

Bruno Gabriel Gustavo Leonardo Zambolini Vicente

Modelagem do Transporte de O₂ em um Biorreator para Cultivo de Célula Animal

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola de Engenharia de São
Carlos, da Universidade de São Paulo

Curso de Engenharia Elétrica com ênfase
em Sistemas de Energia e Automação

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto Boffino de Almeida Monteiro

São Carlos
2008

À minha família, meus amigos e aos meus eternos guias...

AGRADECIMENTOS

Dedico especiais agradecimentos ao Prof. José Roberto, meu orientador, que propôs gentilmente o desafio de avaliar sob o ponto de vista da engenharia elétrica os princípios básicos de funcionamento do biorreator alvo do estudo. Além disso, sou eternamente grato pela imensa atenção e dedicação proporcionada, pelas longas conversas e debates, bem como por todos os conselhos que tem me ajudado a conduzir melhor minha carreira.

Agradeço também aos amigos do Laboratório de Controle e Eletrônica de Potência – LACEP, pela cordialidade e pelo ambiente de trabalho que proporcionaram durante todos estes anos.

Agradeço pelo imenso apoio da minha querida Fernanda, companheira importante dos melhores momentos da minha vida, pessoa ao qual devo profundo respeito e admiração.

Agradeço intensamente aos companheiros de estadia em São Carlos, especialmente ao Monaro, Marcel, Anderson e compania, incríveis engenheiros eletricistas ao qual tive o privilégio de dividir tantas e boas fieiras da vida acadêmica, assim como bons momentos e conversas de altíssimo nível.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Definição e Conceito	1
1.2 Diferenças biológicas entre células microbianas e animais.....	1
1.3 Objetivos	4
2 DESENVOLVIMENTO	5
2.1 Materiais e métodos.....	5
2.2 Características dos biorreatores.....	5
2.3 Caracterização física do biorreator avaliado.....	6
2.4 Leis fundamentais de química geral	7
2.4.1 Lei de Dalton	7
2.4.2 Lei de Henry	8
2.4.3 Aspectos relevantes ao trabalho.....	9
2.5 Leis de transporte de massa	11
2.5.1 Lei de Fick.....	11
2.5.2 Coeficientes convectivos de transporte de massa	12
2.5.3 Coeficientes globais de transferência de massa.....	14
2.5.4 Relação entre os coeficientes globais e os individuais	14
2.5.5 Fluxo global em soluções diluídas.....	17
2.5.6 Cinética da transferência de massa	18
2.6 Leis de circuitos elétricos	19
2.7 Analogia Transporte-Circuitos Elétricos	20
2.7.1 Formulação.....	20
2.7.2 Cálculo dos parâmetros de circuito.....	25
2.7.3 Circuito elétrico análogo	27
2.8 Validação do modelo	32
2.9 Estratégias de controle.....	33
2.9.1 Controlador On-Off	34
2.9.2 Controlador por Histerese	36

2.9.3	Controlador PWM.....	38
2.9.4	Análise dos controladores	39
3	CONCLUSÕES.....	47
4	ANEXOS.....	49
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura típica de uma bactéria.....	2
Figura 2 - Estrutura de uma célula animal típica.....	3
Figura 3 - Geometria do biorreator.....	6
Figura 4 - Interface Membrana – Meio de Cultura.....	22
Figura 5 - Interface Meio de Cultura – Ar.....	23
Figura 6 – Esquema do biorreator contendo as interfaces de transferência de massa.	25
Figura 7 - Circuito modelado a partir dos parâmetros mapeados.....	28
Figura 8 - Mapeamento simplificado dos parâmetros de circuito.	29
Figura 9 - Circuito modelado simplificado.	29
Figura 10 - Resposta ao degrau do modelo obtido.	33
Figura 11 - Malha de controle para o biorreator.....	34
Figura 12 - Controlador On-Off, monitoramento do O ₂	35
Figura 13 - Controlador On-Off, entrada de O ₂ e N ₂	35
Figura 14 - Controlador Histerese, monitoramento do O ₂	36
Figura 15 - Controlador Histerese, entrada de O ₂ e N ₂	37
Figura 16 - Controlador PWM, monitoramento do O ₂	38
Figura 17 - Controlador PWM, entrada de O ₂ e N ₂	39
Figura 18 - Circuito elétrico para situação de válvula de O ₂ fechada.....	40
Figura 19 - Controlador On-Off, monitoramento de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5%....	40
Figura 20 - Controlador On-Off, entrada de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5%.....	41
Figura 21 - Controlador Histerese, monitoramento de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5% ..	42
Figura 22 - Controlador Histerese, entrada de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5%.....	42
Figura 23 - Controlador PWM, monitoramento de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5%.....	43
Figura 24 - Controlador PWM, entrada de O ₂ com injeção de N ₂ a 8,5%.....	44
Figura 25 - Controlador On-Off, operação para ciclo de cultivo completo.	44
Figura 26 - Controlador Histerese, operação para ciclo de cultivo completo.	45
Figura 27 - Controlador PWM, operação para ciclo de cultivo completo.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da constante de Henry na água (Kx10 ⁵ .atm ⁻¹) (GERRARD, 1980)..	8
Tabela 2 - Solubilidade dos gases em água 22°C e a 37°C (GERRARD, 1980).....	9
Tabela 3 - Massa molar dos gases do cultivo.....	10
Tabela 4 - Parâmetros da analogia Transporte-Circuitos.....	24
Tabela 5 - Controlador On-Off : consumo de O ₂ em relação a 1h de vazão total.....	36
Tabela 6 - Controlador Histerese: consumo de O ₂ em relação a 1h de vazão total.....	37
Tabela 7 - Controlador PWM: consumo de O ₂ em relação a 1h de vazão total.....	39
Tabela 8 - K _{La} para algumas condições de trabalho.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS

a : área de interface por unidade de volume do biorreator (m^2/m^3);

C_0 : Capacitância do volume de Ar no interior da Membrana;

C_1 : Capacitância do volume de Ar livre;

C_2 : Capacitância do volume de Cultivo Celular;

C_{ap} : capacidade de armazenamento de carga (Capacitância, em Faraday, F)

CHO : célula de mamífero (*Chinese Hamster Ovary*);

CO_2 : gás carbônico;

$C_{O_2}^{(H_2O)}$: concentração de oxigênio no meio de cultura.

$C_{O_2}^{(ar)}$: concentração de oxigênio no ar.

C_∞ : valor de saturação de O_2 no meio líquido (g/m^3);

D_{AB} : difusividade de uma mistura A e B (m^2/h)

$g \geq 0$: condutância ao fluxo de corrente elétrica (Siemens, Ω^{-1});

\tilde{G} : fluxo de massa molar (kgmol/h);

H_2O : água;

H_A : constante de Henry para A, determinada experimentalmente.

I : corrente elétrica na secção transversal do condutor (C/s);

I_{CEL} : orrente de consumo de massa do crescimento celular.

I_m : fluxo de massa M no tempo, ou corrente mássica (kg/s);

\tilde{I} : fluxo do constituinte A ($\text{kgmol}/\text{h} \cdot \text{m}^2$)

J_A : fluxo de massa de A;

J_B : fluxo de massa de B;

$k_{\tilde{x}}$: coeficiente local de transferência de massa aplicável à fase líquida (m/h);

$k_{\tilde{y}}$: coeficiente local de transferência de massa aplicável à fase gasosa (m/h);

K : constante de proporcionalidade, ou constante de Henry.

$K_L a$: constante global de transferência O_2 (h^{-1}).

$K_L a_{\max} = 5,5\text{h}^{-1}$: máximo coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio do processo;

$K_L a_{\min} = 2,9\text{h}^{-1}$: mínimo coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio do processo;

$m = \frac{H_A}{p_A}$: constante de Henry normalizada pela pressão parcial de um constituinte numa solução líquida;

M : quantidade de massa para dado volume contido na solução (kg);

M_A : massa molecular de A

M_B : massa molecular de B

n : número de mols do gás;

N_2 : nitrogênio;

$NaOH$: hidróxido de sódio;

N_A : densidade de fluxo de massa A ($\text{kg}/\text{h.m}^2$);

\tilde{N}_A : densidade de fluxo molar em relação a um sistema fixo de coordenadas ($\text{kgmol}/\text{h.m}^2$);

O_2 : oxigênio;

p_A : pressão parcial de A;

$P = 0,2$ atm: pressão parcial do gás;

P_T : pressão total da mistura;

PWM : modulação por largura de pulso (*Pulse Width Modulation*);

\bar{p}_A : pressão parcial de um constituinte numa solução líquida;

$q_{\max} = 10\text{mL/s}$: vazão máxima de transferência de volume na entrada;

Q : quantidade de cargas elétricas (Coulombs, C);

$r = 0,082 \frac{\text{atm} \cdot L}{\text{mol} \cdot K}$: constante de Boltzmann;

$R \geq 0$: resistência ao fluxo de corrente elétrica (Ohms, Ω);

R_1 : Resistência de entrada da interface Membrana – Cilindro;

R_2 : Resistência de interface Membrana – Cultivo Celular;

R_3 : Resistência de interface Cultivo Celular – Ar;

$R_m \geq 0$: resistência ao fluxo de massa ($L^{-1} \cdot h$);

R_{val} : resistência de entrada da válvula de O_2 ;

$T = 27 + 273 = 300\text{K}$: temperatura do gás no ar.

U_1 : tensão no volume de ar livre acima;

U_2 : tensão no meio de cultivo celular;

U_{IN} : tensão da entrada de O₂.

$V = 1\text{L}$: volume total da mistura gasosa;

Vol : volume da solução (L).

$V_{transferido} = 50\text{mL}$: volume transferido para vazão máxima;

V_x : volume total do reator (m³).

x_A : fração mássica de A (kg/kg).

\tilde{x}_A : fração molar média constituinte A (kgmol/kgmol);

\tilde{x}_{As} : fração molar do soluto na interface da solução líquida;

\tilde{x}_A^* : fração molar do soluto no líquido, em equilíbrio com o gás de composição \tilde{y}_A ;

\tilde{y}_A : fração molar do soluto na fase gasosa no bordo da camada limite ou a fração molar média.

\tilde{y}_{As} : fração molar do soluto na fase gasosa, junto à interface;

\tilde{y}_A^* : fração molar do soluto no gás em equilíbrio com o líquido de composição \tilde{x}_A ;

α : solubilidade de O₂ em H₂O, das condições de temperatura e pressão (L/L).

$\Delta P = 1\%$: variação da pressão na entrada do cilindro;

ρ : massa específica da mistura (kg/m³);

ρ_{AM} : coeficiente de transporte local convectivo (m/s);

ρ_{As} : concentração do constituinte A no limite de uma fase (kg/m³);

$\tilde{\rho}$: concentração molar média (kgmol/m³)

RESUMO

Atualmente, grande parte dos produtos farmacêuticos de alto valor agregado, como proteínas recombinantes, hormônios e vacinas virais, são produzidas por células animais. Essas células possuem como vantagem sobre os cultivos bacterianos, empregados tradicionalmente, a capacidade de reproduzir, de forma confiável, proteínas de maior complexidade. Em contrapartida, o cultivo dessas células exige controle refinado das condições do meio de cultura, a fim de que o produto final possa ser produzido.

O processo de cultivo de células animais tem despertado o interesse da indústria e da comunidade científica, os quais cada vez mais vêm pesquisando maneiras de incrementar a produtividade para certas linhagens celulares. Grupos de trabalho estudam a inserção de nutrientes e suplementos, enquanto outros pesquisadores concentram-se na engenharia genética e introdução de mudanças no metabolismo.

Uma outra vertente baseia-se no aperfeiçoamento dos sistemas de controle do processo de cultivo, apresentando custos de desenvolvimento significativamente menores. Nessa linha de pesquisa, esse trabalho propõe uma modelagem matemática da difusão de oxigênio em um biorreator através da identificação de seus aspectos físicos por elementos de circuitos elétricos, tornando possível a investigação e aplicação de técnicas de controle conhecidas da engenharia elétrica.

Palavras chave: modelagem em parâmetros de circuitos elétricos, biorreatores, cultivo celular, transferência de massa.

ABSTRACT

Actually, great part of the high value pharmaceutical products, as recombinants proteins, hormones and virals vaccines, is currently produced by animal cells. These cells have great advantage on the bacterial cultures, traditionally used for be able to reproduce proteins of bigger complexity. On the other hand, the culture of these cells demands sufficiently fine control of the conditions of the cellular environment, so that small amounts it end item can be produced.

The process of culture of animal cells has been increasing the interest of the industry and the scientific community, which each time more comes researching pathways to develop the productivity for some specifics cellular ancestry. Work groups study the insertion of nutrients and supplements while other researchers concentrate in genetic engineering and introduction of changes in the metabolism.

Another research way is based on the improving of the systems of control of the environment of culture, having presented significantly lesser costs of development. In this line of research, this work considers a mathematical modeling of the oxygen diffusion in a bioreactor through the identification of its physical aspects for elements of electric circuits, becoming possible the inquiry and application of known techniques of control of electric engineering.

Keywords: modeling in electrical circuitry parameters, bioreactors, cell culture, mass transfer.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Conceito

O cultivo de células animais é tradicionalmente empregado na produção de vacinas, tanto para humanos como para uso veterinário. Mais recentemente encontrou espaço na indústria farmacêutica, sendo empregado na produção de proteínas terapêuticas (POLASTRI, 1997).

Anteriormente aos crescentes avanços na utilização de cultivos de células animais, grande expectativa criou-se acerca do uso com sucesso de bactérias recombinantes para produção de insulina e hormônios de crescimento humano, imaginando-se que mais proteínas pudesse ser produzidas com essa tecnologia (ATLAS, 1995).

Entretanto, a experiência da indústria comprovou a limitação do uso desses microorganismos prevista pelos setores acadêmicos. Para pequenas proteínas de complexidade reduzida, a tecnologia microbiana apresenta resultados que viabilizam a produção em escala. Em contrapartida, o nível de complexidade da maioria das proteínas de maior valor agregado, além da sua extensão, tornam o método impraticável, uma vez que freqüentemente são desnaturadas ou de configuração tridimensional inapropriada (WIRTH e HAUSER, 1993). As proteínas animais que despertam interesse do setor farmacêutico normalmente tem modificações importantes como fosforilações e carboxilações, além de usualmente serem glicolisadas, diferenças muitas vezes fundamentais para o adequado funcionamento biológico da proteína.

Do ponto de vista prático, as células animais necessitam de um grande número de cuidados extra, quando comparados aos cultivos de microrganismos realizados em biorreatores. Entre estes cuidados deve-se citar a ausência das paredes celulares, que dificultam a aeração por sistemas tradicionais de aspersão, devido a tensões de cisalhamento presentes no meio de cultura e que ocasionam danos celulares (MICHAELS et al., 1996). Esse obstáculo foi contornado a partir do desenvolvimento de um sistema para cultivos de células animais empregando membranas de silicone como interface de inserção de gases (CASEY et al., 1999).

1.2 Diferenças biológicas entre células microbianas e animais

Sob o ponto de vista biológico, as bactérias são seres procariontes, também chamadas de protocélulas. A sua principal característica é a ausência de carioteca individualizando o núcleo celular, ausência de algumas organelas e o pequeno tamanho que credita-se ao fato de não possuírem compartimentos membranosos originados por evaginação ou invaginação. Também possuem DNA na forma de um anel não-associado a proteínas, como acontece nas células eucarióticas, nas quais o DNA se dispõe em filamentos espiralados e associados a histonas (JUNQUEIRA, 2000).

Essas células são desprovidas de mitocôndrias, plastídeos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e sobretudo cariomembrana o que faz com que o DNA fique disperso no citoplasma, sendo sua estrutura típica apresentada na Figura 1.

