21 – ATIVIDADE DE FITASE E CRESCIMENTO DA BIOMASSA

5.7 CONCLUSÃO DESTE CAPÍTULO

Na exposição deste capítulo é possível verificar os resultados obtidos pelo novo sistema e a comparação com método usual de determinação de biomassa. Os valores relacionados à estimativa de biomassa mostraram-se bastante próximos aos medidos pelo método de extração de ergosterol, contribuindo, desta forma, para a validação dos algoritmos utilizados no programa, haja vista que a localização da região linear, na curva logarítmica de biomassa, é feita automaticamente pelo software e nesta região são calculados os parâmetros do processo. Cálculos foram feitos por métodos manuais, pela observação direta dos gráficos iniciais e posterior determinação das regiões de interesse, bem como dos procedimentos para levantamento dos parâmetros conforme Spier (2008). Os resultados alcançados foram próximos numericamente e no caso de alguns valores de biomassa estimada seu comportamento foi correlacionado ao gráfico de medições experimentais, ou seja, as variações em cada um deles foram avaliadas e este procedimento revelou grande coerência, conforme exposto, em aproximadamente 0,993 num máximo estatístico de 1 que, considerando dados experimentais sujeitos a incertezas de processo, provaram sua validade matemática.

Durante este processo, o sistema de aquisição de dados, incluindo todos os seus componentes, foi adequado para a confirmação da associação de produção da enzima fitase com o respectivo crescimento da biomassa, bem como o monitoramento do coeficiente respirométrico para garantir a validade da metodologia utilizada para determinação dos outros parâmetros (PANDEY et al., 2001).

O valor do coeficiente respirométrico apresentou valor médio de 1,1 sendo seu valor teórico para este processo igual a 1, quando todo o valor de massa de oxigênio consumido é transformado em gás carbônico. Embora este valor esteja ligeiramente acima do esperado não se caracterizou como processo anaeróbio, conforme pode ser analisado pelo gráfico deste parâmetro.

6 APLICAÇÃO EM PROCESSO COM MUDANÇA DE ESCALA

No presente capítulo estão expostos os resultados de um processo que, embora utilize como microrganismo o fungo *A. niger* FS3, também para produção da enzima fitase, como descrito em capítulo anterior, apresenta a aplicação na metodologia de mudança de escala. Para atingir este objetivo são demonstrados os comportamentos relativos a volumes de 1 kg, 2 kg e 10 kg de polpa cítrica em fermentação em estado sólido.

6.1 PROCESSO DE MUDANÇA DE ESCALA

Para que os processos testados e desenvolvidos possam ser utilizados em maiores escalas, torna-se necessária a aplicação de metodologia adequada (SERMANNI e TISO, 2008). A partir de uma escala menor, usada em laboratório, o processo passa por experimentos sem a necessidade de grande disponibilidade de material. Durante esta fase podem ser feitos ajustes conforme o comportamento do processo, bem como a possível otimização do mesmo. Para que se mantenha a condição de investimento em material e energia, o processo pode ser modificado para uma escala semi-piloto, ou piloto, onde outros aspectos devem ser considerados, como por exemplo, características mecânicas, às quais tanto o substrato quanto os microrganismos estarão sujeitos, incluindo a própria demanda energética do processo. Quando as adaptações já foram implementadas e demais ajustes realizados, pode-se atingir a escala industrial, visando produção em quantidade e redução de custos por demanda.

6.2 MICRORGANISMO UTILIZADO NESTE PROCESSO

Para a geração do produto de interesse foi utilizado o fungo *A. niger* FS3, como indicado em Spier et al. (2008). Nesta seção, a modificação foi apenas nas quantidades de substrato e inóculo, de acordo com cada escala em estudo.

6.3 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR TIPO TAMBOR HORIZONTAL

Em todas as três escalas escolhidas para este estudo, foram utilizados os biorreatores do tipo tambor horizontal (SERMANNI e TISO, 2008). Os volumes internos foram tais que a massa de meio sólido ocupasse apenas cerca de um terço do volume, permitindo a circulação dos gases insuflados e gerados pelo próprio processo.

Para que não houvesse regiões preferenciais para a circulação de ar, o que poderia promover um crescimento heterogêneo da biomassa, foi pré-determinada a ação de misturar periodicamente o meio sólido.

As massas de meio sólido usadas, de forma a aumentar gradativamente a escala, foram de 1 kg, 2kg e 10 kg.

6.4 ANÁLISE DE BIOMASSA PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL

A medição de biomassa experimental foi feita com base no método descrito por Carvalho et al. (2006), e de forma semelhante ao descrito no Capítulo 5, os respectivos extratos obtidos foram analisados por um HPLC (High performance liquid chromatography) Varian ProStar com coluna tipo C18 e ajuste em 282 nm.

6.5 RESULTADOS APRESENTADOS PELAS FERRAMENTAS DE SOFTWARE

Esta seção expõe os resultados obtidos pelo uso do *software* e uma comparação com os obtidos pelo método descrito na seção anterior, de modo que haja possibilidade de análise de validade das estimativas feitas pelo programa. Alguns resultados auxiliares foram gerados, como a indicação de associação entre a produção de fitase e o respectivo crescimento da biomassa.

6.5.1 Valores Determinados pelo Sistema de Aquisição

Em cada uma das escalas testadas foi determinada uma vazão média necessária para o cálculo das massas de oxigênio e gás carbônico. As Figuras 22, 23 e 24 mostram os resultados relativos a esta variável durante o processo de fermentação para cada massa de meio sólido.

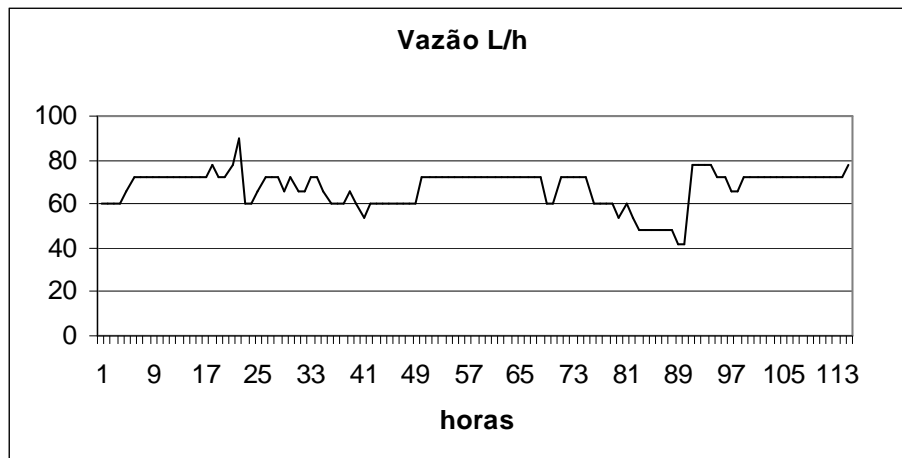


FIGURA 22 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 1 KG

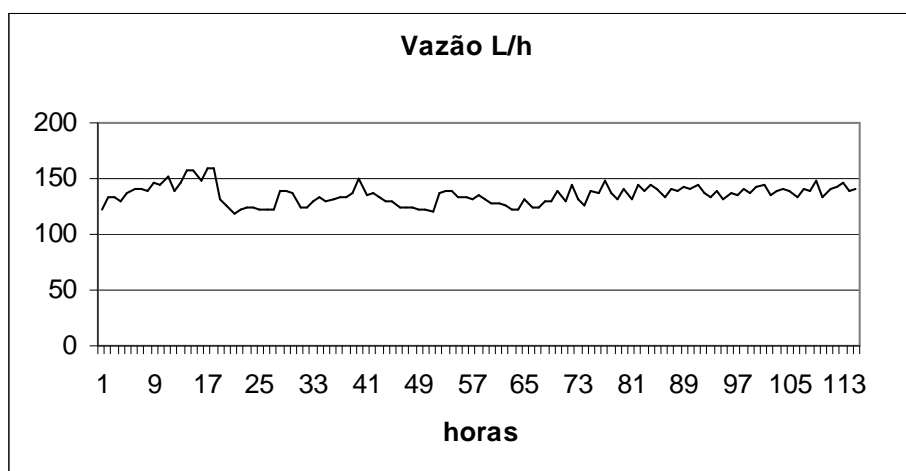


FIGURA 23 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 2 KG

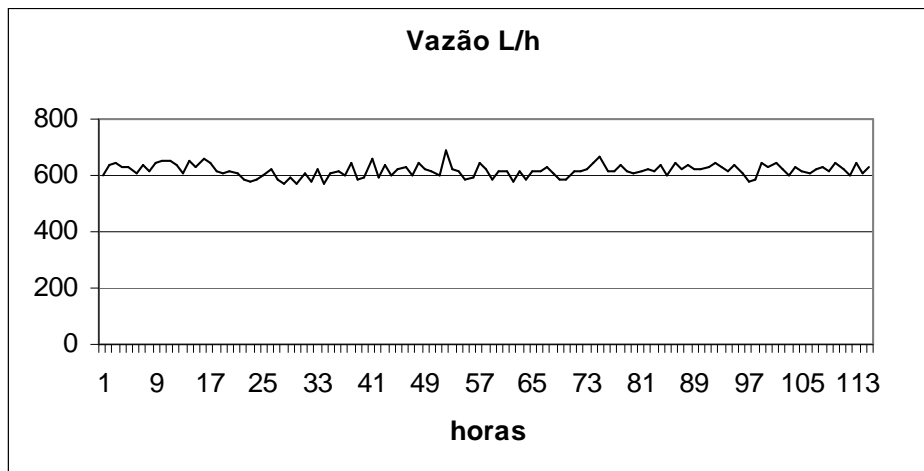


FIGURA 24 - VAZÃO DE AR PARA O REATOR DE 10 KG

Os valores de vazão foram determinados de acordo com o metabolismo do fungo e do reator em questão. Para o reator com massa de 1 kg foi ajustada uma vazão média de 60 L/h, para o de 2 kg uma vazão de 120 L/h e para o de 10 kg uma vazão de 600 L/h.

