

8. MODELAÇÃO, MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DE REACTORES BIOLÓGICOS

Eugénio C. Ferreira* e Sebastião Feyeo de Azevedo**

8.1 INTRODUÇÃO

8.1.1 EVOLUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, SOCIAL E INDUSTRIAL

A evolução industrial na segunda metade do Sec. XX foi influenciada principalmente por quatro tipos de factores interligados: (i) pelos desenvolvimentos absolutamente extraordinários da tecnologia digital; (ii) pelos avanços da ciência; (iii) pela evolução da Sociedade em exigência e procura; e (iv) particularmente nos últimos trinta anos, pela evolução dos conceitos de negócio.

Nas áreas da tecnologia digital e da teoria de sistemas observa-se um grande progresso nas tecnologias de medidas e informação e a uma revolução na oferta de sistemas de controlo distribuído e de aplicações informáticas abertas. Conceitos novos, tanto na monitorização industrial por via indirecta, inferencial, com base em modelos clássicos ou em métodos de engenharia de conhecimento, como na área do controlo avançado, estão a entrar, embora lentamente por razões que se discutirão, na prática da operação do processo industrial

Esta evolução das estratégias de produção industrial tem sido fortemente condicionada por factores e preocupações relacionadas com saúde, segurança e sustentabilidade ambiental, por exigências de qualidade da sociedade e do mercado, por pressões económicas e pela evolução das estratégias das companhias, primeiro de negócio local para global, agora, alguns o dizem, para conceitos de negócio ‘metanacional’, associados a conceitos da ‘economia do conhecimento’.

Pode dizer-se que, em conjunto, estes factores têm favorecido investimentos em automação industrial no sentido de operação mais limpa e mais segura, de maior qualidade de produto e de maior eficiência e produtividade nos processos.

A importância económica de obtenção de altos rendimentos justifica a introdução de estratégias de monitorização e controlo, para acompanhar de um modo regular e preciso a produção, de forma a garantir reprodutibilidade da qualidade dos produtos.

Como exemplo, estes requisitos ganham uma grande importância na situação de utilização de metabolitos secundários para fins terapêuticos. Neste caso, a aprovação por autoridades regulamentares implica que todo o processo seja validado (que observe as especificações) e que o controlo do processo seja estabelecido de modo a garantir uma qualidade consistente do produto.

8.1.2 ABORDAGENS DE ANÁLISE DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Nos processos biotecnológicos esta exigência de competitividade, e de procura de metodologias operacionais capazes de assegurar de modo estável e reprodutível uma produtividade máxima com um mínimo de custos, tem encontrado resposta num esforço de conjugação de três abordagens ao problema:

- A **abordagem biológica ou bioquímica** em que se procura melhorar o desempenho do processo e dos próprios catalisadores pela selecção de microrganismos e de meios de cultura apropriados ou por manipulações genéticas (mutagénese induzida; recombinação genética baseada em fusão de protoplastos,...) - objectivos da Engenharia Genética e da Microbiologia;
- A **abordagem tecnológica** que se concentra no desenvolvimento de melhores tecnologias e condições operacionais (regime de funcionamento, processos imobilizados, novas concepções de reactores, etc.) - objectivos da Engenharia Biológica / Engenharia Bioquímica;
- A **abordagem matemática** que recorre à modelação matemática dos processos e à utilização de estratégias (por vezes automáticas) de monitorização e controlo da operação dos reactores biológicos – objectivos da Engenharia de Sistemas e Processos, da Biologia de Sistemas e da Bio-informática.

A abordagem matemática é normalmente utilizada após a concepção e optimização do processo sob o ponto de vista das abordagens biológica e tecnológica. Os ganhos de desempenho introduzidos pela abordagem matemática poderão não ser tão importantes, sobretudo quando comparados com as outras abordagens. A abordagem biológica/bioquímica pode melhorar significativamente o baixo rendimento na produção de metabolitos secundários. A engenharia genética poderá introduzir incrementos de 50 vezes em certos processos. A abordagem tecnológica conseguirá melhoramentos na ordem dos 50%.

8.1.3 AUTOMAÇÃO INDUSTRIAL

O investimento em automação e em sistemas informáticos em novas instalações piloto de desenvolvimento de produtos e processos duplicou na última década, representando 15% do total a investir. A indústria tem-se mostrado reticente na introdução de novas estratégias de monitorização e controlo devido aos riscos de contaminação e preocupação em relação à robustez e fiabilidade dos sensores. A aplicação de modelos no controlo em

ciclo fechado em fermentações industriais é ainda insignificante. A indústria utiliza principalmente modelos parciais ou empíricos.

Uma das grandes dificuldades do controlo de processos biotecnológicos reside nos problemas associados à tecnologia de medição das variáveis de interesse. Importa distinguir entre as variáveis que podem ser realizadas em linha e as que têm de ser feitas em diferido. No controlo de um reactor biológico exige-se o acesso em tempo real a variáveis medidas em linha, isto é, um algoritmo de controlo deve dispor, periodicamente, de determinados valores de variáveis do processo. É nesta fase que os computadores adquirem um papel relevante (Figura 8–1a), dada a sua capacidade de aquisição rápida de dados através de uma interface *ad hoc* - Sistema de Aquisição de Dados (SAD). Um SAD deverá permitir a aquisição e armazenamento de dados a frequências variáveis, de modo a corresponder aos períodos críticos do processo biotecnológico, possibilitando o processamento posterior da informação. Deverá também permitir a automatização das várias etapas do processo (enchimento, fornecimento de nutrientes, esterilização, etc.).

A Figura 8–1b esquematiza as principais tarefas da operação de processos assistida por computador, agrupadas em três blocos – Modelação, Monitorização e Controlo – que constituem os temas abordados no presente capítulo.

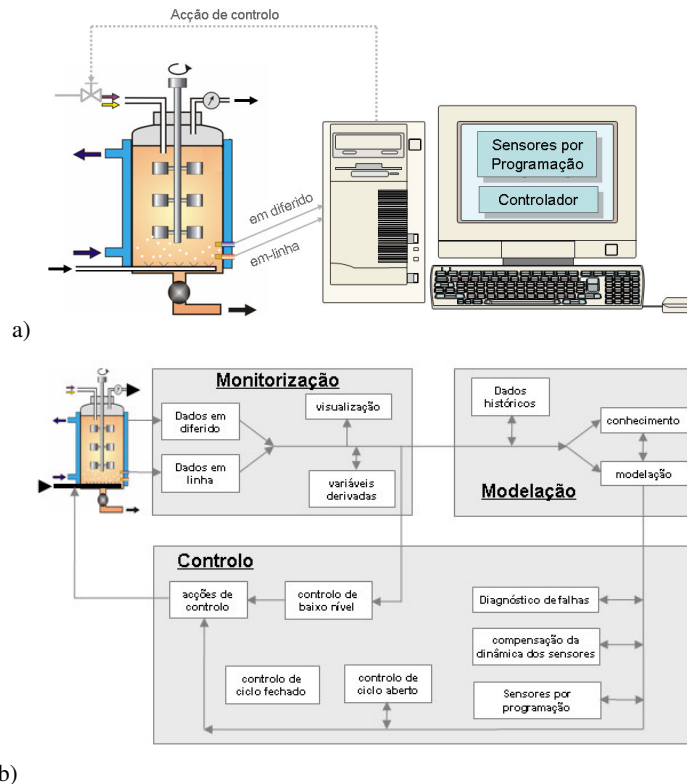


Figura 8–1 – Operação de processos assistida por computador.

8.2 MODELAÇÃO DA DINÂMICA DE REACTORES BIOLÓGICOS

8.2.1 CLASSES DE MODELOS MATEMÁTICOS

Existem vários tipos de abordagens à questão da modelação nas ciências naturais. Os vários tipos de modelos são normalmente distinguidos em termos de classes. A classificação que se segue, sem pretender ser exaustiva, é efectuada com recurso à exemplificação da modelação do crescimento microbiano.

Um **modelo verbal** faz uma descrição qualitativa do processo biológico e é normalmente usado na comunicação entre cientistas da área da microbiologia e cientistas de outras disciplinas. Num **modelo descritivo** utiliza-se um ajuste numérico de dados experimentais para fins interpolativos. Deve ser usado somente dentro da região onde o modelo foi testado experimentalmente. Este tipo de modelo é muitas vezes referido como **modelo caixa negra**. Um **modelo preditivo** (ou explanatório) tem como finalidade a extrapolação de dados. Este tipo de modelo também é designado por **modelo caixa cinzenta**.

Os **modelos não estruturados** constituem uma classe de modelos sem preocupação de descrição da estrutura da população a modelar. No caso duma população microbiana, nada é dito acerca da composição ou qualidade da biomassa. O crescimento é expresso unicamente como sendo o aumento de biomassa. As células são indistinguíveis umas das outras, sendo vistas como caixas negras no que se refere aos processos fisiológico e metabólico. Este tipo de modelos é usado, normalmente, na descrição de fenómenos de crescimento, em que num dado intervalo de tempo, todas as propriedades extensivas aumentem do mesmo factor - *crescimento balanceado*.

Se o crescimento ocorre num ambiente não balanceado, caso da maioria das situações extra laboratoriais, então o modelo a usar deve descrever a alteração na estrutura do microrganismo em resposta a alterações nas condições ambientais - **modelo estruturado**. Há uma preocupação, neste tipo de modelo, para considerar a composição/qualidade da biomassa e os seus estados fisiológicos. É de referir o pioneirismo de FREDRICKSON (1976) com uma das primeiras propostas de aplicação de modelos estruturados à modelação do crescimento microbiano. O livro de ROELS (1983) constitui uma referência importante sobre modelação estruturada e não estruturada para sistemas microbianos e enzimáticos.

Designa-se por **modelo distribuído** o modelo em que o termo biomassa é utilizado com o sentido de quantidade média (distribuída) em todo o reactor biológico. A referência a um **modelo segregado** considera a natureza celular da vida microbiana (RAMKRISHNA, 1994).

Um **modelo determinístico** tem um significado de ausência de incerteza, possibilitando reconstituir o comportamento passado e prever o comportamento futuro duma propriedade, conhecidos que sejam os parâmetros do modelo e o estado actual. Num **modelo estocástico** considera-se a incerteza, atribuindo a um acontecimento uma dada probabilidade de ocorrência.

Um fenómeno que decorra continuamente no tempo deverá ser tratado matematicamente recorrendo a **modelos contínuos**. Esta abordagem é válida no caso do crescimento microbiano se estiverem presentes muitos microrganismos ($>10^4$) crescendo de um modo não sincronizado. Numa cultura síncrona e/ou no caso de um número pequeno de microrganismos ($<10^4$), os fenómenos não acontecerão continuamente no tempo. Nestas situações deverá usar-se um **modelo discreto**.

A modelação de um processo com gradientes espaciais de concentração, ou outra propriedade, é efectuada com recurso aos chamados **modelos de parâmetros distribuídos** (não deve ser confundido com modelo distribuído). Na situação de inexistência de variações espaciais, fala-se de **modelos de parâmetros concentrados**.