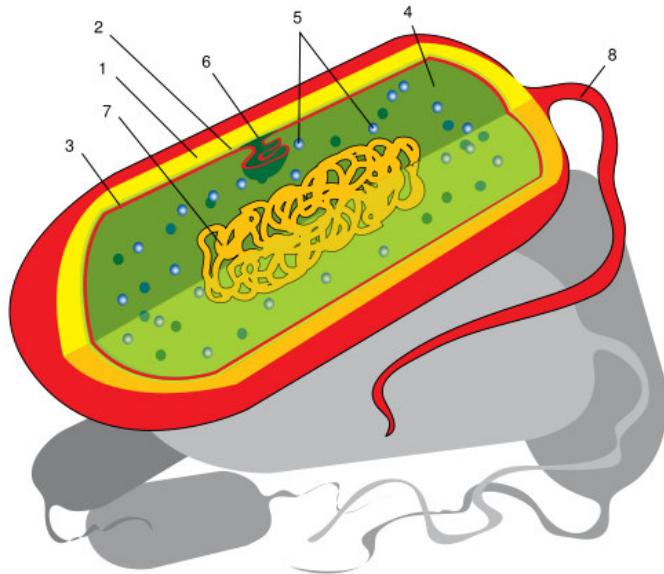


Figura 1 - Estrutura típica de uma bactéria.

- 1. Cápsula, 2. Parede celular, 3. Membrana plasmática, 4. Citoplasma, 5. Ribossomos, 6. Mesossomos, 7. DNA (nucleóide), 8. Flagelo bacteriano (BAILEY e OLLIS, 1986).**

As células animais são eucariontes ou eucarióticas, também chamadas de eucélulas, de maior complexidade do que as células procariontes (Figura 2). Possuem membrana nuclear individualizada e vários tipos de organelas. Estudos indicam ser altamente provável que essas células tenham surgido por um processo de aperfeiçoamento contínuo das células procariontes (JUNQUEIRA, 2000)

Não é possível avaliar com precisão quanto tempo a célula "primitiva" levou para sofrer aperfeiçoamentos na sua estrutura até originar o modelo que hoje se repete na imensa maioria das células, mas é provável que tenha demorado muitos milhões de anos. Acredita-se que a célula "primitiva" era pequena e para que sua fisiologia estivesse melhor adequada à relação tamanho *versus* funcionamento era necessário que crescesse (DE ROBERTIS, 2001). Assim, a membrana da célula "primitiva" tenha emitido internamente prolongamentos ou invaginações da sua superfície, os quais se multiplicaram, adquiriram complexidade crescente, conglomeraram-se ao redor do bloco inicial, até o ponto de formarem a intrincada malha do retículo endoplasmático. Dali ela teria sofrido outros processos de dobramentos e originando-se outras estruturas intracelulares como o complexo de Golgi, vacúolos, lisossomos e outras.

Quanto a presença da mitocôndria, uma corrente de cientistas que acreditam que a melhor teoria que explica a existência destes orgâculos é a Teoria da Endossimbiose (BLANCHARD e LYNCH, 2000) segundo a qual um ser com uma célula maior possuía dentro de si uma célula menor mas com melhores características, fornecendo um refúgio à menor e esta a capacidade de sintetizar proteínas com interesse para a outra.

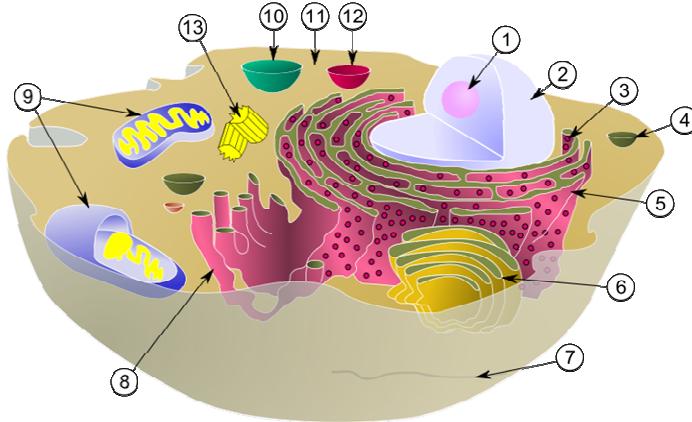


Figura 2 - Estrutura de uma célula animal típica

1. Nucléolo, 2. Núcleo celular, 3. Ribossomos, 4. Vesículas, 5. Ergastoplasma ou Retículo endoplasmático rugoso (RER), 6. Complexo de Golgi, 7. Microtúbulos, 8. Retículo endoplasmático liso 9. Mitocôndrias, 10. Vacúolo, 11. Citoplasma, 12. Lisossomas, 13. Centríolos (BAILEY e OLLIS, 1986).

Enquanto as células de microrganismos estão adaptadas ao crescimento independente, embora formando muitas vezes agregados, as células de seres superiores encontram-se diferenciadas, cada uma com uma função específica dentro do organismo (DE ROBERTIS, 2001).

Durante a fase embrionária, essas células passam por uma série de transformações, de modo que cada célula adulta está diferenciada para exercer uma função, fazendo parte de um tecido ou órgão. Apesar de pertencerem todas à mesma espécie, e conterem exatamente o mesmo material genético, cada célula é capaz de sintetizar diferentes compostos que por sua vez, poderão ser utilizados por células em outros órgãos (JUNQUEIRA, 2000).

Decorre assim, forte interdependência entre as células, que gera como consequência, uma série de limitações não encontradas em organismos microbianos. Por exemplo, uma bactéria é capaz de metabolizar várias fontes de carbono oferecidas, sintetizando vários compostos necessários ao seu crescimento. Desta forma, pode crescer em meios bastante simples, constituídos por uma fonte de carbono, uma de nitrogênio, alguns sais e alguma fonte de micronutrientes, como extrato de levedura (STANIER, 1986).

Já uma célula animal está adaptada a crescer em um organismo que, através da corrente sanguínea, lhe proverá todos os nutrientes necessários. Outras partes do organismo serão responsáveis pela digestão do alimento ingerido e sua transformação em intermediários do metabolismo. Conclui-se, que ao se tentar cultivar células animais *in vitro*, como no exemplo em biorreatores, o meio de cultura oferecido deve ser extremamente complexo, contendo todos os aminoácidos, vários sais minerais, vitaminas, ácidos graxos e glicose, suprindo todos os ingredientes que normalmente, o sangue supriria (WOLFE, 1993).

Outra característica de cultivos com células animais é a necessidade de duas fontes de carbono: glicose e glutamina, que é metabolizada em glutamato e alfa-cetoglutarato, entrando no ciclo de ácidos tricarboxílicos (VRIEZEN et al., 1997). No metabolismo destas fontes de carbono, praticamente toda glicose é convertida em lactato e toda glutamina em amônio. As relações entre lactato produzido por glicose consumida e de amônio produzido por glutamina consumida representam importantes parâmetros de acompanhamento do processo, fornecendo indícios do fluxo metabólico interno da célula a cada momento do cultivo (ZENG et al., 1998; OZTURK et al, 1997).

Semelhantemente, do ponto de vista de resistência ao estresse imposto em um biorreator, as células animais se apresentam muito mais frágeis que as microbianas, devido à falta de uma parede celular rígida (SAMBANIS e HU, 1993). Desta forma, a freqüência de agitação de centenas de rotações por minuto (típica em biorreatores de bancada com microrganismos) torna-se inibitória ao crescimento de células animais e, portanto o desenvolvimento de formas alternativas de agitação e aeração passam a ser objeto de estudo de engenharia. No caso de crescimento de células suspensas em biorreatores agitados e aerados por aspersão, o maior dano é devido à quebra das bolhas de ar na superfície do líquido e à velocidade de drenagem do filme líquido em torno da interface gás-líquido (PAPOUTSAKIS, 1991). Várias tentativas de contornar esse problema são freqüentemente citadas na literatura. A utilização de sistema de aeração sem a formação de bolhas é uma forma de se evitar tal dano (CASEY et al., 1999).

1.3 Objetivos

O trabalho desenvolvido tem por objetivo principal a construção de um modelo matemático para o sistema de transporte de O₂ em um biorreator para cultivo de célula animal. Baseando-se na investigação e identificação de parâmetros que possam ser mapeados de forma a se obter um circuito elétrico equivalente, de posse de um modelo consistente, torna-se possível a avaliação e estudo de sistemas de controle aplicáveis ao biorreator modelado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Materiais e métodos

O estudo realizado apoiou-se fundamentalmente no material bibliográfico disponível na biblioteca da Escola de Engenharia de São Carlos, EESC/USP, tais como os artigos científicos e livros disponíveis para consulta, bem como no material encontrado em *sites* especializados da Internet.

Para simulação utilizou-se linguagem C para codificação dos arquivos-fonte, produzido e gerenciado no editor de texto Emacs, compilado através do pacote GNUMake, instalados em uma estação de trabalho GNU/Linux, disponibilizada pelo Laboratório de Controle e Eletrônica de Potência – LACEP.

2.2 Características dos biorreatores

O termo biorreator pode ser empregado para referir-se a qualquer equipamento ou sistema que dá suporte a um ambiente biologicamente ativo (IUPAC, 1992). Em uma dessas concepções, um biorreator configura-se por um recipiente no qual é realizado processos químicos que envolvem organismos ou substâncias bioquimicamente ativas derivadas de organismos, podendo ser esses processos aeróbicos ou anaeróbicos. Geralmente, os biorreatores são cilíndricos, da ordem de litros a metros cúbicos, e na maioria das vezes feitos de aço inoxidável.

Outra denominação para biorreatores faz referência a um aparato ou sistema para crescimento celular ou de tecidos, no contexto, do cultivo de células animais. Esses equipamentos são normalmente desenvolvidos para estudos de melhoramento ou substituição de funções biológicas celulares (IUPAC, 1992).

Do ponto de vista dos modos de operação, um biorreator pode ser classificado como batelada, batelada alimentada ou operação contínua (IUPAC, 1992):

Batelada: constitui-se na inserção do volume total dos componentes da reação no início da operação, retirando-se o volume total esperado do produto ao final do processo.

Batelada alimentada ou semi-batelada: parte dos reagentes são inseridos no início do processo, sendo acrescido por partes ou continuamente até alcançar o volume final de reagentes. Ao fim do processo, retira-se o volume completo do produto final. Também sob esta definição está a situação para a inserção completa dos reagentes e a retirada gradual do produto final.

Operação contínua: nesse modo de operação existe o fluxo contínuo de reagentes na entrada e um fluxo contínuo de produto final na saída.

2.3 Caracterização física do biorreatore avaliado

O biorreatore alvo desse estudo será operado no modo de batelada, com a introdução contínua de oxigênio para que o processo de respiração celular possa ser realizado. Fisicamente o equipamento é composto por uma cilindro de volume total de 1L, onde emprega-se 80% de volume inicial para o cultivo. As dimensões do reservatório são: 54 mm de raio da base por 108mm de altura, como pode ser visto na figura 1, abaixo:

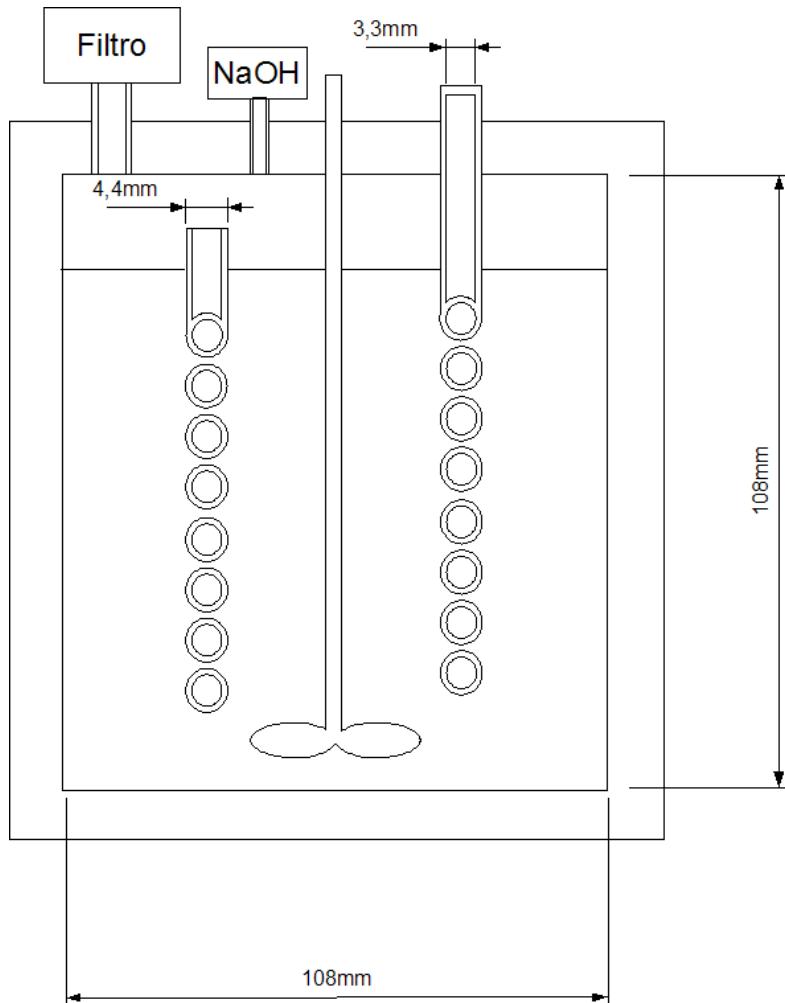


Figura 3 - Geometria do biorreatore.

O sistema de aeração por difusão emprega membrana tubular de silicone, que reduz sensivelmente as perdas de cultivo devido a danos às células animais (PAPOUTSAKIS, 1991).

As dimensões da membrana são: 4,4 mm de diâmetro externo, 3,3mm de diâmetro interno, e 0,55mm de espessura de parede. São utilizados 7,0 m de membrana do interior do cilindro, fabricada pela empresa Silicotex (SP). O sistema de agitação é composto por uma única pá simples, com rotação de trabalho entre 25 e 100 rpm.

2.4 Leis fundamentais de química geral

O fenômeno de transporte de massa estudo no desenvolvimento desse trabalho fundamenta-se nos princípios da química geral que trata de soluções, especialmente entre fases líquidas e gasosas. Faz-se necessário, portanto uma revisão teórica destes conceitos, com a finalidade de contribuir para o entendimento do procedimento e raciocínio desenvolvido.

2.4.1 Lei de Dalton

Químico e físico inglês, fundador da teoria atômica moderna, John Dalton nasceu em Eaglesfield, Cumberland, a 6 de setembro de 1766, e faleceu em Manchester, a 27 de julho de 1844.

A 21 de outubro de 1803 Dalton apresentou à Literary and Philosophical Society (Sociedade Literária e Filosófica), de Manchester, um trabalho intitulado por *Absorption of gases by water and others liquids* (Absorção de gases pela água e outros líquidos), na qual estabeleceu os princípios básicos de sua famosa teoria atômica. Suas observações sobre o aumento da pressão dos gases com a elevação da temperatura e a descoberta de que todos os gases apresentam o mesmo coeficiente de expansão foram também verificadas, independentemente dele, por Gay-Lussac (RUSSELL, 1994).

Dalton estabeleceu então que:

"A pressão total de uma mistura de gases é igual à soma das pressões parciais dos gases que a constituem".

Considera-se pressão parcial a pressão que cada gás, isoladamente e à mesma temperatura, exerce sobre as paredes do recipiente que continha a mistura. Esse princípio só se aplica aos gases ideais.

A pressão total exercida sobre as paredes em que a mistura está contida é calculada através da soma das pressões parciais:

$$P_T = P_1 + P_2 + \dots + P_n \quad (1)$$

A expressão matemática da lei de Dalton é dada por:

$$p_A = P_T \cdot x_A \quad (2)$$

Sendo,

p_A : pressão parcial de A;

P_T : pressão total da mistura;

x_A : fração molar de A.

2.4.2 Lei de Henry

A solubilidade de um gás dissolvido em um líquido é proporcional à pressão parcial do gás acima do líquido. Este é o enunciado da lei de Henry, que pode ser escrita

$$x_A = K \cdot p_A \quad (3)$$

Onde:

x_A : fração molar de equilíbrio do gás em solução (sua solubilidade);

p_A : pressão parcial de A na fase gasosa;

K : constante de proporcionalidade, ou constante de Henry.

Tabela 1 - Valores da constante de Henry na água (Kx10⁵ .atm⁻¹) (GERRARD, 1980).