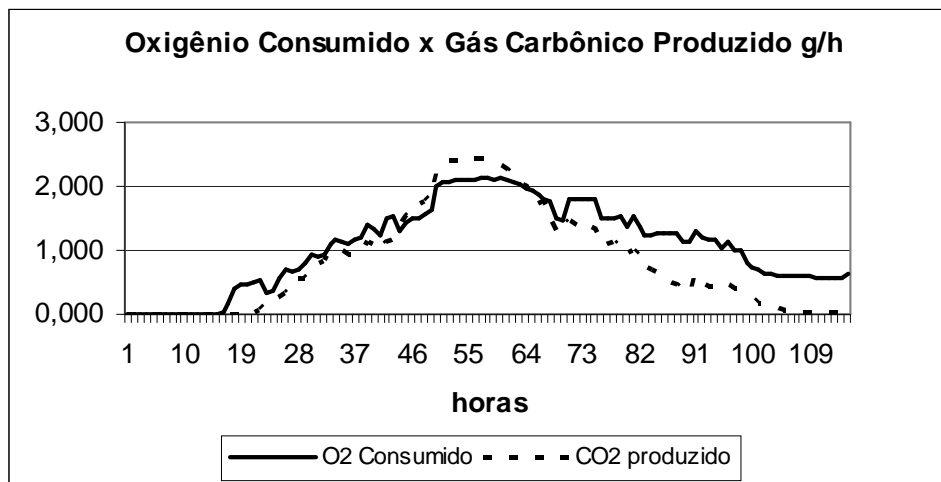


FIGURA 25 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 1 KG

Os valores de vazão foram definidos com base no critério de escalonamento de aeração constante, ou seja, em todos os casos este valor foi de 1L/min/kg de meio. Neste processo o fungo consome oxigênio e produz gás carbônico. A medição

destes gases pelos sensores apresentou os valores expostos nas Figuras 25, 26 e 27.

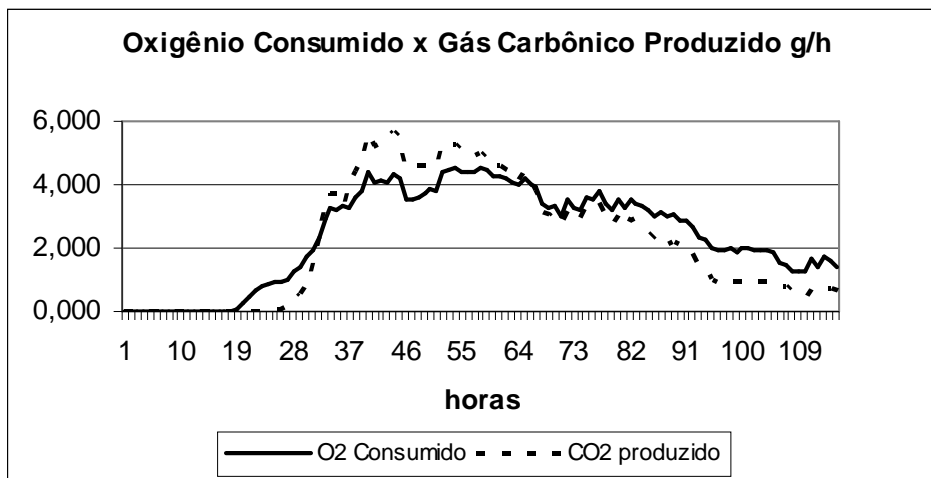


FIGURA 26 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 2 KG

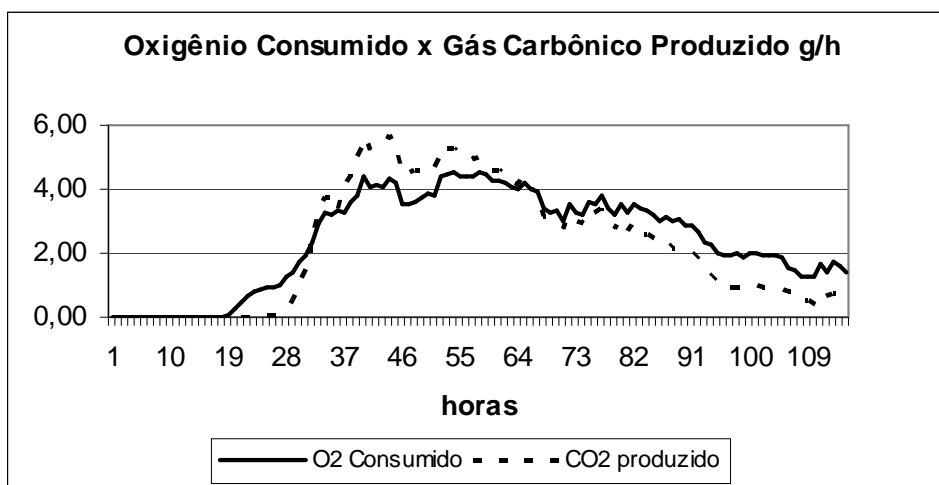


FIGURA 27 – COMPORTAMENTO RESPIROMÉTRICO REATOR DE 10 KG

A produção de gás carbônico está diretamente relacionada ao consumo de oxigênio. Com o intuito de evidenciar esta dependência, foram calculados os coeficientes de determinação (R^2) dos conjuntos de valores em cada escala, cujos valores foram 0,85 para o reator de 1 kg, 0,89 para o de 2 kg e 0,88 para o de 10

kg. Estes valores demonstram a correlação esperada no que se refere ao comportamento respirométrico dos processos em estudo.

6.5.2 Resultados de Biomassa Estimada pelo Programa

Para facilitar a análise, os Gráficos 28, 29 e 30 abaixo mostram os valores de biomassa estimados pelo programa e também os valores experimentais, medidos conforme seção anterior. As estimativas feitas pelo programa estão baseadas no perfil de consumo de oxigênio, bem como nos valores iniciais e finais de biomassa em cada um dos reatores e respectivas escalas.

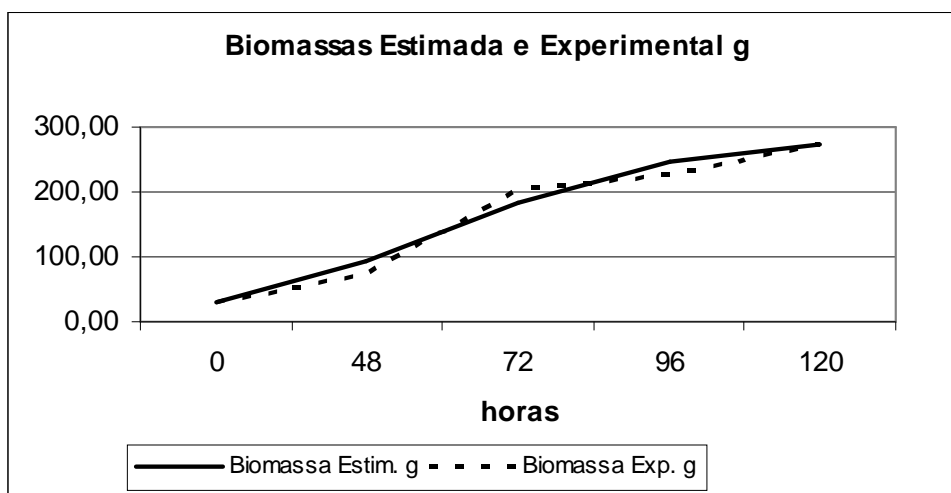


FIGURA 28 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 1KG

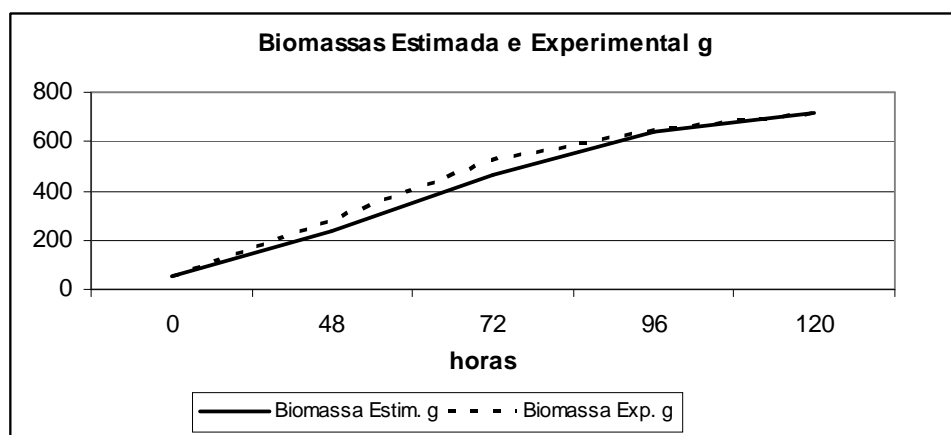


FIGURA 29 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 2KG

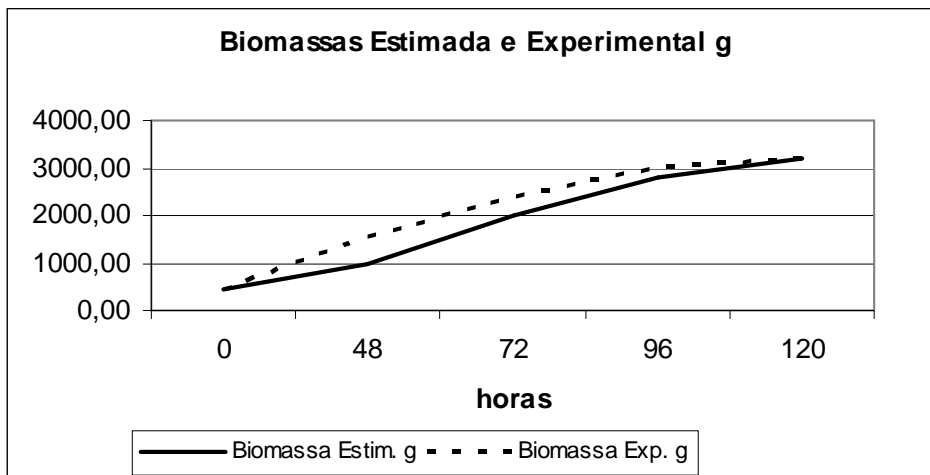


FIGURA 30 – BIOMASSAS ESTIMADA E EXPERIMENTAL REATOR DE 10KG

Embora existam discrepâncias entre os valores estimados pelo programa e os valores medidos experimentalmente, o comportamento de ambos foi analisado através do coeficiente de determinação (R^2) cujos valores foram 0,97 para o processo com 1 kg de meio, para o de 2 kg o resultado foi 0,99 e para o reator com 10 kg foi 0,95. Estes indicadores demonstram que os valores estimados acompanham os medidos de forma bastante próxima.

6.5.3 Outros Resultados Apresentados pelo Programa

As tabelas abaixo mostram os parâmetros do processo apresentados pelo software.