Desenvolvimentos recentes na área de modelação de processos biotecnológicos apontam caminhos em direcção à utilização de sistemas periciais. Os **modelos baseados em sistemas periciais** incorporam equações matemáticas para as relações quantitativas e relações qualitativas (regras) baseadas em conhecimento.

É de salientar que um dado modelo pode pertencer a mais de uma classe. Assim, por exemplo (YUAN e BELLGARDT, 1992), um modelo matemático pode ser não verbal, preditivo, caixa cinzenta, estruturado, segregado, determinístico e contínuo no tempo. A Tabela 8-1 evidencia o contraste entre os pares de modelos matemáticos.

Tabela 8-1- Pares de grupos de modelos matemáticos.

Determinístico	Estocástico
Não Estruturado	Estruturado
Distribuído	Segregado
Descritivo	Preditivo
Caixa Negra	Caixa Cinzenta
Contínuo no tempo	Discreto no tempo
Parâmetros concentrados	Parâmetros distribuídos

Como se verificou, podem considerar-se vários tipos de modelos para a representação matemática de processos em reactores biológicos. Os modelos matematicamente mais complexos são os que têm em conta o efeito do estado dos microrganismos. Nestes, as variáveis do modelo são estruturadas de acordo com a idade, o volume, a massa, etc. O processo biotecnológico ocorre dentro das células vivas que podem ser visualizadas como micro-reactores bioquímicos segregados interagindo com o seu ambiente (KOSSEN, 1979). Dada a sua complexidade, devida à natureza expansiva e reprodutora destes micro-reactores e à complexidade das reacções intracelulares, a sua utilização em controlo de processos é pouco prática. De maior utilidade são os modelos não estruturados em que se supõe que a cultura consiste num único tipo de organismo de crescimento homogéneo.

Neste tipo de modelo as propriedades dos organismos são assumidas como sendo representadas pela quantidade de biomassa presente no sistema.

8.2.2 EQUAÇÕES DE BALANÇO EM REACTORES BIOLÓGICOS

A dinâmica dos processos em reactores biológicos é consequência da cinética de crescimento dos microrganismos, da hidrodinâmica e tipo de reactor, do modo de alimentação de substratos e nutrientes. Num reactor biológico a dinâmica da variação da quantidade ou concentração de cada componente é explicada em termos de dois fenómenos:

- o fenómeno de transformação ou conversão (reacções químicas, bioquímicas e biológicas) de alguns componentes noutros componentes;
- o fenómeno de transporte/transferência de massa (convecção, difusão) por trocas de líquido e/ou de gás do reactor biológico com o ambiente exterior.

O modelo dinâmico geral para reactores biológicos com agitação perfeita (Figura 8–2) e mistura completa (a composição de um componente no meio líquido é assumida como sendo homogénea) é obtido através de um balanço macroscópico aos componentes envolvidos num dado esquema reaccional. O balanço macroscópico a um sistema constituído por um reactor é obtido pelo seguinte balanço genérico:

$$ACUMULAÇÃO = CONVERSÃO + (ENTRADA - SAÍDA) \quad (8.1)$$

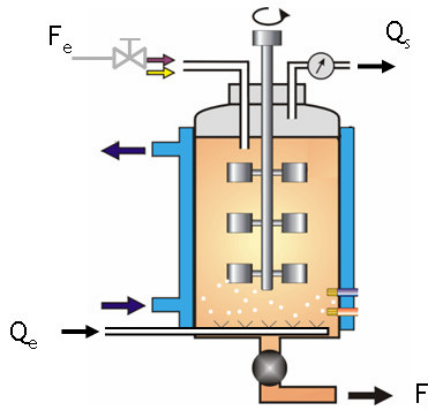


Figura 8–2 – Reactor biológico perfeitamente agitado.

A descrição dinâmica assenta num sistema de equações não lineares do espaço de estados denominado **Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos** (Bastin e Dochain, 1990). Para um dado esquema reaccional, composto por m reacções e n componentes, o modelo geral é constituído por um sistema de n equações diferenciais ordinárias escritas para a concentração de cada componente – variável de estado. A dinâmica da concentração de cada componente C_i é, então, escrita da seguinte forma:

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^m (\pm) \frac{1}{Y_{ij}} r_j - DC_i + F_i - Q_i \quad (8.2)$$

em que

- C_i Variável de estado (concentração do componente i);
- Y_{ij} Rendimento do componente i na reacção j ;
- r_j Taxa de reacção ou taxa de crescimento j ;
- F_i Caudal mássico de alimentação ao reactor na forma líquida (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i ;
- Q_i Caudal mássico de saída do reactor na forma gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i .
- D Taxa de diluição (D^{-1} é o tempo de residência) definida como a razão entre o caudal volumétrico de alimentação (F_e) e o volume (V) de líquido no reactor:

$$D \equiv \frac{F_e}{V} \quad (8.3)$$

Os rendimentos Y_{ij} são valores estritamente positivos. O termo correspondente apresenta o sinal “-” quando i é reagente e o sinal “+” quando i é produto da reacção. Estes rendimentos são adimensionais (unidades de massa/unidades de massa) em consequência de se exprimir a taxa de uma reacção em relação à taxa de crescimento da biomassa. No caso da biomassa, o valor do rendimento será, obviamente, igual à unidade. Os componentes não intervenientes numa dada reacção apresentam coeficientes, naturalmente, nulos.

O modelo geral pode ser escrito usando a seguinte representação matricial:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{Y} r(C, t) - DC + F - Q \quad (8.4)$$

em que

- C vector de estado constituído pelas concentrações dos componentes: $C^T = [C_1, C_2, \dots, C_n]$;
- Y matriz de rendimentos: $Y = [Y_{ij}]$;
- r vector de taxas de reacção ou taxas de crescimento: $r^T = [r_1, r_2, \dots, r_m]$;
- F vector de caudais mássicos de entradas líquidas no reactor (por unidade de volume de líquido no reactor): $F^T = [F_1, F_2, \dots, F_n]$;
- Q vector de caudais mássicos de saídas gasosas do reactor (por unidade de volume de líquido no reactor): $Q^T = [Q_1, Q_2, \dots, Q_n]$.

Nesta equação estão evidenciados os dois fenómenos físicos que ocorrem num reactor biológico: o termo r/Y descreve a cinética das reacções químicas, biológicas ou bioquímicas, e os termos $-DC + F - Q$ descrevem a dinâmica dos fenómenos de transporte no reactor.

Adicionalmente, poderá ser necessária (dependendo do modo de operação do reactor) uma equação para a variação de volume líquido no reactor, traduzida da seguinte forma:

$$\frac{dV}{dt} = F_e - F_s \quad (8.5)$$

em que F_s é o caudal volumétrico da corrente de saída do reactor.

O Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos é aplicável nas três situações particulares de operação de um reactor biológico. Na Tabela 8-2 pode inferir-se o efeito do modo de operação do reactor nos caudais de alimentação e retirada de meio, no volume de meio e na taxa de diluição.

Tabela 8-2- Influência do modo de operação de reactores biológicos no modelo dinâmico geral

<i>Modo</i>	<i>Descontínuo</i>	<i>Semi-contínuo</i>	<i>Contínuo</i>
F_e	0	$F_e(t)$	$F_e(t) = F_s(t)$
F_s	0	0	$F_s(t) = F_e(t)$
dV/dt	0	$F_e(t)$	0
V	Constante	$V(t)^a$	Constante
D	0	$D(t) = F_e(t)/V(t)^b$	Constante

a. O volume de meio crescerá ao longo do tempo, limitado naturalmente pela capacidade do reactor.

b. A taxa de diluição, D , poderá ser crescente, decrescente ou constante, dependendo do perfil de alimentação em substrato, isto é, da função $F_e(t)$.

8.2.3 MODELAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO

A notação $r(C,t)$, usada na equação (8.4), significa que as taxas de crescimento do vector r são variáveis no tempo e são funções (não lineares) do estado C . As cinéticas de crescimento dos microrganismos são normalmente traduzidas, em termos do vector r , pela seguinte definição:

$$r_j(C) \equiv \mu_j(C)X \quad (8.6)$$

em que

μ_j taxa específica de crescimento na reacção j ;
 X concentração dos microrganismos (biomassa).

A equação (8.6) traduz o facto de a cinética de crescimento ser directamente proporcional à concentração da biomassa. A taxa específica de crescimento é entendida como a variação da concentração de biomassa por unidade de tempo (taxa de crescimento) e por unidade de concentração de biomassa (proveniente do crescimento em cultura descontínua):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (8.7)$$

A tradução matemática da dependência de μ com diversos factores (substrato, biomassa, produto, oxigénio dissolvido, metabolitos inibitórios, pH, temperatura, intensidade da luz, etc.) tem originado os mais diversos modelos cinéticos. BASTIN e DOCHAIN (1990) dedicam um apêndice do seu livro a listar cerca de 50 modelos cinéticos que ilustram essas dependências. A proposta de MONOD (1942) para a modelação da taxa específica de crescimento é, talvez, a mais conhecida e utilizada pela comunidade científica das áreas de biotecnologia e microbiologia. Não inclui o efeito das diferenças entre as células, nem as alterações na composição celular. Não é adequada para a fase de latência nem para a fase de morte celular. Representa, unicamente, a dependência de μ com a concentração de um substrato limitante e tem a forma de uma equação hiperbólica de saturação semelhante a outras utilizadas em cinética enzimática e em fenómenos de adsorção:

$$\mu(t) = \frac{\mu_{\max} S(t)}{k_m + S(t)} \quad (8.8)$$

em que

μ_{\max} Taxa específica máxima de crescimento;
 k_m Parâmetro de afinidade dos microrganismos ao substrato;
 S Concentração de substrato.

8.2.4 MODELAÇÃO DA FORMAÇÃO DE UM PRODUTO DE SÍNTESE

O crescimento dos microrganismos é muitas vezes acompanhado pela formação de produtos. Essa formação pode estar ou não associada ao crescimento. Os produtos podem ser solúveis na cultura ou podem emergir numa forma gasosa (caso do dióxido de carbono nos processos aeróbios e do *biogás* em digestão anaeróbia). O balanço de massa relativo ao produto no reactor pode ser escrito na seguinte forma geral:

$$\frac{dC_p}{dt} = vX - DC_p - Q_p \quad (8.9)$$

em que

- C_p Concentração na fase líquida para o produto de síntese;
- v Taxa específica de produção;
- Q_p Caudal mássico gasoso de saída do produto P por unidade de volume de reactor.

O termo vX representa a taxa de formação do produto e traduz o facto de a produção ser “catalisada” pela biomassa. Na situação de formação de um produto associada ao crescimento, assume-se que a taxa específica de produção é directamente proporcional à taxa específica de crescimento:

$$v \equiv \mu/Y_p \quad (8.10)$$

em que Y_p é o rendimento produto-biomassa.

Para a situação de formação de um produto parcialmente dissociada do crescimento (fermentação de ácido láctico), LUEDEKING e PIRET (1959) propuseram a conhecida expressão:

$$v = \mu/Y_p + v_p \quad (8.11)$$

em que v_p é taxa específica de produção não associada ao crescimento.