	0°C	20°C	40°C	60°C
H ₂	1,72	1,46	1,31	1,21
N ₂	1,86	1,32	1,00	0,874
O ₂	3,98	2,58	1,84	1,57

A lei de Henry aplica-se somente quando a concentração do soluto e a sua pressão parcial são baixas, isto é, quando o gás e sua solução são essencialmente ideais, e quando o soluto não interage fortemente de nenhuma maneira com o solvente.

2.4.3 Aspectos relevantes ao trabalho

A solubilidade dos gases na solução aquosa, caracterizada pelo meio de cultura, indica a concentração máxima que se pode obter para uma dada pressão atmosférica de trabalho. O sistema modelado nesse estudo baseia-se na aplicação do gás oxigênio na entrada sob a pressão máxima de 1 atmosfera.

Para a correta determinação da solubilidade dos gases envolvidos no transporte de massa, deve-se conhecer a temperatura média de trabalho na solução. No caso do sistema avaliado, o cultivo é mantido sob 37°C de temperatura, por meio de um sistema de controle específico para esse fim.

Sendo assim, calculam-se as concentrações máximas dos gases no meio de cultura. Sabendo que o meio de cultura está sob 1 atmosfera e a 37°C, de (GERRARD, 1980) obteve-se a Tabela 2

Tabela 2 - Solubilidade dos gases em água 22°C e a 37°C (GERRARD, 1980).

	$\alpha = L / L$	
	22°C	37°C
H ₂	0,018	0,016
N ₂	0,015	0,013
O ₂	0,030	0,024

A Tabela 2 fornece a solubilidade em termos de fração de volume, que pode ser trabalhado de forma semelhante quando se tem diretamente a fração molar para o solvente sob as condições especificadas.

Sabendo que a pressão parcial do gás O₂ no ar, a 1atm, é 20%, através da Lei dos Gases Ideais (RUSSEL, 1994) calcula-se a concentração desse gás na mistura gasosa do ar:

$$PV = nrT \quad (4)$$

Determinando-se a concentração molar do gás para uma unidade de V , ou seja, Isolando o termo $n \cdot V^{-1}$, têm-se:

$$\Rightarrow \frac{n}{V} = \frac{P}{rT} = 8,13 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1} \quad (5)$$

Onde

n : número de mols do gás;

$P = 0,2$ atm: pressão parcial do gás;

$V = 1\text{L}$: volume total da mistura gasosa;

$r = 0,082 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$: constante de Boltzmann;

$T = 27 + 273 = 300\text{K}$: temperatura do gás no ar.

A Tabela 3 apresenta a massa molar dos átomos componentes dos gases

Tabela 3 - Massa molar dos gases do cultivo.

Átomo	Massa Molar ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
O	15,9994
N	14,0067
C	12,0108
H	1,0079

Desta maneira, obtém-se a concentração em massa de O_2 no ar por:

$$C_{O_2}^{(ar)} = \frac{(8,13 \cdot 10^{-3}) \cdot (2 \cdot 16)}{1} = 0,2601 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \quad (6)$$

onde,

$C_{O_2}^{(ar)}$: concentração de oxigênio no ar.

A concentração de O_2 no meio de cultivo a 37°C é obtida multiplicando-se a constante α pela concentração no ar, dada por $C_{O_2}^{(ar)}$:

$$C_{O_2}^{(H_2O)} = \alpha \cdot C_{O_2}^{(ar)} = 6,24 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 6,24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \quad (7)$$

onde,

$C_{O_2}^{(H_2O)}$: concentração de oxigênio no meio de cultura.

Portanto, analisando as concentrações obtidas, pode-se observar que existe um limite máximo de transferência de oxigênio para o cultivo na pressão de trabalho empregada. Essa

informação é importante por determinar que a injeção de gás, ou seja, a concentração no cultivo, está limitada da pressão de entrada dos gases no sistema, como prevê a Lei de Henry (MAHAN, 1995).

2.5 Leis de transporte de massa

2.5.1 Lei de Fick

A relação empírica para a taxa de transporte difusivo de massa foi proposta pela primeira vez por Fick, em 1855, conforme registram BENNETT e MYERS (1978), nos quais está baseado o desenvolvimento a seguir apresentado. A notação desse item segue também a apresentada por BENNETT e MYERS (1978).

A lei de Fick para a difusão molecular de um constituinte A em B na direção y é dado por:

$$\tilde{I} = -D_{AB} \cdot \tilde{\rho} \frac{d\tilde{x}_A}{dy} \quad (8)$$

\tilde{I} = fluxo do constituinte A (kgmol/h.m²)

D_{AB} = difusividade de uma mistura A e B (m²/h)

$\tilde{\rho}$ = concentração molar média (kgmol/m³)

\tilde{x}_A = fração molar do constituinte A (kgmol/kgmol)

O fluxo molar \tilde{I}_A é medido em relação a um referencial que se move com a velocidade molecular média da mistura \tilde{u} . A força motriz para a difusão é o gradiente da fração molar de A.

A forma da Lei de Fick da equação 8 é conveniente para utilização com gases. Para meios líquidos é utilizada a equação baseada no fluxo de massa J_A , em kg/hm² em relação ao centro de massa:

$$J = -D_{AB} \cdot \rho \frac{dx_A}{dy} \quad (9)$$

em que:

ρ = massa específica da mistura (kg/m^3);

x_A = fração mássica de A (kg/kg).

Para um sistema que se interdifunde, mantendo constante a massa específica, o centro de massa é estacionário. Por definição, tem-se:

$$J_A + J_B = 0 \quad (10)$$

onde,

J_A : fluxo de massa de A;

J_B : fluxo de massa de B;

As equações 8 e 9 são duas das muitas formas possíveis para a lei de Fick. Para sistemas com massa específica, ρ constante, como é o caso de misturas diluídas, a equação 7 fica:

$$J = -D_{AB} \frac{d\rho_A}{dy} \quad (11)$$

sendo, ρ_A é a concentração de A em kg/m^3 e os demais termos já foram definidos na equação 9.

$$\rho_A + \rho_B = 0 \quad (12)$$

Por definição, tem-se ainda que:

$$x_A = \frac{\rho_A}{\rho} = \frac{\tilde{x}_A M_A}{\tilde{x}_A M_A + \tilde{x}_B M_B} \quad (13)$$

em que M_A e M_B são as massas moleculares dos constituintes A e B expressas em kg/kgmol .

2.5.2 Coeficientes convectivos de transporte de massa

De forma análoga ao transporte convectivo de calor, o transporte de massa pode ser tratado por uma equação da forma (SCHULZ, 2003):

$$N_A = k_p (\rho_{As} - \rho_{Am}) \quad (14)$$

sendo,

ρ_{Am} : coeficiente de transporte local convectivo (m/s);

N_A : densidade de fluxo de massa A (kg/h.m²);

ρ_{As} : concentração do constituinte A no limite de uma fase (kg/m³);

ρ_{Am} : concentração de A em algum ponto do meio (kg/m³).

Sendo k_p , o coeficiente local de transporte convectivo em metros por segundo e seu valor uma função da geometria do sistema, da velocidade e propriedades do fluido.

Um sistema no qual um soluto está sendo transportado, em regime permanente, de uma fase gasosa para uma fase líquida pode ser descrito pelas equações:

$$\tilde{N}_A = k_{\tilde{y}} (\tilde{y}_A - \tilde{y}_{As}) \quad (15)$$

$$\tilde{N}_A = k_{\tilde{x}} (\tilde{x}_{As} - \tilde{x}_A) \quad (16)$$

em que:

\tilde{N}_A = densidade de fluxo molar em relação a um sistema fixo de coordenadas (kgmol/h.m²);

$k_{\tilde{x}}$ = coeficiente local de transferência de massa aplicável à fase líquida (m/h);

$k_{\tilde{y}}$ = coeficiente local de transferência de massa aplicável à fase gasosa (m/h);

\tilde{x}_A = fração molar do soluto no bordo da camada limite de concentração ou a fração molar média;

\tilde{x}_{As} = fração molar do soluto na interface da solução líquida;

\tilde{y}_{As} = fração molar do soluto na fase gasosa, junto à interface;

\tilde{y}_A = fração molar do soluto na fase gasosa no bordo da camada limite ou a fração molar média.

No caso da interface de contato entre os dois gases, \tilde{N}_A é o número de moles do soluto A que deixa a interface, por unidade de tempo, por unidade de área da interface. O índice \tilde{x} significa o que se aplica à fase líquida e deve ser usado conjuntamente com a força motora expressa em fração molar na fase líquida. O coeficiente $k_{\tilde{y}}$ tem a mesma unidade e significado de $k_{\tilde{x}}$ mas, como mostra o índice \tilde{y} , deve ser usado conjuntamente com a força motora descrita pelas frações molares de fase gasosa (BENNET e MYERS, 1978).

2.5.3 Coeficientes globais de transferência de massa

Para transporte entre fases geralmente é conveniente usar um coeficiente global de transporte de massa, que pode ser definido por uma das seguintes equações:

$$\tilde{N}_A = k_{\tilde{y}} (\tilde{y}_A - \tilde{y}_A^*) \quad (17)$$

$$\tilde{N}_A = k_{\tilde{x}} (\tilde{x}_A^* - \tilde{x}_A) \quad (18)$$

onde, as quantidades \tilde{y}_A^* e \tilde{x}_A^* representam concentrações de equilíbrio,

\tilde{y}_A^* = fração molar do soluto no gás em equilíbrio com o líquido de composição \tilde{x}_A ;

\tilde{x}_A^* = fração molar do soluto no líquido, em equilíbrio com o gás de composição \tilde{y}_A ;

$k_{\tilde{x}}$ = coeficiente global de transferência de massa aplicável na película líquida (m/h);

$k_{\tilde{y}}$ = coeficiente global de transferência de massa aplicável na película gasosa (m/h).

Portanto, $(\tilde{y}_A - \tilde{y}_A^*)$ e $(\tilde{x}_A^* - \tilde{x}_A)$ são expressões que representam a força motriz global para o transporte de massa entre as duas fases fluidas (SCHULZ, 2003).

2.5.4 Relação entre os coeficientes globais e os individuais

As equações 10 e 11 podem ser reescritas como segue (SCHULZ, 2003):

$$(\tilde{y}_A - \tilde{y}_{As}) = \frac{\tilde{N}_A}{k_{\tilde{y}}} \quad (19)$$

$$(\tilde{x}_{As} - \tilde{x}_A) = \frac{\tilde{N}_A}{k_{\tilde{x}}} \quad (20)$$

O equilíbrio entre as fases segue, por hipótese, a lei de Henry:

$$\bar{p}_A = \tilde{x}_A H_A \quad (21)$$

onde:

\bar{p}_A = pressão parcial de um constituinte numa solução líquida;

H_A = constante de Henry para A, determinada experimentalmente.

Dividindo-se a equação 21 pela pressão total p , obtém-se:

$$\tilde{y}_A = \frac{\tilde{x}_A H_A}{p} = m \tilde{x}_A \quad (22)$$

A quantidade H_A / p é chamada de m .

Na interface tem-se as frações molares \tilde{y}_{As} e \tilde{x}_{As} que podem ser relacionadas, usando a equação 22 e colocando-se o resultado na equação 23, obtendo-se:

$$\frac{\tilde{y}_A}{m} - \tilde{x}_A = \frac{\tilde{N}_A}{k_{\tilde{x}}} \quad (23)$$

Multiplicando a equação 23 por m e somando o resultado a equação 24 tem-se:

$$\tilde{y}_A - m \tilde{x}_A = \frac{\tilde{N}_A m}{k_{\tilde{x}}} \quad (24)$$

$$\tilde{y}_A - m \tilde{x}_A = \frac{\tilde{N}_A m}{k_{\tilde{y}}} + \frac{\tilde{N}_A m}{k_{\tilde{x}}} = \tilde{N}_A \left(\frac{1}{k_{\tilde{y}}} + \frac{m}{k_{\tilde{x}}} \right) \quad (25)$$

O termo $m \tilde{x}_A$ representa a fração molar do soluto, no gás em equilíbrio com um líquido de composição \tilde{x}_A . Portanto, pode-se reconhecer que $m \tilde{x}_A$ é idêntico a \tilde{y}_A^* . Assim:

$$\tilde{y}_A - \tilde{y}_A^* = \tilde{N}_A \left(\frac{1}{k_{\tilde{y}}} + \frac{m}{k_{\tilde{x}}} \right) \quad (26)$$

Comparando a equação 26 com a definição do coeficiente global $K_{\tilde{y}}$ expressa pela equação 22, verifica-se que:

$$K_{\tilde{y}} = \frac{1}{\left(\frac{1}{k_{\tilde{y}}} + \frac{m}{k_{\tilde{x}}} \right)} \quad (27)$$

Analogamente, pode-se obter para $K_{\tilde{x}}$

$$K_{\tilde{x}} = \frac{1}{\left(\frac{1}{k_{\tilde{x}}} + \frac{m}{k_{\tilde{y}}} \right)} \quad (28)$$

Mesmo que os coeficientes individuais $k_{\tilde{y}}$ e $k_{\tilde{x}}$ sejam constantes ao longo do sistema, o coeficiente global poderá variar como resultado da variação de m . A quantidade m é função da temperatura, concentração e pressão total e é constante, em geral, apenas para soluções diluídas à temperatura constante e numa coluna em que a variação de pressão é constante (BENNETT e MYERS, 1978).

Na dedução das equações 27 e 28 assumiu-se m constante. Bennett e Myers (1978) discutem essa questão em um exemplo com auxílio de um gráfico, sugerindo-se a consulta à referência para maiores detalhes. Notam, entretanto, que essas restrições ao uso do coeficiente global tornam-se irrelevantes se ele for, aproximadamente, igual a um dos coeficientes individuais.

Exemplificando, se $m/k_{\tilde{x}}$ é desprezível quando comparado a $1/k_{\tilde{y}}$, diz-se que a resistência gasosa é a controladora e $K_{\tilde{y}}$ é aproximadamente igual a $k_{\tilde{y}}$. Note-se que não basta que m seja pequeno ou $k_{\tilde{x}}$ grande, mas sim que a relação entre eles deve ser pequena quando comparada com $1/k_{\tilde{y}}$.

Essas considerações valem também para o caso em que a resistência na fase líquida é a controladora do processo e então $K_{\tilde{x}} = k_{\tilde{x}}$. Bennett e Myers (1978) ressaltam que, embora não se deva usar um coeficiente global para sistemas em que a relação $m = \tilde{y}_A/\tilde{x}_A$ não seja constante, geralmente ele é o único coeficiente encontrado nas referências. Isto ocorre porque quase sempre é impossível, em contatos de dois fluidos, medir \tilde{x}_{As} e \tilde{y}_{As} experimentalmente e calcular os coeficientes individuais a partir das velocidades de transporte de massa entre fases. Normalmente, apenas \tilde{x}_A e \tilde{y}_A podem ser medidos, e as resistências individuais precisam ser estimadas indiretamente.

Uma justificativa citada pelos autores para o uso, em desacordo com a teoria, de coeficientes globais, é a falta de precisão da maioria dos dados de transporte de massa. “Desvios padrão de 20% a 30% não são raros, de modo que erros menores, introduzidos pelo uso dos coeficientes globais podem não ser significativos. Esta falta de precisão não é motivada por falta de cuidado, mas pela dificuldade em obter dados reproduzíveis de velocidades e composição numa torre de absorção empacotada” (BENNETT e MYERS, 1978).