TABELA 6 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 1 KG

Parâmetro	Total	0 a 48 horas	0 a 72 horas	72 a 120 horas
Y x/o (g/g)	1,974	1,381	2,173	1,607
μ (h^{-1})	0,026	0,021	0,034	0,006
m (g O ₂ /g biom. h)	0,005	0,017	0,007	0,016

Para uma análise segmentada por fases do processo os valores foram calculados nos intervalos indicados. Os valores de produção de biomassa em relação ao oxigênio consumido (Y x/o), para o reator de 1 kg, demonstram que no intervalo até 72 horas a taxa desta transformação foi mais intensa, com valor de 2,173 g/g, o que também pode ser considerado pelo próprio gráfico de crescimento

da biomassa. Sob este aspecto, a velocidade específica de crescimento também concorda com este intervalo, apresentando seu maior valor. O coeficiente de manutenção, por sua vez, sugere que a maior parte do consumo energético foi devida ao crescimento da biomassa, com menor valor proporcional neste intervalo.

TABELA 7 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 2 KG

Parâmetro	Total	0 a 48 horas	0 a 72 horas	72 a 120 horas
Y x/o (g/g)	3,110	3,843	3,539	2,393
μ (h ⁻¹)	0,032	0,040	0,044	0,007
m (g O ₂ /g biom. h)	0,003	0,006	0,004	0,011

Para o reator com 2 kg percebe-se que houve um maior crescimento dentro do intervalo até 48 horas a partir do início do processo. O valor de Yx/o apresenta seu máximo neste intervalo, com uma taxa maior de transformação relativa. O resultado relacionado ao coeficiente de manutenção apresenta a condição de que no último segmento do processo houve maior consumo energético no sentido de se manterem vivos os microrganismos em comparação com o desgaste ligado ao crescimento em número e, conseqüentemente, em massa. A velocidade específica de crescimento manteve-se, praticamente, constante até o período de 72 horas, diminuindo na última fase estimada do processo.

TABELA 8 – PARÂMETROS CALCULADOS PARA REATOR DE 10 KG

Parâmetro	Total	0 a 48 horas	0 a 72 horas	72 a 120 horas
Y x/o (g/g)	3,168	6,623	4,009	2,161
μ (h ⁻¹)	0,024	0,031	0,031	0,006
m (g O ₂ /g biom. h)	0,003	0,003	0,003	0,012

Os resultados relacionados ao reator com 10 kg demonstraram uma velocidade específica de crescimento constante até o período de 72 horas, de forma semelhante ao reator anterior. A taxa de transformação de oxigênio consumido em biomassa foi maior no período entre o início e 48 horas, mostrando no último segmento um decréscimo mais significativo quando comparado aos outros intervalos, ou seja, uma desaceleração pode ser percebida, a qual é confirmada pelo valor da velocidade específica. Neste processo o valor do coeficiente de

manutenção foi constante, exceto no último período, onde surge um aumento expressivo, novamente indicando que durante o processo o consumo energético foi mais direcionado ao aumento da população em forma de biomassa, enquanto que no período final a biomassa já não sofre um aumento considerável em relação ao tempo, indicando um proporcional aumento na quantidade de energia direcionada à sobrevivência do microrganismo.

6.6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DESTE CAPÍTULO

Neste capítulo o trabalho foi desenvolvido como auxílio ao procedimento de mudança de escala de produção de fitase, com uso de polpa cítrica como substrato. Os resultados apresentados demonstraram coerência quanto ao comportamento do processo em cada uma das ordens de grandeza testadas. Durante a fermentação foram colhidas amostras nas quais foi realizada análise posterior, através de HPLC, pelo método de ergosterol. A comparação entre os valores de biomassa estimados e medidos serve como indicação do grau de proximidade alcançado pelo software, validando assim o seu uso como ferramenta dentro da metodologia utilizada para o aumento de escala.

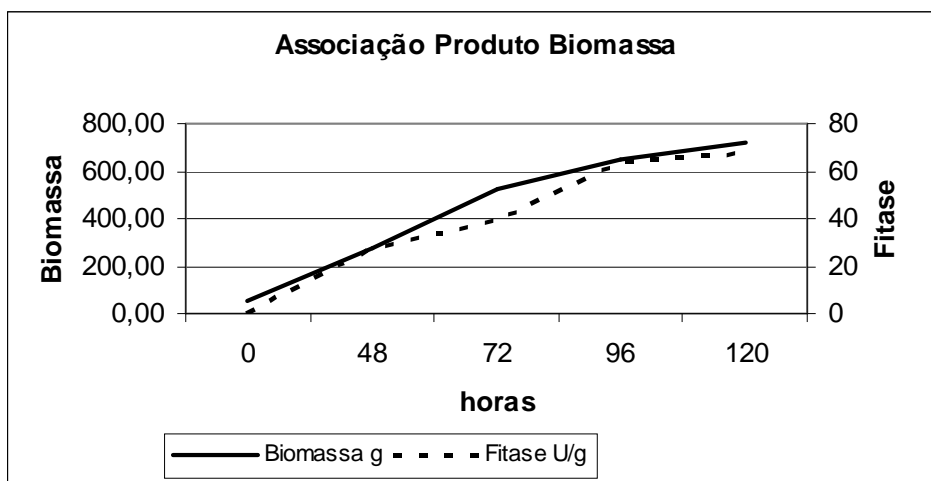


FIGURA 31 - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE DA ENZIMA E BIOMASSA

A avaliação gráfica do crescimento da biomassa permitiu outra verificação, relacionada à associação da produção da fitase ao crescimento, conforme pode ser visto na Figura 31, onde os valores de biomassa usados foram os estimados pelo

FERSOL2. Esta análise foi feita para o reator de 2 kg, embora os resultados para as outras escalas tenham sido bastante semelhantes. O coeficiente de correlação entre estes comportamentos foi de 0,98. Este valor concorda com o resultado previsto conforme descrito por Spier (2008).

6.7 CONCLUSÃO DESTE CAPÍTULO

Na concepção inicial do sistema de aquisição de dados, foi verificada a necessidade de utilizar-se sensor de vazão adequado para minimizar os erros gerados pelas medições muito próximas dos extremos de suas faixas de atuação. Durante os experimentos aqui descritos não foi necessária a mudança deste sensor, embora a faixa de valores apresente diferenças na ordem de dez vezes.

Os valores de vazão demonstraram maior estabilidade, principalmente nas escalas maiores, devida ao uso de um compressor de ar exclusivo para cada processo, de modo que fossem minimizadas as interferências relacionadas a eventuais diferenças de pressão. No caso da primeira escala houve uma variação proporcionalmente maior devido a dificuldades no ajuste de menores vazões pelo sistema disponível utilizado.

Os gráficos relacionados ao consumo de oxigênio comparado à produção de gás carbônico foram conclusivos no que se refere à proporção entre estas duas mudanças gasosas no processo de fermentação, reforçado pelos coeficientes de correlação calculados para estas grandezas.

A perceptível concordância entre os gráficos de crescimento da biomassa gerados pelo software e seus respectivos valores medidos demonstra a capacidade de estimativa dos algoritmos utilizados. Mesmo na condição de maiores amplitudes nas diferenças, o processo apresentou um comportamento bastante semelhante, quanto aos períodos de maior crescimento e estabilidade posterior, evidenciados pelo resultado do seu coeficiente de correlação relativamente alto. A média do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,97 considerando todos os experimentos relacionados à mudança de escala, assim o resultado de biomassa estimado pelo FERSOL2 foi novamente validado pela comparação com método experimental.

Os parâmetros determinantes do acompanhamento do processo, gerados pelo FERSOL2, mostraram coerência em cada uma das fases testadas, método

usado, neste caso, para buscar uma caracterização fragmentada, com intuito de expor de forma mais sensível o comportamento em cada segmento dentro do tempo total de fermentação.

Em se tratando de processo ligado à produção da enzima fitase, um teste final proporcionou a confirmação da associação de atividade desta enzima frente ao crescimento da biomassa, com grau de proximidade bastante elevado indicado pelo coeficiente de correlação de 0,98. Este indicador concorda com os resultados apresentados por Spier (2008), onde o valor foi de 0,99 num volume bastante inferior de biomassa.

7 APLICAÇÕES PARCIAIS DAS FERRAMENTAS

Embora com o uso apenas parcial das ferramentas desenvolvidas, este capítulo demonstra aplicações nas quais o sistema auxiliou em processos que não são classificados como fermentação em estado sólido ou mesmo submersa. Devido a condição de medição do sistema ser bastante versátil e na presença de necessidades semelhantes por outros experimentos, decidiu-se por avaliar a capacidade de adaptação, tanto dos sensores e controladores, quanto das características físicas e mecânicas do sistema.

Nestes casos o sistema de aquisição de dados, bem como a posterior análise dos resultados, foi suficiente para atingir os objetivos propostos durante o estudo de comportamento dos processos. Auxiliou também no levantamento de informações para a caracterização dos mesmos.

7.1 PROCESSO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS VEGETAIS

Para a análise respirométrica, utilizada posteriormente para o desenvolvimento de um modelo matemático para o biorreator de imersão por bolhas (B.I.B.®) patenteado por Soccol et al. (2008), o sistema de aquisição de dados foi utilizado, porém com algumas limitações. Devido à pequena quantidade de biomassa, com a conseqüente redução da capacidade de trocas gasosas, seja por respiração ou fotossíntese, os resultados referentes ao consumo ou produção de Gás Carbônico foram inferiores aos passíveis de medição com os sensores utilizados, devido a sensibilidade especificada não ser suficiente para este tipo de aplicação (SCHEIDT, 2008).

7.1.1 Organismo Utilizado neste Processo

As células vegetais utilizadas durante este experimento foram de Orquídeas *Oncidium leucochilum*. Esta espécie, conforme Scheidt (2008), é natural do México, Guatemala e Honduras, países onde pode ser encontrada em florestas úmidas e altitudes variáveis de 500 a 2.000 metros. A escolha desta espécie foi feita com base em seu fácil cultivo *in vitro*, e por existir, também, interesse comercial em sua produção.

7.1.2 Biorreator Desenvolvido para Células Vegetais BIB

O uso do sistema foi feito com o intuito de auxiliar nas tarefas de ajustes necessários ao processo, propondo a possibilidade de se atingir a escala industrial de produção, visando a redução de custos por demanda.

Em se tratando de trabalhos referentes à micropropagação de plantas, dois tipos de biorreatores são os mais usados, conforme Scheidt (2008), os biorreatores de imersão temporária, expondo temporariamente a solução nutritiva aos explantes, e os de imersão permanente, mantendo o contato dos explantes durante toda fase de cultivo. Neste trabalho, o sistema novo desenvolvido partiu do princípio de que as plantas podem absorver mais nutrientes no sistema de imersão por bolhas, comparado ao tradicional, melhorando sua produtividade e reduzindo, assim, o custo de plantas por unidade produzida. A Figura 32 mostra o esquema do reator desenvolvido.

