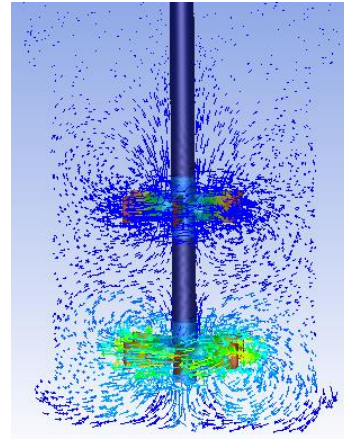
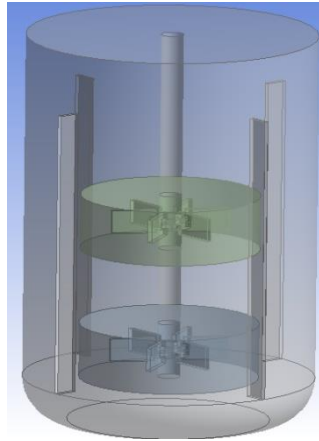




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
Departamento de Engenharia Mecânica



Desenvolvimento de um Modelo Matemático em CFD Caracterizante de uma Cultura de Células em Biorreatores

MARGARIDA CAVACO LEITE RIBEIRO
(Licenciada em Engenharia Mecânica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Mecânica

Orientador(es):

Professora Doutora Cláudia Sofia Séneca da Luz Casaca

Professora Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado

Professor Doutor Nelson Pereira Caetano Marques

Júri:

Presidente: Doutor Silvério João Crespo Marques

Vogais: Doutor Gonçalo Nuno de Oliveira Duarte

Doutora Cláudia Sofia Séneca da Luz Casaca

Fevereiro de 2020



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
Departamento de Engenharia Mecânica

Desenvolvimento de um Modelo Matemático em CFD Caracterizante de uma Cultura de Células em Biorreatores

MARGARIDA CAVACO LEITE RIBEIRO
(Licenciada em Engenharia Mecânica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Mecânica

Orientador(es):

Professora Doutora Cláudia Sofia Séneca da Luz Casaca

Professora Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado

Professor Doutor Nelson Pereira Caetano Marques

Júri:

Presidente: Doutor Silvério João Crespo Marques

Vogais: Doutor Gonçalo Nuno de Oliveira Duarte

Doutora Cláudia Sofia Séneca da Luz Casaca

Fevereiro de 2020

If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.

Isaac Newton

Resumo

Um dos maiores desafios da humanidade nos dias de hoje constitui o estudo e a compreensão de doenças para as quais não existem tratamentos eficientes ou tratamentos sequer. É nesse sentido que se tem vindo a explorar novas opções, como os produtos biotecnológicos. Na área farmacêutica, os maiores volumes de receitas anuais são referentes a estes produtos, prevendo-se um aumento anual de 1% até 2022. No entanto, o desenvolvimento destes produtos apresenta certas dificuldades, especialmente no tratamento de culturas *in vitro*, já que as células envolvidas nestes processos são extremamente sensíveis a qualquer alteração do meio.

Este trabalho final de mestrado pretende caracterizar parâmetros como velocidade criada pela agitação das pás e inserção de oxigénio no meio, necessários à maximização da produção de uma cultura de células num Biorreator, já que este tipo de equipamentos constitui um dos principais meios de controlo e monitorização em tempo-real das aplicações mencionadas. A ferramenta que permite a melhor compreensão deste estudo é a dinâmica de fluidos computacional, CFD, evitando deste modo a perda de investimentos de milhões de euros numa só cultura.

Neste sentido, foi realizado um estudo do estado de arte dos biorreatores e dos métodos utilizados em CFD, no programa ANSYS Fluent. A validação de conceitos foi realizada a partir de um artigo que caracteriza a ascensão de uma bolha, num meio aquoso retangular 3D, através do método de Euler. O cálculo matemático realizado utilizou o método de múltiplos referenciais móveis (MRF), um modelo de turbulência $k - \epsilon$ padrão e finalmente um modelo multifásico com recurso às equações de Euler. Adicionalmente, foram realizados ensaios experimentais para se validarem os resultados obtidos, com recurso a um biorreator de bancada BIOSTAT Startorius de 2 L.

Concluiu-se que os ensaios experimentais permitem validar o escoamento, quer relativamente ao tempo de homogeneização da mistura, como ao movimento realizado pela sua fase secundária, sendo que cada estágio da cultura apresenta comportamentos diferentes. E também que devido à exigência computacional e tempo necessário de cálculo não foi possível realizar estudos iterativos para a convergência dos melhores valores de parâmetros a utilizar e um estudo detalhado do sistema.

Palavras-chave

Dinâmica de Fluidos Computacional CFD, Biorreator, E coli, Modelo Multifásico

Abstract

One of the greatest challenges facing humanity today is the study and understanding of diseases for which there are no effective treatments or treatments at all. It is in this sense that new options such as biotechnological products have been explored. In pharmaceuticals, the highest annual revenue volumes refer to these products and its predicted to increase annually 1% until 2022. However, the development of these products presents certain difficulties, especially in the treatment of in vitro cultures, since the cells involved in these processes are extremely sensitive to any change in the medium.

This master's final work, as the title indicates, is intended to characterize parameters such as velocity created by the rotation of the blades and the air sparging, necessary to maximize the production of a cell culture in a bioreactor, since this type of equipment is one of the main means of control and monitoring of the applications mentioned. The tool that allows a better understanding of the above is the computational fluid dynamics, CFD, thus avoiding the loss of investments of millions of euros in a single culture.

A study of the state of the art of bioreactors as well as the methods used in CFD in ANSYS Fluent, were carried out. A concept validation was performed from an article that characterizes the rise of a bubble in a rectangular 3D aqueous medium by the Euler method. Then, a mathematical calculation was performed using the moving multiple reference (MRF) methods, a standard k- ϵ turbulence model and finally a multiphase model using the Euler equations. Experimental tests were also performed to validate the results using a 2 L BIOSTAT Startorius bench bioreactor.

It was concluded that the experimental tests allow to validate the flow, both in relation to the time of homogenization of the mixture, as well as to the movement carried out by its secondary phase, being that each stage of the culture presents different behaviours. Also, due to the computational requirement and necessary calculation time, it was not possible to carry out iterative studies for the convergence of the best values of parameters to be used and a detailed study of the system.

Keywords

Computational Fluid Dynamics CFD, Bioreactor, E coli, Multiphase Model

Agradecimentos

Quando uma meta é alcançada, é impossível não olhar para trás, perceber o caminho percorrido e agradecer a todos os que fizeram parte dele. Nesse sentido, quero deixar o meu agradecimento a todos os que estiveram presentes neste processo.

Em primeiro lugar um grande obrigada à minha família. Aos meus avós Joaquina e Arnaldo, pelo amor imenso e dedicação incansável, aos meus pais Alexandra e José Pedro, pelo apoio incondicional e boa disposição, e à minha irmã Carolina, que nunca deixou de me lembrar que somos capazes de tudo o que queremos.

Aos meus orientadores, Doutora Cláudia Casaca, Doutora Cecília Calado e Doutor Nelson Marques, o meu enorme agradecimento, pelo acompanhamento, motivação e tempo dedicados.

Agradeço também ao departamento de Biomédica, pela disponibilização do laboratório e ferramentas indispensáveis à realização deste trabalho, como o biorreator.

Queria deixar também o meu profundo agradecimento aos meus amigos, responsáveis pela felicidade e fé que deposito no meu dia a dia. Especialmente a: Afonso Alves, Alexandra Amor, Ana Rosa, António Brito, Bianca Ferreira, Carolina Esteves, Catarina Laranjeira, Diogo Gomes, Etelvina Catão, Fernando Silva, Francisco Aço, João Canedo, João Tiago Nunes, Joana Anglin, Leonor Estrela, Margarida Dias, Maria do Carmo Aragão, Mário Rui, Marta Barreto, Micaela Martins, Pedro Gaspar, Pedro Soares, Rita Dias, Rui Escalinha, Rute Milho, Vasco Bento e Vasco Pinheiro.

E finalmente, ao Hugo Almeida, pelas horas incontáveis e paciência infinita, obrigada.

Índice

| | |
|--|------|
| Resumo | iii |
| Abstract..... | v |
| Agradecimentos | vii |
| Índice | ix |
| Índice de Figuras | xi |
| Índice de Tabelas | xiii |
| Nomenclatura..... | xv |
| 1 Introdução..... | 1 |
| 1.1 Motivações..... | 1 |
| 1.2 Objetivos..... | 3 |
| 1.3 Artigos chave da bibliografia..... | 3 |
| 1.4 Estrutura do Trabalho | 4 |
| 2 Biorreatores | 7 |
| 2.1 Estado de Arte: Biorreatores..... | 7 |
| 2.2 Caracterização do Biorreator em estudo..... | 18 |
| 2.2.1 Quantificação analítica de um Biorreator de agitação mecânica..... | 19 |
| 2.2.2 Biorreator em estudo | 21 |
| 3 Dinâmica de Fluidos Computacional | 27 |
| 3.1 Estado de Arte: CFD..... | 29 |
| 3.1.1 Equações Governantes da CFD | 32 |
| 3.2 Dinâmica de Fluidos Computacional e o estudo de biorreatores..... | 36 |
| 3.3 Software a ser utilizado..... | 38 |
| 3.3.1 ANSYS | 38 |
| 3.3.2 Modelos da ANSYS a utilizar | 39 |
| 3.4 Metodologia de Simulação | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.5 | Caso de Validação | 47 |
| 4 | Modelo Proposto | 61 |
| 4.1 | Influência de parâmetros isolados..... | 61 |
| 4.1.1 | Geometria | 62 |
| 4.1.2 | Malha | 63 |
| 4.1.3 | Modelo turbulento com MRF | 65 |
| 4.1.4 | Modelo multifásico turbulento com MRF..... | 70 |
| 4.1.5 | Ensaio Experimentais..... | 74 |
| 5 | Conclusão | 79 |
| | Bibliografia..... | 83 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2-1 – Doze exemplos de biorreatores: (Mandenius, 2016) | 15 |
| Figura 2-2 – Biorreator Biostat® B plus de 2 L (Manual, 2012) | 21 |
| Figura 2-3 – Dimensões Externas Vaso (Manual, 2012)..... | 22 |
| Figura 2-4 – Acessórios do Biorreator: a) lâminas Rushton; b) defletores; c) tubo de oxigenação. (Manual, 2012) | 24 |
| Figura 2-5 - BIOSTAT® B-MO (Manual, 2014)..... | 25 |
| Figura 3-1 – Ilustração de um biorreator com introdução de ar (Mandenius, 2016)..... | 37 |
| Figura 3-2 – Esquema do processo de modelação matemática | 39 |
| Figura 3-3 – Formulação dos Referenciais para impulsores duplos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013)..... | 44 |
| Figura 3-4 – Fluxograma do processo em CFD | 46 |
| Figura 3-5 – Geometria utilizada no artigo para validação | 48 |
| Figura 3-6 – Malha do artigo para validação com zoom na bolha (Islam et al., 2015)..... | 49 |
| Figura 3-7 – Modelação de geometria do caso de estudo utilizando fronteiras geométricas para definição das superfícies..... | 50 |
| Figura 3-8 - Modelação de geometria do caso de estudo utilizando sobreposição de superfícies..... | 51 |
| Figura 3-9 – Tipos de elementos de malha (Kalra & Mashuq-Un-Nabi, 2018)..... | 51 |
| Figura 3-10 – Malha na fronteira DesignModeler..... | 52 |
| Figura 3-11 – Qualidade da malha, simulação 9A VOF | 53 |
| Figura 3-12 – Espectro de qualidade de avaliação da qualidade da malha, (Mat & Asmuin, 2018)..... | 53 |
| Figura 3-13 – Painel Modelo multifásico Euleriano e fases..... | 56 |
| Figura 3-14 – Condições de fronteira, modelo Euleriano | 57 |
| Figura 3-15 – Ascensão da bolha em 0,4 s, método Euleriano | 58 |
| Figura 3-16 – Curva de velocidade da bolha em 0,4 s, método Euleriano..... | 59 |