2.5.5 Fluxo global em soluções diluídas

Para se obter o fluxo de massa transportada, a densidade de fluxo (\tilde{N}_A) deve ser multiplicada pela área através da qual ocorre o transporte. Em vários sistemas de troca, a área interfacial é difícil de medir ou calcular. Nos casos em que a área interfacial não é acessível, pode-se definir a quantidade a , área de interface por unidade de volume do reator (m^2/m^3). Com isso, a partir da equação 11 pode-se escrever:

$$\frac{\tilde{G}}{V_T} = K_{\tilde{x}} a (\tilde{x}_{As} - \tilde{x}_A) \quad (29)$$

em que:

\tilde{G} : fluxo de massa molar (kgmol/h);

V_T : volume total do reator (m^3).

a : área de interface por unidade de volume do reator (m^2/m^3)

Na equação 29, a $K_{\tilde{x}} a$ é expresso em kgmol/hm^3 . Expressando a equação 29 com a força motriz em termos de concentrações molares, lembrando que $\tilde{x}_A = \tilde{\rho}_A / \tilde{\rho}$, tem-se:

$$\frac{\tilde{G}}{V_T} = \frac{K_{\tilde{x}} a}{\tilde{\rho}} (\tilde{\rho}_{As} - \tilde{\rho}_A), \quad (30)$$

com a constante de $K_{\tilde{x}} a / \tilde{\rho}$ em unidades de h^{-1} ou s^{-1} , representando o coeficiente global por unidade de volume do reator.

Para o fluxo de massa G em kg/h, lembrando que $G = \tilde{G} \cdot M_A$ e também que a concentração em massa pode ser expressa a partir da concentração molar por $\rho_A = \tilde{\rho}_A \cdot M_A$, tem-se que:

$$\frac{G}{V_T} = \frac{\tilde{G}}{V_T} M_A = \frac{K_{\tilde{x}} a}{\tilde{\rho}} M_A \left(\frac{\rho_{A_s}}{M_A} - \frac{\rho_A}{M_A} \right) \quad (31)$$

Portanto:

$$\frac{G}{V_T} = \frac{K_{\tilde{x}} a}{\tilde{\rho}} (\rho_{A_s} - \rho_A) \quad (32)$$

A equação 32 está na forma normalmente encontrada na literatura sobre reatores aeróbios, apenas com mudanças na nomenclatura, para o caso da transferência de oxigênio na água. Na maioria dos trabalhos da literatura, a constante $K_{\tilde{x}} a / \tilde{\rho}$ é denotada por $K_L a$, e denominada de coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio.

Desta maneira, a formulação para o coeficiente global de transferência de O_2 ($K_L a$) de para o biorreator pode ser encontrada analiticamente. Nesse trabalho o coeficiente $K_L a$ foi extraído de SANTIAGO (2006), que obteve valores na faixa de 2,9 a 5,5 h^{-1} , em 800 ml de meio de cultura com 7m de membrana tubular de silicone.

2.5.6 Cinética da transferência de massa

Uma vez definido o coeficiente global de transferência de massa $K_L a$, a dinâmica de transporte de massa pode ser assumida como uma equação de primeira ordem, assumindo que a concentração volumétrica do ar seja constante ao longo do comprimento da membrana (SCHULZ, 2003):

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot (C_\infty - C) \quad (33)$$

C_∞ : valor de saturação de O_2 no meio líquido (g/m³);

Além disso, deve-se observar a relação entre concentração e quantidade de massa, dada por:

$$C = \frac{M}{Vol} \quad (34)$$

M : quantidade de massa para dado volume contido na solução (kg);

Vol : volume da solução (L).

Desta maneira, a dinâmica de transporte de massa pode ser quantificada em termos absolutos de quantidade de massa transferida.

2.6 Leis de circuitos elétricos

Na teoria geral de circuitos elétricos o transporte de cargas elétricas é descrito pela variação instantânea no tempo da quantidade de elétrons através da secção transversal de um condutor (JOHNSON et al,1994):

$$I = \frac{dQ}{dt} \quad (35)$$

Q : quantidade de cargas elétricas (Coulombs, C);

I : corrente elétrica na secção transversal do condutor (C/s);

A relação entre a variação da tensão (U), dada em Volts, aplicada ao componente e a corrente elétrica que passa por ele é constante. Essa razão é chamada de resistência elétrica e seu valor numérico resulta da Lei de Ohm (JOHNSON et al,1994);

$$\Delta U = RI \quad (36)$$

onde:

$R \geq 0$: resistência ao fluxo de corrente elétrica (Ohms, Ω);

Alternativamente, pode-se utilizar a definição da corrente I em relação a variação de tensão ΔU , através da constante recíproca da resistência, a condutância, dada pela letra g :

$$I = g \cdot \Delta U \quad (37)$$

onde,

$g \geq 0$: condutância ao fluxo de corrente elétrica (Siemens, Ω^{-1});

Segundo a formulação geral de circuitos elétricos, a corrente de cargas elétricas que atravessam elementos acumuladores de cargas elétricas é dada pela variação instantânea no tempo da tensão U vezes uma constante de armazenamento, descrito pela seguinte equação:

$$I = C_{ap} \frac{dU}{dt} \quad (38)$$

onde:

C_{ap} : capacidade de armazenamento de carga (Capacitância, em Faraday, F)

Para um dado material, a capacitância C_{ap} depende exclusivamente das dimensões geométricas deste material, sendo tanto quanto maior quanto forem estas medidas.

2.7 Analogia Transporte-Circuitos Elétricos

2.7.1 Formulação

Mediante o embasamento teórico em transporte de massa e carga apresentado, o primeiro paralelo que deve ser estabelecido reside na unidade elementar de transporte. Para a construção das analogias entre transporte e circuitos elétricos, mapeou-se a unidade elementar de massa com a unidade de carga:

$$M \equiv Q \quad (39)$$

Retomando-se a relação entre concentração e massa exposta na equação 34, define-se o fluxo de massa M no tempo, I_m , de forma análoga à corrente elétrica descrita na equação 38. Assim, a equação 40 descreve a relação entre variação instantânea de massa e variação instantânea de concentração no tempo:

$$I_m = \frac{dM}{dt} = Vol \frac{dC}{dt} \quad (40)$$

sendo,

I_m : fluxo de massa M no tempo, ou corrente mássica (kg/s);

Analizando conjuntamente a equação 33, que descreve a dinâmica de transporte de massa através de superfícies, reescrita sob a forma da equação 41, e a equação 40, que descreve a relação entre a variação instantânea de massa e concentração, identificou-se nas duas equações a derivada temporal em C , através da equação 42, obtendo-se a relação entre a corrente mássica I_m e variação da concentração no meio líquido, exposta na equação 43.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot \Delta C \quad (41)$$

sendo,

$\Delta C = (C_\infty - C)$: diferença entre a concentração de saturação de O_2 no meio líquido e na interface de transporte;

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{Vol} \cdot \frac{dM}{dt} = Vol \cdot K_L a \cdot \Delta C \quad (42)$$

$$\Rightarrow I_m = Vol \cdot K_L a \cdot \Delta C \quad (43)$$

sendo,

Vol : volume da solução (L);

$K_L a$: constante global de transferência O_2 (h^{-1}).

Comparando a equação 37 com a equação 43, evidencia-se a correspondência algébrica entre as correntes de transporte de carga (I) e transporte de massa (I_m):

$$I = g \cdot \Delta U \quad (44)$$

$$I_m = Vol \cdot K_L a \cdot \Delta C \quad (45)$$

Consequentemente, através da manipulação das equações 44 e 45, obtém-se a correspondência algébrica entre a variação de tensão (ΔU) e variação de concentração no meio líquido (ΔC), expostas nas equações 46 e 47

$$\Delta U = R \cdot I \quad (46)$$

$$\Delta C = \frac{1}{Vol \cdot K_L a} \cdot I_m \quad (47)$$

Analizando-se as equações 46 e 47, deduz-se que o análogo do parâmetro resistivo no transporte de massa (R_m) dá-se por:

$$R_m = \frac{1}{Vol \cdot K_L a} \quad (48)$$

onde,

$R_m \geq 0$: resistência ao fluxo de massa ($L^{-1} \cdot h$);

O parâmetro de resistência ao fluxo de massa (R_m) encontrado modela a resistência de transferência de massa entre a membrana tubular de silicone e o meio de cultura. Na Figura 4, tem-se a representação do parâmetro resistivo modelado, considerando a Teoria de Filmes apresentada em SCHULZ (2003)

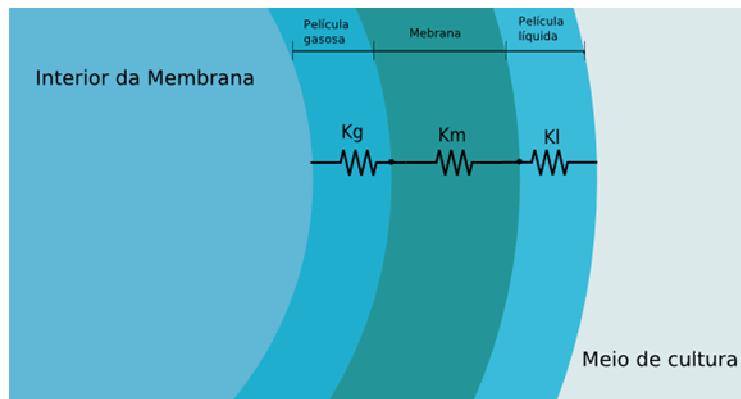


Figura 4 - Interface Membrana – Meio de Cultura.

As constantes K_m , K_g e K_l consistem, respectivamente, nas constantes de transferência de massa da membrana tubular de silicone, do meio gasoso e do meio líquido, representando

qualitativamente a resistência dessas interfaces ao fluxo de massa proveniente do interior da membrana (meio gasoso) para o meio da cultura celular (meio líquido), através da membrana (interface entre meio gasoso e líquido).

Outra resistência ao fluxo a ser considerada é em relação à interface do meio de cultura e o volume de ar presente na parte superior do biorreator. Essa resistência pode ser obtida da mesma maneira que a encontrada para a membrana, observando-se que o parâmetro $K_L a$ deve ser modificado para o caso de interface direta entre meio de cultura e o ar (CASEY et al., 1999).

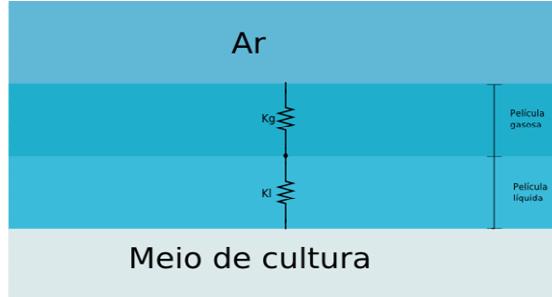


Figura 5 - Interface Meio de Cultura – Ar.

No presente trabalho, um segundo tipo de parâmetro resistivo foi introduzido para incorporar a restrição imposta pela válvula de entrada de oxigênio. Essa restrição traduz o efeito de atraso na transferência de massa por parte da entrada de gás, para situações de pequena variação percentual da pressão de entrada de oxigênio (TULLIS, 1989), dada por:

$$R_{val} = \Delta P \cdot \frac{V_{transferido}}{q_{max}} \quad (49)$$

onde,

R_{val} : resistência de entrada da válvula de O_2 ;

ΔP : variação percentual da entrada de O_2 ;

$V_{transferido}$: volume transferido para vazão máxima;

q_{max} : vazão máxima na entrada de O_2 .

Além do parâmetro resistivo encontrado pela analogia construída, é de grande importância para construção do modelo de circuito em análise, a modelagem de elementos armazenadores das unidades de partículas transportadas. Observando-se a equação 34 e aplicando derivada nos dois termos da equação, têm-se,

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{Vol} \frac{dM}{dt} = \frac{1}{Vol} I_M \quad (50)$$

Rearranjando a equação 50, de forma a obter-se a corrente mássica em termos da variação instantânea da concentração, na equação 52:

$$\frac{1}{Vol} I_M = \frac{dC}{dt} \quad (51)$$

$$\Rightarrow I_M = Vol \frac{dC}{dt} \quad (52)$$

Comparando a equação 52 obtida com a equação 38 apresentada a partir da Teoria de Circuitos Elétricos:

$$I_M = Vol \frac{dC}{dt} \quad (53)$$

$$I = C_{ap} \frac{dU}{dt} \quad (54)$$

Portanto, para efeito da construção de analogia Transporte-Circuitos, têm-se que o volume para onde o fluxo de massa é transportado desempenha o papel de elemento armazenador, como o capacitor de circuitos elétricos. A medida de capacidade para esse caso se dá diretamente, sendo a medida do volume manejado, observando-se a solubilidade do gás para o meio da cultura, conforme o exposto no item 2.4.3.

A Tabela 4 resume todas as analogias matemáticas desenvolvidas, possibilitando a construção do modelo de circuito elétrico do sistema de transferência de massa estudado no trabalho.

Tabela 4 - Parâmetros da analogia Transporte-Circuitos.

Parâmetro Elétrico	Símbolo	Parâmetro de Transporte	Símbolo
Carga elétrica	Q	Massa	M
Corrente elétrica	I	Fluxo de massa	I_M
Capacitância	Cap	Volume	Vol
Tensão elétrica (Carga/Capacitância)	$U=Q/C_{ap}$	Concentração (Massa/Volume) ou Pressão Parcial	$C=M/Vol$

2.7.2 Cálculo dos parâmetros de circuito

Uma vez estabelecidas as relações matemáticas e os parâmetros correspondentes entre a teoria de transporte de massa e circuitos elétricos, a próxima etapa constitui-se no desenvolvimento do circuito equivalente ao fenômeno físico.

Na Figura 6 identificou-se todos os parâmetros em relação as interfaces e volumes envolvidos no equipamento a ser modelado:

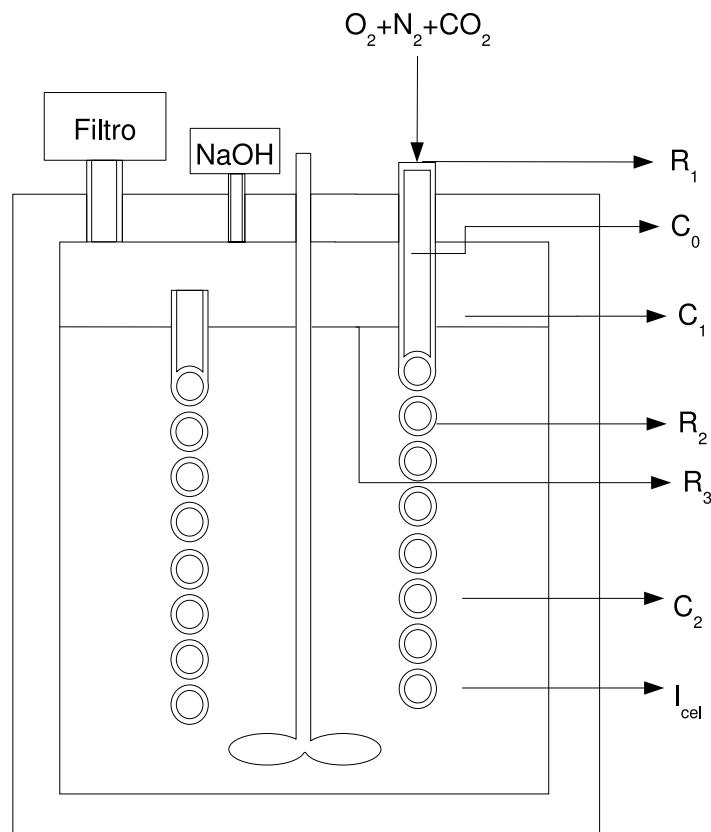


Figura 6 – Esquema do biorreator contendo as interfaces de transferência de massa.

Os parâmetros são identificados por:

R_1 : Resistência de entrada da interface Membrana – Cilindro;

R_2 : Resistência de interface Membrana – Cultivo Celular;

R_3 : Resistência de interface Cultivo Celular – Ar;

C_0 : Capacitância do volume de Ar no interior da Membrana;

C_1 : Capacitância do volume de Ar livre;

C_2 : Capacitância do volume de Cultivo Celular;

I_{CEL} : orrente de consumo de massa do crescimento celular.

A seguir, conforme a formulação desenvolvida calculou-se o valor de cada parâmetro identificado na Figura 6.

O primeiro parâmetro encontrado, R_1 , relaciona-se a restrição imposta por uma pequena oscilação percentual na pressão de entrada do biorreator,

$$R_1 = \Delta P \cdot \frac{V_{transferido}}{q_{\max}} = 5\Omega \quad (55)$$

Onde:

$\Delta P = 1\%$: variação da pressão na entrada do cilindro;

$V_{transferido} = 50\text{mL}$: volume transferido para vazão máxima;

$q_{\max} = 10\text{mL/s}$: vazão máxima de transferência de volume na entrada.