O balanço de massa ao produto reduz-se à forma do modelo geral de reactores biológicos de acordo com a seguinte correspondência:

Tabela 8-3- Correspondência do balanço à formação de um produto de síntese ao modelo geral de reactores biológicos

Modelo Geral	C	r/Y	F	Q
Balanço ao produto	C_p	$vX = \begin{cases} \frac{1}{Y_p} \mu X \\ \left(\frac{1}{Y_p} \mu + v_p \right) X \end{cases}$	0	Q_p

8.2.5 DINÂMICA DO OXIGÉNIO DISSOLVIDO

As fermentações aeróbias são processos arejados pelo facto de os microrganismos necessitarem de oxigénio de forma a desenvolverem-se apropriadamente. O oxigénio molecular é usado pelos microrganismos aeróbios como um oxidante para as suas necessidades energéticas. Este processo, denominado respiração, pode decorrer através de diferentes vias metabólicas, dependendo do tipo de substrato e do tipo de microrganismo. O oxigénio dissolvido no meio de cultura pode ser encarado como um substrato adicional. A medição da concentração de oxigénio dissolvido em processos em reactores biológicos é normalmente efectuada através de eléctrodos electroquímicos cuja calibração decorre por imersão de uma sonda no meio líquido supostamente em equilíbrio com uma fase gasosa de concentração de oxigénio conhecida (ar por exemplo). Devido a este procedimento, usa-se muitas vezes a pressão parcial de oxigénio, p_{O_2} , como medida da concentração de oxigénio dissolvido, assumindo-se que existe uma saturação do líquido para essa pressão parcial. Devido a este facto, é usual encontrar a designação “tensão de oxigénio dissolvido” para denominar a concentração de oxigénio dissolvido. O balanço de massa ao oxigénio dissolvido num fermentador é traduzido pela seguinte equação:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2}X - DC_{O_2} + Q_{O_2} \quad (8.12)$$

com

- C_{O_2} Concentração de oxigénio dissolvido no reactor;
- Q_{O_2} Taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para a fase líquida;
- q_{O_2} Taxa específica de consumo de oxigénio pelos microrganismos;

A taxa específica de consumo de oxigénio depende, obviamente, da taxa de crescimento dos microrganismos:

$$q_{O_2} = \frac{1}{Y_{O_2}} \mu \quad (8.13)$$

em que Y_{O_2} é o rendimento biomassa - oxigénio.

A taxa de transferência de oxigénio é habitualmente escrita como $Q_{O_2} \equiv K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2})$

em que

- $C_{O_2}^*$ Concentração de saturação oxigénio dissolvido;

K_{La} Coeficiente global de transferência de oxigénio.

Na equação 8.12 é, por vezes, incluído um termo proporcional à concentração de biomassa para traduzir a parte do oxigénio utilizada na respiração endógena.

O balanço de massa ao oxigénio reduz-se à forma do modelo geral de reactores biológicos de acordo com a seguinte correspondência:

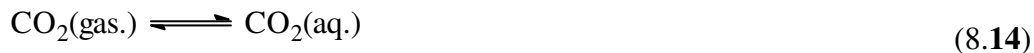
Tabela 8-4- Correspondência do balanço ao oxigénio ao modelo geral de reactores biológicos

Modelo Geral	C	r/Y	F	Q
Balanço ao oxigénio	C_{O_2}	$q_{O_2} X = \frac{1}{Y_{O_2}} \mu X$	0	$-Q_{O_2}$

8.2.6 DINÂMICA DO DIÓXIDO DE CARBONO DISSOLVIDO

O oxigénio tem sido considerado como a principal variável que controla o ambiente gasoso de uma fermentação; há contudo situações evidentes de que o dióxido de carbono desempenha um papel importante em várias fermentações, sejam aeróbias ou anaeróbias, devido ao seu papel no metabolismo celular. O dióxido de carbono constitui um substrato bio-sintético nas reacções de carboxilação ou um produto metabólico nas reacções de descarboxilação.

O cálculo da concentração de dióxido de carbono dissolvido não é tão imediato como no caso do oxigénio. O dióxido de carbono é bastante mais solúvel em água que o oxigénio. A 30 °C as solubilidades expressas em litros de gás por litro de água são: 0.0261 e 0.665 para o oxigénio e dióxido de carbono respectivamente. Adicionalmente, o dióxido de carbono reage com a água, formando hidrogenocarbonato e carbonato, conforme se evidencia pelas seguintes reacções de associação e dissociação:



A velocidade da reacção de formação de ácido carbónico é bastante lenta quando comparada com a da sua dissociação. Uma indicação da importância relativa de cada uma

das formas moleculares de dióxido de carbono na fase líquida de uma fermentação é dada pelas seguintes relações de equilíbrio:

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2(\text{aq.})]} = 10^{-3} \quad (8.18)$$

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{2.5 \times 10^{-4}}{[\text{H}^+]} \quad (8.19)$$

$$\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{6 \times 10^{-11}}{[\text{H}^+]^2} \quad (8.20)$$

Torna-se evidente, com estas relações, que a concentração do ião carbonato é sempre desprezável para a gama de valores normalmente utilizada em processos em reactores biológicos (pH 4.0 - 7.0). Em fermentações de levedura (pH 4.0 - 5.5) o dióxido de carbono dissolvido encontrar-se-á, maioritariamente, na forma $\text{CO}_2(\text{aq.})$. Para estas gamas de pH podem ignorar-se as reacções de dióxido de carbono dissolvido com os iões hidroxilo, assim como a sua complexação com grupos aminados de moléculas de proteínas.

O dióxido de carbono produzido no interior da célula pelo seu metabolismo, e uma vez que a membrana celular é relativamente impermeável às espécies iónicas, passa para o meio na forma de dióxido de carbono dissolvido.

A dinâmica da concentração de dióxido de carbono dissolvido durante uma fermentação é descrita pela seguinte equação, resultante de um balanço material:

$$\frac{dC_{CO_2}}{dt} = q_{CO_2} X - DC_{CO_2} - Q_{CO_2} \quad (8.21)$$

em que

C_{CO_2} Concentração de dióxido de carbono na fase líquida;

q_{CO_2} Taxa específica de produção de dióxido de carbono devida ao crescimento dos microrganismos;

Q_{CO_2} Taxa de transferência de dióxido de carbono da fase líquida para a fase gasosa.

Tal como no caso do oxigénio, a taxa específica de produção de dióxido de carbono dependerá, obviamente, da taxa de crescimento dos microrganismos:

$$q_{CO_2} = \frac{1}{Y_{CO_2}} \mu \tag{8.22}$$

em que Y_{CO_2} é o rendimento biomassa - dióxido de carbono.

O balanço de massa ao dióxido de carbono reduz-se à forma do modelo geral de reactores biológicos conforme a seguinte correspondência:

Tabela 8-5- Correspondência do balanço ao CO₂ ao modelo geral de reactores biológicos

Modelo Geral	C	r/Y	F	Q
Balanço ao dióxido de carbono	C_{CO_2}	$q_{CO_2} X = \frac{1}{Y_{CO_2}} \mu X$	0	Q_{CO_2}

8.3 MONITORIZAÇÃO INDUSTRIAL

A Monitorização pode ser entendida como a aquisição e análise de informação com vista à operação dos processos e, particularmente em processos por partidas, ao acompanhamento da qualidade do produto que está a ser produzido.

Em processos biotecnológicos as propriedades mais importantes que normalmente releva medir podem classificar-se como propriedades *objectivas* e *subjectivas*.

São bem conhecidos, de há muito, sensores e métodos para *medidas directas* de propriedades *objectivas* tais como pH, temperaturas, níveis, caudais e concentrações diversas. No entanto, apesar da muita investigação que se vai realizando neste tema de desenvolvimento de sensores, é facto que uma limitação significativa na monitorização e controlo de processos biotecnológicos reside ainda nos sensores para medidas directas de muitas outras variáveis (primeiro nível de monitorização), ou porque não existem, ou porque não são fiáveis, ou porque o seu custo é proibitivo.

Uma alternativa avançada da monitorização de processos biotecnológicos, tornada hoje possível pelo progresso da tecnologia digital para monitorização e controlo industrial, consiste na incorporação de medições directas do processo, em linha e em tempo-real, em modelos e em algoritmos de estimação que forneçam informação não directamente mensurável, tal correspondendo a um segundo nível de monitorização. De outra forma falando, esta é a via de *medição indirecta* (inferencial) de variáveis dos processos.

Em vários tipos de processos biotecnológicos a monitorização industrial exige a medição essencialmente qualitativa de propriedades de outra natureza, difíceis de medir, genericamente designadas de propriedades *subjectivas*. Como exemplo, podem ser mencionadas propriedades tais como o aroma, o paladar, o sabor, a consistência e a cor, bem relevantes em indústrias como as dos lacticínios (GEORGIEVA ET AL., 2002A, 2002B).

Neste enquadramento, interessa então apreciar aspectos básicos e avançados relacionados com estas formas diversas, complementares, de monitorização industrial.

8.3.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE SENSORES E TÉCNICAS DE MEDIDA DIRECTA

Aspectos de automação industrial

Há quatro etapas distintas, bem definidas, no projecto e implementação de sistemas de controlo para a operação de processos biotecnológicos: (i) o projecto e implementação de uma configuração de monitorização e controlo apropriada; (ii) a execução do primeiro nível de aquisição directa de dados, normalmente de propriedades objectivas, e monitorização do processo (incluindo a manutenção de ‘históricos’ e a implementação de alarmes do processo); (iii) a implementação de um segundo nível de monitorização, com interpretação de dados (análise inferencial), incluindo a incorporação de informação sobre propriedades subjectivas, se disso for o caso; (iv) o projecto e implementação de soluções óptimas de operação do processo, aonde se deve incluir toda a informação disponível sobre o processo.

Em configurações de monitorização e controlo distribuído, como ilustrado na Figura 8–3, a coluna dorsal de comunicações é digital. Protocolos de comunicação garantem transmissão de dados para interpretação centralizada, para monitorização e para optimização de fábrica. Controlo é efectuado normalmente a nível local. A este nível, a transmissão foi durante muitos anos somente analógica – primeiro pneumática, depois eléctrica (em corrente ou tensão). Cada vez mais no entanto, também a nível local a transmissão entre sensores (ditos inteligentes) e controladores é digital.

A nível local a instrumentação de controlo de processos inclui: (1) Sensores; (2) Controladores; (3) Elementos Finais de Controlo (normalmente válvulas); (4) Equipamentos auxiliares, tais como condicionadores de sinal e conversores.

Aspectos gerais sobre sensores

A Figura 8–4 representa esquematicamente os módulos físicos e instrumentais que constituem um ciclo simples (uma variável de leitura, uma variável de comando) de aquisição de dados e controlo digital de um processo a nível local.

Tal como representado, um sensor é composto por um *Elemento Sensor* propriamente dito e por um *Transmissor*. O sinal de saída do sensor, analógico ou digital, deve obedecer a um padrão compatível com o sinal de entrada do *Sistema de Controlo Digital (SCD)*. Na medida da não compatibilidade total esse sinal deve sofrer um conjunto de transformações de condicionamento até à recepção pelo SCD.

A maioria dos transmissores tem uma dinâmica rápida. Quando a resposta do sensor também é rápida a dinâmica da medida pode ser desprezada nos modelos dinâmicos do processo. Há no entanto casos em que a dinâmica da medida, nomeadamente os seus tempos-mortos (atrasos de transporte) pode ser relevante e ignorá-la causa dificuldades de controlo.