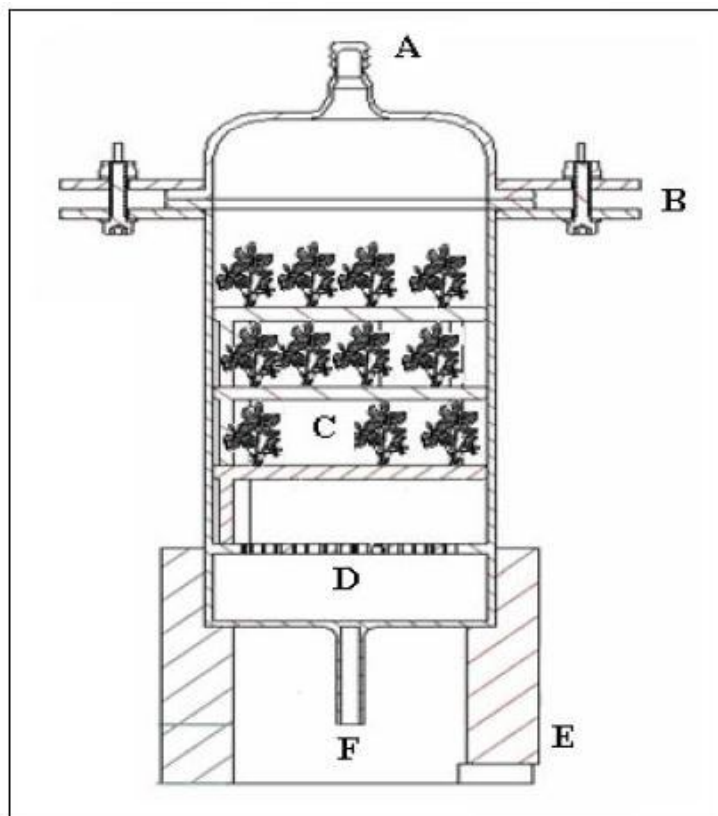


FIGURA 32 - ESQUEMA DO REATOR: A) Saída de ar, B) Kit fixação, C) Estágios, D) Placa porosa, E) Base, F) Entrada de ar.

Fonte: Soccol et al. (2008).

7.1.3 Resultados Obtidos com o Sistema de Aquisição

Para o trabalho de levantamento de informações necessárias à posterior elaboração do modelo matemático do reator, foram feitas medições com o sensor de vazão, ligado ao software de aquisição de dados. A observação do comportamento do reator permitiu que se determinasse um valor máximo de vazão de 9 L/min para o modelo desenvolvido. A limitação se deve ao aumento de pressão no sistema de filtração, ocorrendo vazamentos com vazões excessivas (SCHEIDT, 2008). O procedimento de medição de vazões, comparando-se o resultado esperado de altura de solução nutritiva, demonstrou que vazões entre 5 L/min e 6 L/min foram suficientes para manter esta altura em cerca de 15 cm, valor adequado para cobrir todos os três estágios do reator em estudo.

Devido ao valor reduzido de vazão, comparado ao volume do reator, e a baixa taxa de transformação de oxigênio em gás carbônico e o comportamento inverso, durante a fotossíntese, foi possível verificar que os sensores de CO₂ apresentaram sensibilidade insuficiente para que o programa pudesse registrar concentrações. Entretanto, os sensores de oxigênio apresentaram sensibilidade suficiente para que o sistema pudesse registrar os períodos de respiração e fotossíntese. Embora com percentuais bastante reduzidos, devido ao volume de ar utilizado no reator e a capacidade de transformação dos gases pelos explantes, cuja biomassa também seria bastante pequena para realizar tais trocas gasosas. A sucessão destes períodos foi determinada assumindo-se que a percentagem de oxigênio na entrada permaneceu praticamente constante, a qual foi comparada com a percentagem na saída do sistema de imersão. Esta condição fez com que os valores de consumo de oxigênio fossem na ordem de centésimos de percentual. A inversão no valor de consumo indica, na verdade, a produção deste gás. A Figura 33, mostra a variação do percentual de oxigênio, considerando-se a diferença entre entrada e saída do sistema, onde é possível verificar o ciclo de respiração e fotossíntese. Este ciclo apresentou valores médios de respiração de 10 horas e 42 minutos e fotossíntese durante 13 horas e 4 minutos. O tempo de fornecimento de luz artificial foi de 16 horas, o que demonstra um pequeno atraso em relação à exposição de luz e sua respectiva reação em termos de realização de fotossíntese.

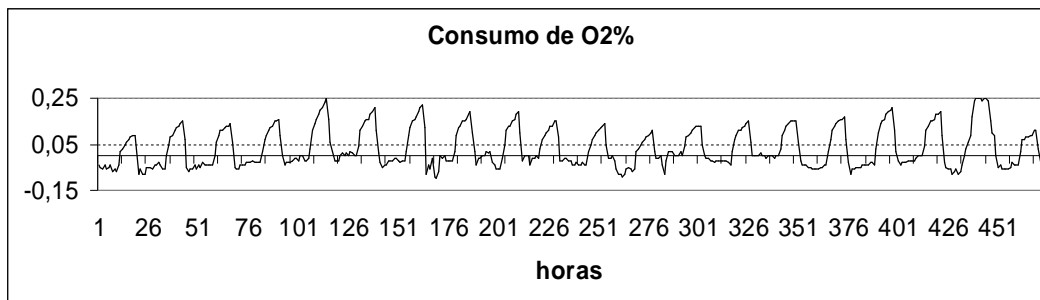


FIGURA 33 - CICLO DE RESPIRAÇÃO E FOTOSSÍNTESE NO CONSUMO DE O₂

7.1.4 Conclusão

O sistema de aquisição, incluindo sensores e demais componentes, foi concebido, inicialmente, para o uso em processos de fermentação em estado sólido. Nestes os valores de consumo e produção de gases são mais expressivos, nos quais foram baseadas as especificações dos dispositivos de medição.

Nesta parte da pesquisa, o principal objetivo foi auxiliar no levantamento de informações pertinentes para a determinação de um modelo matemático do reator em estudo. Os resultados relacionados à vazão foram de grande utilidade para a concepção do modelo, mostrando inclusive algumas das limitações do reator real.

As medições feitas com os sensores de gás foram suficientes para a verificação do comportamento das células vegetais em termos de ciclos de respiração, corroborando com o previsto, dados os ciclos determinados artificialmente pela irradiação de luz sobre o reator. Para melhorar a condição de medição, sem a modificação de especificações dos sensores, seria necessária quantidade maior de explantes, aumentando consideravelmente a condição de transformação gasosa em valores mensuráveis pelo sistema, no tempo avaliado.

Para uma melhor análise dos resultados apresentados pela Figura 33 é necessário levar em consideração a ordem de grandeza utilizada, ou seja, os valores estão em centésimos de percentual, com escala variando entre -0,15% e 0,25%, assim fica demonstrado que a quantidade de biomassa ativa seria bastante reduzida quando comparada aos requisitos que levaram à especificação dos sensores. Os sensores de oxigênio possuem uma sensibilidade relacionada ao valor de umidade relativa, conforme AlphaSense, (2009a), assim foi calculado o desvio a

partir dos valores registrados pelo sistema da umidade relativa percentual presente na saída do processo, cujo valor médio foi de 83,3%.

7.2 PROCESSO DE CULTIVO DE MICROALGA EM MANIPUEIRA

Neste trabalho foi realizado um estudo para o desenvolvimento de bioprocesso para o cultivo da microalga (*Chlorella minutissima*), utilizando como substrato a manipueira (BORGHETTI, 2009). De acordo com Cereda (2001), a manipueira é o resíduo líquido mais importante decorrente do processamento da mandioca, sendo sua produção estimada na ordem de 30%, quando comparada ao peso de matéria-prima em fábricas de farinha, constituindo um montante bastante elevado frente à capacidade de absorção natural do meio ambiente, gerando grande impacto ecológico. O objetivo de produzir biomassa de microalga, neste meio, está baseado no seu alto teor de amido, compostos cianogênicos e de sais minerais, ainda com altos níveis de nitrogênio, características estas que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos (CEREDA, 2001).

7.2.1 Microalga Utilizada neste Processo

As microalgas são microrganismos fotossintéticos microscópicos. Podem ser coloniais ou filamentosos, geralmente coloridos. Filogeneticamente podem ser classificados como procarióticos ou eucarióticos (OLAIZOLA, 2003). Ainda conforme Olaizola (2003), estes microrganismos não são um grupo muito estudado, sob o ponto de vista biotecnológico, pois, dentre as mais de dez mil espécies de microalgas supostamente existentes, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções em todo o mundo, poucas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e apenas uma pequena quantidade foi cultivada em escala industrial. Estas informações indicam um potencial bastante rico no sentido de se conseguirem novas descobertas. Este estudo foi baseado no cultivo da microalga *Chlorella minutissima*, com o objetivo de analisar a produção de biomassa (BORGHETTI, 2009).

7.2.2 Biorreator Utilizado no Cultivo da *Chlorella minutissima*

Para a realização dos estudos foi utilizado reator tipo tanque com aeração forçada e agitação. O ambiente onde foi instalado permaneceu sob ciclo de iluminação artificial por lâmpadas com uso de temporizadores, com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O meio utilizado foi obtido com as proporções de 20% de manipueira, 70% de água e 10% de inóculo (BORGHETTI, 2009).

7.2.3 Resultados Obtidos pelo Sistema Instalado

O sistema de aquisição de dados foi instalado de forma a gravar os valores de temperatura do ambiente, percentuais de oxigênio, tanto no ambiente quanto na saída do reator, valor de vazão de ar insuflado no reator e valores percentuais de gás carbônico na entrada e saída do processo.

A Figura 34 mostra os valores de consumo de oxigênio e a Figura 35 indica a produção de gás carbônico.