| | |
|---|--------------|
| Figura 4-1– Convergência do estudo realizado | 62 |
| Figura 4-2 – Modelação do Biorreator | 63 |
| Figura 4-3 – Edição da Malha do Biorreator | 64 |
| Figura 4-4 – Definições da malha | 64 |
| Figura 4-5 – Qualidade da malha | 65 |
| Figura 4-6 – Geometria dos impulsores | 66 |
| Figura 4-7 – Condições de zona de células | 67 |
| Figura 4-8 – Fluxo e vetor velocidade (m/s) | 69 |
| Figura 4-9 – Fração Volúmica do ar no biorreator durante 1,1 s | 71 |
| Figura 4-10 – Velocidade do ar no biorreator [m/s]..... | 72 |
| Figura 4-11 – Pormenor de velocidade do ar nos impulsores do biorreator [m/s] | Erro! |
| Marcador não definido. | |
| Figura 4-12 – Pressão Dinâmica do ar e da água no biorreator [Pa] | 74 |
| Figura 4-13 - Impulsores em rotação com: a) água; b) inserção de corante; c) injeção de ar na água; d) injeção de ar na água e inserção de corante; e) injeção de ar num meio nutritivo e bactéria <i>E. coli</i> | 75 |
| Figura 4-14 – Movimento realizado pelas bolhas de ar..... | 76 |
| Figura 4-15 – Comparação da pressão dinâmica Ensaio Experimental vs Simulação | 77 |
| Figura 4-16 – Comparação do movimento de partículas Ensaio Experimental vs Simulação | 77 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1 – Descrição geral dos principais artigos utilizados para o estudo de casos multifásicos..... | 4 |
| Tabela 1.2 – Descrição detalhada dos principais artigos utilizados para o estudo de casos multifásicos..... | 4 |
| Tabela 2.1 – Fases no desenvolvimento da indústria da fermentação. Adaptado de (Lima & Mota, 2003; Mandenius, 2016)..... | 13 |
| Tabela 2.2 – Critérios do <i>design</i> dos reatores. Adaptado de (Mandenius, 2016)..... | 14 |
| Tabela 2.3 – Dimensões Externas do vaso (Biotech, 2012) | 22 |
| Tabela 2.4 – Dimensões Internas do Vaso. Adaptado de (Biotech, 2012) | 23 |
| Tabela 3.1 – Estrutura do procedimento de simulação..... | 45 |
| Tabela 3.2 – Propriedades dos fluidos em estudo | 47 |
| Tabela 3.3 – Passos para satisfazer as condições utilizadas no artigo a validar..... | 49 |
| Tabela 3.4 – Tabela resumo das simulações mais estudadas, caso VOF (1/2)..... | 54 |
| Tabela 3.5 – Tabela resumo das simulações mais estudadas, caso VOF (2/2)..... | 55 |

Nomenclatura

BCG - Bacille de Calmette e Guerin.

CAGR – *Compound Annual Growth Rate* (Taxa Composta Anual de Crescimento, na literatura portuguesa)

CFD – *Computational Fluid Dynamics* (Dinâmica de Fluidos Computacional, na literatura portuguesa)

CMRL – *Connaught Medical Research Laboratories* (Laboratórios de investigação médica Connaught, na literatura portuguesa)

CSF – *Contínuos Surface Force* (Força de Superfície Contínua, na literatura portuguesa)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico (ADN), literatura portuguesa)

DCD – *Domain Control Unit*, (Unidade de Controlo do Domínio, na literatura portuguesa)

VOF- *Volume Of Fluid* (Volume De Fluído, literatura portuguesa)

E coli –*Escherichia Coli*

EPDM – *Ethylene Propylene Diene Monomer* (monômero de etileno-propileno-dieno, na literatura portuguesa)

FEA – *Finit Element Analysis* (Análise de Elementos Finitos, na literatura portuguesa)

FEM – *Finite Element Method* (Método de Elementos Finitos, na literatura portuguesa)

GUI – *Graphical User Interfaces* (Interface Gráfica do Utilizador, na literatura portuguesa)

MRF – *Multiple Reference Frame* (Múltiplos Referenciais Móveis, na literatura portuguesa)

OTR – *Oxygen transfer rate* (Taxa de Tranferência de Oxigénio, na literatura portuguesa)

OUR – *Oxygen uptake rate* (Taxa de Absorção de Oxigénio, na literatura portuguesa)

PISO – *Pressure Implicit with Splitting Operators* (Método de Pressão Implícita com Separação de Operadores, na literatura portuguesa)

PLIC – *Piecewise Linear Interface Construction*

1 Introdução

1.1 Motivações

Um dos grandes desafios do mundo atual é o desenvolvimento de tratamentos outrora impensáveis, para a cura de doenças complexas. Os produtos biotecnológicos, segundo a Apifarma, são definidos como os produtos fabricados com recurso à biotecnologia, de origem biológica (normalmente a partir de organismos vivos ou os seus componentes ativos). Estes métodos permitem a criação de medicamentos mais direcionados para a cura de doenças específicas, raras ou sem tratamento, de forma mais segura (“apifarma - Associação Portuguesa Da Industria Farmacêutica,” n.d.). A indústria farmacêutica é por isso, uma área muito pressionada para assegurar a alta qualidade dos produtos que garantem as terapias adequadas aos pacientes. O processo de desenvolvimento para estes medicamentos apresenta um grande número de restrições devido à complexidade das estruturas moleculares e da sua atividade biológica (Gnoth, Jenzsch, Simutis, & Lubbert, 2007). Apesar das dificuldades que estes processos representam, as análises de mercado da indústria farmacêutica tudo indicam para um aumento da taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,5%, e um valor de 0,94 triliões de euros em 2022, onde no top 100 das vendas do mercado farmacêutico, estão incluídos os produtos de origem biológica que, em 2016 ocupavam já 49% desta análise. Pensa-se que a quota de mercado deste tipo de produtos aumente de 25% para 30% até 2022, passando a deter nesse mesmo ano, 52% das vendas mundiais (Evaluate Pharma, 2016).

A complexidade referida anteriormente é causada maioritariamente pela instabilidade dos seres vivos utilizados, perante qualquer pequena alteração no meio de cultura. Com o intuito de se acelerar o processo de desenvolvimento e controlar as reações dos organismos, é obrigatório a existência de um equipamento de controlo e monitorização adequado (Sales et al., 2015). Em adição a isso, é de máxima relevância entender e modelar as interações entre as reações biológicas e a hidrodinâmica que acontecem nos bioprocessos, uma vez que o aumento de escala de biorreatores de tamanho laboratorial para industrial resulta numa diminuição de produtividade, devida parcialmente à diminuição da eficiência de mistura. Apesar da baixa produtividade a nível industrial, os biorreatores são os equipamentos mais utilizados na produção de bioprodutos, pela sua diversidade, baixo custo e eficiência. (Delafosse et al., 2014; Mandenius, 2016). A alteração na eficiência da mistura destes sistemas, verifica-se devido aos altos gradientes de substrato, oxigénio dissolvido, pH e

outros, encontrados nos biorreatores de grandes dimensões, levando à alteração da resposta biológica do meio. (Delafosse et al., 2014).

É neste sentido que se tem vindo a desenvolver técnicas que permitem estudar com exatidão a reação dos fluidos perante alterações do meio. A dinâmica de fluidos computacional (CFD) é uma tecnologia, ou ferramenta, particularmente eficaz no estudo de processos hidrodinâmicos e de mistura. É possível em várias situações, incorporar fenómenos complexos tratando-os com equações básicas que se complementam com equações adicionais de conservação (Bezzo & Macchietto, 2004). Assim, através da computação é possível obter modelos essenciais nas técnicas de aumento de escala, que permitem identificar quais as condições de operação ideais para o efeito (Villiger et al., 2018). A CFD é uma ferramenta útil no estudo dos parâmetros envolvidos no desempenho do biorreator, desde o seu design até aos estudos de transferência de massa a ocorrer no mesmo [6]. No entanto, apesar de permitir o conhecimento sobre os detalhes numa operação, esta ferramenta também tem alguns problemas, como por exemplo ser computacionalmente intensiva, levando a períodos de simulação muito longos, especialmente se envolvidas reações mais complexas, como reações biológicas (Delafosse et al., 2014). Além disso, os estudos nesta área são muitas vezes limitados a estudos monofásicos, sendo que estudos mais complexos de interações líquido-sólido começaram a surgir apenas recentemente. Finalmente, ainda a aumentar a complexidade deste tipo de trabalho está a falta de validação experimental dos modelos existentes para sistemas de escalas industriais, fazendo com que a aplicação destes modelos seja restrita (Villiger et al., 2018). É no seguimento da necessidade de existirem modelos capazes de extrapolar análises de biorreatores de pequenas dimensões para dimensões industriais, que este trabalho é proposto. Com recurso às ferramentas de CFD, perceber a influência da mistura mecânica, possibilitada pela rotação das pás existentes no sistema em estudo, da fase gasosa introduzida no formato de bolhas através de um aspersor do tipo anel, e abordar a alteração do comportamento do meio com o envolvimento de nutrientes e de uma cultura da bactéria *Escherchia coli* (*E coli*).

Como referido, o modelo a realizar incide no estudo de um biorreator de agitação mecânica com inserção de ar por meio de um aspersor, mais especificamente num primeiro estudo independente de velocidade e da presença de uma fase gasosa e num segundo estudo com a junção destes dois parâmetros. Analisando assim a mistura conseguida por este tipo de equipamentos que, tem um papel principal na obtenção de produtos com melhor qualidade, ou seja funcionais para o seu propósito terapêutico (padrões de glicosilação ou distribuição de tamanho molecular), já que promove a uniformidade térmica, bem como das reações químicas (Pukkella, Vysyaraju, Tammishetti, Rai, & Subramanian, 2019).

Este tipo de equipamentos é amplamente utilizado na indústria devido à sua versatilidade, simples construção e fácil operação.

A bactéria em estudo, *Escherichia coli*, é uma das bactérias mais utilizadas em modificação genética, devido à sua fácil manipulação e rápida multiplicação (em meios de cultura nutricionalmente ricos, na sua fase de crescimento exponencial, a *E coli* pode reproduzir-se em 20 min, levando a que em uma noite, um único organismo tenha produzido uma colónia) (Casali & Preston, 2010).