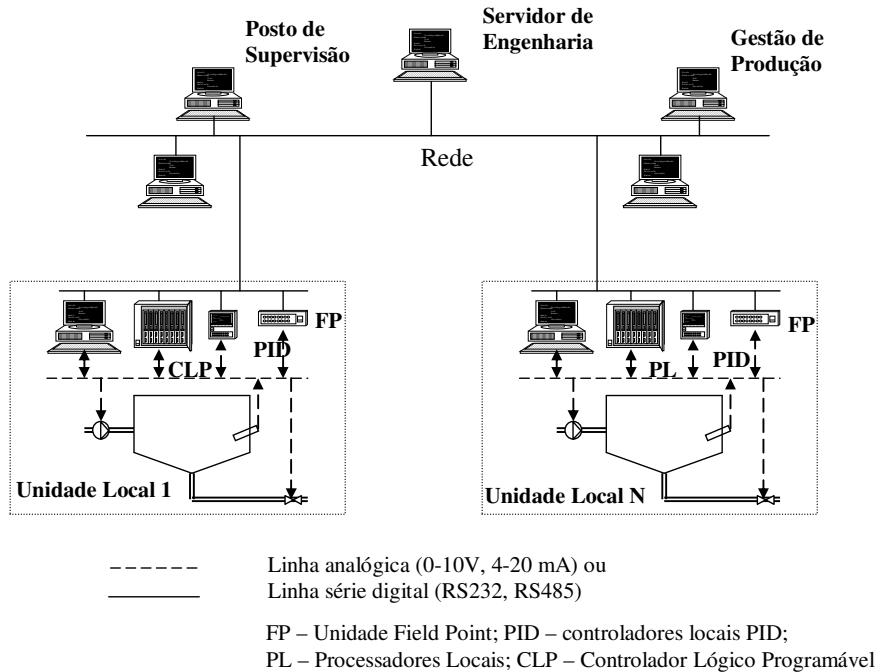


Figura 8-3 – Esquema de um sistema distribuído de automação e controlo industrial.

Os sensores exibem comportamentos lineares ou não-lineares, tal tendo a ver e estando expresso na relação entre a variação real da propriedade medida e o sinal transmitido. As fontes de não-linearidade residem normalmente no elemento sensor (Figura 8-4). Para um sensor linear o ganho para uma dada calibração é constante, sendo a razão entre o intervalo de medida fixado (*set span*) e a gama de saída do sinal. Hoje em dia, com aquisição digital de dados, transdutores não-lineares são facilmente incorporados no software de interpretação de dados e conseqüentemente muitas das não-linearidades dos sensores não causam problemas práticos.

Os sensores comerciais aplicados nas bio-indústrias estão sujeitos a várias restrições de qualidade, nomeadamente sanitárias, de segurança e de requisitos ambientais. A tendência de evolução no projecto destes sensores é no sentido da integração crescente dos ‘elementos sensores’ em microcircuitos que igualmente incorporam auto-compensações para variações ambientais, fornecendo um sinal compatível com os controladores industriais. Este tipo de sensores tem as vantagens acrescidas de terem dimensões reduzidas, não apresentarem componentes mecânicas sujeitas a desgaste e de serem normalmente de custo baixo.

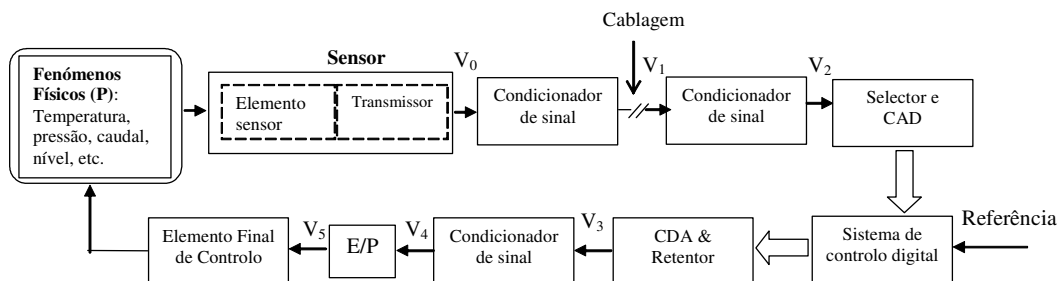


Figura 8-4 – Representação esquemática de um ciclo de controlo digital por retroacção (CAD – Conversão Analógico-digital; CDA – Conversão Digital-Analógica; E/P – Conversão Electrónico-Pneumático).

Principais tipos de medidas, sensores e técnicas de medida

Esta matéria é apreciada em detalhe no Cap. 6. Como principais variáveis normalmente envolvidas na monitorização de bioprocessos, a nível industrial (FEYO DE AZEVEDO ET AL., 2001) temos: pH; temperatura; nível; densidade ou massa específica; pressão; concentração de biomassa; concentração de oxigénio; concentração de dióxido de carbono; potencial redox; condutividade térmica; condutividade eléctrica; potencial redox e viscosidades.

Em termos de técnicas de medida, merecem referência pela sua relevância os métodos: de FIA (*Flow Injection Analysis*), de cromatografia (líquida e gasosa), de espectrometria de massa, de fotometria IV, electroquímicos ou ainda envolvendo analisadores paramagnéticos.

Uma área de medidas em intenso desenvolvimento é a dos biossensores, - são sensores que combinam a elevada especificidade de componentes biológicos com as capacidades de ferramentas electrónicas. Consistem essencialmente num módulo de sensor biológico em contacto íntimo com um transdutor físico.

Finalmente, nestas notas necessariamente breves, um desafio do presente e do futuro é o do desenvolvimento de sensores/estimadores para medir em linha componentes a nível intracelular (SONNLEITNER, 1999).

Sensores inteligentes e outros equipamentos na rede de monitorização e controlo

Sensores inteligentes são equipamentos que através de sistemas digitais embutidos podem ser ligados à rede do sistema distribuído de monitorização e controlo, com comunicação bi-direccional. Em particular aceitam comandos remotos para calibração remota.

Computadores de uso geral podem ser ligados à rede para efeito de implementar de forma dedicada métodos de medição por via inferencial (sensores por programação) ou dedicarem-se a tarefas de análise de dados de alto nível, a supervisão ou outras tarefas dedicadas de controlo.

FieldPoints (FP) são equipamentos modulares de Entrada/Saída (E/S) que ligam um banco de sinais analógicos e/ou digitais, incluindo igualmente a capacidade de efectuar conversões analógico-digital e digital-analógico.

A questão essencial de um sistema de controlo distribuído está pois em que as tarefas de recepção das medidas e de envio de comandos de controlo estejam distribuídos no campo. Poderão ser construídas configurações hierárquicas de controlo em que tarefas de alto nível tais como supervisão e optimização estejam totalmente integradas com tarefas de nível de campo – aquisição de dados e controlo local.

Padrões de comunicação

‘Comunicações industriais’ é tema que se refere a software e equipamentos, incluindo os respectivos protocolos de comunicação. Importa comentar que é uma área que se caracteriza por contínua mutação de soluções oferecidas.

Hoje temos disponível um número significativo de padrões de comunicação industrial, desenhados para diferentes tipos de exigências: *Ethernet*, *DeviceNet*, *Foundation Fieldbus*, *PROFIBUS* e *CAN (Controller Area Network)*.

Alguns deles (como o *CAN* e o *DeviceNet*) especificam protocolos de comunicação de nível baixo – actuação sensor - controlador - Elemento Final de Controlo. Outros estão especificamente orientados para aplicações de campo distribuídas (*Fieldbus* e *PROFIBUS*) – diferem em especificações de vias de comunicação (*BUS*), em velocidade de transferência de dados e em protocolos de comunicação. Os dois padrões mais importantes em aplicações de larga escala são o *Fieldbus* e o *PROFIBUS*.

Ethernet é a tecnologia LAN (Local Area Network) mais utilizada. Pode usar cabo coaxial, determinadas gradações de cablagem múltipla, ou fibra óptica. Os equipamentos que suportam *Ethernet* implementam o protocolo CSMA/CD. *Ethernet* está em conformidade com as normas IEEE 802.3 e corre normalmente sob o protocolo TCP-IP (embora outros sejam possíveis).

Conceitos básicos sobre conversão analógico-digital (AD) e digital-analógico (DA)

Todos os sistemas de controlo digital contêm interfaces de comunicações que executam conversões AD e DA. Estas tarefas são normalmente efectuadas por computadores não-específicos com placas de conversão AD e DA, por módulos *FieldPoint* ou por Processadores Locais (PL).

Importa examinar aspectos básicos do problema da aquisição de dados e controlo, nomeadamente o fluxo de informação desde a ‘propriedade do processo’ até à ‘palavra binária no computador’ e o fluxo de retroacção desde a ‘palavra binária de decisão’ até ao Elemento Final de Controlo.

Aquisição de Dados

A cadeia de aquisição de dados está apresentada esquematicamente na Figura 8-4. O estágio de projecto do sistema de aquisição de dados deve começar com uma análise qualitativa sobre o seguinte:

- O sensor deve ser escolhido com o objectivo de maximizar a sensibilidade da cadeia de leitura para o intervalo de medida desejado. Isto significa que a calibração do sensor deve ser tal que o intervalo de medida (*span*) coincida com o intervalo de variação da propriedade sob escrutínio e que esse intervalo corresponda à gama de saída do sensor.
- Os conversores AD industriais estão hoje razoavelmente padronizados. Um conversor de 12 bits é normalmente suficiente. A gama de entrada não é usualmente problema, assumindo que se dispõe dos necessários condicionadores de sinal.
- O condicionamento de sinal deve ser tal que o sinal de saída do sensor V_0 seja traduzido num sinal V_2 que tenha a mesma gama que a do conversor AD. Esta situação maximiza a resolução global da cadeia de leitura.

Ainda no estágio de projecto, a análise quantitativa deve ser efectuada em passos que vão desde o processo até ao computador, isto é:

- O sensor transmite normalmente um sinal analógico (V_0), que deve ser uma função conhecida da propriedade do processo P. Assuma-se por razões de simplicidade que essa relação é linear, expressa pela eq. (8-23):

$$V_0 = k_0 P + z_0 \quad (8.23)$$

- Este sinal normalmente sofrerá alguma forma de condicionamento (transformação de natureza, amplificação, atenuação, etc.) antes do CAD, dependendo este condicionamento das condições de compatibilidade dos sinais e das gamas de transmissão (V_1 e V_2). Este tipo de transformações pode normalmente ser expresso pelas seguintes transformações lineares:

$$V_1 = k_1 V_0 + z_1 \quad (8.24)$$

$$V_2 = k_2 V_1 + z_2 \quad (8.25)$$

- Considerando um CAD de N bits, com uma gama de entrada [V_{min} , V_{max}], a palavra digital correspondente a V_2 é dada por:

$$D = \text{INT} \left[\frac{V_2 - V_{min}}{V_{max} - V_{min}} 2^N \right] \quad (8.26)$$

O erro de discretização correspondente é dado por $\pm 0.5 \frac{V_{max} - V_{min}}{2^N}$. Para um conversor de

12 bits este erro está bem abaixo dos limites de exigência industrial, na medida em que é bem menor do que outros erros na cadeia de comunicações.