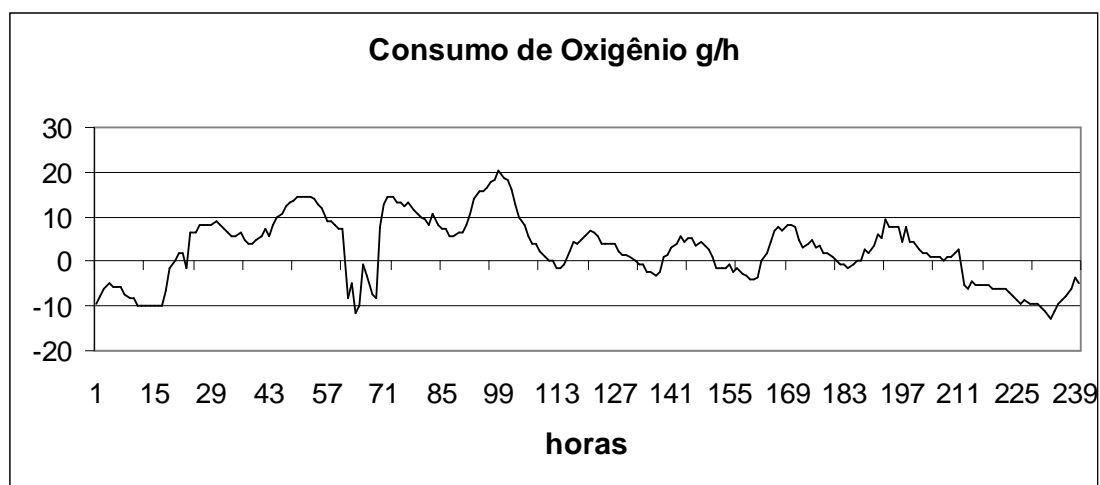


FIGURA 34 - CONSUMO DE OXIGÊNIO EM G/H

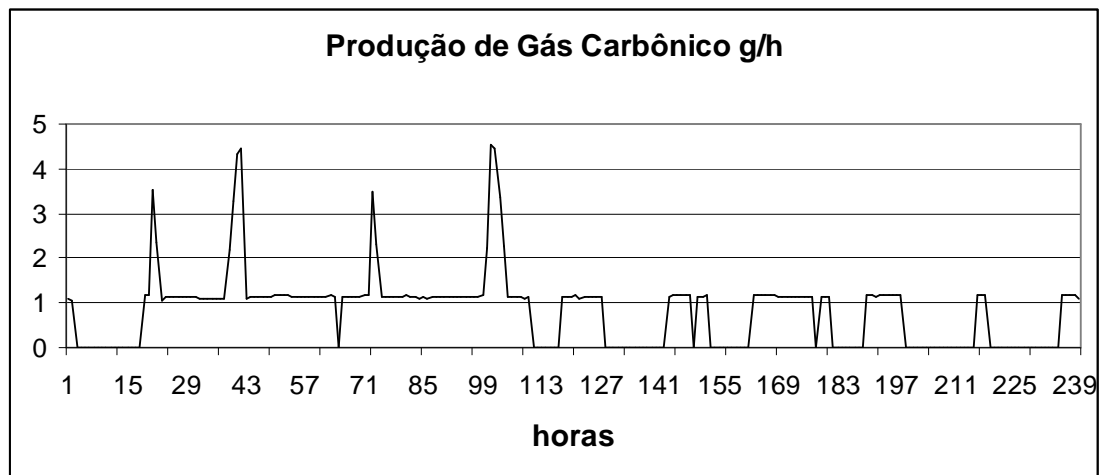


FIGURA 35 - PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO EM G/H

Para facilitar a comparação entre os comportamentos de produção e consumo destes gases, a Figura 36, mostra estas duas curvas sobrepostas.

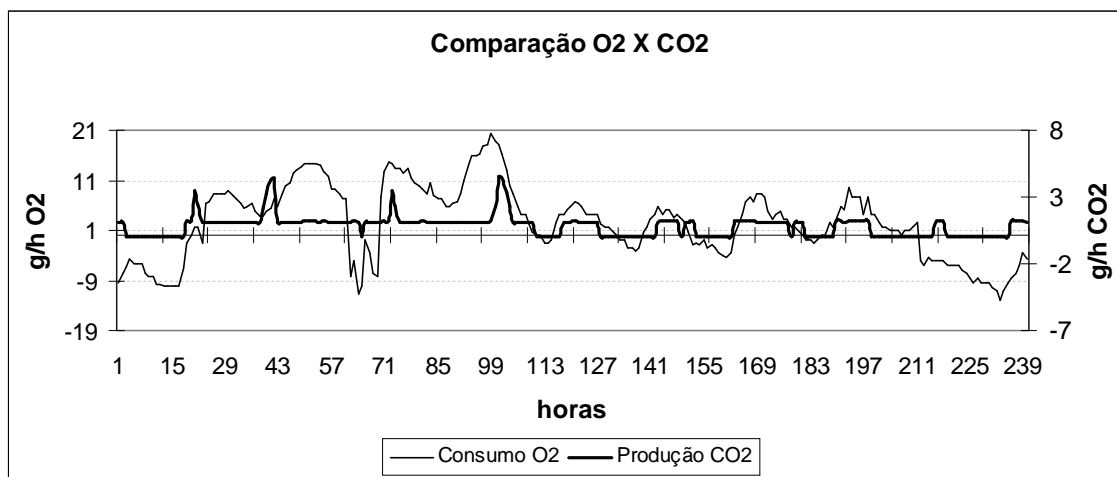


FIGURA 36 - COMPARAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO E CONSUMO DE GASES

A comparação entre os valores apresentados demonstra que houve um ciclo determinado de consumo de oxigênio e, conseqüentemente, de produção de gás carbônico. Considerando que a microalga realiza fotossíntese, a indicação de um valor negativo no consumo de O_2 pode ser interpretada como a produção deste gás, numa vazão constante. Esta inversão no sinal de consumo de O_2 acontece em alguns períodos, dadas as vazões e massa de microalgas presentes no processo. Desta mesma forma, o comportamento da produção de gás carbônico demonstra um

comportamento cíclico em comparação com o oxigênio, determinado pela correlação entre estes elementos no metabolismo da microalga.

7.2.4 Conclusão

Durante os experimentos foi feita uma tentativa de injeção de gás carbônico para verificação do comportamento de crescimento da biomassa quando da presença deste gás em maior proporção. Nas condições apresentadas no laboratório ocorreram dificuldades no controle de vazões relativas ao ar, este diretamente do ambiente, e do gás carbônico, proveniente de cilindro próprio. A pressão do cilindro associada a falta de válvulas adequadas, impediram a mistura em proporções constantes destes gases. Devido a isto o procedimento não pôde ser mantido, porém o sensor de medição de CO₂ permaneceu em uso para a avaliação na saída do reator.

Como este microrganismo realiza fotossíntese, o programa FERSOL2 não foi utilizado, pois o modelo matemático não prevê formação de biomassa por outra fonte de energia externa, como neste caso o fornecimento de luz artificialmente para o reator.

Os resultados obtidos pelo sistema de aquisição de dados, e a posterior análise destes, permitiu uma melhor compreensão do comportamento da microalga quando nas condições impostas pelo reator em uso, bem como nas demais variáveis envolvidas, como concentração de manipueira e inóculo iniciais. O fato de permitir a visualização em tempo real das variáveis medidas mostrou-se bastante útil na tarefa de monitoramento do andamento do processo durante todo o seu período de estudo, pois qualquer distúrbio frente ao esperado nas variáveis seria indicador de eventuais problemas, tanto locais, como vazamentos e falhas no reator, quanto ambientais como diminuição da pressão de aeração, por exemplo. Em alguns destes casos foi possível atuar sobre o problema antes que pudesse afetar o resultado do experimento.

O fotoperíodo programado através do uso de temporizadores atuando sobre lâmpadas foi estabelecido como 12 horas, ou seja, período simétrico de presença e ausência de luz. O ciclo de fotossíntese determinado pelo metabolismo da microalga foi de 13 horas e meia, o qual foi calculado pela média dos períodos

registrados durante todo o andamento do processo e, em se tratando de experimento prático, apresentou desvio percentual aproximado de 11,11%.

É possível verificar que, durante algumas fases do processo, não houve um sincronismo entre o consumo de oxigênio e produção de gás carbônico, mesmo considerando a condição inversa durante a fotossíntese. Este comportamento pode ser relacionado à dificuldade em manter a vazão constante de CO₂ na entrada e também a possibilidade de consumo de outra fonte de carbono presente no próprio meio de cultivo, por ser heterogêneo.

7.3 PROCESSO DE CULTIVO DE MICROALGA EM MBM

Nesta seção será descrita a aplicação do sistema em reator para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em meio do tipo MBM (Modified Bristol Media) descrito por Watanabe (1960 apud COSTA et al. 2006).

Novamente o microrganismo em estudo realiza fotossíntese, assim somente uma utilização parcial dos recursos desenvolvidos no sistema de aquisição e estimativa de parâmetros foi utilizada, porém os resultados foram suficientes para orientar demais cálculos para uma caracterização mais completa do processo de crescimento da microalga, bem como levantamento de rendimento do reator em termos de produção de biomassa por tempo e área de cultivo.

7.3.1 Microalga Utilizada neste Processo

As microalgas podem produzir vários produtos de interesse como carboidratos, proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas e pigmentos, além de fornecerem moléculas bioativas (DUFOSSE et al., 2005).

Especificamente neste processo foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris* LEB 104, obtida da Universidade de Santa Maria (UFSM – RS). Esta é descrita como uma microalga verde unicelular de tamanho entre 2 a 4 µm, possuindo mancha ocelar e vacúolos contráteis. Conforme citado por Raven et al. (2001), esta espécie pode ser considerada uma Chlorophyceae unicelular não-móvel. Na natureza pode ser encontrada em água doce, salgada e no solo. Formada por células que contêm um único cloroplasto em forma de taça, com ou sem pirenóide e um único núcleo muito pequeno, para reprodução possui apenas a forma

assexuada, ou seja, cada célula haplóide se divide mitoticamente duas ou três vezes, formando, assim, quatro ou oito células não-móveis.

7.3.2 Biorreator utilizado para cultivo de *Chlorella vulgaris*

O reator utilizado foi do tipo Tanque Agitado (SERMANNI e TISO, 2008). O suporte para sensores foi adaptado para se conectar às mangueiras originais do reator, de modo que o sistema de aquisição pudesse interagir com o processo. A medição foi feita sobre as variáveis de vazão, tanto de ar insuflado no reator quanto de gás carbônico separadamente, oxigênio percentual na entrada e saída e gás carbônico percentual presente na saída do processo.

7.3.3 Resultados Obtidos com o Sistema de Aquisição

Conforme exposto na seção anterior, o sistema foi adaptado ao reator de forma a permitir a medição das variáveis de processo. As Figuras 37, 38 e 39 mostram os resultados apresentados pelo processo. Os gráficos de massa de gás carbônico, bem como de oxigênio, foram calculados a partir da medição de vazão em L/min e dos percentuais destes gases. Esta vazão foi monitorada através do uso de rotâmetro, devido ao valor estar muito próximo da escala inferior do sensor, inviabilizando seu uso devido aos erros associados. O sensor de vazão usado na entrada de CO₂ gera sinal proporcional a esta grandeza, independente do valor de pressão, ou seja, não foi necessária a medição de temperaturas e aplicação da lei dos gases perfeitos para a obtenção dos valores reais. A partir destas grandezas foram calculados os valores em gramas por hora. No caso específico do oxigênio, foi feita a medição na entrada e saída do sistema, sendo a diferença tomada como consumo deste gás. Para o caso do gás carbônico, o valor de entrada foi medido pela vazão deste, o qual foi fornecido por cilindro próprio, contendo somente este gás. A medição de CO₂ na saída, comparando com o resultado de entrada, também permitiu a determinação de consumo ou produção durante o processo.