1.2 Objetivos

Neste trabalho pretendem-se caracterizar parâmetros de velocidade de rotação e inserção de ar presentes num biorreator de agitação mecânica de pequenas dimensões, para que o desenvolvimento de uma bactéria e conseqüente produção de plasmídeo (moléculas de DNA extranuclear de replicação autónoma) sejam eficientes.

Para a melhor caracterização desses parâmetros recorrem-se a ferramentas de CFD, mais especificamente utilizando o software Fluent da ANSYS, com o intuito de se produzir um modelo capaz de realizar uma extrapolação do biorreator em estudo para um biorreator de dimensões industriais.

Na validação deste modelo, pretende-se utilizar um biorreator de bancada, de 2 L, da STARTORIUS, gentilmente disponibilizado pela área departamental de engenharia biomédica, do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e da Escola Superior de Tecnologias de Saúde.

1.3 Artigos chave da bibliografia

Na literatura destaca-se a especial dificuldade nos estudos relativos à formação de bolhas e seu estudo multifásico. No entanto, na bibliografia encontrada existe senso comum quanto às metodologias a utilizar e resultados esperados. A Tabela 1.1 e a Tabela 1.2 mostram os estudos revistos para o presente trabalho, sendo que o de maior interesse foi o estudo de uma única bolha em ascensão num meio líquido, utilizado para a validação do método Euler-Euler (Islam, Ganesan, Sahu, Uddin, & Mannan, 2015).

Estudos Euler-Lagrange também são encontrados, (Darmana, Deen, & Kuipers, 2005). Em todos os estudos se tentam resolver problemas multifásicos gás-líquido, em regimes transientes, sendo que regimes de turbulência são só utilizados em alguns, (Sarkar,

Shekhawat, Loomba, & Rathore, 2016), (Bach et al., 2017) . Em (Lapin, Schmid, & Reuss, 2006) encontra-se um estudo CFD com população de bactérias Escherichia coli.

Tabela 1.1 – Descrição geral dos principais artigos utilizados para o estudo de casos multifásicos

| Ref. | Título | Ano | Tipo de Simulação | Software utilizado |
|------------------------|---|------|---|-----------------------|
| (Islam et al., 2015) | A single air bubble rise in water: A CFD Study | 2013 | Ascensão de bolhas com diversos diâmetros, por domínios retangular e trapezoidal | ANSYS Fluent |
| (Darmana et al., 2005) | Detailed modeling of hydrodynamics, mass transfer and chemical reactions in a bubble column using a discrete bubble model | 2005 | Reator de coluna de bolhas, com interações gás-líquido. | Código Próprio |
| (Bach et al., 2017) | Evaluation of mixing and mass transfer in a stirred pilot scale bioreactor utilizing CFD | 2017 | Mistura, transferência de massa para grandes potências | ANSYS CFX |
| (Sarkar et al., 2016) | CFD of mixing of multi-phase flow in a bioreactor using population balance model | 2016 | Biorreator com mistura mecânica e inserção de gás | GAMBIT + ANSYS Fluent |
| (Lapin et al., 2006) | Modeling the dynamics of E. coli populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor – A structured-segregated approach | 2006 | Caracterizar o comportamento de uma população de células heterogênea num biorreator sem mistura ideal | PHOENICS comercial |

Tabela 1.2 – Descrição detalhada dos principais artigos utilizados para o estudo de casos multifásicos

| Ref | Modelo Multifásico | Modelo Turbulento | Parâmetros estudados | Tipo de validação |
|------------------------|--------------------|------------------------------------|--|--|
| (Islam et al., 2015) | VOF | n/a | Velocidade de ascensão da bolha, | A partir da literatura |
| (Darmana et al., 2005) | E-L | Smagorinsky | Velocidade de ascensão da bolha, evolução do diâmetro da bolha | Dados experimentais da literatura. |
| (Bach et al., 2017) | E-E | $k - \epsilon$ | Mistura, transferência de massa, tamanho de bolha | Experimental |
| (Sarkar et al., 2016) | E-E | $k - \epsilon$ | Velocidade de rotação dos impulsores, fluxo de gás inserido. | Dados experimentais da literatura. |
| (Lapin et al., 2006) | E-L | Chen-Kim $k - \epsilon$ modificado | Mistura, transferência de massa | Observações experimentais da literatura. |

1.4 Estrutura do Trabalho

O início deste trabalho final de mestrado contou com uma vasta pesquisa bibliográfica referente às três áreas disciplinares que o compõe, mais concretamente sobre biorreatores, dinâmica de fluidos computacional e biologia (referente à bactéria E coli).

No primeiro capítulo apresenta-se uma introdução do tema, que permite ao leitor ter um primeiro contacto com as matérias a serem abordadas, sem entrar pormenorizadamente nas mesmas. Isso acontece no subcapítulo das motivações que levaram à realização desta dissertação. Seguem-se os objetivos e a metodologia utilizada no trabalho.

De seguida, no capítulo 2, é abordado o tema dos biorreatores, onde é feito um estado da arte destes equipamentos, desde a sua utilização há milhares de anos, até aos dias de hoje, com as respetivas evoluções. São também apresentados os tipos de biorreatores mais utilizados pela indústria e os parâmetros influenciadores no seu desempenho. Finalmente é caracterizado o biorreator em estudo.

No terceiro capítulo, desenvolvem-se os conceitos da dinâmica de fluidos computacional: apresenta-se um estado da arte desta tecnologia, é abordada a temática da CFD aplicada aos biorreatores, descreve-se o software utilizado (Fluent da ANSYS) e apresentam-se os modelos desse mesmo software que foram postos em prática. Ainda é feita uma validação de um modelo multifásico simples, a ascensão de uma bolha num líquido estagnado, referida em (Islam et al., 2015).

A caracterização do modelo proposto, é apresentada no quarto capítulo e passa pela introdução da temática da biologia, referente à bactéria *E coli*, bem como os parâmetros a estudar e ainda o desenvolvimento do modelo: desde a modelação do equipamento, à malha e culminando na simulação. São apresentados os resultados e feita uma comparação com o ensaio experimental, realizado *in situ*, nos laboratórios da área departamental de engenharia biomédica.

Finalmente, no capítulo 5, são apresentadas as principais conclusões do trabalho.

2 Biorreatores

No desenvolvimento crescente de produtos biotecnológicos, em especial na indústria biofarmacêutica, a cultura de células (e seu controlo) tem representado um papel importante no tempo de desenvolvimento celular e nas próprias características do produto celular (Eaker et al., 2017). Isto porque a síntese das moléculas desejadas, é realizada por células vivas que apresentam grande sensibilidade a pequenas mudanças no seu meio de cultura (Sales et al., 2015). Neste sentido, os bioengenheiros têm vindo a ser desafiados com a criação e otimização de sistemas com um papel essencial no controlo e crescimento da cultura de células (Mandenius, 2016). Por definição, um biorreator é o espaço onde as reações biológicas acontecem e por esse motivo, é o sistema que deve criar as condições ideais ao meio, para que a reação seja ótima (Mandenius, 2016).

Neste capítulo 2, é apresentado o estado de arte destes sistemas e a caracterização do biorreator utilizado no presente projeto.

2.1 Estado de Arte: Biorreatores

A biotecnologia é, entre muitas definições, a tecnologia que utiliza organismos vivos ou parte deles para a produção de serviços e bens. Envolvendo várias áreas do conhecimento, vai desde a biotecnologia clássica, que engloba atividades realizadas pelo homem há milhares de anos, até à biotecnologia moderna, que passa pela engenharia genética e técnicas de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) recombinante. Independentemente da época temporal ou desenvolvimento tecnológico, este conjunto de técnicas tem, de forma geral, apresentado benefícios económicos, sociais e ambientais (Faleiro, 2011).

A evolução dos processos biotecnológicos só foi exequível através do uso e contínua melhoria do *design* de ferramentas, como os biorreatores, conhecidas desde os tempos antigos como os aparelhos centrais na geração de produtos de base celular como bebidas alcoólicas, químicos ou antibióticos (Eaker et al., 2017; Mandenius, 2016). No entanto, por maior importância que tenha a ferramenta, só com grande entendimento biológico é possível melhorar a eficiência da sua operação. É que, a operação de um biorreator não pode ser considerada independente, já que está fortemente subordinada às características da cultura microbiana a utilizar (Lima & Mota, 2003). É nesse sentido que a combinação dos conhecimentos matemáticos e físicos, com os conhecimentos biológicos, será sempre determinante para o avanço da biotecnologia industrial (Concepts, n.d.). No estudo da

ciência biológica, deparamo-nos com bilhões de anos de evolução, que culminam nas formas e estruturas do mundo vivo atual, cuja composição é no entanto formada pelos mesmos tipos de moléculas químicas, devido à nossa origem comum (Lodish et al., 2014).

Desde a formação do planeta, há 4600 milhões de anos, ao aparecimento das primeiras células há cerca de 3900 milhões de anos, até aos dias de hoje, os organismos vivos passaram por uma transformação que se traduz numa diversificação de características, atividades e interações (Lima & Mota, 2003; Lodish et al., 2014). A manipulação destes organismos vivos para obtenção de substâncias de grande importância como alimentos, combustível ou medicina, data de há muitos milhares de anos, sendo que o primeiro processo de fermentação, a produção de vinho, é pensado ser praticado desde o ano 10000 a.C. (Faleiro, 2011; P.Ward, 1992). Acredita-se ainda que os egípcios já fabricavam cerveja entre 5000 a 6000 a.C., seguindo-se a produção de leite, igualmente em 5000 a.C., o pão em 4000 a.C. e as bebidas espirituosas em 1000 a.C. Algas Espirulina, vinagre e outras comidas fermentadas e temperos indígenas remontam também a essas épocas (P.Ward, 1992). Apesar da vasta utilização destes métodos, ainda não eram reconhecidos os microrganismos responsáveis pelos mesmos.

O conceito do processo de fermentação, estimado como a divisão química do açúcar devido a vibrações inerentes em moléculas desejadas, foi pela primeira vez refutado por Antonie Van Leeuwenhoek, que observou em gotas de cerveja fermentada, células de levedura. No entanto, esta noção foi rapidamente esquecida e a ideia de que a fermentação não envolvia organismos vivos prevaleceu (Ligon & Ph, 2002; P.Ward, 1992). Mais tarde, entre 1836 a 1837 três investigadores, Cagniard-Latour, Schwann e Kützing declararam individualmente que a levedura era efetivamente um organismo vivo. Após a sua ridicularização, só em 1847 surgiu um estudo, realizado pelo professor físico Blondeau que defendia que os diferentes tipos de fermentação eram desenvolvidos por diferentes tipos de fungos (P.Ward, 1992). Após as observações e conclusões de Lorenz Oken e Theodor Schwann sobre o comportamento celular, Louis Pasteur, em 1856 fez três observações que o levaram a concluir que a levedura, organismo vivo presente na fermentação, era o responsável pela formação de álcool a partir do açúcar e ainda quais os microrganismos responsáveis pelo seu azedamento (Ligon & Ph, 2002; Mandenius, 2016).