O coeficiente de transferência para o caso da interface entre membrana e massa de água do cultivo é máximo, dado pela equação 56,

$$R_2 = \frac{1}{K_L a_{\max} \cdot C_2} = 34,1k\Omega \quad (56)$$

sendo,

$K_L a_{\max} = 5,5\text{h}^{-1}$: máximo coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio do processo;

$C_2 = 0,8 \cdot \alpha = 19,2\text{mL}$: volume efetivo de O_2 no cultivo a 37°C .

A resistência proveniente da interface entre o meio de cultivo e o ar do volume livre foi aproximada por 1% do valor mínimo do coeficiente de transferência global $K_L a$, segundo a hipótese apresentada em SCHULZ (2003).

$$R_3 = \frac{1}{0,01 \cdot K_L a_{\min} \cdot C_2} = 6,46 M\Omega \quad (57)$$

sendo,

$K_L a_{\min} = 2,9 h^{-1}$: mínimo coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio do processo;

$C_2 = 0,8 \cdot \alpha = 19,2 mL$: volume efetivo de O_2 no cultivo a $37^\circ C$.

A capacidade do volume no interior da membrana, que caracteriza C_0 dá-se por:

$$C_0 = A_{mem} \cdot h_{vm} = 59,9 \mu F \quad (58)$$

Onde

$$A_{cultivo} = \pi \cdot \left(\frac{0,0033}{2} \right)^2 = 8,6 \mu m^2$$

$h_{vm} = 7m$, comprimento de membrana.

Considerando que não há perdas do volume cultivo inicial as capacidades C_1 e C_2 são dadas diretamente pelo volume das massas de ar livre e cultivo que representam, observando a solubilidade do gás O_2 para o meio de cultura, descrita por α , conforme a Tabela 2:

$$C_1 = 0,2 F$$

$$C_2 = 0,8 \cdot \alpha = 19,2 mF$$

2.7.3 Circuito elétrico análogo

A partir da Figura 6, que apresenta a localização dos parâmetros mapeados pela analogia construída, obteve-se o circuito elétrico análogo do processo de transporte de O_2 no biorreator:

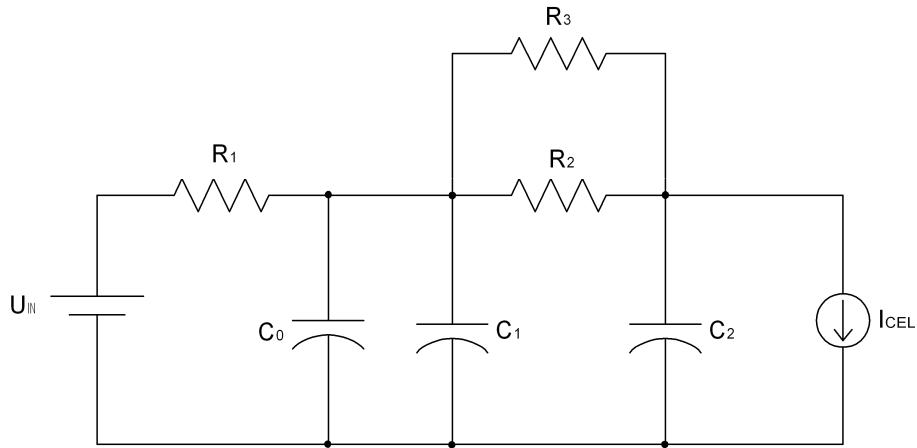


Figura 7 - Circuito modelado a partir dos parâmetros mapeados.

Na Figura 7, a fonte de massa advinda da entrada de O_2 é representada no circuito pela tensão U_{IN} , de forma a fornecer a concentração de entrada no biorreator. Além disso, I_{CEL} represesta o consumo de O_2 celular no meio de cultivo.

Considerando que o valor do capacitor C_0 em paralelo com C_1 é muito inferior, e dois elementos de carga deste tipo em paralelo se somam (JOHNSON et al, 1994), C_0 pode ser desconsiderado. O resistor R_3 em paralelo com R_2 é de valor muito superior, podendo, para este caso, ser considerado como circuito aberto (JOHNSON et al, 1994). Essa nova organização das interfaces consideradas é apresentada na Figura 8.

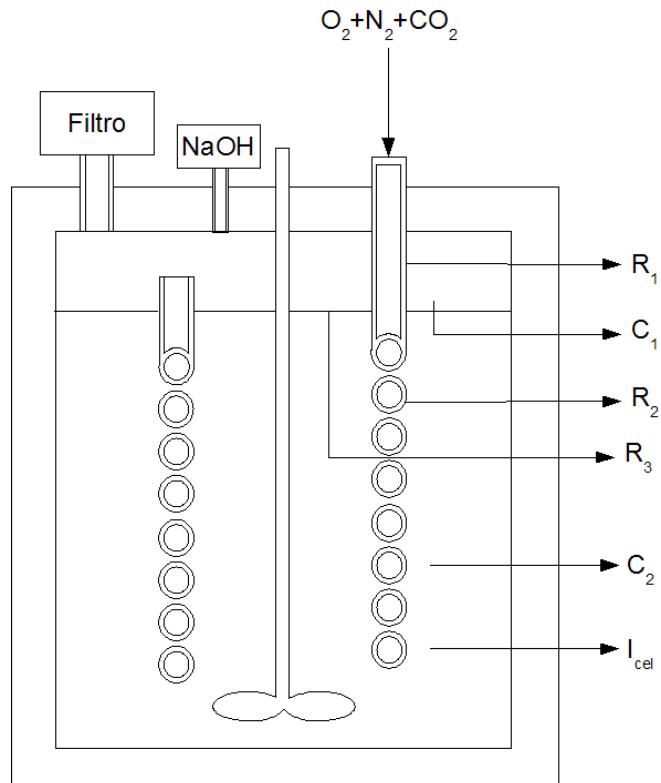


Figura 8 - Mapeamento simplificado dos parâmetros de circuito.

Assim, incorporando as simplificações observadas, tem-se o novo circuito elétrico resultante da analogia desenvolvida, na Figura 9:

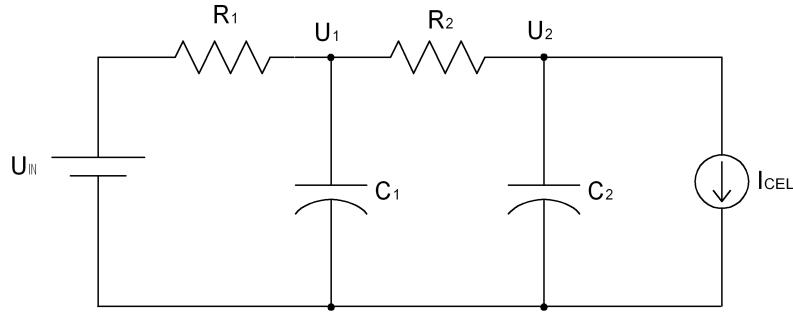


Figura 9 - Circuito modelado simplificado.

A partir do circuito elétrico obtido, desenvolveu-se o sistema de equações diferenciais ordinárias que rege o modelo, apoiando-se nos conceitos de análise de circuitos no tempo (JOHNSON et al, 1994)

Para obtenção dessas equações, realizou-se a análise nodal segundo a Lei das Correntes de Kirchhoff, onde o somatório das correntes que entram e saem de um nó é sempre igual zero (ALEXANDER e SADIQU, 2006). Retomando as equações 36 e 38, que apresentam o valor da corrente elétrica em relação à variação da tensão, e aplicando a Lei das Correntes de Kirchhoff no nó em U_1 , (Figura 9), obtém-se a equação 59.

$$\begin{aligned} \frac{U_{IN} - U_1}{R_1} - \frac{(U_1 - U_2)}{R_2} - C_1 \frac{dU_1}{dt} &= 0 \\ \Rightarrow \frac{dU_1}{dt} &= \frac{1}{C_1} \left[-\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) U_1 + \frac{U_2}{R_2} + \frac{U_{IN}}{R_1} \right] \end{aligned} \quad (59)$$

Da mesma forma, realizando-se a análise nodal em U_2 , obtém-se a equação 60.

$$\begin{aligned} \frac{(U_1 - U_2)}{R_2} - C_2 \frac{dU_2}{dt} &= 0 \\ \Rightarrow \frac{dU_2}{dt} &= \frac{1}{C_2} \left[\frac{U_1}{R_2} - \frac{U_2}{R_2} \right] \end{aligned} \quad (60)$$

Desta maneira, rearranjando-se e agrupando-se as equações 59 e 60, têm-se o sistema de equações da equação 61:

$$\begin{cases} \frac{dU_1}{dt} = -\left(\frac{R_1 + R_2}{R_1 R_2 C_1}\right) U_1 + \frac{U_2}{R_2 C_1} + \frac{U_{IN}}{R_1 C_1} \\ \frac{dU_2}{dt} = \frac{U_1}{R_2 C_2} - \frac{U_2}{R_2 C_2} + 0.U_{IN} \end{cases} \quad (61)$$

O próximo passo do desenvolvimento consiste na obtenção da função de transferência do sistema resultante do modelo obtido. Para o sistema em questão, tem-se como entrada a tensão (análogo da concentração) U_{IN} e como saída a tensão U_2 no meio de cultivo celular. Com essa finalidade, aplica-se a Transformada de Laplace na equação 61, segundo as condições estabelecidas em (BRAUN, 1979), isolando-se U_{IN} e U_2 em função a tensão U_1 , como apresentado nas equações de 62 a 72.

$$sU_2 = \left(\frac{1}{R_2 C_2}\right) U_1 - \left(\frac{1}{R_2 C_2}\right) U_2 \quad (62)$$

$$U_2 \cdot \left(s + \frac{1}{R_2 C_2}\right) = \left(\frac{1}{R_2 C_2}\right) U_1 \quad (63)$$

$$U_2 = \frac{\left(\frac{1}{R_2 C_2}\right)}{\left(s + \frac{1}{R_2 C_2}\right)} U_1 \quad (64)$$

$$U_2 = \frac{\left(\frac{1}{R_2 C_2}\right)}{\left(\frac{sR_2 C_2 + 1}{R_2 C_2}\right)} U_1 = \left(\frac{1}{R_2 C_2}\right) \cdot \left(\frac{R_2 C_2}{sR_2 C_2 + 1}\right) \cdot U_1 \quad (65)$$

$$\Rightarrow U_2 = \left(\frac{1}{sR_2 C_2 + 1}\right) \cdot U_1 \quad (66)$$

Colocando U_{IN} em termos de U_1 e U_2 , a partir da aplicação da transformada de Laplace no primeiro termo da equação 61,

$$sU_1 = -\left(\frac{R_1 + R_2}{R_1 R_2 C_1}\right)U_1 + \frac{U_2}{R_2 C_1} + \frac{U_{IN}}{R_1 C_1} \quad (67)$$

$$\frac{U_{IN}}{R_1 C_1} = \left(s + \frac{R_1 + R_2}{R_1 R_2 C_1}\right)U_1 - \left(\frac{1}{R_2 C_1}\right)U_2 \quad (68)$$

$$U_{IN} = (R_1 C_1) \cdot \left(\frac{sR_1 R_2 C_1 + R_1 + R_2}{R_1 R_2 C_1}\right)U_1 - (R_1 C_1) \cdot \left(\frac{1}{R_2 C_1}\right)U_2 \quad (69)$$

Eliminando U_2 , substituindo-se a equação 66 na equação 69

$$U_{IN} = \left(\frac{sR_1 R_2 C_1 + R_1 + R_2}{R_2}\right) \cdot U_1 - (R_1) \cdot \left(\frac{1}{R_2}\right) \cdot \left(\frac{1}{sR_2 C_2 + 1}\right) \cdot U_1 \quad (70)$$

$$U_{IN} = \left(\frac{sR_1 R_2 C_1 + R_1 + R_2}{R_2} - \frac{R_1}{R_2 \cdot (sR_2 C_2 + 1)}\right) \cdot U_1 \quad (71)$$

$$U_{IN} = \left(\frac{(sR_1 R_2 C_1 + R_1 + R_2) \cdot (sR_2 C_2 + 1) - R_1}{R_2 \cdot (sR_2 C_2 + 1)}\right) \cdot U_1 \quad (72)$$

Construindo a relação de saída pela entrada, desenvolve-se, das equações 73 a 77, a função de transferência para o sistema,

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{\left(\frac{1}{sR_2 C_2 + 1}\right) \cdot U_1}{\left(\frac{(sR_1 R_2 C_1 + R_1 + R_2) \cdot (sR_2 C_2 + 1) - R_1}{R_2 \cdot (sR_2 C_2 + 1)}\right) \cdot U_1} \quad (73)$$

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{R_2}{(sR_1 R_2 C_1) \cdot (sR_2 C_2 + 1) + R_1 \cdot (sR_2 C_2 + 1) + R_2 \cdot (sR_2 C_2 + 1) - R_1} \quad (74)$$

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{R_2}{s^2 R_1 R_2^2 C_1 C_2 + s R_1 R_2 C_1 + s R_1 R_2 C_2 + R_1 + s R_2^2 C_2 + R_2 - R_1} \quad (75)$$

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{R_2}{s^2 R_1 R_2^2 C_1 C_2 + s(R_1 R_2 C_1 + R_1 R_2 C_2 + R_2^2 C_2) + R_2} \quad (76)$$

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{\frac{R_2}{R_1 R_2^2 C_1 C_2}}{s^2 + s\left(\frac{R_1 R_2 C_1 + R_1 R_2 C_2 + R_2^2 C_2}{R_1 R_2^2 C_1 C_2}\right) + \frac{R_2}{R_1 R_2^2 C_1 C_2}} \quad (77)$$

Fatorando R_2 no numerador e denominador da equação 77, tem-se:

$$\frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{\frac{1}{R_1 R_2 C_1 C_2}}{s^2 + s\left(\frac{R_1 C_1 + R_1 C_2 + R_2 C_2}{R_1 R_2 C_1 C_2}\right) + \frac{1}{R_1 R_2 C_1 C_2}} \quad (78)$$

Numericamente, tem-se a função de transferência da equação 78,

$$H(s) = \frac{U_2}{U_{IN}} = \frac{0.001532}{s^2 + 1.002s + 0.001532} \quad (79)$$

2.8 Validação do modelo

Uma vez finalizado o processo de modelagem matemática e de posse da função de transferência do sistema proveniente da analogia Transporte – Circuitos construída, a próxima etapa do trabalho constitui-se na validação do modelo obtido.

A primeira análise que deve ser feita diz respeito ao tempo de resposta do modelo obtido, que é avaliado através da aplicação de um degrau de 100% de tensão (a concentração em transporte) na entrada do circuito modelado (JOHNSON et al, 1994). O tempo de resposta, em circuitos constituídos por resistores e capacitores, corresponde ao tempo que o sistema leva para atingir 63% do valor de regime (BRAUN, 1979).

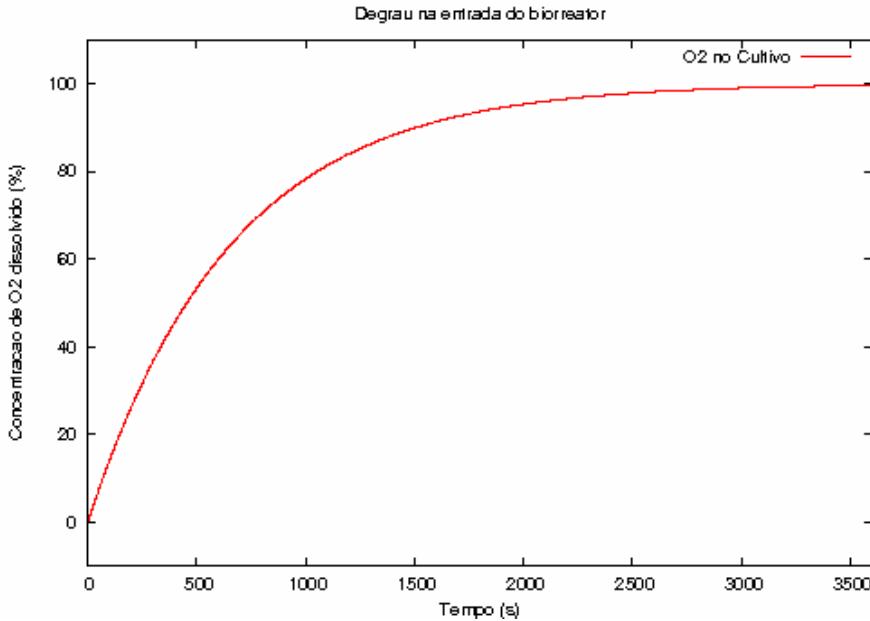


Figura 10 - Resposta ao degrau do modelo obtido.