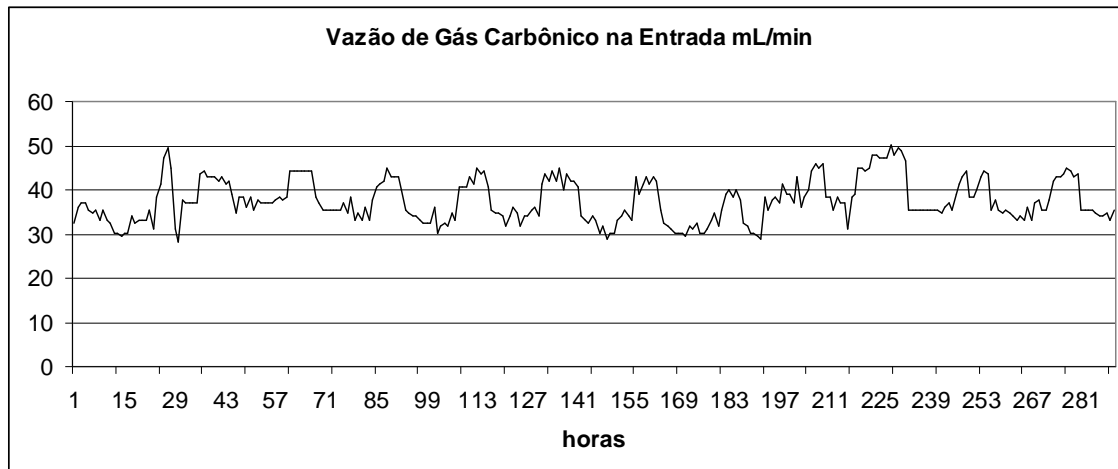


FIGURA 37 - VAZÃO DE CO₂ NA ENTRADA DO REATOR EM ML/MIN

A Figura 37 mostra o valor da vazão medida antes da aplicação do CO₂ ao processo, através de sensor. Estes valores foram verificados também através de indicador, do tipo rotâmetro, já calibrado para este gás. Devido à calibração de fábrica do sensor de vazão ter sido feita para ar, um fator de correção foi aplicado aos valores originais para que fosse reajustado para o gás carbônico, fator indicado pelo próprio fabricante em tabela de calibração. A vazão média ficou em 37,4 mL/min.

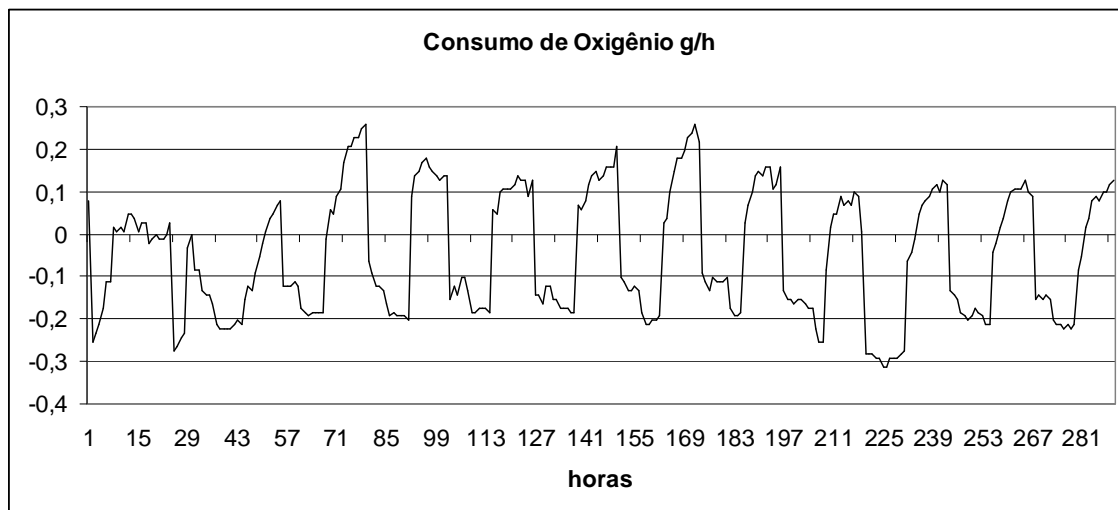


FIGURA 38 - CONSUMO DE OXIGÊNIO EM G/H

O resultado de oxigênio consumido, apresentado em gramas por hora na Figura 38, demonstrou comportamento cíclico, sendo que o tempo de ciclo médio

durante toda a extensão do processo foi de 23 horas e 20 minutos, o que corrobora com o valor esperado do ciclo diário em 24 horas, determinado pelo temporizador de acionamento da iluminação artificial.

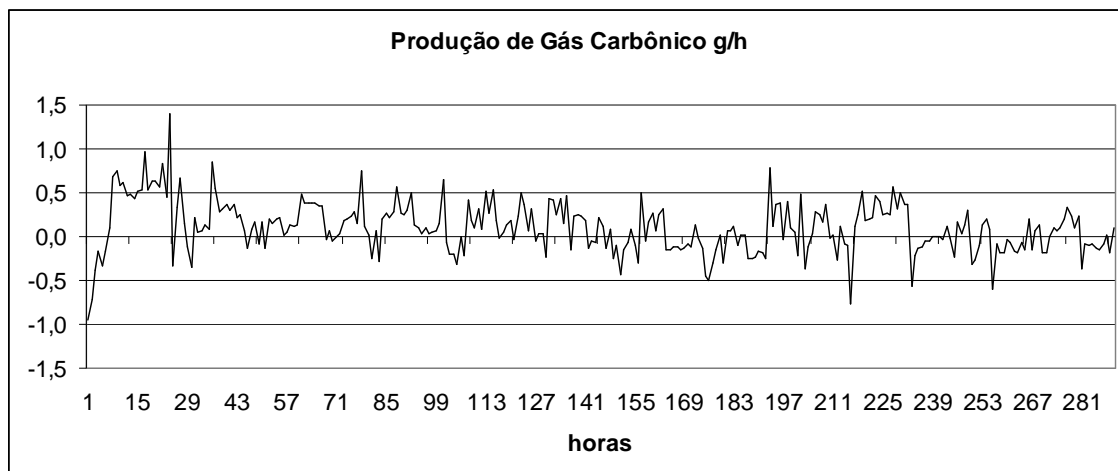


FIGURA 39 – PRODUÇÃO DE CO₂ EM G/H

A Figura 39 mostra o comportamento da produção de CO₂ pelo processo, onde os valores negativos se referem ao consumo deste gás. As medições foram elaboradas com o objetivo de, além de acompanhar o comportamento do processo, determinar qual a quantidade de gás carbônico foi retirado da mistura de entrada. Durante os períodos de fotossíntese os valores de consumo foram quantificados através da integração da curva gerada no gráfico, utilizando integração numérica pela regra do trapézio conforme descrito por Etter e Ingber, (2007). A partir deste valor e considerando o volume do reator de 8 litros, foi possível extrapolar o consumo para as unidades geralmente utilizadas para mensurar a magnitude de retirada de CO₂ da atmosfera, pela transferência em forma de biomassa de microalgas. O valor para este processo foi de 76,07 ton/acre/ano de gás carbônico.

7.3.4 Conclusão desta Seção

Para complementar a verificação de exatidão do sistema de medição, foi elaborado um teste no reator com um meio “branco”, ou seja, o processo foi acompanhado com todos os recursos, porém sem a adição de microrganismo, de modo que os valores de trocas gasosas fossem nulos. O resultado ficou dentro das

tolerâncias dos sensores. Um desvio de 0,61 g/h em média no consumo de CO₂ foi o mais expressivo no que se refere ao funcionamento do processo, apresentado pelo “branco”. A sua presença é explicada pelo acréscimo de um erro, quando da utilização do fator de correção, na ordem de 5% a 10% quando utilizado com outro gás que não o ar, para o qual foi calibrado em fábrica. Na concepção inicial do sistema não havia sido previsto o uso com gás carbônico puro, haja vista que nos processos de fermentação este gás estaria misturado ao ar. Esta limitação do sensor não prejudicou sua condição de medição, apenas necessitando de um ajuste posterior nos valores gerados e, ainda, deve ser considerado que esta correção é linear, com um valor multiplicador constante de 0,7382 (AALBORG, 2006).

Os valores de medição de oxigênio na saída do processo levaram em consideração os desvios causados pela presença de umidade neste ponto, cujo resultado médio foi de 79,38% de umidade relativa.

A vazão de entrada de CO₂ medida apresentou uma média de 37,4mL/min, considerando que o valor determinado pelo procedimento era na ordem de 40 mL/min, esta grandeza mostrou um desvio percentual de apenas 6,5% durante todo o andamento do processo. O comportamento da injeção de gás carbônico extra no processo mostrou estabilidade devido a sua origem proveniente de cilindro próprio. Desta forma a pressão relativa não se modificou muito durante o processo, o que acarretou em pequena incidência de perturbação nesta grandeza.

Os resultados gerados por este experimento foram usados para avaliar a quantidade de CO₂ que o processo retira da atmosfera, estimado com base nas medidas mais usuais de tanques para cultivo de microalgas (SYDNEY, 2009).

Diferente dos processos anteriores, este necessitou de medição de dois valores diferentes de vazão. Um sensor foi utilizado para a medição de injeção de gás carbônico e para o ar um rotâmetro. O sensor previsto para a medição de entrada de ar possui uma faixa de atuação até 200L/min, porém a repetibilidade deste apresenta um valor máximo de 0,5% do fundo de escala (AALBORG, 2006). Este valor aplicado à escala completa do dispositivo resulta em cerca de 1 L/min. Para o experimento realizado neste estudo, a vazão de ar deveria ser mantida em torno de 1,2 L/min, assim a proximidade do desvio e do valor pré-determinado tornou inviável seu uso. Devido a esta característica, a vazão total de ar foi medida

através de rotâmetro e os resultados foram incorporados posteriormente nos cálculos junto aos valores registrados pelo sistema de aquisição de dados.

A ferramenta desenvolvida para aquisição de dados mostrou flexibilidade quanto a modificações necessárias para o atendimento de peculiaridades de cada processo, sendo apenas renomeado o endereço do controlador para o qual o sensor passou a enviar seu sinal, bem como a adequação de escalas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresenta as conclusões deste trabalho, incluindo comentários relativos aos objetivos iniciais deste. Também são comentados resultados complementares e sugeridas algumas possibilidades para trabalhos futuros.