Relativamente à área da saúde, foram utilizados pela primeira vez agentes semelhantes a microrganismos para fornecimento imunológico, no combate contra a varíola, por Edward Jenner. Apesar das evidências mais antigas da existência desta doença datarem de há 3000 anos atrás em algumas múmias egípcias, só em 1798 foi desenvolvida uma vacina contra a

mesma. O médico inglês Jenner, providenciou argumentos concretos para a crença de que pessoas previamente contaminadas pela varíola bovina, eram também imunes à varíola. Esta ideia levou-o a utilizar material de uma lesão de varíola bovina para a imunização de James Phipps em 1796, e assim se deu início a uma era de erradicação desta patologia (Geddes, 2006). Mais tarde, em 1877, com a atenção de Pasteur para as causas e prevenção de doenças infecciosas do homem e dos animais, gerou-se um grande desenvolvimento no uso de vacinas e imunologia (P.Ward, 1992).

Neste início dos anos 80 do século XIX, investigadores como Emile Roux e Robert Koch compreenderam, a partir do legado deixado, as implicações que os mecanismos de fermentação tinham para a bacteriologia e proliferação de doenças, levando à exploração do potencial industrial das células e ainda à determinação de requisitos a ser utilizados no *design* de biorreatores futuros (Mandenius, 2016; P.Ward, 1992). Por muitos anos, a tecnologia da vacina viral foi primitiva, devido à necessidade de se utilizarem animais como fontes de vírus e, ainda que se tenham destacado pela positiva várias vacinas como a vacina contra a cólera, em 1885 por Ferran Y. Clua, vacinação para o tifo durante a primeira guerra mundial, contra o tétano na segunda guerra mundial e em 1939 a primeira vacina BCG (Bacille de Calmette e Guerin) contra a tuberculose, também são muitos os exemplos de resultados negativos, como o desastre de Lubeck, em 1930 (P.Ward, 1992).

Ainda no início do século XX foram desenvolvidas por Harrison e Carrel muitas das técnicas da cultura de células de mamíferos. Aperfeiçoaram-se as concentrações de sal e aminoácidos no meio de cultura, utilizaram-se pela primeira vez plasma suplementar e linfa coagulada como aditivo estimulante ao crescimento e ainda se desenvolveram biorreatores para a propagação de vírus e outros produtos. Os diferentes e mais avançados métodos de cultura celular, permitiram a preparação de grandes quantidades de vírus com muito menos contaminação por parte de materiais exteriores provenientes dos tecidos dos hospedeiros (P.Ward, 1992). Também no início do século XX, processos de fermentação de larga escala foram implementados, tendo tido um grande efeito sobre a indústria de guerra desse período. Na produção de explosivos, começou a ser utilizado glicerol, obtido em processos de fermentação de glicose. Outro exemplo é a produção de larga escala de butanol e acetona através de bactérias de ácido butírico (grupo dos ácidos monocarboxílicos) utilizados primeiro para o desenvolvimento de explosivos e depois para fabrico de borracha na indústria de carros emergente. No entanto estes bioprocessos foram rapidamente abandonados por produtos à base de petróleo, que representavam melhores processos económicos (Mandenius, 2016).

Um passo determinante na evolução do *design* e desempenho dos biorreatores foi a produção industrial de enzimas em empresas especializadas, como a Novo Nordisk. A comercialização de enzimas microbianas extracelulares foi pela primeira vez realizada à volta de 1890 por Jokichi Takamine e, em 1913, Boidin e Effront, ao desenvolverem enzimas bacterianas, descobriram com a enzima *Bacillus subtilis* que esta produzia uma amílase termoestável, quando a crescer num meio de cultura estacionário num meio líquido extraído de malte ou grão (Krishna, 2002; Mandenius, 2016). Estes métodos de cultura foram utilizados pelos Estados Unidos da América até à década de 1950 e continuam a ser usados, especialmente no Japão até ao dias de hoje (P.Ward, 1992).

No ano de 1929, Alexander Fleming fez uma descoberta que revolucionou a prática da medicina, com a descoberta dos antibióticos. Este evento é um exemplo forte de como a associação da microbiologia e da biotecnologia industrial permitiu o avanço da cultura de microrganismos. Fleming, ao analisar detalhadamente o bolor criado numa das suas culturas, descobriu o seu efeito antibiótico. O bolor encontrado foi identificado como *Penicillium*, levando a que Fleming desse o nome de penicilina à substância segregada pelo mesmo (Fleming & Wong, 2003).

Nos finais dos anos 30, Howard Florey e Ernst Chain iniciaram estudos relativos a substâncias antibacterianas produzidas por bolor e conseguiram isolar a forma pura da penicilina em 1940. Ainda desenvolveram em conjunto com Normam Heatley, Marvin Johnson e outros, associados a empresas farmacêuticas, um método de produção desta substância em biorreatores, levando à sua rápida produção e utilização ainda na Segunda Guerra Mundial. Estes acontecimentos exigiram a otimização do *design* e operação dos biorreatores para corresponder às necessidades médicas na cura de infeções. Ainda prepararam o caminho para a criação de novos antibióticos, incluindo a estreptomicina, cefalosporinas e aminoglicosídeos, bem como centenas de novos antibióticos isolados anualmente desde a década de 1940 até os dias atuais (Fleming & Wong, 2003; Mandenius, 2016; P.Ward, 1992).

Simultaneamente à criação e expansão de antibióticos, foram desenvolvidos outros produtos microbianos primários e secundários, como os aminoácidos e ácidos orgânicos. Estes eram utilizados como produtos alimentares, *commodities* químicas e polímeros microbianos, e atingiram níveis de produção elevados [3].

Na sequência dos avanços alcançados, surgiu o uso industrial de células animais e com este novos desafios para a biotecnologia, uma vez que as células animais devem ser manipuladas de formas completamente diferentes dos fungos (Mandenius, 2016).

Em 1950, Parker, Morgan e Morton, desenvolveram nos laboratórios de investigação médica Connaught (CMRL), um meio de cultura capaz de suportar o crescimento de um embrião proveniente de células de pinto por cerca de 4 semanas. A partir de 1955 Eagle determinou alguns requisitos nutricionais necessários para a proliferação de L-cells (ratos) e HeLa-cells (humanos), levando a que se iniciassem formulações para o sucesso dos meios de cultura de células (Yao, 2017). Os estudos realizados levaram à criação de vacinas virais e prepararam o caminho para a industrialização de anticorpos monoclonais (P.Ward, 1992). Georges Kohler e César Milstein em 1975, conseguiram obter uma forma de clonar anticorpos monoclonais a partir de uma cultura de hibridoma e ainda determinaram a configuração de um reator capaz de realizar a sua produção, preparando o caminho para avanços notáveis nos campos de biologia celular, diagnóstico clínico e biotecnologia (Little, Kipriyanov, Gall, & Moldenhauer, 2000; Mandenius, 2016). Apesar do marco histórico alcançado por Kohler e Milstein, a verdadeira revolução da biotecnologia industrial, chegou com a engenharia genética e as tecnologias de DNA recombinante, através dos produtos macromoleculares, primeiro em bactérias e fungos e depois em células animais e humanas (Mandenius, 2016). Estes desenvolvimentos tecnológicos abriram as portas à formação de novas combinações genéticas, pelas possibilidades ilimitadas de conjugação de segmentos de DNA, entre diferentes organismos (Hogan, 2015; P.Ward, 1992).

Os genes de mamíferos poderiam a partir daí ser inseridos em microrganismos e estirpes de bactérias resistentes a antibióticos poderiam ser criadas. A par da curiosidade e intenção de prosperar nesta evolução, questões de segurança pública e ética começaram a ter a atenção da população. Por este motivo, em Fevereiro de 1975, 150 cientistas dos Estados Unidos e 12 outros países reuniram-se no centro de conferências Asilomar, na Califórnia e adotaram novos guias de regularização relativos à genética molecular (Hogan, 2015).

A partir do encontro de 1975, várias empresas farmacêuticas foram estabelecidas, investindo fortemente em atividades de investigação e desenvolvimento, sendo que o primeiro produto terapêutico a atingir aprovação regular foi a insulina humana, produzida a partir de uma estirpe recombinante de *E. coli* (Mandenius, 2016; P.Ward, 1992).

Empresas como a Biogen, a Amgen, a Chiron e a Genzyme desenvolveram também outros produtos bioterapêuticos como as hormonas de crescimento e as interleucinas, cujo tempo de desenvolvimento foi relativamente curto, tendo em conta as exigências dos requisitos regulamentares e a multiplicidade de novas condições de produção (desde considerações clínicas até novas metodologias de fabrico). Estas produções representaram inúmeros desafios para os bioprocessos e os biorreatores (Mandenius, 2016).

Finalmente, os últimos progressos no *design* de biorreatores advieram da produção de aplicações com produtos de medicina regenerativa e células-tronco pluripotentes, uma vez que as células a tratar demonstram maior vulnerabilidade e comportamentos de crescimento complexos, levando a produções muito diferentes. Existindo ainda parâmetros críticos de transferência de massa, limitações de oxigênio, nutrientes e esterilização da cultura (Mandenijs, 2016).

Na tabela 2.1 são apresentados alguns dos marcos mais importantes na história da evolução dos biorreatores, especificando-se também os produtos obtidos pela respectiva fermentação, o controlo de processo, modo de operação, a existência de instalação piloto (após implementação dos elétrodos esterilizáveis de pH e O₂) e a seleção de estirpes (Lima & Mota, 2003). Como referido anteriormente, um biorreator é definido como um aparelho tipo câmara, próprio para o crescimento de organismos como bactérias e vírus que podem ser geneticamente modificados e desse modo utilizados para fins terapêuticos. Esta definição destaca o motivo principal nos esforços de *design* do biorreator: conseguir criar as condições propícias para o crescimento eficiente e a produção de produtos biológicos variados, de diferentes tipos e tamanhos de células numa única unidade. A esta exigência adiciona-se o fator temporal do crescimento inconstante dos diferentes organismos e traduz-se em adaptações técnicas de cada *design* e a criação de diferentes soluções (Mandenijs, 2016).

Além das preocupações inerentes à produção destas culturas existem também outras responsabilidades a ser tomadas, como a minimização de custos relativos aos processos: o custo capital do biorreator e equipamento associado, o custo dos substratos e ainda os custos associados à separação e purificação do produto (Andrews, 1988).

Adicionalmente à dificuldade em encontrar o equilíbrio entre estes custos ainda é necessário entender que uma harmonização perfeita de condições para um produto, pode não ser a mesma para outro. A necessidade do ajuste de todos os parâmetros envolvidos (como *design*, velocidade, tipo de aspersão, acessórios, pH, etc) é o que leva à relevância de uma correta configuração do biorreator (Andrews, 1988). E mesmo que se verifique um grande e contínuo desenvolvimento destes sistemas, existem dificuldades em manter a estabilidade e variação dos bioprocessos.

O *design*, projeto e construção dos biorreatores ainda não é capaz de colmatar as falhas nas misturas e fracos desempenhos dos mesmos (Al-mashhadani, Wilkinson, & Zimmerman, 2015).