Para a escolha dos *Tempos de Amostragem* (T) usa-se em aplicações industriais uma ‘regra de algebeira’ simples: adopta-se um tempo T de aproximadamente um décimo da constante de tempo característica do processo.

O estágio de implementação da aquisição de sinais local consiste essencialmente em programar a selecção de canais (multiplexagem), a conversão analógico-digital (CAD), a leitura da informação digital (valor binário D) e a descodificação dos dados (obter as propriedades P correspondentes às palavras digitais lidas D).

Para cada varrimento (selecção de canais e leitura) dos canais de entrada, efectuado à frequência correspondente ao tempo de amostragem T, a descodificação dos dados é efectuada, programando o cálculo sucessivo dos valores desde a palavra D até à propriedade P através das eqs. (8.27) a (8.30), respectivamente as inversas das eqs. (8.23) a 8.26).

$$V_2 = V_{\min} + (D + 0.5) \frac{V_{\max} - V_{\min}}{2^N} \quad (8.27)$$

$$V_1 = (V_2 - z_2) / k_2 \quad (8.28)$$

$$V_0 = (V_1 - z_1) / k_1 \quad (8.29)$$

$$P = (V_0 - z_0) / k_0 \quad (8.30)$$

A partir deste estágio os valores das variáveis do processo estão disponíveis na aplicação de aquisição de dados para todo o tipo de acção desejada, nomeadamente interpretação de dados, gráficos, arquivo de históricos, análise de alarmes e respectivas acções, cálculo de acções de controlo.

Acção de controlo

Está fora do escopo desta secção analisar em detalhe algoritmos de controlo. Assumindo que foi decidida uma dada acção, expressa numa palavra binária C, tal comando é transmitido desde o sistema de controlo até ao elemento final de controlo através de uma cadeia de comunicação elementar, incluindo o conversor DA com um elemento retentor de sinal (*Hold*) e, no caso mais geral do elemento final de controlo ser uma válvula, com um condicionador de sinal, um amplificador tampão de potência e um transdutor electrónico-pneumático.

Em termos de projecto, assumindo que o CDA tem uma saída em tensão, a eq. (8.31) representa a conversão DA, em que N é o número de bits de conversão, V_{ref} é a tensão de referência (correspondente a uma gama de saída 0- V_{\max} , com $V_{\max} \approx V_{ref}$):

$$V_3 = V_{ref} C / 2^N \quad (8.31)$$

O padrão industrial para conversores DA é normalmente de 12 bits. A maioria das gamas de saída utilizadas é de 0-10 V ou 4-20 mA.

Finalmente, e referindo de novo o condicionamento de sinal, deve tomar-se o cuidado de proceder a uma cablagem correcta, nomeadamente garantindo que as linhas de terra de instrumentos e fontes de sinal sejam de uma boa qualidade equivalente (comentário que se aplica também às linhas de conversão AD) e tomar-se o cuidado de utilizar amplificadores de protecção de potência para proteger os equipamentos de controlo de correntes elevadas.

Medição de propriedades subjectivas

Propriedades tais como o sabor, odor, paladar, cor ou consistência, são propriedades subjectivas de grande importância para a operação dos processos em várias indústrias alimentares, nomeadamente nas indústrias dos lacticínios. Actualmente o operador utiliza, num número significativo de casos, os seus sentidos humanos para a aceitabilidade de produtos e para decidir sobre acção na operação. Investe-se actualmente em técnicas de medidas de propriedades subjectivas,

O conceito do equipamento ‘Nariz Electrónico’, tecnologia já comercialmente disponível, para detectar aromas e cheiros é um bom exemplo desse esforço.

Técnicas de análise de imagem estão hoje também já bastante desenvolvidas. Propriedades dos materiais tais como o aspecto visual podem ser obtidas por via inferencial, através de análise de imagem, servindo esta informação para o controlo do processo (Ferreira et al., 2001).

8.3.2 MONITORIZAÇÃO INFERENCIAL – SENSORES POR PROGRAMACÃO

Processo – caracterização na perspectiva da Engenharia de Sistemas

Dentro do contexto das aplicações em análise é adequado definir *processo* como um conjunto de equipamentos interligados, funcionando de forma a produzir produtos, experimentando alterações de composição, de morfologia, de conteúdo energético ou de estado físico.

Do ponto de vista da Engenharia de Sistemas, (Figura 8–5) defina-se primeiro *variáveis de estado*, como o conjunto de variáveis que caracterizam o processo para os objectivos que estejam em causa. O *estado do processo* é afectado por *variáveis de entrada* que, em função do papel que desempenham ou das suas origens, se podem classificar como *variáveis manipuladas* (por acções de controlo) ou *perturbações*. Por sua vez, *variáveis de saída* do processo são aquelas das quais temos informação, quantitativa ou qualitativa, e que de facto nos permitem identificar o *estado do processo*. Em termos práticos, ou as *variáveis de estado* coincidem com as *variáveis de saída*, ou são função mais ou menos complexa dessas *variáveis de saída*.

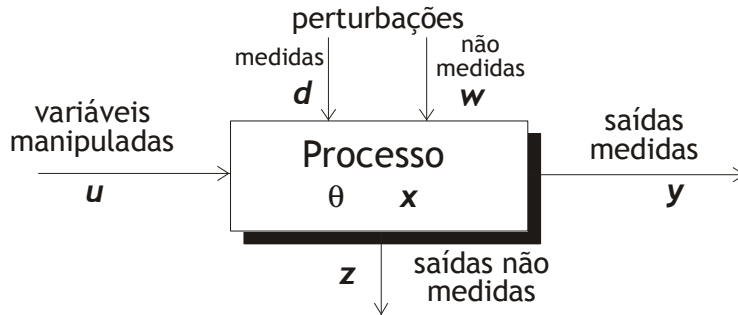


Figura 8-5 – Representação de um processo na perspectiva da Teoria de Sistemas.

Monitorização e controlo de processos biotecnológicos

Como sugerido na Figura 8.4, num problema genérico de controlo, o controlador recebe informação adquirida por sensores, idealmente medidas directas de sensores físicos,.

O controlo de processos biotecnológicos tem, como já comentado, alguma especificidade nesta matéria de monitorização e disponibilidade de informação.

Em primeiro lugar, num número significativo de processos utiliza-se informação obtida através de ensaios em diferido, com tempos-mortos significativos. Tal decorre da necessidade de remoção de amostras do reaktor biológico e de subsequente análise laboratorial, que fornecerá a informação ao operador ou ao sistema de controlo para a formulação da necessária acção de controlo, normalmente, *controlo em ciclo aberto*, como se verá na secção 8.4.

Depois, e complementarmente, as principais variáveis de estado de um processo de fermentação (concentrações de biomassa, substrato e produto) não são normalmente mensuráveis directamente em linha, sendo esta mais uma razão a impossibilitar o *controlo por retroacção*. Esta dificuldade de medidas é ultrapassada com os conceitos de monitorização inferencial, em que medidas directas do processo são incorporadas, em linha e em tempo-real, em modelos e em algoritmos de estimação que forneçam informação não directamente mensurável.

Os algoritmos de estimação de estados baseados em modelos são normalmente designados por **observadores**. A reconstrução do estado por um observador possibilitará, deste modo, o controlo do processo de fermentação

A implementação informática deste tipo de algoritmos para a sua utilização em linha tem sido genericamente designada em inglês por *software sensors*. A nossa proposta em língua Portuguesa é a denominação **sensores por programação** (FERREIRA, 1995) e é apresentada esquematicamente na Figura 8-6.

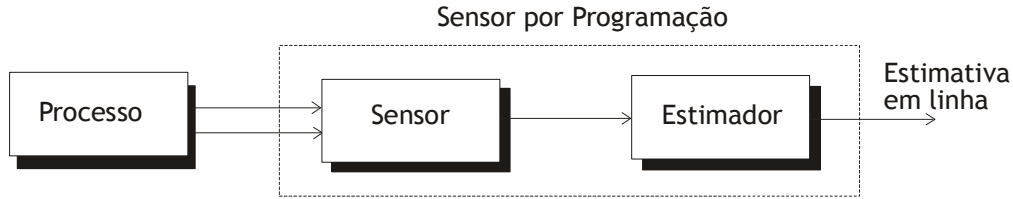


Figura 8-6 – Sensores por programação.

Observadores de estados

O princípio dos observadores de estados consiste em utilizar medidas para corrigir as estimativas de estados fornecidas por um modelo. Na Teoria de Sistemas, os trabalhos clássicos de KALMAN (1960) e LUENBERGER (1964) são normalmente apontados como referências importantes no desenvolvimento de algoritmos de estimação. Os filtros de Kalman são projectados de modo a minimizar, no resultado calculado, os efeitos dos ruídos na medição e os erros do modelo. O observador de Luenberger é projectado para que o erro de observação conduza a um ponto de equilíbrio ($\epsilon = 0$) de estabilidade assintótica. O observador de Luenberger (tal como o filtro de Kalman) é normalmente derivado a partir do modelo linearizado em torno de um ponto de equilíbrio. Deste modo as propriedades de convergência e estabilidade são aplicadas localmente em torno desse ponto.

O projecto e aplicação de observadores de estado em reactores biológicos têm sido uma área activa ao longo das últimas duas décadas (STEPHANOPOULOS e SAN, 1984; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1994; PERRIER *et al.*, 2000). Uma dificuldade importante nesta aplicação prende-se com a incerteza de alguns dos termos nos modelos usados para a descrição dinâmica dos processos. Assim, podemos distinguir duas classes de observadores de estado para reactores biológicos. A primeira classe de observadores é baseada no conhecimento completo da estrutura do modelo. Inclui os observadores clássicos do tipo **Luenberger** e **Kalman** e **Observadores Não Lineares**. A segunda classe de observadores, designados por **Observadores Assintóticos**, é baseada na ideia de a incerteza dos modelos dos reactores biológicos residir nos modelos cinéticos dos processos. O projecto destes observadores é baseado em balanços de massa, não requerendo o conhecimento da cinética do processo. Estes observadores apresentam o inconveniente potencial da sua taxa de convergência da estimação ser completamente dependente das condições operatórias.

Observadores assintóticos

A ideia subjacente a **observadores assintóticos** consiste em tirar partido da estrutura dos modelos dinâmicos dos reactores biológicos de modo a obter uma parte do modelo numa forma independente da cinética.

O modelo geral pode ser escrito usando a seguinte representação matricial

$$\frac{dc}{dt} = Yr(c, t) - Dc + F - Q \quad (8.32)$$

em que c - vector de estado constituído pelas concentrações dos componentes $c^T = [c_1, c_2, \dots, c_n]$; Y - matriz de coeficientes de rendimentos $Y = [Y_{ij}]$; r - vector de taxas cinéticas das reacções $r^T = [r_1, r_2, \dots, r_m]$; F - vector de caudais mássicos de entradas líquidas no reactor (por unidade de volume de líquido no reactor): $F^T = [F_1, F_2, \dots, F_n]$; Q - vector de caudais mássicos de saídas gasosas do reactor (por unidade de volume de líquido no reactor): $Q^T = [Q_1, Q_2, \dots, Q_n]$.