8.1 QUANTO AOS OBJETIVOS

Conforme exposição em cada um dos capítulos, referentes à aplicação dos sensores e controladores, ficou demonstrada a adequação destes frente aos processos propostos como teste. Considerando que, inicialmente, o objetivo tenha sido a instrumentação de processo de fermentação em estado sólido, apenas alguns testes iniciais com sensores de Gás Carbônico eletroquímicos mostraram a sua inadequação. Os demais sensores foram especificados já com este teste em mente, ou seja, as condições de escala e tratamento de sinal foram escolhidas sempre com base em sinais industriais padrão, permitindo a conexão direta com os controladores instalados.

Para que o sistema pudesse ser usado tanto em reatores de pequeno porte, como colunas, por exemplo, quanto em reatores de maior tamanho como os tanques e cilindros, não houve outra condição para escolha do sensor de vazão senão o uso de dois sensores com faixas de atuação diferentes, um para uso até 100mL/min e outro até 200L/min, assim este foi o único elemento do sistema que teve a necessidade de ser substituído de acordo com o porte do processo, sendo os outros todos mantidos conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos no processo de cultivo de microalgas em MBM, com relação à vazão total de ar, demonstraram a necessidade de aquisição de novo sensor, com faixa de atuação na ordem de 10L/min, pois a medição de valores muito próximos de 1L/min se mostrou proibitiva devido aos desvios percentuais totais, dados geralmente em comparação ao fundo de escala. Para este processo os erros associados foram muito próximos dos valores a serem medidos, impedindo assim seu uso dentro de um padrão mínimo de exatidão. Cabe comentar que a repetibilidade dos sensores de vazão é de 0,5% do fundo de escala e para o sensor de maior faixa de atuação esta grandeza resulta em 1L/min, novamente reprovando seu uso na faixa indicada para o processo.

O uso de controladores universais de processos mostrou a capacidade de adaptação no uso do sistema, bem como sua função primordial de controle em processos onde estava disponível algum elemento final de atuação, como no caso dos tanques com aquecimento por resistências, nos quais pôde ser feito o controle propriamente da temperatura. A conexão através de rede de padrão industrial proporcionou a necessária imunidade a ruídos elétricos, presentes mesmo considerando um ambiente laboratorial.

A plataforma de produção do Software de Aquisição de dados foi utilizada para a geração de uma interface própria para o uso em bioprocessos, com a condição de leitura direta das grandezas medidas já com as devidas conversões de escala para facilitar seu entendimento durante a evolução dos processos.

Nos processos onde o programa FERSOL2 pôde ser utilizado com todos os seus recursos, este produziu resultados coerentes com o comportamento do processo, incluindo a proximidade dos valores comparados a processos experimentais, ou mais usuais, para sua determinação. Os testes propostos nos experimentos foram suficientes para a validação dos métodos usados quando do projeto do software, haja vista que em todos os casos os valores foram sempre bastante próximos, independentemente do processo em estudo. Os resultados de comparação entre a estimativa gerada pelo FERSOL2 e os valores medidos diretamente apresentaram coeficientes de determinação médio de 0,92. Este resultado pode ser considerado na validação do programa nesta tarefa, com as provas experimentais comparadas aos resultados apresentados pelo processamento a partir do *software*. Para demais análises futuras os resultados do FERSOL2 poderiam ser tomados sem a necessidade de medições experimentais, reduzindo o tempo e recursos materiais necessários para avaliação de desempenho dos processos. Apenas como exemplo de comparação entre o FERSOL2 e o programa anterior, os valores de seus principais parâmetros resultantes do processamento de alguns experimentos antigos estão apresentados na Tabela 9, onde a indicação “antigo” refere-se à primeira versão e “atual” ao FERSOL2, o nome do arquivo serve apenas como referência para os processos. Cabe lembrar que a nova versão faz um número maior de iterações, com um grau de aproximação

superior ao da versão antiga, assim alguns dos parâmetros apresentam pequenos desvios, porém com coerência quando avaliados pelos métodos aqui tratados.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS SOFTWARES

Nome do Arquivo		m (g O ₂ /g biom. h)	Yx/o (g/g)	μ (h ⁻¹)
Recap7a	Antigo:	0,020	2,00	0,28
	Atual:	0,013	1,67	0,25
Recap3a	Antigo:	0,020	2,02	0,55
	Atual:	0,040	1,86	0,40
Recap2a	Antigo:	0,003	3,598	0,40
	Atual:	0,006	3,519	0,38

A metodologia foi utilizada com êxito em alguns dos microrganismos mais usuais, incluindo processos em reatores diferentes e cujos produtos também foram diversos, cabendo comentar que além dos microrganismos também os meios de cultivo foram diferentes. Um dos indicadores usados na validação da metodologia empregada, formada pelo sistema de aquisição junto à ferramenta computacional, foi a correlação entre valores de biomassa, porém outro indicador pôde ser levantado e analisado quando do uso para produção de Fitase. Este indicador foi a correlação entre o crescimento da biomassa e a atividade da enzima, com resultado médio de 0,98 em todos os experimentos analisados pelo sistema, concordando com as demais publicações afirmando sobre a associação entre crescimento e produção da enzima em questão.

Para finalizar os testes, alguns processos que não se enquadram em fermentação em estado sólido foram avaliados pela mesma metodologia, porém com uso parcial das mesmas ferramentas e cujos resultados também foram bastante promissores, mesmo em se tratando de auxiliar no levantamento de parâmetros. No caso de análise de crescimento de células vegetais, o sistema foi suficiente para demonstrar os ciclos de respiração e fotossíntese no reator, com total do período de 23 horas e 46 minutos, aproximando-se do valor real de 24 horas, bem como do valor máximo aplicável de vazão em 9L/min no reator em estudo. Para o caso dos

estudos em microalgas o sistema foi testado em condições também diferentes das presentes nos processos fermentativos. Embora com algumas limitações, como as relacionadas aos desvios de alguns sensores, o sistema pôde ser utilizado para levantamento de outros parâmetros de desempenho destes processos, como por exemplo, o valor final de gás carbônico retirado do ar pela biomassa, cujo valor foi de aproximadamente 76 ton/acre/ano. Algumas limitações de sensores puderam ser contornadas pelo uso de outros recursos, como no caso de ajuste dos valores de oxigênio consumido com relação à influência da umidade relativa presente, a qual foi medida em praticamente todos os processos, mesmo quando não tenha sido necessário qualquer ajuste.

Com base na sequência dos resultados expostos nos capítulos anteriores, é possível considerar como atingido o objetivo geral da pesquisa rerepresentado como segue: Propor uma metodologia de análise e avaliação aplicável a diversos processos, e respectivos microrganismos, através do uso de sistema de aquisição de dados, sensores e ferramenta computacional.

8.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a intenção de complementar esta pesquisa, bem como produzir soluções ainda necessárias para o contínuo uso das ferramentas desenvolvidas, seguem algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Realização de testes complementares em processos de Fermentação Submersa, de modo a validar com mais informações os recursos já disponíveis no programa principal;
- Verificação da possibilidade de uso de sensores de percentual de oxigênio com outras bases de funcionamento, que não eletroquímicos, com o intuito de aumentar a vida útil destes dispositivos;
- Desenvolver dispositivos finais de atuação, como válvulas proporcionais para pequenas vazões, adaptados para as aplicações nos laboratórios e adequadas a sua ordem de grandeza;
- Pesquisar os recursos computacionais necessários para integrar as funções dos programas de modo que permita a indicação, em tempo real, dos parâmetros

principais dos processos, sem a necessidade de processamento posterior dos dados para gerá-los (POWELL e WEEKS, 2001);

- Pesquisar quais as modificações necessárias e incorporar no algoritmo do FERSOL2 a possibilidade de realizar estimativas de crescimento de biomassa quando utilizado em processo que realize fotossíntese.

8.3 CONCLUSÃO

A contribuição desta pesquisa está relacionada com a possibilidade de tornar mais práticas, rápidas e confiáveis, as análises dos comportamentos dos processos aqui contemplados.

Quando do acompanhamento de um processo, a verificação em tempo real das grandezas determinantes do funcionamento correto deste é crucial para seu melhor entendimento, em caso de processo ainda em estudo, ou de seu monitoramento, em processos bem conhecidos, possibilitando alguma mudança em suas características quando na presença de alguma perturbação ou condição desfavorável.

A aplicação do sistema em processos com Bactérias, Fungos e Microalgas demonstrou a abrangência das ferramentas como solução ligada ao monitoramento, ainda que algumas funções de controle não tenham sido implementadas. Mesmo diante disto, apresentando indicações que foram indispensáveis na decisão do pesquisador, ligado diretamente ao seu estudo específico, sobre necessidade de interrupção da fermentação, por exemplo, quando sob influência de alguma contaminação ou mau funcionamento de algum dos dispositivos auxiliares. Este procedimento pode ser de grande importância em reatores de grande porte, sendo este recurso, presente nas ferramentas, um indicador relacionado à economia de matéria-prima e conseqüente melhora da rentabilidade financeira de determinado processo. Cabe salientar que o investimento total em materiais, sensores, licenças de *softwares* e demais etapas para o desenvolvimento das ferramentas, foi na ordem de vinte mil reais, o qual comparado ao custo total de um biorreator de grande porte, que pode chegar a ordem de algumas centenas de milhares de reais, mostra sua viabilidade em aplicações industriais

Mesmo tendo sido uma aplicação parcial dos recursos desenvolvidos, a aquisição e análise dos resultados referentes a produção de Microalgas, mostrou grande potencial para a geração de indicadores, matematicamente demonstrados sobre resultados experimentais, a respeito da capacidade de retirada de gás carbônico da atmosfera pelos reatores fechados de produção de biomassa destas algas. Os resultados atingidos mostram a coerência entre os valores calculados pelos gráficos, e ajustes definidos por flutuações em outras variáveis, quando em comparação com resultados medidos e calculados por outros métodos de medição.

Os resultados, obtidos em cada um dos processos, dos parâmetros que definem os processos de fermentação como coeficiente de manutenção, velocidade específica de crescimento e rendimento ou produção de biomassa comparada ao consumo de oxigênio, foram confirmados por procedimentos analíticos ou por outros métodos, validando, desta forma, os métodos e algoritmos empregados no projeto do programa de computador.

Outras aplicações poderão ser desenvolvidas para adaptação a outras áreas de interesse dentro do programa de pós-graduação, haja vista o potencial demonstrado pelos experimentos no que se refere à versatilidade do sistema em conjunto.