Tabela 2.1 – Fases no desenvolvimento da indústria da fermentação. Adaptado de (Lima & Mota, 2003; Mandenius, 2016).

| Fase | Principais produtos | Tipo de biorreator | Controlo de processo | Modo de Operação | Instalação piloto | Seleção de estirpes |
|-----------------|---|--|---|--|-------------------|---|
| I Pré-1900 | Álcool | Barris (de madeira) Vasos de Cobre (cerveja) | Termómetro Hidrómetro Permutador de calor | Descontínuo | Não | Culturas puras de leveduras Uso de bom vinagre como inóculo |
| | Vinagre | Barris, tabuleiros, leitos percoladores | | Descontínuo | Não | |
| II 1900 a 1940 | Fermento de padeiro, ácido cítrico e láctico, acetona/butanol | Vasos de aço (2000 hl) para acetona/butanol. Distribuidor de ar para fermento de padeiro. Agitação mecânica em vasos pequenos. | Utilização de medidor de pH para controlo em diferido. Controlo de temperatura. | Descontínuo Alimentação contínua | Não | Uso de culturas puras |
| III 1940 a 2000 | Penicilina e outros antibióticos. Aminoácidos. Nucleótidos. Biotransformações. Enzimas. | Vasos arejados com agitação mecânica. Operação assética. Primeiros fermentadores. | Utilização de eléctrodos de pH e oxigénio autoclaváveis. Uso do conceito de controlo. | Descontínuo. Alimentação contínua. Alguns processos contínuos. | Algumas | Existência de programas e mutação e seleção de estirpes |
| IV 1960 a 2000 | Proteína microbiana a partir de hidrocarbonetos. | Vasos com circulação induzida por gás comprimido. | Uso de sistemas de controlo por computador. | Culturas contínuas com reciclagem do meio. | Muito Importante | Engenharia genética de estirpes microbianas |
| V 1979 a 2000 | Produção de Compostos recombinantes (insulina, interferão) | Fermentadores desenvolvidos em III e IV | Sistemas de controlo desenvolvidos em III e IV | Descontínuo. Alimentação Contínua. Contínuo. | Muito Importante | Clonagem de genes em estirpes microbianas usando engenharia genética. |
| VI 2006 | Células Pluripotentes | Adaptados para novas condições de cultura | Sistemas desenvolvidos em III e IV | Alimentação contínua. Descontínua. | Muito Importante | Células a partir de hES e iPS. |

Para que o *design* seja o mais eficiente possível é necessário ter em consideração certas condições e procedimentos operacionais, tais como: Transferência de massa e energia (dentro dos mais críticos); Fatores ambientais num sentido amplo; Temperatura ambiente, humidade e ocorrência de contaminações; Esterilização (procedimento operacional que difere consoante o organismo e que deve ser cuidadosamente adaptada à forma geométrica dos biorreatores e os seus materiais de construção); Inoculação de células (relaciona-se com o tamanho do inóculo, o estado da célula para entrar na fase de crescimento exponencial, sua variabilidade e sensibilidade às condições micro ambientais e sua pureza); Composição da cultura (Inclui os aspetos químicos relacionados com o seu valor nutricional bem como

aspectos biológicos dos componentes em relação às vias metabólicas envolvidas no crescimento e produção de células); Relações cinéticas no biorreator (descritas para a amplitude do estado e condições) (Mandenius, 2016).

Na tabela 2.2 são resumidos os critérios utilizados para o *design* dos reatores para cada problema e objetivo associado.

Tabela 2.2 – Critérios do *design* dos reatores. Adaptado de (Mandenius, 2016)

| Problema de <i>Design</i> | Objetivo | Meios | Parâmetros |
|--|---|--|---|
| Transferência de gás numa cultura submersa | Garantir taxas de crescimento rápidas Evitar privação de oxigênio | Geometria do reator Desenho do aspensor Defletores Sobrepessão Geometria do impulsor | Proporções $K_L a$ OTR OUR CER |
| Eficiência de mistura | Evitar gradientes de calor, nutrientes e aditivos, stress. Redução da potência | Geometria do impulsor Defletores Análise de mistura CFD | Proporções Tempo de mistura, t Número de potência |
| Fornecimento de nutrientes e adição | Transferência eficiente para o volume do biorreator | Regime alimentar Múltiplas portas | Perfil linear e exponencial |
| Transferência Líquido-Sólido | Aumentar a taxa de reação | Distribuidores de fluxo Suporte poroso | Módulo de Thiele |
| Transferência de calor | Remoção eficiente do calor metabólico | Serpentes internas Reciclagem do meio de cultura | Números adimensionais |
| Esterilização | Assegurar que a cultura é desprovida de microrganismos estranhos, evitando infecções | Procedimento de esterilização Sobrepessão Barreiras Contenção Microfiltros | Tempo e temperatura de esterilização |
| Seleção de estirpes | Encontrar estirpes com propriedades adaptadas ao meio de cultura e aos constrangimentos do reator | Análise microbiana omico | Taxas específicas (μ, q_p, q_s) Constantes de inibição |
| Procedimento de escalonamento | Assegurar as mesmas condições a uma grande escala | Geometria de design dos recipientes e dos impulsores. Gama da mistura | Proporções da janela Regras dos parâmetros de dimensionamento Números Adimensionais |
| Reologia | | Aditivos que afetem a viscosidade CFD | Número de Reynolds Dados da CFD |
| Homogeneidade da cultura | Evitar gradientes para as condições de um reator ideal | CFD | Dados da análise de zona |
| Composição do meio | Meio de cultura equilibrado | Análise fatorial Métodos omicos | Parâmetros de ajuste do modelo |

Com base nestes critérios, têm vindo a ser desenvolvidos vários tipos de biorreatores que podem ser aplicados a processos diferentes, como produção de biomassa (que engloba

levedura, células animais ou microalgas), a formação de metabolitos (como ácidos orgânicos ou antibióticos), a transformação de substratos (como esteroides), ou a produção de uma célula ativa (como enzimas) (Spier, Vandenberghe, Medeiros, & Soccol, 2012).

Dos vários biorreatores desenvolvidos, destacam-se doze exemplos, como pode ser verificado na figura 2-1 (Mandenius, 2016).

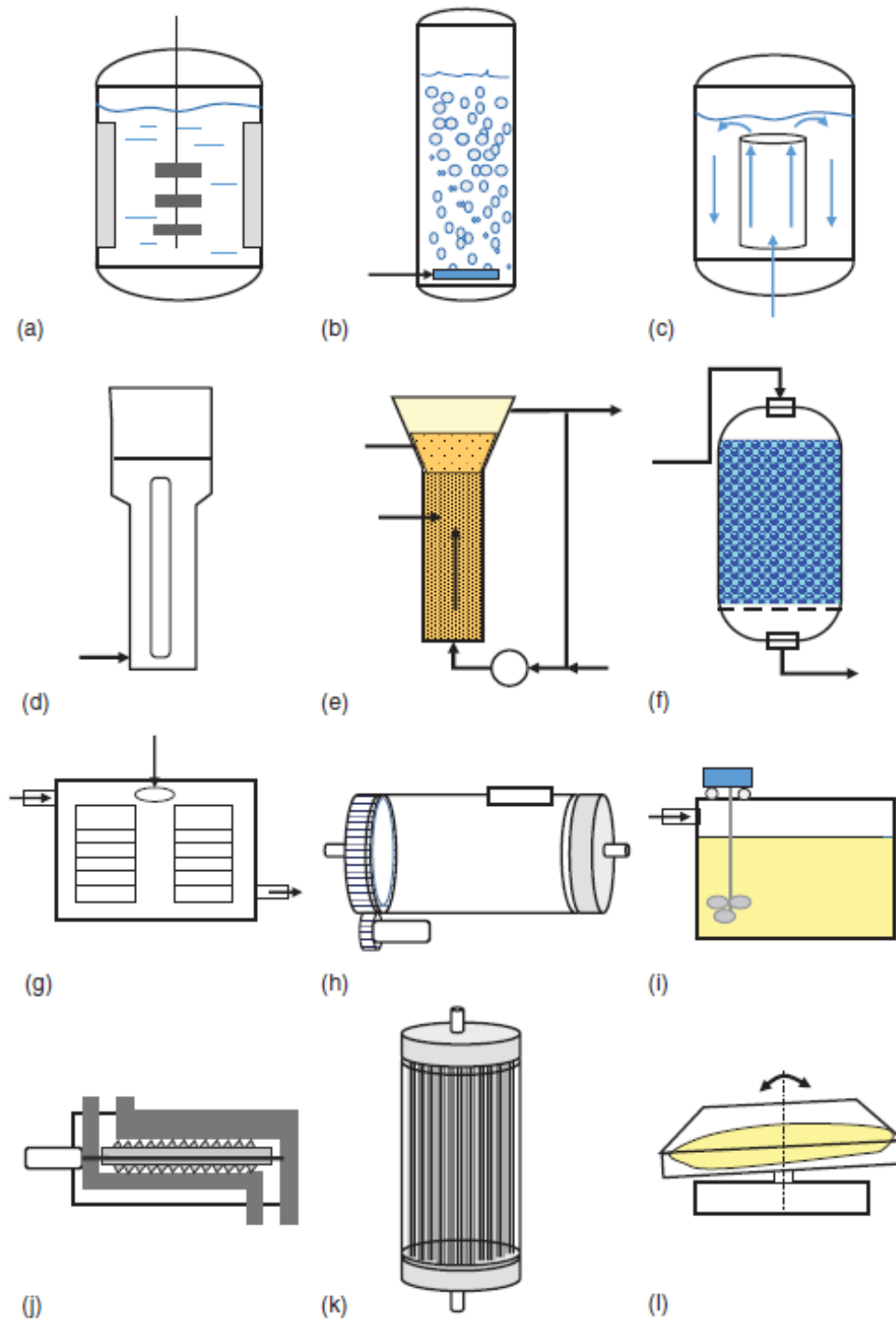


Figura 2-1 – Doze exemplos de biorreatores: (a) Reator de tanque agitado, (b) reator de bolhas, (c) reator de ascensão de ar, (d) reator tipo loop, (e) reator fluidizado com células recicláveis, (f) reator de leito gotejante, (g) reator de prato de fase sólida, (h) reator de tambor rotativo, (i) reator de tanque agitado com impulsor móvel, (j) biorreator de parafuso contínuo, (k) reator de fibra oca, (l) biorreator de ondas. (Mandenius, 2016)

O biorreator de tanque agitado (figura 2-1 (a)), é amplamente utilizado devido à sua simples construção, versatilidade e fácil operação. A mistura neste tipo de equipamentos assegura a melhor qualidade dos produtos, já que promove uniformidade térmica e das reações químicas (Pukkella et al., 2019). É comum nestes reatores existirem defletores ligados às paredes interiores, para minimizar a formação de vórtices elevados quando criados por uma alta rotação de impulsores e melhorar a mistura devido às correntes cruzadas por estes criadas. O número de defletores, e o número e tipo de impulsor têm grande influência sobre os resultados finais das culturas (Pukkella et al., 2019). Existem quatro classes gerais de impulsores em tanques agitados a operar com baixas a médias viscosidades em regimes turbulentos, que podem gerar fluxos axiais, fluxos misturados, radiais e de dispersão (Report, 2017). No entanto, a agitação mecânica constitui um problema em alguns sistemas, uma vez que as tensões de corte geradas podem influenciar negativamente os microrganismos, danificando as estruturas celulares, alterando a sua morfologia, as suas taxas de crescimento e a sua formação metabólica (Zhou et al., n.d.). Apesar dos problemas associados aos reatores de agitação mecânica, existem outros designs alternativos, capazes de solucionar esta desvantagem. Os reatores de colunas de bolhas, (figura 2-1 (b)), são normalmente categorizados dentro dos multifásicos, e apresentam uma construção simples sem partes móveis (Rzehak, Krauß, Kováts, & Zähringer, 2017). São vastamente utilizados na indústria química e de bioprocessos, pela suas capacidades de transferência de massa e de calor, bem como custos de operação e de manutenção baixos (Fletcher, McClure, Kavanagh, & Barton, 2017; Kantarci, Borak, & Ulgen, 2005). Um reator de colunas de bolhas consiste num vaso onde está presente uma fase líquida ou uma suspensão sólido-líquido, e às quais é injetado ar ou outro gás em forma de bolhas, a partir da sua zona inferior (Kantarci et al., 2005). Pode trabalhar em dois modos de operação distintos, modo contínuo em que o fluxo de gás e a suspensão fluem em simultâneo pela coluna até ao topo, ou descontínuo em que a suspensão é estacionária pelo que não se move, havendo apenas subida das bolhas através da coluna (Kantarci et al., 2005). Pela complexa hidrodinâmica nestes reatores é, no entanto, difícil extrapolar os resultados dos estudos feitos em pequenos ensaios para dimensões industriais (Fletcher et al., 2017).