Nesta equação estão evidenciados os dois fenómenos físicos que ocorrem num reactor biológico: o termo Yr descreve a cinética das reacções químicas, biológicas ou bioquímicas, e os termos $-Dc + F - Q$ descrevem a dinâmica dos fenómenos de transporte no reactor.

Supondo conhecidos os coeficientes de rendimento da matriz Y , as taxas de reacção $r(c)$, a taxa de diluição D , os vários caudais dos vectores F e Q e um subconjunto do vector de estado c_1 , por medição em linha, é possível projectar um observador de estado para reconstrução das variáveis de estado não medidas. BASTIN e DOCHAIN (1990) propõem a seguinte equação genérica de um observador de estado para sistemas não lineares do tipo descrito pela equação anterior:

$$\frac{d\hat{c}}{dt} = Yr(\hat{c}, t) - D\hat{c} + F - Q + \Omega(\hat{c})[c_1 - \hat{c}_1] \quad (8.33)$$

em que \hat{c} e \hat{c}_1 representam a estimativa em linha de c e c_1 respectivamente, $\Omega(\hat{c})$ é uma matriz de ganhos de dimensão $n \times q$, função de \hat{c} . Esta equação pode ser vista como sendo uma cópia do modelo (8.4) acrescentada de um termo matriz do erro de observação na parte medida do estado. Uma abordagem particular desta generalização é apresentada na formalização que se segue no projecto de um observador assintótico.

Definindo uma partição do vector de estado em duas partes c_1, c_2 como se segue

$$c = \begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \end{bmatrix} \quad (8.34)$$

em que c_1 e c_2 representam os componentes medidos e não medidos respectivamente. O modelo dinâmico geral é reescrito como sendo

$$\frac{dc_1}{dt} = Y_1 r(c, t) - Dc_1 + F_1 - Q_1 \quad (8.35)$$

$$\frac{dc_2}{dt} = Y_2 r(c, t) - Dc_2 + F_2 - Q_2 \quad (8.36)$$

Introduzindo a seguinte transformação de estado (corresponde a uma mudança linear de coordenadas):

$$z = c_2 - Y_2 Y_1^{-1} c_1 \quad (8.37)$$

obtém-se a seguinte equação para a dinâmica de z :

$$\frac{dz}{dt} = -Dz - Y_2 Y_1^{-1} (F_1 - Q_1) + (F_2 - Q_2) \quad (8.38)$$

Note-se nesta última equação a ausência explícita do termo relativo às velocidades das reacções.

O problema de estimação de estados de reactores biológicos é formalizado seguidamente. Consideram-se conhecidos (por imposição ou medição em linha) a taxa de diluição D , os caudais de entrada F , os caudais gasosos de saída Q e um subconjunto do vector de variáveis de estado medidas em linha, designado por c_1 . Seja q o número de variáveis de estado medidas em linha. O vector das variáveis de estado não medidas é representado por c_2 . O problema da estimação de estados consistirá no projecto de um algoritmo para reconstruir as variáveis de estado não medidas em linha a partir das variáveis medidas. O observador assintótico é então derivado com base nas duas equações anteriores:

$$\frac{d\hat{z}}{dt} = -D\hat{z} - Y_2 Y_1^{-1} (F_1 - Q_1) + (F_2 - Q_2) \quad (8.39)$$

$$\hat{c}_2 = \hat{z} + Y_2 Y_1^{-1} c_1 \quad (8.40)$$

em que \hat{z} e \hat{c}_2 representam estimativas em linha de z e c_2 respectivamente. Este estimador de estado é completamente independente da cinética. Este observador é classificado de assintótico pelo facto de a velocidade de convergência ser determinada pelas condições experimentais (pela taxa de diluição). A análise de erro deste observador ($\tilde{c}_2 = c_2 - \hat{c}_2$) conduz a um ponto de equilíbrio ($\tilde{c}_2 = 0$) de estabilidade assintótica.

A estimação do estado na situação de desconhecimento da matriz dos coeficientes de rendimento pode ser solucionada usando observadores adaptativos para sistemas não lineares (DOCHAIN e BASTIN, 1986).

8.3.3 TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE MONITORIZAÇÃO INFERENCIAL

Como discutido nas secções anteriores um sensor por programação tem por base um modelo do processo que estabelece a relação entre as propriedades medidas e as que se deseja estimar. Por conseguinte, a chave para o sucesso de um sensor por programação está essencialmente na disponibilidade de conhecimento/informação sobre essa relação entre as propriedades do processo, isto é assenta na exactidão e robustez do modelo de base.

Com respeito e no contexto das indústrias biotecnológicas as cinéticas de crescimento e produção representam tipicamente as partes/propriedades do processo mais difíceis de representar matematicamente. Nuns casos, a complexidade de modelos mecanísticos para estes processos não é compatível com algumas simplificações, nomeadamente de linearização, exigidas pelos métodos apresentados. Noutros casos, a falta de informação conduz à impossibilidade de desenvolver os modelos mecanísticos necessários para a utilização dos métodos de medição inferencial tratados na secção precedente.

Durante a década passada começaram a surgir novas abordagens ao problema da estimação de estados e de parâmetros: metodologias baseadas em conhecimento (DI MASSIMO ET AL., 1993); redes neuronais e inteligência artificial (KARIM e RIVERA, 1992); lógica difusa (SIMUTIS ET AL., 1993).

Mais recentemente foram publicados trabalhos em sensores por programação com base em métodos de engenharia do conhecimento (FEYO DE AZEVEDO ET AL., 2001). Assentam em modelos de Inteligência Artificial tais como redes neuronais artificiais, modelos difusos ou modelos híbridos neuro-difusos, combinados com modelos mecanísticos dos processos.

Embora os resultados publicados sejam genericamente muito promissores, mesmo excelentes, na capacidade de previsão com um mínimo de informação, as exigências de *conhecimento* ao nível dos operadores e as exigências computacionais são ainda muito substanciais, o que limita ainda, no curto prazo, a sua aplicação industrial generalizada

8.4. CONTROLO DE REACTORES BIOLÓGICOS

8.4.1. CONCEITOS BÁSICOS¹

Usando como referência a definição de processo apresentada na secção 8.3.2, bem como a sua representação sistémica esquematizada na Figura 8-5, podemos dizer em termos simples que o objectivo do controlo de processos é conduzir de forma estável *variáveis estratégicas de controlo*, directamente associadas a *variáveis de estado* do processo, ao

¹ Muitos livros de texto cobrem em termos gerais as matérias abordadas nesta secção. Sugere-se a consulta de SEBORG ET AL., 2004, para apreciar detalhes dos tópicos que vão ser analisados de forma necessariamente sucinta.

longo de (próximo de) trajectórias pré-definidas, condução esta efectuada através da manipulação adequada de *variáveis de entrada do processo (as variáveis manipuladas)*. As decisões de controlo são definidas tendo como objectivo a optimização de uma função de custo, incluindo nesta optimização as restrições decorrentes de requisitos de especificações de produção, restrições operacionais, segurança do processo e regulamentos ambientais.

Em processos contínuos as referências são normalmente valores constantes de determinadas variáveis de controlo. Nestes casos o objectivo de controlo é manter de forma estável essas trajectórias constantes, pré-definidas, face a perturbações externas. É essencialmente o chamado problema de *controlo regulador*.

Em processos semi-contínuos ou por partidas, em que se incluem a maioria dos processos biotecnológicos, as trajectórias de referência variam no tempo. O objectivo é o mesmo – forçar as variáveis de controlo a seguir de forma estável as referências, agora variáveis no tempo. Este é o problema de *controlo servo*, normalmente bem mais complexo do que o problema do *controlo regulador*, na medida em que os modelos lineares (ou linearizados) em que genericamente se baseiam os métodos de controlo perdem precisão (deixam de ser válidos) com a evolução das trajectórias, de onde decorre a necessidade de usar métodos mais complexos, nomeadamente métodos adaptativos com re-sintonização periódica dos controladores.

8.4.2. METODOLOGIAS DE CONTROLO PARA PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

No precedente deste capítulo identificaram-se as duas principais dificuldades no controlo de processos biotecnológicos: a falta de medidas directas de propriedades relevantes dos processos para efeitos de controlo; os tempos-mortos associados a algumas técnicas de medidas; as não-linearidades intrínsecas dos processos, residentes principalmente nas cinéticas de crescimento e produção e na variabilidade paramétrica associada aos modelos dos processos.

Foi igualmente referenciado que os objectivos da monitorização e controlo de processos biotecnológicos dependem do tipo de produto que se pretende obter. Como exemplos: (i) no caso de um metabolito primário (fermento de padeiro, etanol) estas estratégias deverão ser orientadas para a obtenção de rendimentos e concentrações elevadas ao mais baixo custo total; (ii) na produção de metabolitos secundários (antibióticos, enzimas) pretende-se, com auxílio destas estratégias, garantir uma boa reprodutibilidade, alcançar um elevado grau de pureza e facilitar os estudos de desenvolvimento com vista ao aumento de escala.

Encontramos na literatura várias formas (critérios) de classificar estes métodos (GEORGIEVA ET AL., 2002B): (i) em ciclo-aberto vs. em ciclo-fechado; (ii) por realimentação negativa (retroacção) vs. por antecipação; (iii) linear vs. não-linear; (iv) convencional vs. avançado; (v) métodos matemáticos vs. métodos de engenharia do conhecimento. Como

acontece em outras áreas, um dado método pode naturalmente estar incluído em mais do que uma das categorias citadas.

Neste contexto e dentro do escopo do presente artigo, vamos apreciar algumas filosofias e metodologias de controlo disponíveis.

8.4.3. CONTROLO EM CICLO ABERTO

Esta metodologia tem dominado a indústria bioquímica ao longo dos anos. Consiste essencialmente em forçar as variáveis manipuladas a seguir trajectórias que eventualmente levarão à produção industrial desejada. Essas trajectórias são definidas a priori, em tempo diferido, seja simplesmente com base na experiência industrial acumulada ou como resultado de estudos de optimização com base em modelos.

Controlo óptimo

Em controlo óptimo em ciclo aberto as trajectórias óptimas das variáveis manipuladas são calculadas em tempo diferido de acordo com uma função objectivo descrita matematicamente por uma *funcional*, seja no tempo ou no espaço. Estes valores são forçados em-linha, quer actuando directamente no Elemento Final de Controlo quer através de algum sistema de controlo local. Não se efectua qualquer acção correctiva no caso da trajectória óptima se desviar da trajectória nominal. Assim, a tarefa chave num sistema de controlo óptimo é a de encontrar as trajectórias óptimas para as variáveis relevantes do processo.

Dois pontos importantes a respeito deste tema: (i) o primeiro é que o método requer um modelo suficientemente detalhado, que descreva a evolução do estado do processo por forma a permitir o cálculo das funções de custo; (ii) o segundo é que, considerando que não há acções correctivas relativamente a perturbações e incertezas paramétricas que sempre ocorrem na operação de um processo, é inevitável que o resultado seja uma operação sub-óptima do processo.