Observando a saída obtida na Figura 10, nota-se que o sistema possui tempo de resposta de aproximadamente de 11 minutos, aproximando-se da constante de tempo relativo ao coeficiente global de transferência de oxigênio do processo, $K_L a$, em situação de máxima transferência, é de $5,5 \text{ h}^{-1}$, e o tempo de resposta determinado pela membrana é da ordem de 10,9 minutos (equação 80).

$$K_L a_{\max} = 5,5 \text{ h}^{-1} \Rightarrow \frac{1}{K_L a_{\max}} = \frac{1}{5,5} \text{ h} = 10,9 \text{ min} \quad (80)$$

Ou seja, o resultado da modelagem do biorreator avaliado indica que coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio sofreu um pequeno aumento, quando comparado a constante de tempo do sistema. Isso deve-se à inclusão nesse modelo de mais interfaces de transferência de massa, aumentando a resistência de entrada para o sistema de injeção de gases.

2.9 Estratégias de controle

Uma vez validada a modelagem do biorreator avaliado, a próxima etapa do trabalho consiste na elaboração de estratégias de controle dos gases inseridos para o crescimento celular.

O processo de crescimento do cultivo testado no trabalho exige, entre outras condições de ambiente, concentrações de O_2 limitadas a uma faixa de 40 a 60% da concentração máxima do gás oxigênio, dissolvido no cultivo celular a 37°C.

Sendo assim, a primeira etapa do trabalho dos controladores de O_2 projetados consiste na inserção de O_2 no equipamento, com nível de referência alvo (ou *set point*) ajustado para 50% da concentração de O_2 máxima, em meio de cultura 37°C. Previamente, o sistema é colocado a 0% de concentração de O_2 , através da abertura da válvula de N_2 .

Para o monitoramento da concentração de O_2 no cultivo, um sensor de concentração foi introduzido na simulação, de atraso de leitura de cerca de 80s, correspondente aos valores típicos encontrados para este tipo de aplicação (GASPARETTI, 2000).

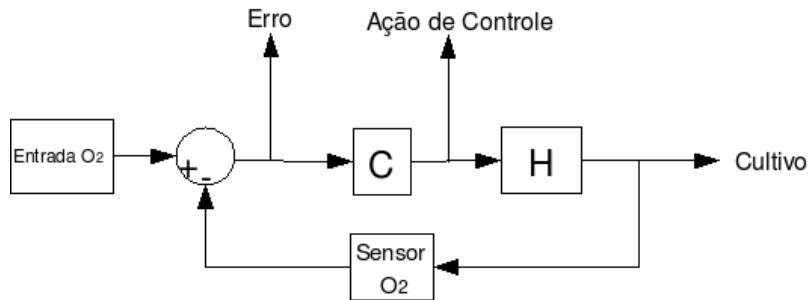


Figura 11 - Malha de controle para o biorreator.

A atuação dos sistemas de controle testados deve manter a concentração de oxigênio limitado a uma faixa de 40% a 60%. Caso a concentração de O_2 ultrapasse o limite superior máximo, o sistema deve injetar gás N_2 , através de uma válvula presente na entrada de gases no biorreator, para diminuir a proporção de O_2 no cultivo.

2.9.1 Controlador On-Off

O controlador On-Off atua através de ação de controle que mantém a entrada ligada enquanto a variável controlada não supera o valor alvo estabelecido.

Para o sistema projetado, o valor alvo estabelecido foi de 50% da concentração de O_2 no volume do cultivo. De forma a preparar o ambiente de cultivo a primeira etapa consiste em adequar a concentração ao nível aceitável pelas células do cultivo. Desta maneira o controlador testado apresentou o comportamento apresentado nas Figura 12 e Figura 13.

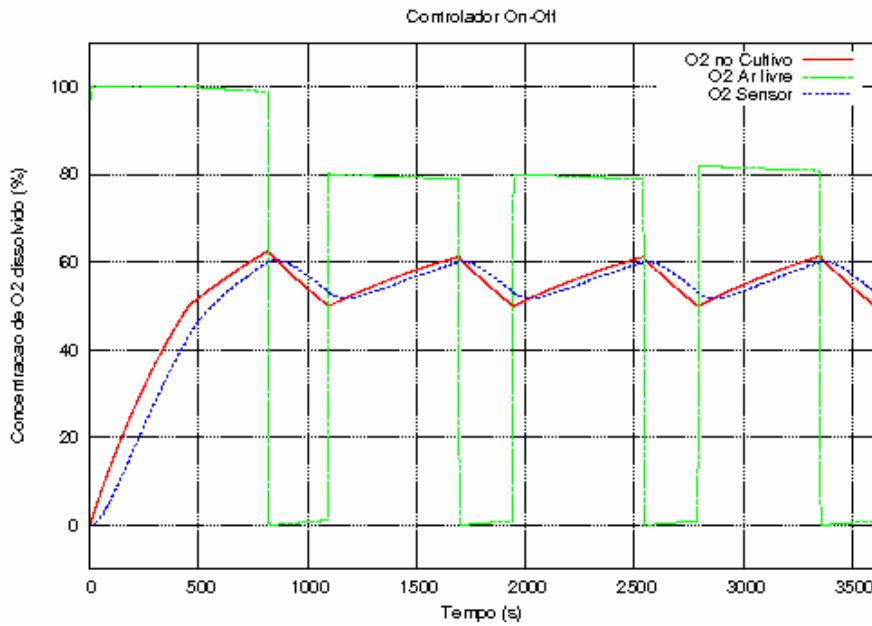


Figura 12 - Controlador On-Off, monitoramento do O₂.

Observando a Figura 12, nota-se que o controlador On-Off apresentou oscilação na concentração do meio de cultura (em vermelho), assim como a concentração de oxigênio no volume de ar livre variou significamente durante o período.

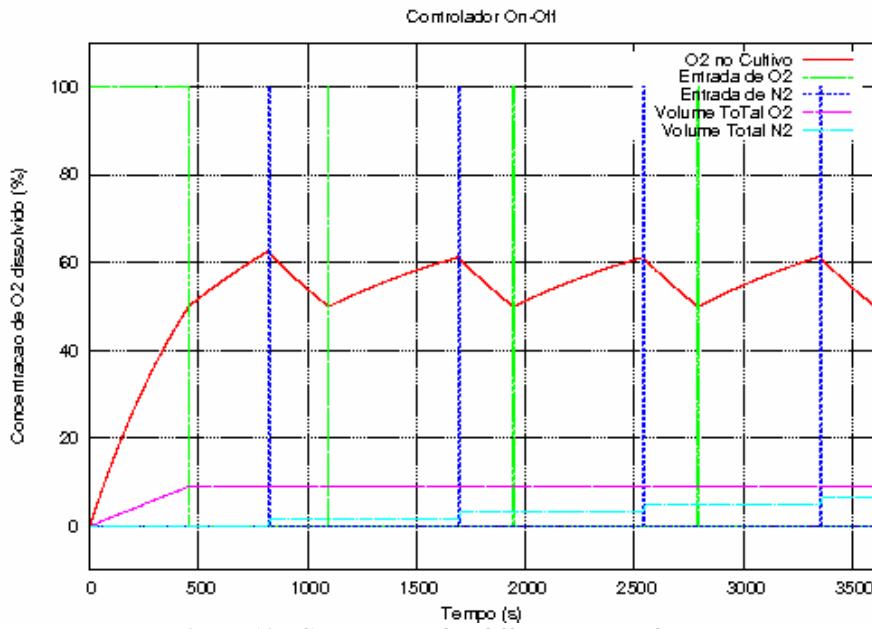


Figura 13 - Controlador On-Off, entrada de O₂ e N₂.

Deve-se observar, através da Figura 13, que o controle de injeção de N₂ atuou conforme o estabelecido pela estratégia de controle, evitando que a concentração de O₂ no meio de cultivo

permanecesse por muito tempo acima do valor máximo permitido, ou seja, 60% da concentração máxima no meio de cultivo celular.

A Tabela 5 apresenta o consumo de oxigênio e nitrogênio em relação a situação da válvulas da entrada desses gases abertas integralmente durante todo o período de simulação realizado.

Tabela 5 - Controlador On-Off : consumo de O₂ em relação a 1h de vazão total.

	Consumo (%)
O ₂	10
N ₂	8

2.9.2 Controlador por Histerese

A estratégia de controle empregando histerese consiste na ação de controle que desliga a entrada para variável controlada acima do limite máximo e liga a entrada para a variável controlada abaixo do limite mínimo.

No controle projetado, o limite superior corresponde ao nível de 60% da concentração máxima e o limite inferior ao nível de 40% da concentração mínima.

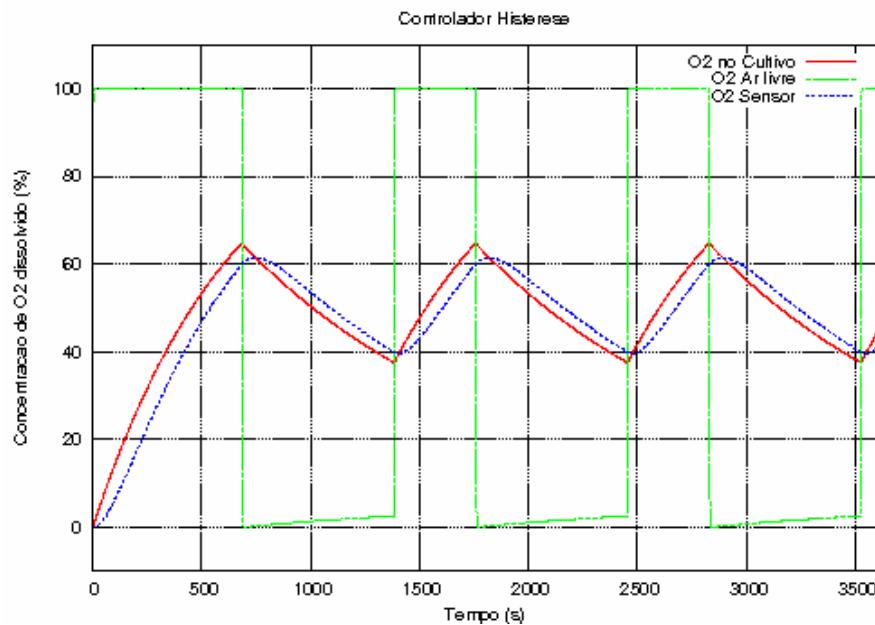


Figura 14 - Controlador Histerese, monitoramento do O₂.

Observando a Figura 14, nota-se que o controlador por Histerese apresentou oscilação na concentração do meio de cultura (em vermelho), assim como a concentração de oxigênio no

volume de ar livre variou significamente durante o período. Essas oscilações foram maiores que as obtidas com o controlador On-Off, o que é resultado da estratégia de manter ligada a entrada de O₂ até a concentração no cultivo superar o valor máximo permitido.

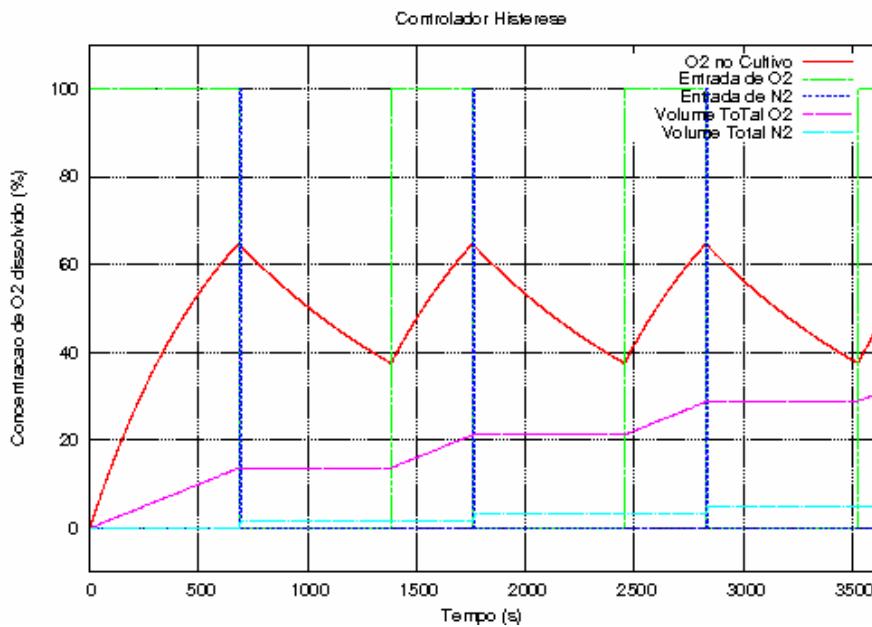


Figura 15 - Controlador Histerese, entrada de O₂ e N₂.

Uma vez que a estratégia desse controlador mantém a entrada de ar aberta até superar o valor máximo permitido, deduz-se que mais O₂ seja injetado no biorreator. Esse fato é comprovado através da Figura 15, que apresenta um salto no consumo de O₂. Em contrapartida, o consumo de N₂ é reduzido, visto que o controlador só reabre a válvula de entrada de O₂ quando a concentração no meio de cultivo fica abaixo do limite inferior.

A seguir, a Tabela 6 apresenta o consumo de oxigênio e nitrogênio em relação à situação das válvulas que controlam a entrada desses gases abertas integralmente durante todo o período de simulação realizado.

Tabela 6 - Controlador Histerese: consumo de O₂ em relação a 1h de vazão total.

	Consumo (%)
O ₂	30
N ₂	5

2.9.3 Controlador PWM

O controlador PWM (*Pulse Width Modulation*) baseia-se na modulação da largura de pulso da entrada para ajustar a variável controlada ao valor alvo.

A largura do pulso de controle é determinada pelo erro calculado através da realimentação do sistema de controle (Figura 11). Assim, o controlador envia um pulso proporcional de modo a tentar corrigir a variável de controle, aproximando-a do valor alvo determinado.

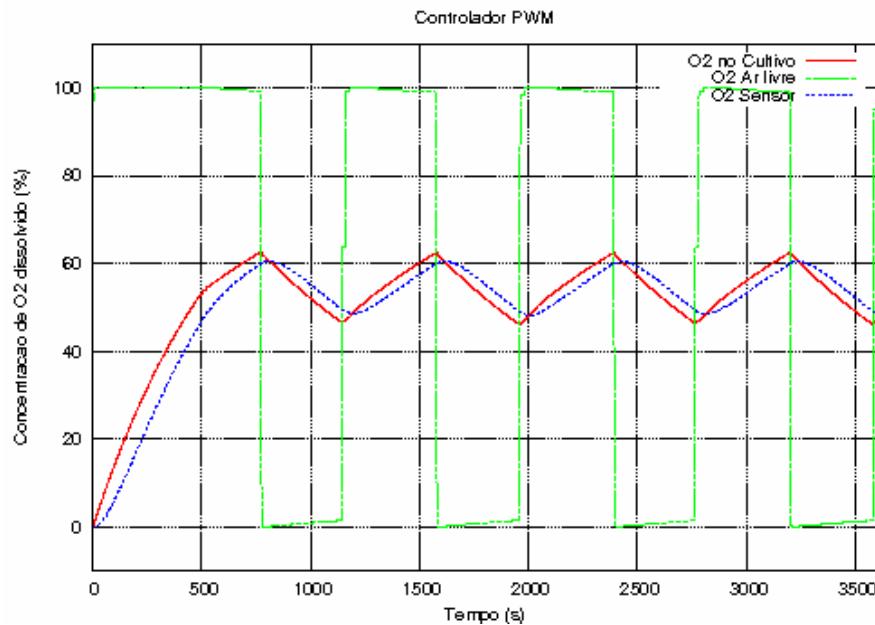


Figura 16 - Controlador PWM, monitoramento do O₂.