O biorreator em estudo é uma combinação dos dois biorreatores acima descritos, sendo composto por defletores, pás de agitação mecânica e um aspersor de bolhas.

Dentro dos reatores pneumáticos, além dos reatores de colunas de bolhas, também são comumente utilizados os reatores de ascensão de ar. Nos reatores de ascensão de ar (figura 2-1 (c)), as culturas de células, especialmente células animais e de plantas, são agitadas pneumáticamente por um fluxo de ar ou de outro gás. Este fluxo de ar, além de ter a função

de agitação também tem de assegurar uma troca satisfatória entre a fase gasosa e o meio (Merchuk, 1990). Por esta razão, estes reatores demonstram ser uma alternativa atrativa aos tanques agitados, especialmente em bioprocessos, que incluem produtos ou reagentes gasosos. No entanto, estão limitados pela transferência de massa e pela fraca capacidade de mistura da fase líquida, particularmente quando trabalham com altas densidades de células (Al-mashhadani et al., 2015). Se o reator tiver um caminho de ar forçado em loop, seja ele interior ou exterior, é denominado reator loop, (figura 2-1 (d)). Estes reatores têm um desempenho excelente na mistura com níveis de consumo energético relativamente baixos, o que os torna lucrativos em sistemas de reação multifásicos limitados de transferência de massa. Também a sua capacidade de dispersão de reagentes, que promove uma distribuição uniforme de calor, e a sua flexibilidade na aplicação de reações lentas e rápidas são vantagens que os tornam interessantes (Warmeling, Behr, & Vorholt, 2016). Por estes motivos, reatores loop são bastante utilizados em processos bioquímicos, como por exemplo o tratamento de águas residuais, já que, e ao contrário dos reatores de colunas de bolhas, é facilmente adaptado a diferentes dimensões com resultados semelhantes (Sharma & Tripathi, 2016). Os reatores de leito fluidizado (figura 2-1 (e)) podem ser comparados aos reatores de colunas de bolhas com uma alteração no seu design, já que o topo do reator é mais largo, para que a velocidade do fluido possa diminuir. As partículas ficam retidas no reator enquanto o fluido circula para cima. Estes reatores são úteis em processos que utilizam biocatalizadores fluidos suspensos como imobilização de células e flocos microbianos. Quanto maior dispersão de gás maior eficiência terá este reator, se cumprir as condições ideais de densidade de partículas e correta reutilização do fluido (Andrews, 1988; Mandenius, 2016). No reator de leito de gotejamento (figura 2-1 (f)) existe uma cama de partículas catalíticas estacionárias, por onde correm fluxos de gás e líquido. Por vezes, particular de maior dimensão inertes cataliticamente não ativas, são adicionadas à cama para aumentar a área disponível para transferência de massa gás-líquido, melhorar a mistura e reduzir os gradientes de temperatura (Stamatiou & Muller, 2018). Os reatores de estado sólido (figura 2-1 (g)) seguem o modelo de bandeja chinês, em que a cultura de células é colocada em bandejas, dentro de um recipiente com condições controladas. Esta ideia de bandejas pode ser alterada por um reator de leito estático, que demonstra ser mais eficiente (Mandenius, 2016). Outra forma de agitar as células e os reagentes é através do reator com tambor rotativo (figura 2-1 (h)), este realiza uma mistura sem aeração de forma contínua ou intermitente. Quando a rotação é negligenciada, comporta-se como um reator de bandejas. Como a rotação desempenha um papel relevante na mistura, é importante considerar a altura da cama através da qual mistura uniforme pode ser alcançada. Este ajuda na transferência de

calor entre O_2 e Difusão de CO_2 através do espaço da cabeça o biorreator de tambor rotativo. (Ashok, Doriya, Rao, & Kumar, 2017) O reator de tanque agitado (figura 2-1 (i)) com impulsor móvel, é ainda uma alternativa de agitação de células e constitui uma solução simples para esse problema. O impulsor presente neste equipamento, além de realizar rotação, move-se também transversalmente ou à volta do reator (dependendo do design do mesmo, que pode variar drasticamente) (Mandenius, 2016). Os reatores de parafuso contínuo (figura 2-1 (j)) vêm resolver situações de criação de movimento do sistema em que o fluido tem grande viscosidade. O parafuso presente no sistema, com aproximadamente o mesmo diâmetro do reator opera contínua ou intermitentemente para empurrar o substrato de uma ponta à outra (Mitchell, Krieger, & Berovič, 2006). Relativamente a aplicações mais recentes da biotecnologia, pode-se falar dos reatores e fibra oca (figura 2-1 (k)) que conseguem ultrapassar limitações no transporte de nutrientes até então conhecidas, através do processo de difusão. Apresenta excelentes propriedades de transferência de massa e providencia às células proteção contra as tensões mecânicas geradas (Eghbali, Nava, Mohebbi-Kalhari, & Raimondi, 2016). Finalmente, os reatores de mistura tipo onda (figura 2-1), são uma espécie de sacos que são movimentados como ondas para que a mistura seja facilitada e a superfície do meio de cultura constantemente renovada e sem bolhas de ar. Alguns parâmetros como frequência de vibração e temperatura têm de ser controlados rigorosamente para que se garantam transferências de massa e energia ótimas (Eibl, n.d.).

2.2 Caracterização do Biorreator em estudo

Os biorreatores são os equipamentos principais na indústria bioquímica e permitem o desencadeamento de biotransformações através de células vivas. Estas unidades permitem baixos custos de operação e melhores processos de controlo. Propiciam a existência de uma economia de escala, sem diminuir a qualidade e consistência do produto. Para que o seu desempenho seja o mais eficiente possível, têm que conseguir atingir as interações ideais entre o meio de cultura e as células e, para isso, é necessário a otimização de parâmetros como temperatura, oxigénio/ar, pH, nutrientes, metabolismos e moléculas biologicamente ativas. Em adição, os biorreatores de última geração asseguram alimentação automatizada, providenciam transferência de massa eficiente e permitem o acoplamento de estímulos mecânicos e físicos externos, bem como a avaliação em tempo real das funções do biorreator (Eaker et al., 2017; Hutmacher & Singh, 2008; Spier et al., 2012).

Os dois requisitos chave para a seleção do biorreator apropriado, são o estabelecimento de área interfacial (área de contacto entre fases) suficiente entre as fases aquosa e orgânica, de

forma a providenciar substrato ou produto de transferência de massa suficientes, e a capacidade de controlar em tempo real essa área interfacial. Estes requisitos foram conseguidos principalmente em três tipos de biorreatores: tanques agitados, tanques de loop e de membrana (Mota & Tramper, 2005).

No presente trabalho, procede-se ao estudo de um biorreator de agitação mecânica, ou tanque agitado (Figura 2-1 (a)) com aspersão de ar ((Figura 2-1 (b)) . Este tipo de biorreatores está presente em quase toda a indústria do ramo. A sua vasta utilização poderá ser justificada pela sua simples construção, versatilidade e fácil operação (Pukkella et al., 2019).

Nestes equipamentos, o parâmetro com maior influencia na eficiência da produção é a qualidade da mistura (possível de quantificar através da existência de zonas de baixa energia ou da densidade celular) (Pukkella et al., 2019). Uma mistura com boa qualidade tem diversas vantagens como: uma utilização eficiente de todo o volume do equipamento, impedir a estratificação de partículas, evitar a formação de espuma, gradientes de pH e temperatura conformes, dispersar produtos finais metabólicos e consequentemente produtos tóxicos adjacentes, manter o contacto bacterial e seus substratos, promover a transferência de calor, entre outros (Kariyama, Zhai, & Wu, 2018).

Para que tenha a maior qualidade possível, existem diferentes tipos de acessórios que podem ser adicionados ao tanque, para cada tipo de aplicação. Os tipos de lâminas de rotação são um exemplo de um acessório que pode ser alterado para melhorar a eficiência dessa mistura. Também os defletores (tradicionalmente presos à parede do tanque), que são placas verticais, ajudam a minimizar a formação de vórtices (criados pela rotação do impulsor) criando contra correntes que aumentam o movimento de partículas (Pukkella et al., 2019). Estes tipos de equipamentos podem ser também avaliados com alguns parâmetros analíticos.