Tradicionalmente este problema de controlo tem sido resolvido pela aplicação de técnicas de optimização matemática baseadas no Princípio de Pontryagin. São reconhecidas dificuldades na aplicação destas técnicas. Alguns autores propõem a utilização de métodos estocásticos. Em relação aos métodos clássicos, estes métodos têm várias vantagens: são mais simples de aplicar e não exigem restrições nem na complexidade dos modelos que é necessário utilizar, nem na forma da função objectivo. Métodos como optimização com base em técnicas de 'recozimento simulado' (*simulated annealing*), ou algoritmos genéticos conduzem a resultados de qualidade semelhante aos obtidos com as técnicas de Pontryagin, com custos de desenvolvimento bem inferiores. A única restrição destes métodos estocásticos está no custo computacional, mas esta é uma restrição cada vez menos relevante dada a evolução da capacidade computacional dos sistemas digitais.

8.4.4. CONTROLO POR RETROACÇÃO (REALIMENTAÇÃO NEGATIVA)

Controlo por retroacção consiste na realimentação de medidas das variáveis a controlar ao sistema de controlo, na detecção do erro de controlo, por comparação das medidas com as referências, na decisão de controlo com base nesse erro detectado e na consequente acção de controlo sobre o Elemento Final de Controlo, de que resulta a manipulação das *variáveis manipuladas* do processo e de que resultará o controlo do processo. A decisão de controlo é tomada de acordo com a lei de controlo implementada no controlador.

A **Error! Reference source not found.** ilustra a configuração típica de controlo por retroacção. Comparando com a Figura 8-5 nota-se que existe agora o ciclo fechado de realimentação da informação conforme acima descrito.

Num problema de controlo o controlador pode incorporar informação adquirida em tempo real pelos sensores ou proveniente de observadores de estado e estimadores de parâmetros. Dadas as dificuldades referidas para a instrumentação em reactores biológicos, a estimação dos estados e o controlo inferencial nestes processos têm uma grande importância. No controlo inferencial, a medida directa de uma variável que se pretende controlar, mas que não está acessível por motivos tecnológicos, é substituída por uma sua estimativa. Esta é obtida a partir de um modelo do processo e de variáveis auxiliares (**Error! Reference source not found.**).

Controlo por retroacção é a estratégia mais utilizada em controlo de processos, muito por razão de estar ligada à *intuição humana* na acção no quotidiano, comentário que se aplica ao principal algoritmo de acção adoptado – o algoritmo PID (de acção Proporcional-Integral-Derivativa). Estratégias de controlo com versões do algoritmo PID são as mais usadas em controlo de processos, desde há mais de sete décadas.

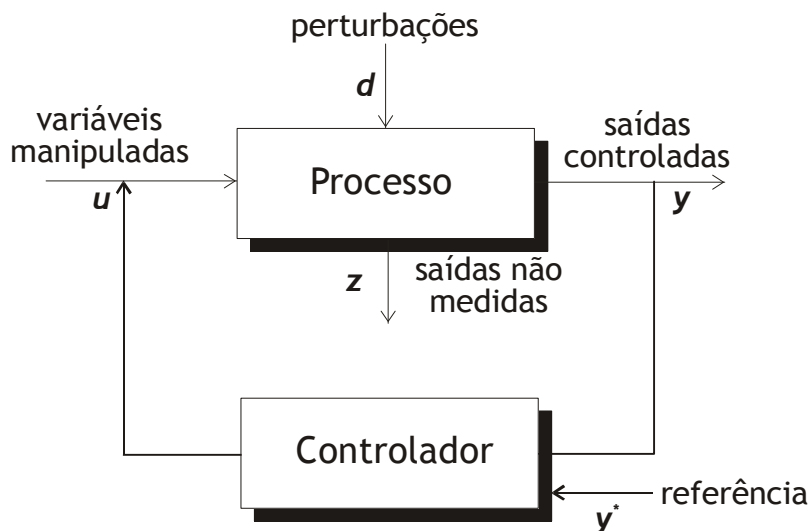


Figura 8-7 – Estrutura da configuração de controlo por retroacção.

Hoje em dia estes algoritmos são fornecidos nas suas versões digitais, em controladores individuais, em controladores lógicos programáveis ou em computadores dedicados a controlo. Os algoritmos discretos mais utilizados em controladores PID comerciais estão apresentados na

Tabela 8-6.

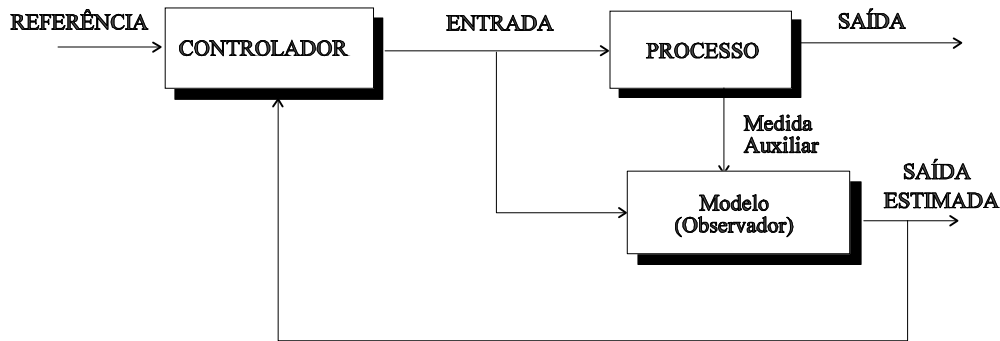


Figura 8-8 – Estrutura da configuração de controlo por retroacção com monitorização inferencial.

Os controladores PID são muito simples de operar e de manter, mas são limitados nas suas funções. É necessário sintonizá-los adequadamente o que significa obter os parâmetros de sintonização que sejam um compromisso adequado entre a estabilidade que se confere ao processo e a exactidão resultante. Refira-se que existem várias técnicas de auto-sintonização de controladores, uma opção hoje em dia incluída em todos os controladores comerciais oferecidos, pelo que este não é mais um problema de controlo. Em algoritmos digitais a acção derivativa tem o efeito de amplificar ruídos. Consequentemente é necessário tomar o cuidado de utilizar filtros digitais (também usualmente disponíveis no menu dos controladores comerciais) ou então adoptar sintonizações conservadoras (ganho proporcional mais baixo, tempo integral mais elevado e constante de tempo derivativo mais baixa do que o recomendado pela auto-sintonização).

A principal desvantagem de algoritmos PID reside no facto de só operarem bem em sistemas pouco complexos e pouco variantes. Ainda assim, são genericamente implementados com sucesso em tanques de fermentação para o controlo de variáveis tais como caudais, pH, temperaturas e pressões.

Tabela 8-6- Algoritmos de controlo digital - PID e Avanço-atraso

Algoritmo PID de posição	$u_k = u_{ss} + K_c \left(e_k + \frac{T}{\tau_i} \sum_{j=1}^k e_j + \frac{\tau_d}{T} (e_k - e_{k-1}) \right)$
Algoritmo PID de posição modificado	$u_k = u_{ss} + K_c \left(e_k + \frac{T}{\tau_i} \sum_{j=1}^k e_j + \frac{\tau_d}{T} (y_{m_{k-1}} - y_{m_k}) \right)$
Algoritmo PID de velocidade	$u_k = u_{k-1} + K_c \left((e_k - e_{k-1}) + \frac{T}{\tau_i} e_k + \frac{\tau_d}{T} (e_k - 2e_{k-1} + e_{k-2}) \right)$
Algoritmo PID de velocidade modificado	$u_k = u_{k-1} + K_c \left((e_k - e_{k-1}) + \frac{T}{\tau_i} e_k + \frac{\tau_d}{T} (e_k - 2e_{k-1} + e_{k-2}) \right)$
Algoritmo avanço-atraso discreto exacto	$u_{ff_k} = \frac{\tau_{ff1}}{\tau_{ff2}} K_{ff} e_{ff_k} + \left(1 - \frac{\tau_{ff1}}{\tau_{ff2}}\right) f_k,$ $f_k = K_{ff} \left(1 - \exp(-T/\tau_{ff2})\right) e_{ff_k} + \exp(-T/\tau_{ff2}) f_{k-1}$
Notação específica: u_k – acção de controlo no momento k ; u_{ss} - acção de controlo de estado estacionário; e_k – erro no momento k ; y_{mk} – variável medida no momento k ; K_c, K_{ff} - ganhos dos controladores; τ_i - constante de tempo integral; τ_d - constante de tempo derivativo; T – período de amostragem; τ_{ff1}, τ_{ff2} - constantes de tempo avanço-atraso	

8.4.5. CONTROLO POR ANTECIPAÇÃO

A ideia subjacente ao controlo por antecipação é a de medir variáveis que constituam perturbações importantes para o processo e actuar no elemento final de controlo por forma a que o efeito da perturbação na variável controlada não seja sentido, ou pelo menos seja fortemente atenuado. A acção do controlador tem por base o conhecimento antecipado dessa perturbação.

As grandes questões relacionadas com este tipo de controlo estão na escolha judiciosa das perturbações, que obviamente têm que ser mensuráveis, e no projecto do controlador. Pode ocorrer que o controlador ideal não seja fisicamente realizável.

É bem claro que enquanto que a filosofia de controlo por retroacção é essencialmente curativa, esta é antecipativa, o que em termos conceptuais é altamente desejável.

O controlo por antecipação proporciona melhorias muito significativas no controlo dos processos quando aplicado a perturbações importantes do processo. Tem no entanto duas limitações decisivas para que nunca seja utilizado individualmente, isto é para que seja visto essencialmente como uma filosofia complementar da realimentação negativa: (i) por um lado teríamos que conhecer todas as fontes de perturbação dos processos e projectar um controlador para cada uma dessas fontes, algo que não tem qualquer viabilidade prática; (ii) adicionalmente, todos os controladores deveriam ser realizáveis. Ora é bem conhecido que frequentemente a solução teórica de controlo por antecipação não é fisicamente exequível.

Em aplicações práticas adopta-se uma solução de retroacção-antecipação, como esquematizado na Fig. 8-9.

Adicionalmente, uma vez que a solução de antecipação é complementar da retroacção, adopta-se generalizadamente um algoritmo de controlo avanço-atraso de fase (Tabela 8-6) que tem a flexibilidade suficiente para se aproximar com boa qualidade de controlo das soluções teóricas eventualmente exigidas.

Com a tecnologia de controlo digital hoje disponível as soluções de controlo por retroacção-antecipação são muito facilmente implementáveis e conduzem a melhorias muito significativas relativamente à solução por retroacção simples. A sintonização dos controladores por antecipação faz-se essencialmente por inspecção dos termos dominantes da solução de controlo teórica.