Na **Figura 16**, nota-se o mesmo comportamento oscilatório dos controladores On-Off e Histerese. Diferentemente do controlador On-Off, a concentração de O₂ no *headspace* (volume de ar livre) recupera o valor máximo para cada ciclo de abertura da válvula de entrada de O₂, indicando que há maior armazenamento de oxigênio a cada ciclo.

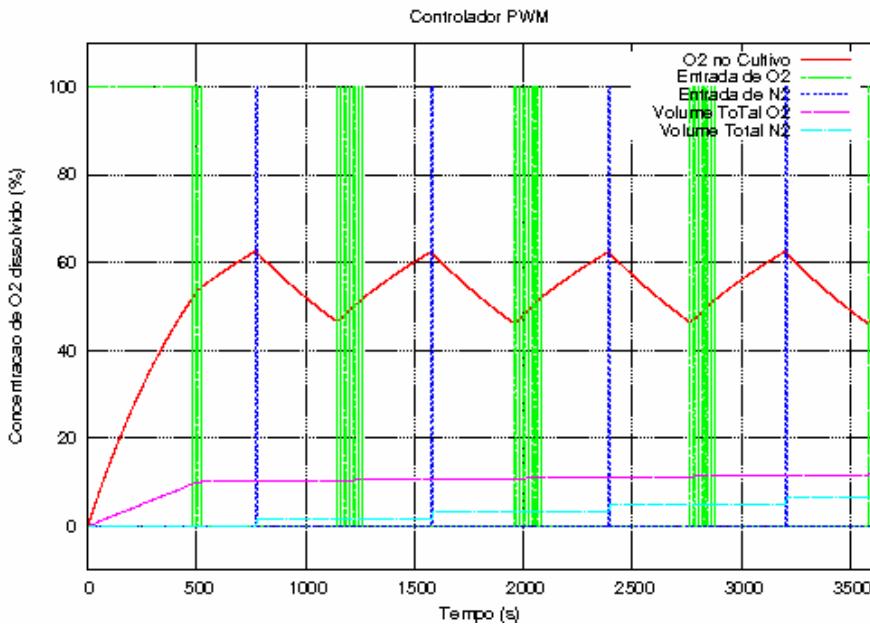


Figura 17 - Controlador PWM, entrada de O₂ e N₂.

Observando-se o volume total de O₂ injetado (curva roxa na Figura 17), nota-se que o maior armazenamento de O₂ no volume de ar livre, apresentado na curva verde da **Figura 16**, não provoca maior consumo de oxigênio, comparando-se ao desempenho do controlador On-Off, apresentado nas Figura 12 e Figura 13. Desta maneira, pode-se afirmar que houve menor ejeção de O₂ durante a atuação de caráter inibitório da injeção de N₂, que tem por finalidade diminuir a concentração de O₂ para situação de concentração de oxigênio no meio de cultivo superior ao valor máximo permitido. Além disso, verificou-se menor consumo desse gás, conforme a Tabela 7:

Tabela 7 - Controlador PWM: consumo de O₂ em relação a 1h de vazão total.

	Consumo (%)
O ₂	10
N ₂	5

2.9.4 Análise dos controladores

Observando-se as Figura 12 e Figura 17, nota-se que concentração de O₂ no cultivo continua aumentando, mesmo com a válvula de entrada de oxigênio fechada. Isso ocorre porque a concentração de O₂ na massa de ar livre (*headspace*) é muito superior à concentração no cultivo, provocando a transferência de carga, ao qual é modelado pelo circuito da **Figura 18**.

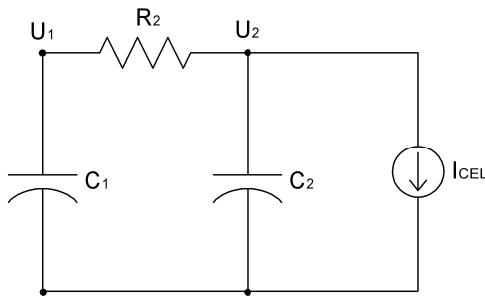


Figura 18 - Circuito elétrico para situação de válvula de O₂ fechada.

Ou seja, sob o ponto de vista da analogia construída, o capacitor C₁ (volume de ar livre) descarrega sob o capacitor C₂ (volume do meio de cultura) através da resistência R₂, (membrana tubular).

Todos os controladores avaliados apresentaram oscilação em torno do valor alvo de concentração. Isso é devido ao controle de injeção de N₂, que quando acionado, injeta grande quantidade do gás de forma a reduzir a concentração no cultivo celular. Como a ação de controle do N₂ é dada a 100%, a concentração dentro do volume livre cai abruptamente (curva verde) e a concentração na massa de água do cultivo diminui, ficando abaixo de 50%, forçando uma nova injeção de O₂ para trazer a variável controlada para o nível estabelecido.

Para contornar esse problema, implementou-se no algoritmo de controle a regulação da abertura da válvula de entrada de N₂, de forma que, a vazão de entrada do gás pudesse ser ajustada para fornecer a quantidade mínima que devolve a variável de controle para a faixa de concentração aceitável.

Desta maneira, para as três estratégias avaliadas, obtiveram-se as respostas apresentadas nas Figura 19 e Figura 24.

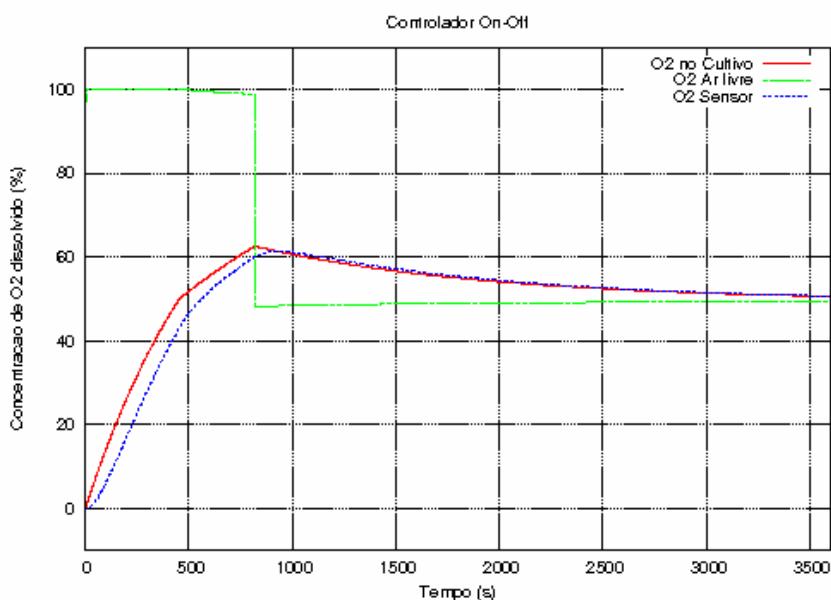


Figura 19 - Controlador On-Off, monitoramento de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

Numericamente, a mínima abertura da válvula que devolve a concentração alvo à faixa de concentração aceitável, foi de 8,5% da abertura total, para o mesmo tempo de atuação da válvula de injeção de N₂.

Na **Figura 19**, observa-se que a concentração de O₂ no meio de cultivo celular estabiliza-se no valor alvo de concentração, atingindo o equilíbrio com a concentração de O₂ no volume de ar livre.

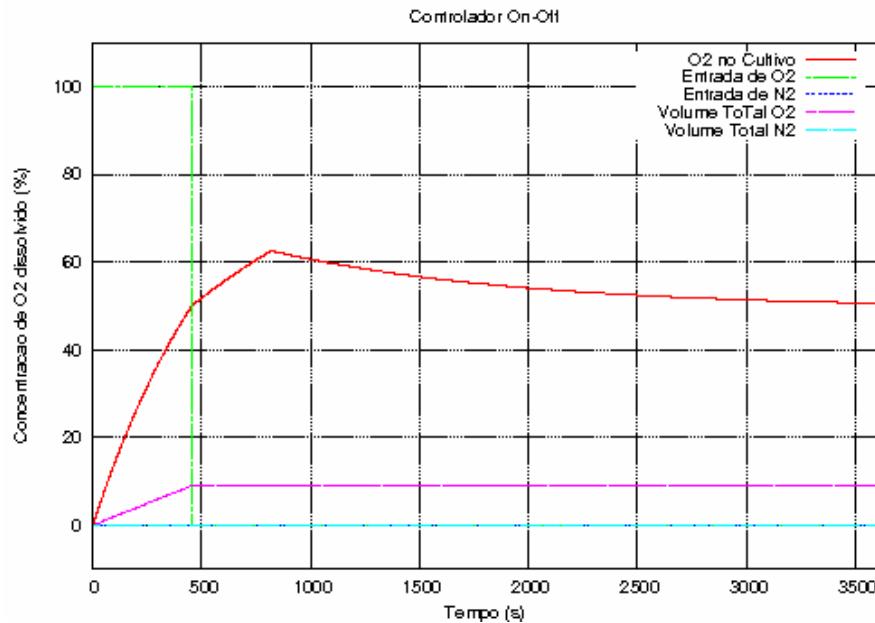


Figura 20 - Controlador On-Off, entrada de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

Comparando-se a Figura 13 com a **Figura 20**, observa-se que houve redução na requisição do gás N₂. Isso deve-se ao fato de que o controlador com o correto ajuste da entrada de N₂ precisa apenas de uma atuação para estabilizar a concentração no meio de cultivo celular.

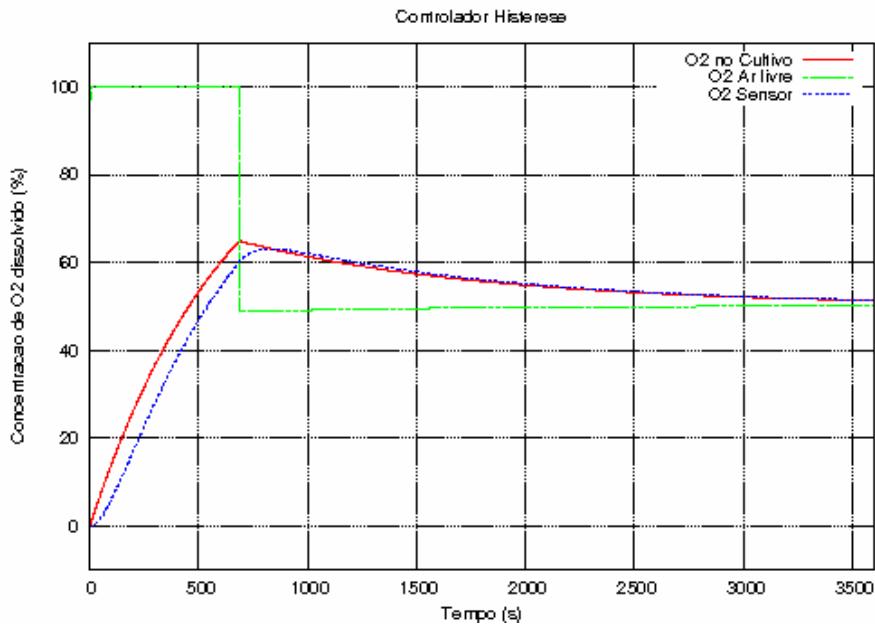


Figura 21 - Controlador Histerese, monitoramento de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

Confrontando-se as Figura 21 e **Figura 19**, nota-se que o controlador Histerese obteve resposta similar ao controalador On-Off. Entretanto, o controlador Histerese apresenta maior tempo de válvula de O₂ aberta, acarretanto na atuação antecipada do controle de injeção de N₂.

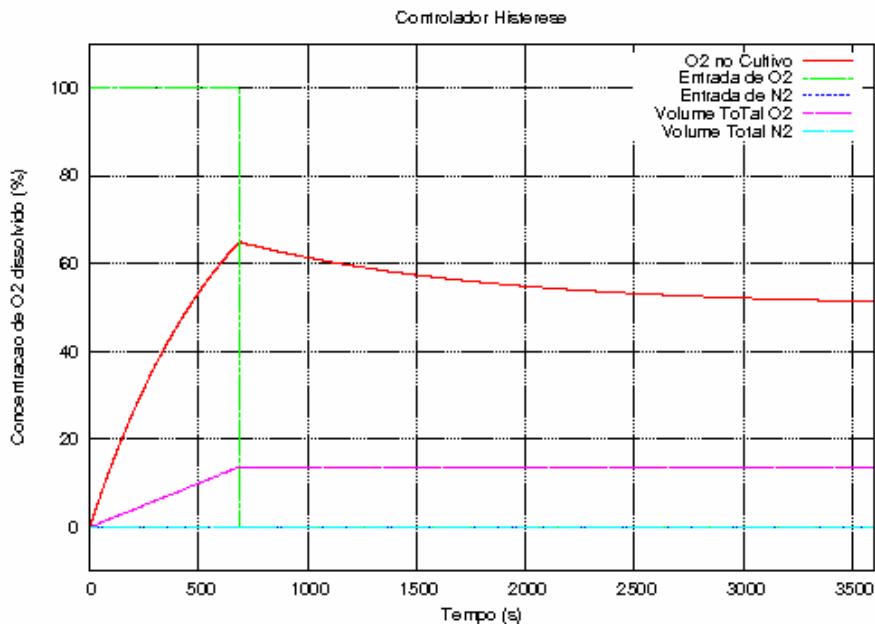


Figura 22 - Controlador Histerese, entrada de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

De maneira semelhante, comparando-se a Figura 15 com a Figura 22, observa-se que houve redução na requisição do gás N₂. Além disso, o consumo de O₂ para o controlador Histerese foi reduzido, ficando ligeiramente superior ao valor obtido para o controlador On-Off.

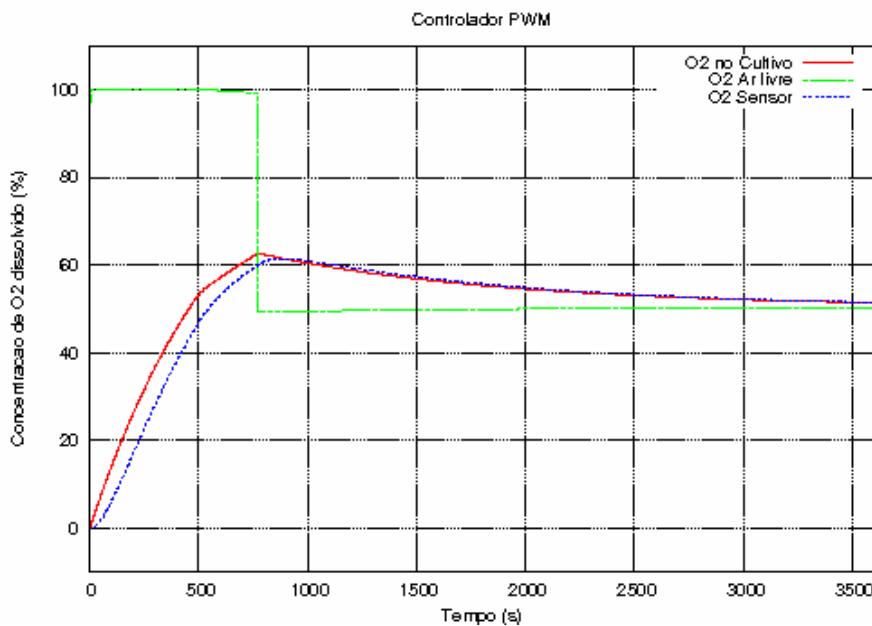


Figura 23 - Controlador PWM, monitoramento de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

Na **Figura 23**, apresenta-se a resposta do controlador PWM à nova estratégia de injeção de N₂. De forma muito parecida aos controladores On-Off e Histerese, o controlador PWM estabilizou a concentração de O₂ no meio de cultivo celular, equilibrando as concentrações de O₂ no valor do volume de ar livre e no meio de cultura.