2.2.1 Quantificação analítica de um Biorreator de agitação mecânica

Um dos parâmetros a ter em conta no projeto de um biorreator, é a relação entre potência e volume, que descreve a quantidade de potência (P)(W) que é dissipada no volume (V)(m^3) do sistema. Está normalmente relacionada com tensão mecânica atuante nas células. Nos biorreatores agitados, pode ser calculado como na equação (2.1), onde N (rps) é a velocidade de rotação dos impulsores e M ($N \cdot m$) o binário aplicado no eixo dos impulsores (Werner, Kaiser, Kraume, & Eibl, 2014).

$$\frac{P}{V} = \frac{2\pi \cdot N \cdot M}{V} \quad (2.1)$$

A partir da potência introduzida, o número de potência adimensional ou número de Newton (N_e) pode ser calculado, como mostra a equação (2.2). Esta medida representa as forças hidráulicas atuantes na pá, para um dado diâmetro (d)(m) e utilizando a massa volúmica líquida ρ_L (kg/m^3). Normalmente utiliza-se na comparação de vários tipos de impulsores. Se um certo número de turbulência é excedido, o número de potência torna-se contante para alguns impulsores relevantes da indústria (Werner et al., 2014).

$$N_e = \frac{P}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d^5} \quad (2.2)$$

Através do Número de Reynolds (Re) é possível caracterizar a turbulência, como mostrado na equação (2.3), onde ρ_L (kg/m^3) e μ_L ($Pa \cdot s$) representam a massa volúmica líquida e a viscosidade dinâmica, respetivamente (Werner et al., 2014).

$$Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot d^2}{\mu_L} \quad (2.3)$$

A mistura e transferência de massa, são forças resultantes da convecção ou mais particularmente da turbulência. A eficiência de um biorreator em conseguir uma mistura homogénea é definida pelo tempo de mistura (t_m)(s) necessário para se conseguir cerca de 95% de homogeneidade da mistura. A relação empírica estabelecida para conhecer esse tempo é mostrada na equação (2.4) (Werner et al., 2014).

$$t_m \propto \frac{P}{V^{-1/3}} \quad (2.4)$$

Outro parâmetro de grande importância é a transferência de massa de oxigénio. Os níveis de oxigénio consumido, ou seja a taxa de absorção de O_2 (OUR), dependem de requisitos específicos da cultura (q_{O_2})($molO_2/cel \cdot s$) e da concentração celular (X)(cel/ml). A taxa de transferência de massa de oxigénio, (OTR), é diretamente proporcional ao coeficiente volumétrico de transferência de O_2 , ($k_L a$)(h^{-1}) e a diferença de concentração entre a interface gás-líquido com o fluido mássico ($dO_2 * -dO_2$)(gO_2/m^3) que representam a força motriz da transferência de massa. Em que dO_2 representa a concentração de oxigénio dissolvido e $dO_2 *$ a concentração de oxigénio dissolvido máxima Isto é demonstrado pela equação (2.5) (Werner et al., 2014).

$$\frac{q_{O_2} \cdot X}{OUR} \leq \frac{k_L a \cdot (dO_2 * -dO_2)}{OTR} \quad (2.5)$$

Em estudos de CFD, o valor $k_L a$ é comumente derivado a partir do produto de uma área específica (a)(m^{-1}), definida pela equação (2.6). Onde A_G (m^2) representa a área da

superfície da fase gasosa e $V(m^3)$ o volume de líquido, α_G é a fração da fase gasosa e $d_B(m)$ o diâmetro médio das bolhas de gás (Werner et al., 2014).

$$a = \frac{A_G}{V} = \frac{6 \cdot \alpha_G}{(1 - \alpha_G) \cdot d_B} \quad (2.6)$$

O coeficiente de transferência mássica $k_L(m/h)$ pode ser estimado utilizando a teoria de penetração de *Higbie*, como mostra a equação (2.7). Em que ε_L representa o rácio de dissipação da energia cinética turbulenta por unidade de massa, $\nu_L(m^2/s)$ a viscosidade cinética, D_L a difusidade de oxigénio ($1,98 \times 10^9 m^2s^{-1}$ em água a 20 °C) e C_1 é uma constante com o valor de $\frac{2}{\sqrt{\pi}}$. (Werner et al., 2014).

$$k_L = C_1 \sqrt{D_L} \cdot \left(\frac{\varepsilon_L}{\nu_L}\right)^{0.25} \quad (2.7)$$

2.2.2 Biorreator em estudo

Neste trabalho utilizou-se um biorreator Biostat® B plus de 2 L, cujo recipiente pertence à plataforma Univessel® disponibilizado pela Sartorius Stedim Systems GmbH. O modelo utilizado trata-se de um “Glass 2L double Wall” (Figura 2-2) (Biotech, 2012).

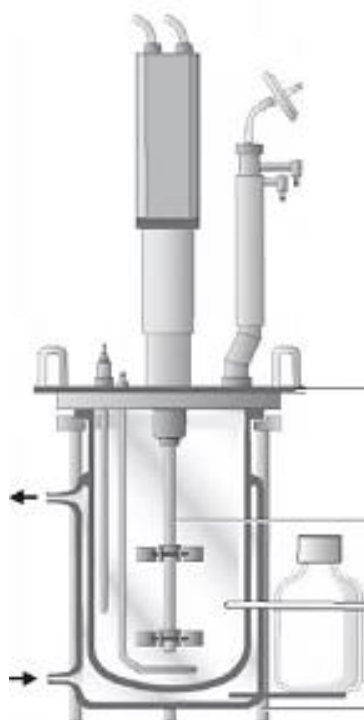


Figura 2-2 – Biorreator Biostat® B plus de 2 L (Biotech, 2012)

Os recipientes de parede dupla são projetados para controlo de temperatura recorrendo a circulação de água à pressão atmosférica. Para prevenir uma sobre pressurização da parede

dupla e conseqüentemente essa sobre pressurização durante a esterilização do equipamento em autoclave, a circulação está ligada ao recipiente da cultura por uns engates rápidos especiais (Biotech, 2012):

- Acesso inferior à parede dupla tem um engate rápido de fecho automático;
- Zona superior de sucção da parede dupla tem um adaptador de tubo macho aberto.

Este recipiente é equipado com impulsores, acionados por um motor montado no topo. A ligação entre o veio do impulsor e o motor pode ser mecânica ou magnética. Para monitorizar o produto estão disponíveis sensores de temperatura, pH e pO_2 (porção de oxigénio), uma sonda anti espuma e outra para controlo de nível de líquido (Biotech, 2012). O recipiente utilizado tem uma capacidade total de 3 L mas o seu volume de trabalho é de 0,6-2 L, e a sua forma é caracterizada por um fundo redondo (provado ser mais eficaz na cultura de microrganismos e células animais) (Biotech, 2012). O suporte estrutural do recipiente é em aço inoxidável. Nas zonas de interação com o fluido, este recipiente é constituído por vidro de borossilicato, aço inoxidável AISI 316L e borracha monômero de etileno-propileno-dieno (EPDM), enquanto que nas zonas sem interação é um aço AISI 304 (Biotech, 2012). As dimensões externas deste produto encontram-se sintetizadas na Tabela 2.3 e representadas na Figura 2-3.

Dimensões Gerais

Tabela 2.3 – Dimensões Externas do vaso (Biotech, 2012)

| Cota | Valor (mm) |
|------|------------|
| D1 | 130,0 |
| H1 | 285,0 |
| H2 | 507,0 |
| H3 | 619,0 |
| H4 | 220,0 |
| H5 | 340,0 |
| H6 | 391,0 |
| H7 | 14,0 |
| B1 | 176,0 |
| B2 | 262,0 |
| D1 | 198,0 |
| T1 | 216,5 |
| T2 | 332,0 |
| T3 | 234,5 |
| T4 | 342,0 |

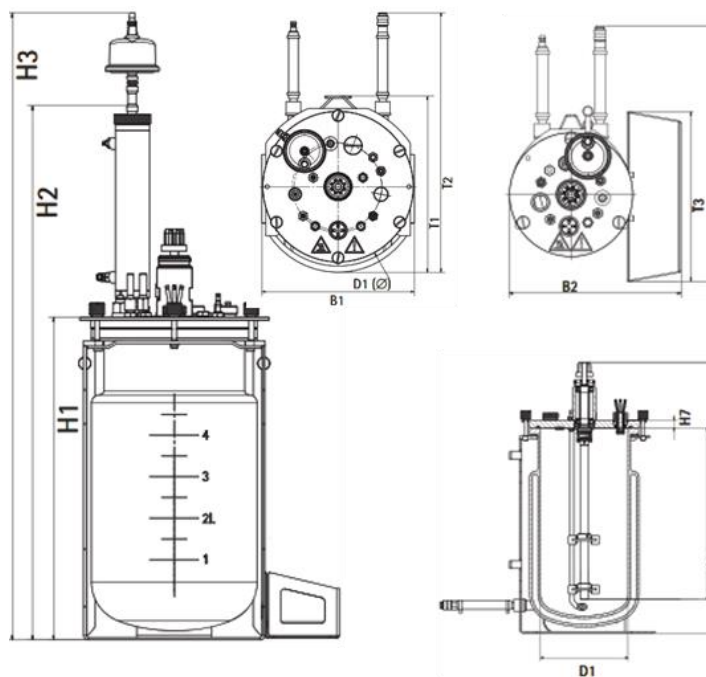


Figura 2-3 – Dimensões Externas Vaso (Biotech, 2012)

As dimensões internas do biorreator em estudo estão sintetizadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Dimensões Internas do Vaso. Adaptado de (Biotech, 2012)

| Dimensão | Valor |
|---|--------|
| Volume Total | 3 L |
| Volume de trabalho max | 2 L |
| Volume de trabalho min | 0,4 L |
| Diâmetro do recipiente d | 130 mm |
| Altura do recipiente h | 240 mm |
| Relação $h d_v$ | 1,8 |
| Altura de líquido h_l | 180 mm |
| Relação $h_l d_v$ | 1,4 |
| Diâmetro do impulsor Rushton de 6 laminas d_{i_1} | 53 mm |
| Relação $d_{i_1} d_v$ (6 lâminas) | 0,42 |

Acessórios

O biorreator em estudo está equipado com um impulsor tipo disco com 6 lâminas de 53 mm de diâmetro. Este tipo de impulsor é o mais adequado para realizar uma mistura intensa da cultura microbiana, e com altas velocidades providenciar um elevado nível de oxigênio. São constituídos por um aço inox AISI 316L (Biotech, 2012). Este acessório pode ser visualizado na Figura 2-4 a).

Neste equipamento também estão incorporados defletores que oferecem resistência ao fluído, para que se consiga uma maior homogeneização do meio da cultura. A baixas velocidades de mistura os defletores melhoram a transferência de massa e inserção de oxigênio, já a altas velocidades ajudam a prevenir a criação de vórtices. Esta estrutura é composta por quatro defletores, com 130 mm de altura, unidos por dois anéis com 125 mm de diâmetro. Este conjunto é fixo à tampa do biorreator por meio de um tubo (Biotech, 2012). Este acessório pode ser visualizado na Figura 2-4 b).

Para oxigenar o meio é utilizado um aspersor do tipo anelar, com 14 furos de 1 mm de diâmetro. Este tipo de aspersores é utilizado à escala industrial, por ser de fácil manutenção, ainda que produza bolhas de grandes dimensões, diminuindo por isso o tempo de residência e a área interfacial das bolhas. O tubo e o anel têm um diâmetro de 6 mm sendo que o anel fica colocado a uma profundidade de 229 mm (Biotech, 2012). Este acessório pode ser visualizado na Figura 2-4 c).

Finalmente, para alimentação da cultura é utilizado um tubo com 6 mm de diâmetro com 185 mm de comprimento, sendo a posição deste ajustável (Biotech, 2012).

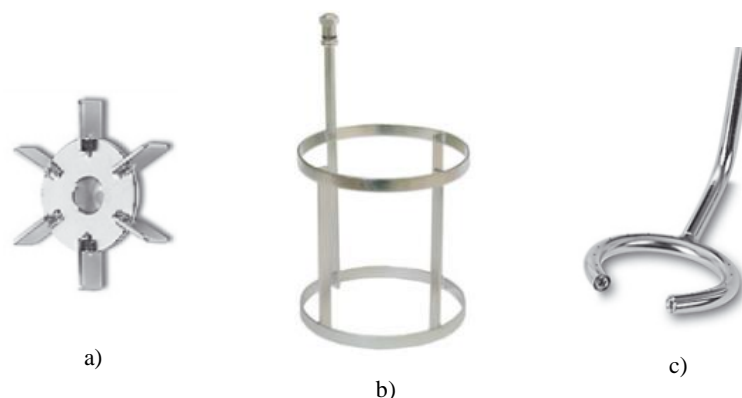


Figura 2-4 – Acessórios do Biorreator: a) lâminas Rushton; b) defletores; c) tubo de oxigenação. (Biotech, 2012)

Eléttodos e Sensores

Para controlo da temperatura é utilizado um sensor de temperatura Pt-100, tipo 200-4. Este sensor consegue ser colocado por forma a atingir uma profundidade de 211 mm (Biotech, 2012).