8.4.6. APRECIACÃO DE OUTROS MÉTODOS DE CONTROLO

Está fora do escopo deste capítulo cobrir todo um extenso conjunto de conceitos e métodos de controlo em processos biológicos, aplicáveis ou sob investigação, mas releva uma apreciação breve desses métodos para uma possível orientação dos leitores interessados nos tópicos (ver FEYO DE AZEVEDO ET AL., 2001; GEORGIEVA ET AL., 2002B; SEBORG ET AL, 2003; ANDRASIK ET AL; 2004 E BARUCH ET AL., 2005)

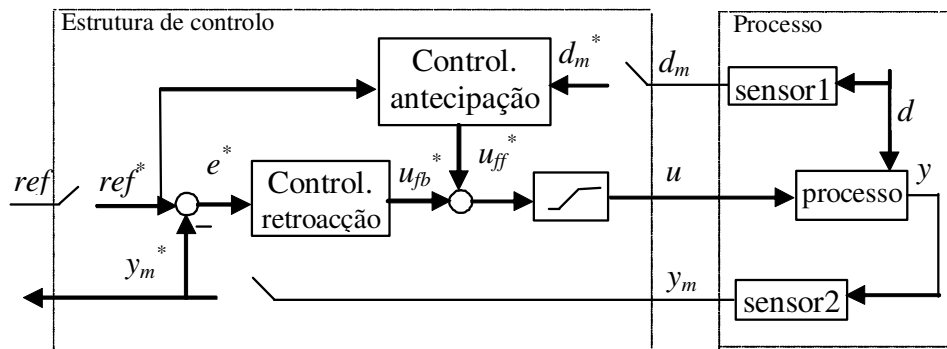


Figura 8-9 – Estrutura de controlo digital por retroacção-antecipação

Controlo convencional em cascata

Frequentemente os processos podem ser decompostos em dois sub-processos em série, com perturbações externas a fazerem-se sentir nas variáveis intermédias. Nestas circunstâncias é possível melhorar significativamente o sistema de controlo por retroacção, incorporando um ciclo interno que actua em função das medições intermédias. Tal é particularmente efectivo quando a dinâmica do sub-processo interno é mais rápida do que a dinâmica do sub-processo externo. Tipicamente utilizam-se configurações em cascata em situações em que as variáveis manipuladas são caudais de gases, particularmente sujeitos a perturbações na pressão de alimentação dos gases, problema que se resolve com o controlo interno desses caudais.

Controlo avançado com base em modelos

O que é que realmente significa o termo *avançado*? O resultado de desenvolvimentos recentes? Provavelmente. Ainda não utilizado em larga escala na indústria? Certamente. Muitas das estratégias de hoje fazem uso de informação disponível através *de modelos dos processos* de onde resulta a designação.

O controlo com base em modelos pode ser classificado como linear ou não linear, dependendo tal do tipo de modelo em que se baseia.

Adicionalmente, o sistema de controlo pode ser *adaptativo* se forem utilizadas medidas em linha para sintonizar os parâmetros dos controladores (o que pode passar por identificar em linha os modelos do processo).

O controlo pode adicionalmente ser *preditivo* se a acção de controlo se basear na previsão da sua influência na trajectória do processo dentro de um certo horizonte.

Releva a menção uma estratégia de grande importância industrial, *o controlo adaptativo-preditivo com base em modelos* já disponível em sistemas comerciais, representando de facto a primeira alternativa (aos sistemas PID clássicos) comercial de controlo avançado bem sucedida. A razão deste sucesso está não só na capacidade destes algoritmos tratarem eficientemente propriedades especiais dos processos tais como tempos-mortos, não-linearidades e restrições diversas, como ainda na sua capacidade de naturalmente incluir compensações antecipativas no projecto integrado do controlador.

Outros métodos referenciados na literatura e objecto de continuada investigação na aplicação a processos biotecnológicos são métodos da classe dos *algoritmos não-lineares*, de que se pode destacar *os algoritmos de controlo adaptativo linearisante* (FERREIRA, 1995) e os métodos de *controlo robusto*, estes últimos particularmente poderosos quando se pretende incluir na decisão de controlo intervalos conhecidos de variação dos parâmetros dos processos.

Novas tendências – controlo com base em métodos de engenharia do conhecimento

Os métodos descritos na secção precedente fazem uso de modelos mecanísticos ou alternativamente de modelos simples de entrada-saída. Ora, já foi dada evidência

abundante neste texto a respeito da dificuldade em desenvolver modelos estruturados, mecanísticos, de processos tão complexos quanto os processos biotecnológicos.

O reconhecimento destas dificuldades associado à existência de diferentes fontes de informação e conhecimento do processo, incluindo o *conhecimento heurístico* e o *conhecimento escondido* em dados crus do processo, levou ao desenvolvimento de métodos de modelação, monitorização e controlo com base em conceitos da área alargada da *engenharia do conhecimento*, tal como já abordado na secção 8.3.3..

Nas publicações mais recentes, principalmente nos últimos cinco anos (ANDRASIK ET AL., 2004; BARUCH ET AL., 2005), tem-se notado um grande incremento na aplicação de algoritmos baseados em conhecimento, na utilização de sistemas periciais e redes neuronais, e na utilização da lógica difusa directamente no projecto de controladores. São concretamente os métodos de controlo com base em *modelos difusos*, *métodos com base em redes neuronais artificiais*, ou *métodos mistos neuro-difusos*.

Mais interessantes e relevantes para as áreas da engenharia química e da engenharia biológica serão no entanto e certamente os *métodos de controlo com base em modelos híbridos*.

Nos modelos híbridos a estrutura formal dos modelos mecanísticos, baseados nos primeiros princípios e no conhecimento teórico clássico sobre cinética, termodinâmica e fenómenos de transporte, é complementada com modelos internos locais baseados nessas métodos da engenharia do conhecimento (redes neuronais etc.), precisamente nos sub-modelos em que o conhecimento teórico é limitado.

A relevância conceptual desta aproximação reside no facto de se manter a referência teórica dos *primeiros princípios*, o que dá robustez científica às soluções, ultrapassando simultaneamente, as limitações de conhecimento ainda existentes, em favor de soluções industriais expeditas.

Os comentários antes efectuados a respeito da aplicação de engenharia de conhecimento na monitorização industrial aplicam-se, digamos que de forma reforçada, à prática do controlo industrial - as exigências de *conhecimento* ao nível dos operadores e as exigências computacionais são substanciais, o que limita ainda, no curto prazo, a sua aplicação industrial generalizada.

BIBLIOGRAFIA

- Andrasik, A., Meszaros, A., Feyo de Azevedo, S. *On-line Tuning of a Neural PID Controller Based on Plant Hybrid Modelling*, Computers Chem. Engng., 28, 1499-1509, 2004.
- Baruch I., Georgieva, P. Barrera-Cortes, J., Feyo de Azevedo, S. *Adaptive Recurrent Neural Network Control of Biological Wastewater Treatment*, Int. Journal of Intelligent Systems, 20:2, 173-193, 2005.
- Bastin, G., Dochain, D. *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.

- Di Massimo, C., Lant, P.A., Saunders, A., Montague, G.A., Tham, M.T., Morris, A.J. *Bioprocess Applications of Model-Based Estimation Techniques*. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 53, 265-277, 1993.
- Dochain, D., Bastin, G. Stable Adaptive Algorithms for Estimation and Control of Fermentation Processes. *Modelling and Control of Biotechnological Processes* (Proc. 1st IFAC Symp., Noordwijkerhout, The Netherlands 1985, A. Johnson, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 37-42, 1986.
- Ferreira, E.C., *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto 1995.
- Ferreira, E.C., M. Mota, M.-N. Pons. *Image Analysis and Multiphase Bioreactors*. Multiphase Bioreactor Design, J.M.S. Cabral, M. Mota, J. Tramper (Eds.), Taylor & Francis, London, Cap. 2, 25-52, 2001.
- Feyo de Azevedo, S., Oliveira, R., Sonnleitner, B. *New Methodologies for Multiphase Bioreactors 3: Data Acquisition, Modelling and Control*. Multiphase Bioreactor Design, J.M.S. Cabral, M. Mota and J. Tramper (Eds.), Taylor & Francis, London, Cap. 3, 53-83, 2001
- Fredrickson, A.G. *Formulation of Structured Growth Models*. Biotechnology and Bioengineering, 18, 1481-1486, 1976.
- Georgieva, P., Oliveira, R., Feyo de Azevedo, S. *Instrumentation and Process Control – Process Control*, in ‘Encyclopedia of Dairy Sciences’, Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox, p. 1401-1410, Academic Press UK, 2002a
- Georgieva, P., Oliveira, R. and Feyo de Azevedo, S, *Instrumentation and Process Control – Instrumentation*, in ‘Encyclopedia of Dairy Sciences’, Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox, p. 1392-1401, Academic Press UK, 2002b
- Kalman, R.E. *A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems*. J. Basic Eng., Transactions of ASME, Ser. D, 82:1, 35-45, 1960.
- Karim, M.N., Rivera, S.L. *Artificial Neural Networks in Bioprocess State Estimation*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 46: Modern Biochemical Engineering, (A. Fiechter, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, 1-34, 1992.
- Kossen, N.W.F. *Mathematical Modelling of Fermentation Processes: Scope and Limitations*. Microbial Technology: Current State, Future Prospects (A.T. Bull, D.C. Ellwood e C. Ratledge, Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 327-357, 1979.
- Luedeking, R., Piret, E.L. *A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH*. J. Biochem. Microbiol. Technol. & Eng., 1, 393, 1959.
- Luenberger, D.G. *Observing the State of a Linear System*. IEEE Trans. Mil. Electron. AC-18, 74-80, 1964.
- Monod, J. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*, Hermann, Paris, 1942.
- Oliveira, R., Ferreira, E.C., F. Oliveira, Feyo de Azevedo, S. *A Study on the Convergence of Observer-Based Kinetic Estimators in Fed-Batch Fermentations*. Journal of Process Control, 6:6, 367-371, 1996.

- Perrier, M., Feyo de Azevedo, S., Ferreira, E.C., Dochain, D., *Tuning of Observer-based Estimators: Theory and Application to the On-line Estimation of Kinetic Parameters*. Control Engineering Practice 8:4, 377-388, 2000.
- Pomerleau, Y., Perrier, M. *Estimation of Multiple Specific Growth Rates in Bioprocesses*. AIChE J., 36, 2, 207-215, 1990.
- Ramkrishna, D. *Towards Self-Similar Theory of Microbial Populations*. Biotechnology and Bioengineering, 43, 138-148, 1994.
- Roels, J.A. *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983.
- Seborg, D. E., Edgar, T. F. and Mellichamp, D. A.; *Process Dynamics and Control*, J. Wiley, 2004
- Simutis, R., Havlik, I., Lübbert, A. *Fuzzy-Aided Neural Network for Real-Time State Estimation and Process Prediction in the Alcohol Formation Step of Production-Scale Beer Brewing*. Journal of Biotechnology, 27, 203-215, 1993.
- Sonnleitner, B. *Bioanalysis and biosensors for bioprocess monitoring*. Adv Biochem Eng Biotechnol 66 (volume editor), 1999.
- Stephanopoulos, G., San, K.-Y. *Studies on On-line Bioreactor Identification. I. Theory*. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1176-1188, 1984.
- van der Heijden, R.T.J.M., Hellinga, C., Luyben, K.Ch.A.M., Honderd, G. *State Estimators (Observers) for the On-Line Estimation of Non-Measurable Process Variables*. Trends in Biotechnology, 7, 205-209, 1994.
- Yuan, J.-Q., Bellgardt, K.-H. *Investigations on the Optimal Control of Storage Stability of Compressed Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae**. Journal of Biotechnology, 32, 261-272, 1994.