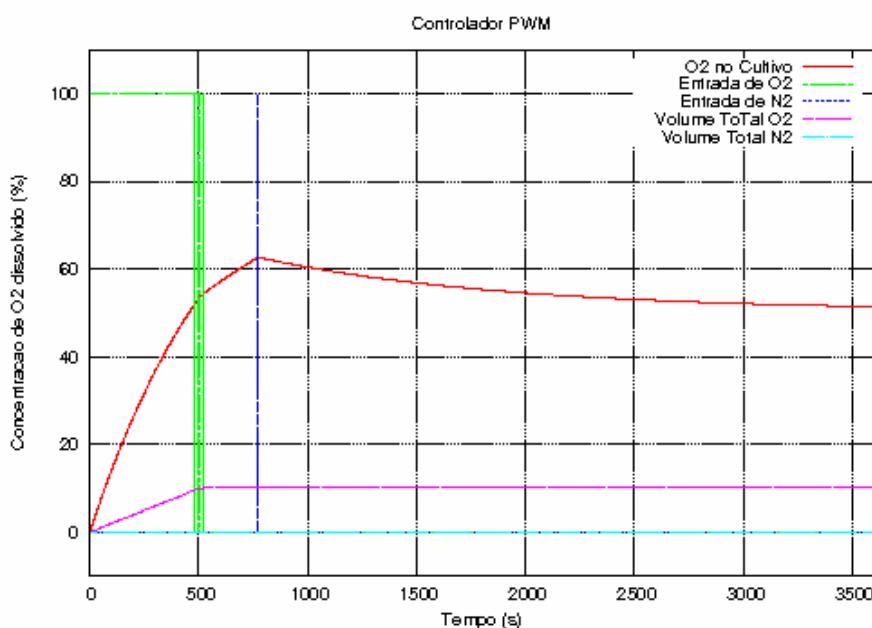


Figura 24 - Controlador PWM, entrada de O₂ com injeção de N₂ a 8,5%.

A Figura 24 evidencia o desempenho superior obtido com a nova estratégia de controle adotada para o nitrogênio. Comparando-se à Figura 17, nota-se a grande redução do consumo de N₂ para este controlador, lembrando-se que o consumo de O₂ manteve-se o mesmo.

Os controladores testados a partir da introdução do controle da entrada de gás N₂ apresentaram desempenho similar em termo de ajuste do volume de ar livre e volume total de gases injetados.

Na seqüência, simulou-se a inserção no cultivo das células animais CHO (*Chinese Hamster Ovary*) no equipamento, para todos os controladores testados. Nota-se que dinâmica de crescimento celular dá-se em vários dias, de forma que a exigência de O₂ do biorreator é mais acentuada para o quarto dia de experimento, como pode-se observar nas Figura 25 a Figura 27.

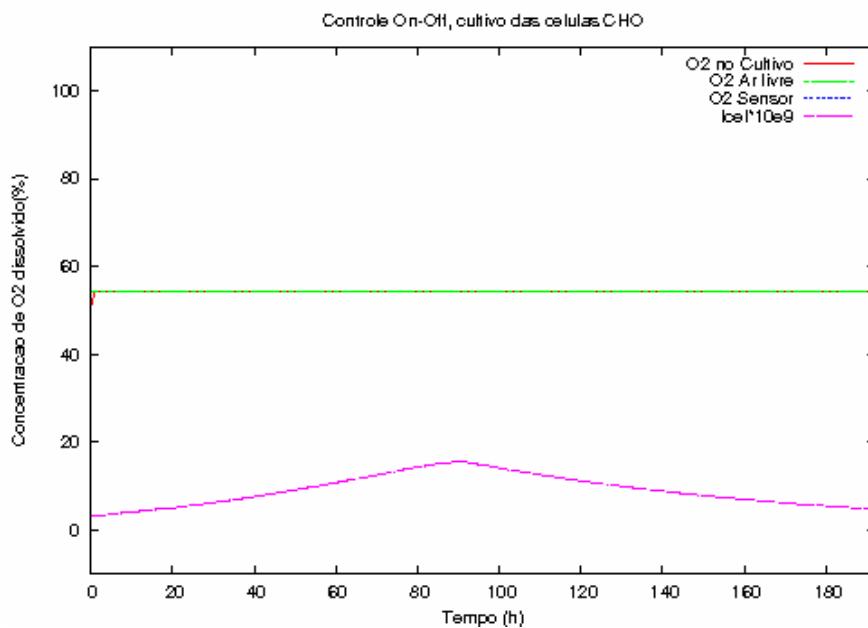


Figura 25 - Controlador On-Off, operação para ciclo de cultivo completo.

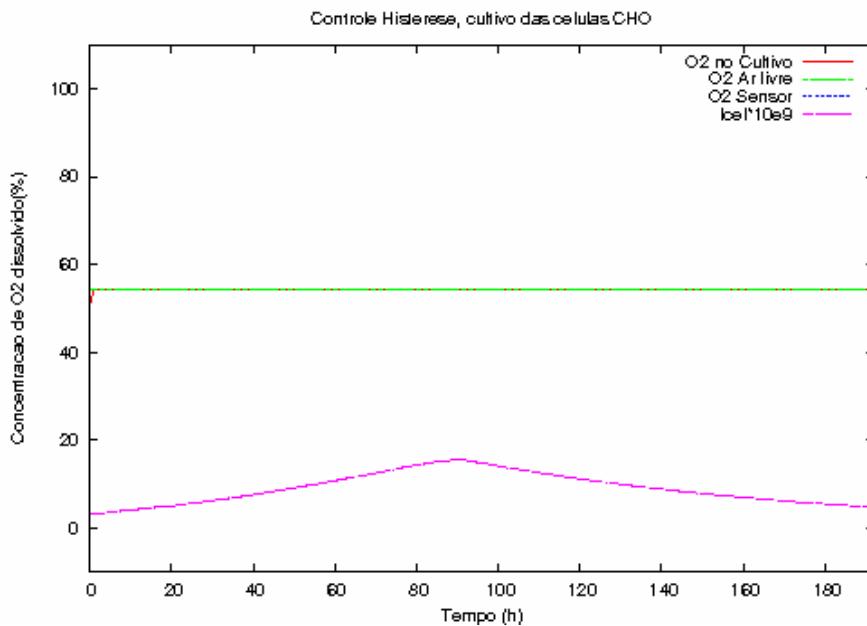


Figura 26 - Controlador Histerese, operação para ciclo de cultivo completo.

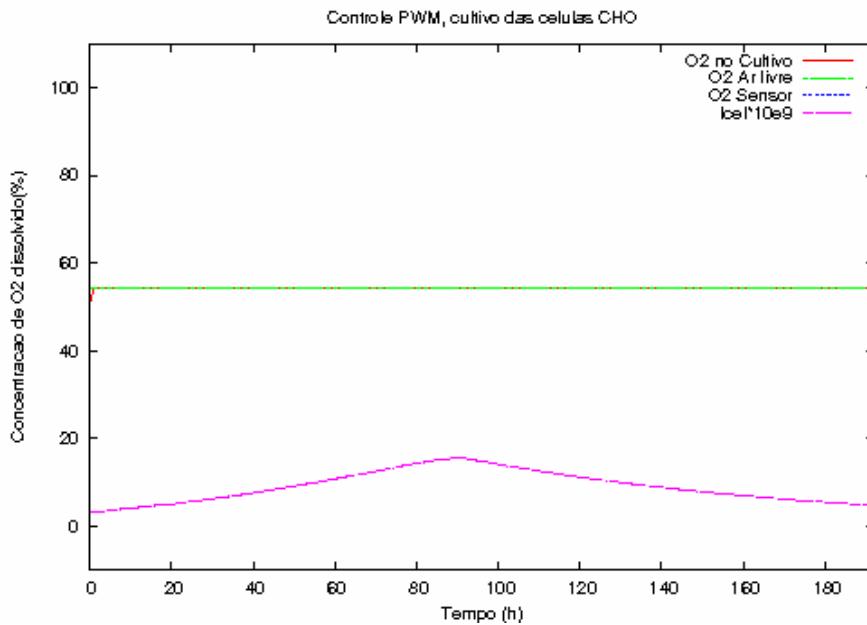


Figura 27 - Controlador PWM, operação para ciclo de cultivo completo.

Como pode ser visto nas Figura 25 a Figura 27, a concentração de O₂ no cultivo permanece inalterada durante todo o experimento. Além disso, a concentração de O₂, no volume de ar livre, permanece em equilíbrio com a concentração do cultivo. Dessa forma, toda queda de concentração é atendida pelo volume de ar livre, uma vez que a solubilidade do gás no ar é muito superior a solubilidade de O₂ na água a 37°C.

3 CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido conduziu à modelagem matemática de um biorreator com aeração através de uma membrana tubular de silicone, com temperatura e pH controlados de forma independente.

O desenvolvimento realizado apoiou-se na identificação da uma analogia entre a transferência dos gases (O_2 , N_2 e CO_2) através de interfaces entre os volumes de transporte envolvidos e o transito de cargas em circuitos elétricos. Essa analogia, possibilitou a obtenção de parâmetros de circuitos elétricos a partir das leis de transporte de massa envolvidas no fenômeno estudado.

A partir dos parâmetros elétricos obtidos, realizou-se um trabalho de validação do comportamento dinâmico do sistema modelado. Atentando-se para as respostas obtidas para o sistema excitado por um degrau unitário em malha aberta, obteve-se um perfil na saída condizente com o esperado. Esse perfil indicou que a resposta do biorreator tem contante de tempo de cerca de 11 minutos, do que deduz-se que o modelo incorporou os atrasos inseridos pelas demais interfaces, além do membrana tubular.

Os sistemas de controle avaliados permitiram a redução no consumo dos gases do cultivo. Entretanto, ainda não foi possível eliminar do sistema a entrada de N_2 , que tem o papel de inibir altas concentrações de O_2 no ambiente de cultivo, uma vez que há a necessidade de atuação ao menos na preparação do ambiente, quando biorreator é levado à concentração de trabalho. Neste momento, a transferência de massa do volume de ar livre eleva a concentração no cultivo, superando o limite superior aceitável pelo cultivo celular.

De posse do modelo matemático obtido, pode-se concluir que a identificação por parâmetros elétricos de um sistema de transferência de massa é válida, reproduzindo satisfatoriamente o comportamento real destes equipamentos. Deve-se destacar, como ressalva, que os parâmetros elétricos encontrados são altamente dependentes das condições de operação do equipamento, tais como aeração e agitação, pois influem diretamente no valor de $K_L a$.

Como sugestão de trabalhos futuros, pode-se estudar o desenvolvimento de um controlador capaz de predizer a necessidade de inserção de O_2 no tempo e amplitude adequados, levando em consideração o atraso provocado pelo sensor de concentração do equipamento. Esse controlador pode ser baseado em técnicas de sistemas inteligentes, tais como sistemas neurais e de lógica fuzzy. Desta maneira seria possível a eliminação da entrada de nitrogênio, uma vez que não seria necessária a diminuição da concentração de oxigênio no cultivo.

4 ANEXOS

Tabela 8 - K_{La} para algumas condições de trabalho.

Velocidade rotação do cilindro interno (rpm)	Vazão de ar (mL min ⁻¹)	Fluido I água K_{La} (h1) ± desvio padrão
25	80	$2,9 \pm 1 \times 10^1$
	160	$3,2 \pm 1 \times 10^2$
	400	$3,3 \pm 5 \times 10^2$
	550	$3,5 \pm 5 \times 10^3$
50	80	$3,6 \pm 3 \times 10^2$
	160	$4,0 \pm 4 \times 10^2$
	400	$4,2 \pm 4 \times 10^2$
	550	$4,6 \pm 5 \times 10^2$
75	80	$4,2 \pm 7 \times 10^2$
	160	$5,0 \pm 4 \times 10^2$
	400	$5,3 \pm 8 \times 10^2$
	550	$5,5 \pm 8 \times 10^2$
100	80	$4,5 \pm 9 \times 10^2$
	160	$5,2 \pm 6 \times 10^2$
	400	$5,7 \pm 3 \times 10^2$
	550	$5,9 \pm 6 \times 10^2$

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, C. K., SADIKU, M. N. O., Porto Alegre: Bookman, 2006 857 p + 1 CD-ROM

ATLAS, RONALD M., Principles of Microbiology. St. Louis, Missouri: Mosby, 1995. 432p.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd edition, Singapore, McGraw-Hill, 1986. 984p.

BENNETT, C. O., MYERS, J. E., Fenômenos de transporte: Quantidade de movimento, calor e massa. 1a edição. São Paulo: Macgraw-Hill do Brasil, 1978. p.821

BLANCHARD, J. L., LYNCH M. Organellar genes: why do they end up in the nucleus?, Trends in Genetics, 16 (7), 2000. p. 315-320.

BRAUN, M., Equações diferenciais e suas aplicações, São Paulo, Editora Campus, 1979.

CASEY, E.; GLENNON, B.; HAMER, G. Oxygen mass transfer characteristics in a membrane-aerated biofilm reactor. Biotecnol. Bioeng., v.62, n.2, 1999. p.183-192.

DE ROBERTIS, E. M. F. (2001) Bases da biologia celular e molecular Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 3. ed. 418 p.

GASparetti, A. C., Sistema para desenvolvimento de sensores inteligentes. São Paulo EPusp – 2000, 15p.

GERRARD, W. Gas solubilities: widespread applications. Oxford : Pergamon, 1980, p. 497

IUPAC, 64, 143 Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). 192, 148 p.

JOHNSON, D. E., HILBURN, J. L, JOHNSON, J. R, Fundamentos de análise de circuitos elétricos, Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1994, 539 p.

JUNQUEIRA, L. C. U. Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1ed.,2000. 339 p.

MAHAN, B. M. Química: um curso universitário. São Paulo : Edgard Blucher, 1995, 582p.

MICHAELS, J. D.; MALLIK, A. K.; PAPOUTSAKIS, E. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotechnology and Bioengineering*, v.51, 1996. p.399-409.

OZTURK, S. S.; THRIFT, J. C.; BLACKIE, J. D.; NAVEH, D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v.53, n.4, 1997. p.372-378.

PAPOUTSAKIS, E. T. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends-Biotechnology*, v.9, n.12, 1991. p.427-37.

POLASTRI, G. D. Development of the cell culture process for the large-scale production of the recombinant tissue plasminogen-activator Activase. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 213th Meeting, Pt.1, Biot145, 1997.

RUSSELL, J. B. Quimica geral 2. ed São Paulo : Makron Books, v1 1994. p500-530.

SANTIAGO, Patrícia Ap. ; SUAZO, Claudio A T ; GIORDANO, Roberto C . Uma nova concepção de biorreator para o cultivo de células. In: II ENTEQ - Encontro Brasileiro sobre Tenologia na Industria Química, 2006, São Paulo. I Tecniq - Seminário sobre Tecnologia na Indústria Química, 2006. v.1.

SAMBANIS, A.; HU, W.-S. Cell culture bioreactors. In: *Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise*, REHM, H.-J.; REED, G. (eds.), 2nd edition, Weinheim, VCH Verlag, v.3, 1993. p.105-126.

SCHULZ, H. E. O essencial em fenômenos de transporte São Carlos: EESC-USP, 2003. 82 p.

STANIER, R.Y., J. L. INGRAHAM, M. L. WHEELIS, AND P. R. PAINTER. *General Microbiology*. 5th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1986. 324p.

TULLIS, J.P. *Hydraulics of pipelines*. John Wiley & Sons, New York, 1989. 320p.

VRIEZEN, N.; ROMEIN, B.; LUYBEN, K. C. A. M.; DIJKEN, J. P. Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.*, v.54, n.3, 1997 p.272-286.

WIRTH, M.; HAUSER, H. Genetic engineering of animal cells. In: *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*, REHM, H.-J.; REED, G. (eds.), 2nd edition, Weinheim, VCH Verlag, v.2, 1993. p.663-744.

WOLFE, R. A. Media for cell culture. In: *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*, REHM, H.-J.; REED, G. (eds.), 2nd edition, Weinheim, VCH Verlag, v.3, 1993. p.141-156.

ZENG, A. P.; HU, W.-S.; DECKWER, W. D. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnol. Prog.*, v.14, n.3, 1998. p.434-441.