REFERÊNCIAS

- AALBORG, 2006. Low Cost Mass Flow Meters. GFM Model Flow Sensor. Disponível em: <http://www.aalgorg.com> . Acesso: 10/05/2006.
- ALPHASENSE, 2006. How Oxygen Sensors Work. Alphasense Application Note AAN009. Disponível em: <http://www.alphasense.com> . Acesso 05/05/2006.
- ALPHASENSE, 2009. Technical Specification: Oxygen Sensor O2A2. Data Sheet. Disponível em: <http://www.alphasense.com> . Acesso 25/07/2009.
- ALPHASENSE, 2009a. Application Note: How Humidity Affects Oxygen Sensor Output. Disponível em: <http://www.alphasense.com> . Acesso 25/07/2009.
- AURIA, R., HERNÁNDEZ S., RAIMBAULT, M. y REVAH, S: Ion Exchange Resin: A Model Support for Solid State Growth Fermentation of *Aspergillus Niger*. *Biotechnol Tech.*, 4, p. 391. 1990.
- BASSANEZI, Rodney Carlos. Ensino-aprendizagem com modelagem matemática: uma nova estratégia. pp. 188-191. São Paulo: Editora Contexto, 2002.
- BINOD, Parameswaran; SINGHANIA, Reeta Rani; SOCCOL, Carlos R. ; PANDEY, Ashok. Industrial Enzymes. In: Ashok Pandey; Christian Larroche; Carlos Ricardo Soccol; Claude-Gilles Dussap. (Org.). *Advances in Fermentation Technology*. 1 ed. pp. 291-320. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2008.
- BORGHETTI, Ivo Alberto. Desenvolvimento de Bioprocessos para o Cultivo da Microalga (*Chlorella minutissima*) Utilizando Diferentes Concentrações de Manipueira como Substrato. 2009. Dissertação. Mestrado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, 2009.
- BRACEWELL, Ronald. *The Fast Fourier Transform and its Applications*. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 2000.
- CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B.O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LEÓN, J.A.; SOCCOL, C.R. (2006) Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 29 (2006) pp. 262–269.
- CEREDA, M. P. (Coord.) *Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca*. 320p. v 4. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.
- CERQUEIRA, Eduardo O.; POPPI, Ronei J.; KUBOTA, Lauro T. Utilização de Filtro de Transformada de Fourier para a Minimização de Ruídos em Sinais Analíticos. *Química Nova*, São Paulo. V23 n 5 pp. 690-698, 2000.
- CHRISTEN, P., AURIA, R., MARCOS, R., VILLEGAS E. y REVAH S: *Adv. Process Eng.*, p. 87. 1994.

COSTA, Jorge Alberto Vieira; RADMANN, Elisangela Martha, CERQUEIRA, Vanessa Sacramento; SANTOS, Glória Cristina dos; CALHEIROS, Maurício Neves. (2006). Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições. *Alim. e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. v.17, n.4, p.429-436, Araraquara, out./dez. 2006.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and Microalgae as Sources of Pigments for Food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science and Technology*. v.16, p. 389-406, 2005.

ETTER, Delores M.; INGBER, Jeanine A. *Engineering Problem Solving With C++*. pp. 237-241. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2007.

FENNEMA, Owen. *Química de los alimentos*. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for Food Application, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 125–140 (2006).

HELLERSTEIN, Joseph; DIAO, Yixin; PAREKH, Sujay; TILBURY, Dawn M. *Feedback Control of Computing Systems*. pp. 268-269. New Jersey: Wiley-IEEE, 2004.

KOBA, Y., FERROZA, B., FUJIO, Y. y UEDA, S: *J. Ferment. Technol.*, 62, 2, p. 175. 1986.

LCDS. Leão Consultoria e Desenvolvimento de Sistemas Ltda. *Supervisório Laquis 3.0*. Disponível em: <http://www.lcds.com.br/laquis.asp> . Acesso: 15/04/2009.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo. *Biotecnologia Industrial. Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. p. 128. Editora Edgard Blücher: São Paulo, 2001.

LIPTÁK, Béla G. *Instrument Engineers' Handbook: Process control and optimization*. pp. 695-697. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MAUGERI, Filho, F. *Produção de Polissacarídeos*. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. vol. 3, p. 125-153. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

MEIJER, Gerard C. M. *Smart Sensor Systems*. West Sussex: John Wiley and Sons, 2008.

MITCHELL, David A; KRIEGER, Nadia; BEROVIC, Marin. *Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

NISHIO, N., TAI, Tai, K. y NAGAI, S: *Hydrolase production by Aspergillus niger in solid state cultivation*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8, p. 263. 1979.

- NOVUS, 2006. Catálogo de produtos. Disponível em: www.novus.com.br . Acesso: 10/05/2006.
- NOVUS, 2006b. Manual de Operação N1100. Disponível em: www.novus.com.br . Acesso: 10/05/2006.
- OKASAKI, N., SUGAMA, S. y TANAKA T: Mathematical model of surface culture of koji mold. *J. Ferment. Technol.*, 58, 5, p. 471. 1980.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, v.20, p.459-466, 2003.
- PANDEY, A., C. R. SOCCOL, RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A. y NIGAM, P.: *Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*. New Dehli: Asiatech Publishers, Inc., 2001.
- PANDEY, A., SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LÉON, J.A.;SOCCOL, V.T. (2001a), Production Purification and Properties of Microbial Phytases. *Bioresource Technology*. v.77, p.203 – 214.
- PANDEY, A., LARROCHE, Christian, C. R. SOCCOL, DUSSAP, Claude-Gilles. *Advances in Fermentation Technology*. New Dehli: Asiatech Publishers, Inc., 2008.
- POWELL, Robert; WEEKS, Richard. *C# and the .NET Framework: the C++ Perspective*. pp. 586-592. Indianapolis: Sams Publishing, 2001.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. (1980), Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p. 199-209. 1980.
- RAIMBAULT, M: *Travaux et Documents de l'ORSTOM*, No. 27, París. 1981.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E.. *Biologia Vegetal*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RODRÍGUEZ LEÓN J. A, L. SASTRE, J. ECHEVARRÍA, G. DELGADO and W. BECHSTEDT: A Mathematical Approach for the estimation of Biomass Production Rate in Solid State Fermentation. *Acta Biotechnologica* 8 (4): 299-302. 1988.
- RODRÍGUEZ LEÓN, J. A., BUENO, G. RODRÍGUEZ, D. E., DELGADO, G., SERRANO, P. y BRIZUELA, M.A.: True and apparent yield and maintenance coefficient and their significance on fermentation .kinetics. Chapter 15 pp. 163-172. In: *New Horizons in Biotechnology*. Ed. S. Roussos, C. R. Soccol, A. Pandey and C. Augur. IRD Editions, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands.2003.
- RODRÍGUEZ-LEÓN, Jose A; SOCCOL, Carlos R; PANDEY, Ashok; RODRÍGUEZ, Daniel E. Chapter 4 Kinetics of Solid-state Fermentation. In: Ashok Pandey; Carlos Ricardo Soccol; Christian Larroche. (Org.). *Current Developments in Solid-state Fermentation*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008.

ROSENTHAL, Joachim; GILLIAM, David S. Mathematical systems theory in biology, communications, computation, and finance. pp. 301-312. New York: Springer, 2003.

ROUSSOS S.; SOCCOL C. R.; PANDEY, Ashok; AUGUR, C. New Horizons in Biotechnology. p. 177. New York: Springer, 2003

SANDBERG, A.S.; ANDERSON, H. (1988), Journal of Nutrition, 118(4), 469-473.

SATO K., M. NAGATANI, K. NAKAMURA and S. SATO: Growth Estimation of *Candida lipolitica* from Oxygen Uptake in a solid State Culture with Forced Aeration. J.Ferment. Technol. 61 (6) 623-629. 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., BACQUET, G., RAIMBAULT, M. y Viniegra-González, G: Biotechnol. Bioeng., 35, p. 802. 1990.

SCHEIDT, Gessiel Newton. Desenvolvimento e Validação de um Biorreator do Tipo Imersão por Bolhas para Micropropagação de Plantas. 2008. 105 p. Tese. Doutorado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, 2008.

SERMANNI, Giovanni Giovannozzi; TISO, Nicola. Aspects of Design of Bioreactors in SSF (Chapter 06) In: Ashok Pandey; Carlos Ricardo Soccol; Christian Larroche. (Org.). Current Developments in Solid-State Fermentation. v.1, p.146-168. 1ed. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008.

SILVA, L. G.; TRUGO, L. C. (1996), Characterization of Fitase Activity in Lupin Seed. Journal of Food Biochemistry, v.20, p. 329-340.

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (DEPR. 01508000078). 03/03/ 2008.

SPIER, Michele Rigon. Development of a Bioprocess for Production of a New *a. Niger* fs3 Phytase: Studies of its Purification and Characterization. 2008. 135 p. Tese. Doutorado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, 2008.

SPIER, Michele Rigon; GREINER, R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci ; PANDEY, Ashok ; SOCCOL, V. T. ; SOCCOL, Carlos Ricardo. Phytase Production Using Citric Pulp (CP) and Others Agroindustrials Residues BY SSF (Published). Food Technology and Biotechnology, v. 45, p. 49-58, 2008.

SPIER, Michele Rigon ; LETTI, L. A. J. ; WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci ; SOCCOL, Carlos Ricardo. A simplified model for *A niger* FS3 growth during phytase formation in solid-state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, p. 151-158, 2009.

STURM, Wilerson. Sensores Industriais - Conceitos Teóricos e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro: Papel Virtual Editora, 2004.

STURM, Wilerson, DERGIN, Dario Eduardo Amaral, SOCCOL, C. R., PANDEY A. Instrumentation and Control in SSF (Chapter 07) In: Ashok Pandey; Carlos Ricardo Soccol; Christian Larroche. (Org.). Current Developments in Solid-State Fermentation. v.1, p.146-168. 1ed. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008.

STURM, Wilerson; DERGIN, Dario Eduardo Amaral; RODRÍGUEZ-LEÓN, Jose A.; MAGALHAES, Deiva Canali Navarro Vieira; SOCCOL, Carlos R. Chapter 8 Informatics in SSF. In: Ashok Pandey; Carlos Ricardo Soccol; Christian Larroche. (Org.). Current Developments in Solid-state Fermentation. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008b.

SYDNEY, Eduardo B. Respirometric balance and analysis of four microalgae: *Dunnaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* and *Spirulina platensis*. 2009. Dissertação (Mestrado em Master BIODÉV) - Université de La Méditerranée Aix Marseille II, 2009.

TEREBIZNIK, M.R.; PILOSOV, A.M.R. Biomass Estimation in Solid State Fermentation by Modeling Dry Matter Weight Loss. *Biotechnology Techniques Journal*, v. 13, number 3, p. 215-219, 1999.

THISTED, Ronald Aaron. Elements of Statistical Computing: numerical computation. pp167. Boca Raton: CRC Press, 1988.

VAISALA, 2006. CO2 Sensors model GMT221. Technical Data. Disponível em: <http://www.vaisala.com>. Acesso: 10/05/2006.