O nível de fluido e quantidade de espuma é controlada por uma única sonda que funciona de acordo com o princípio da condutividade, onde o aço inoxidável do biorreator atua como contra eléctrodo. Quando a espuma entra em contato com a sonda, induz um salto na condutividade o que leva à emissão de um sinal para o controlador. A sonda tem um diâmetro de 6 mm e um comprimento de 150 mm, sendo que o comprimento máximo que pode atingir no biorreator é de 122 mm (Biotech, 2012).

O pH do meio de cultura é controlado por um sensor esterilizável capaz de trabalhar em ambientes até 2,5 bar. No recipiente em estudo é utilizado um eléctrodo de pH EF-12/200 K8-HM com 200 mm de comprimento (Biotech, 2012).

O controlo da quantidade de oxigénio no meio é feito a partir da medição parcial da pressão de oxigénio pO_2 . O eléctrodo utilizado tem um comprimento de 215 mm. (Biotech, 2012).

Controlo e Monitorização

Com o intuito de melhorar a qualidade de culturas de microrganismos em diferentes volumes, foi desenvolvido o equipamento necessário à monitorização e controlo em tempo real do biorreator. O BIOSTAT® B-MO permite a medida, o controlo e avaliação *online* dos

parâmetros envolvidos no processo, como velocidade de rotação das pás, temperatura, pH, parte de oxigênio, entre outros. Também permite a monitorização independente do progresso da fermentação no biorreator. Este equipamento é composto por vários componentes como: unidade de controlo, unidade de controlo do domínio (DCU) e sistema de controlo, módulos de aeração (ar e oxigênio), módulos de temperatura, circuito de arrefecimento por água, aquecimento do filtro de escape e módulo de bombas peristálticas (Manual, 2014). Este dispositivo pode ser visualizado na Figura 2-5.



Figura 2-5 - BIostat® B-MO (Manual, 2014)

3 Dinâmica de Fluidos

Computacional

Ao estudo dos fluidos, quer estejam em movimento (dinâmica) ou em repouso (estática), dá-se o nome de mecânica dos fluidos, cuja classificação engloba tanto os gases como os líquidos, ficando a matéria dividida apenas em dois estados: sólidos e fluidos. A diferença técnica entre estes dois estados é que, enquanto um sólido consegue resistir a uma tensão tangencial por uma deflexão estática, o fluido não. Qualquer tensão aplicada a um fluido, resultará num movimento do próprio fluido, estando este sujeito a uma deformação contínua durante a aplicação da tensão. Relativamente à diferença entre os líquidos e os gases é que, no primeiro caso, as forças coesivas das moléculas são fortes, fazendo com que o seu volume não se altere e forme uma superfície livre num campo gravitacional, se não estiver limitado na parte superior. As forças coesivas entre as moléculas dos gases são desprezáveis pelo que estes não têm um volume definido (White, n.d.).

A dinâmica de fluidos computacional (CFD) é a ciência que produz determinadas previsões acerca dos fenómenos relacionados com os fluidos, com base nas leis da conservação e com recurso a análises numéricas (Hu, 2012). É uma técnica com crescente importância e exatidão, particularmente capaz nos estudos de hidrodinâmica ou processos de mistura. Às leis base da conservação é possível adicionar uma variedade de fenómenos como reações químicas ou outras equações de conservação (Bezzo, Macchietto, & Pantelides, 2004). Apesar da alta eficiência da CFD, ainda não é correto assumir que os resultados obtidos em simulação são exatamente iguais a uma aplicação real, já que existem erros associados a esta abordagem (incertezas do modelo, devido a discretização, arredondamentos, incertezas em aplicações complexas, entre outros) (Hu, 2012)(Casey & Wintergerste, 2000). Além dos cuidados a ter na interpretação dos resultados e na escolha dos métodos de simulação, é preciso a disponibilização de uma grande capacidade computacional (processamento e memória), uma vez que os processos podem ser bastante complexos, especialmente se reações biológicas estiverem envolvidas na análise (Delafosse et al., 2014).

Uma característica de destaque da CFD é a sua abordagem na descrição de processos físicos, dado que substitui a utilização de propriedades de massa ou volume como momento de um corpo em mecânica, ou energia num sistema termodinâmico, pela compreensão de propriedades distribuídas. Ou seja, campos inteiros como temperatura $T(\mathbf{x}, t)$ ou velocidade $\mathbf{V}(\mathbf{x}, t)$. Todas as características pretendidas derivam dos campos distribuídos (Mandenijs,

2016). Esta metodologia é muito atrativa, uma vez que fornece um nível de detalhe muito grande. Processos internos de fluxo de fluido como movimento, rotação e deformação de partículas podem ser tidos em consideração. No entanto, quanto mais detalhado é o problema ou a solução desejada, mais complexas são também as equações que o governam, que são geralmente equações diferenciais parciais e não lineares (exceção de modelos muito simplificados) (Zikanov, 2010).

Na resolução dos problemas de transferência de calor e escoamento de fluidos, existem três abordagens que se podem distinguir (Zikanov, 2010):

1. Teórica, por meio das equações governantes;
2. Experimental, por meio de um ensaio bem definido com um modelo do objeto real;
3. Numérica, por meio de procedimentos computacionais.

A abordagem teórica tem a vantagem de se conseguirem obter soluções exatas, no entanto, as soluções analíticas só são possíveis quando aplicadas a problemas muito limitados, geralmente formulados para condições ideais (Zikanov, 2010).

A abordagem experimental pode representar uma grande ajuda no *design* e otimização de medidas externas, uma vez que lida com o sistema real. No entanto pode demonstrar-se dispendiosa, com grande dificuldade técnica e bastante demorada (Zikanov, 2010).

A abordagem numérica ou computacional consegue descrever quase qualquer escoamento de fluido ou transferência de calor e, ainda que também apresente algumas desvantagens é a abordagem mais benéfica na procura de um resultado correto e exato (Zikanov, 2010).

Uma vez que as equações fundamentais do movimento dos fluidos são conhecidas desde o século XIX, aquando do aparecimento de maiores desenvolvimentos tecnológicos, foram rapidamente contruídos códigos tendo-as como base, capazes de solucionar problemas numéricos de geometrias e condições de fronteira complexas. A CFD foi uma das primeiras áreas a tirar vantagem do campo emergente da ciência computacional. Neste processo, rapidamente se entendeu que a CFD poderia ser uma alternativa à modelação física em diversas áreas da dinâmica de fluidos, com as vantagens da grande flexibilidade e baixo custo. O sucessivo aumento na capacidade computacional e a sua disponibilidade fez com que fosse possível a um utilizador com poucos conhecimentos na matéria e pouca disponibilidade financeira, fazer correr simulações 3D de grande complexidade e tamanho com recurso a um computador pessoal de média qualidade. Isto também representa alguns problemas, no sentido em que o utilizador se presencia com uma maior fonte de possíveis erros (Bates, Lane, & Ferguson, n.d.). Apesar da forte utilização e qualidade de simulação

da CFD, existem ainda áreas emergentes que não têm resposta a problemas concretos do dia-a-dia, como por exemplo nas aplicações biotecnológicas.

3.1 Estado de Arte: CFD

A ideia da aplicação da dinâmica de fluidos remonta aos tempos antigos, com algumas obras de engenharia como aquedutos ou utilização de energia eólica para movimentação de barcos, realizadas muito antes da formalização desta matéria (Laurendeau, n.d.). No século III, Arquimedes introduziu a lei do equilíbrio de fluidos no seu trabalho “Sobre os corpos Flutuantes”, demonstrando a forma dos volumes de água e fazendo nascer assim os primeiros conceitos escritos sobre a mecânica de fluidos (área da física que estuda os fluidos e suas forças atuantes) (Ceccarelli, 2014). Apesar de ter feito várias declarações relativas a fluidos flutuantes e imersos, só mais tarde, em França e Inglaterra, no século XVII, foram desenvolvidas as primeiras bases racionais para a dinâmica de fluidos experimental, tendo a Europa permanecido o berço da dinâmica de fluidos teórica nos séculos XVIII e XIX (Iannelli, n.d.). Em 1687 Isaac Newton introduziu dois conceitos base da dinâmica de fluidos na sua obra “Principia”: Pressão interna (longitudinal e transversal) e semelhança. No entanto, Newton não formulou uma estratégia geral para submeter este meio, às leis do estudo que estava a realizar (Darrigol & Frisch, 2008). O teorema de Bernoulli, surgiu em 1738 nas investigações de Daniel Bernoulli (Iannelli, n.d.). Após 14 anos a trabalhar em ciência naval e a estabelecer as bases teóricas para o desenvolvimento de uma frota eficiente, em 1749 Leonhard Euler publicou na sua dissertação *Scientia Navalis*, uma formulação das leis hidrostáticas e a aplicação das mesmas, em estabilidade de navios. Hoje em dia, a dinâmica de fluidos não pode ser concebida sem as bases fundamentais das equações de Euler, sobre movimento de fluidos ideais, tal como aparecem nos “Principes généraux du mouvement des fluides”, apresentada na Académie Royale des Sciences e Belles-Lettres (Berlim), em 4 de setembro de 1755 e publicado em 1757 (Darrigol & Frisch, 2008). Durante este período, Jean le Rond d’Alembert demonstrou, com equações essencialmente equivalentes às de Euler, que não existe força de atrito em corpos finitos, sendo este o paradoxo de Alembert. As equações de Euler só correspondem a um fluido real quando são tomadas certas assunções, pelo que têm de ser utilizadas com grande prudência (Sabersky, Acosta, Hauptmann, & Gates, n.d.). Após a publicação das equações de Euler, pouco desenvolvimento se fez relativamente à correspondência dos resultados analíticos com o fluxo verdadeiro dos fluidos até à generalização das equações do movimento feitas por Navier (Sabersky et al., n.d.). Claude-Louis Navier, marcou a história da mecânica dos

fluidos com a derivação das equações de momento linear e o tensor de tensão, em 1821, levando às famosas equações de Navier-Stokes (Iannelli, n.d.). Outro trabalho notável foi o de Poisson, publicado em 1829 "Mémoire sur l'équilibre et le mouvement des corps élastiques" em que reformula as equações para um escoamento viscoso (Kosmann-Schwarzbach, n.d.). Através dos princípios fundamentais da mecânica, G. Stokes reformulou os resultados de Navier, em 1845, tendo em conta os efeitos de atrito e por isso incluindo forças tangenciais (Sabersky et al., n.d.). As equações de Navier-Stokes são restritas para fluidos newtonianos, ou seja, fluidos cuja tensão de corte é proporcional ao gradiente de velocidade ou taxa de deformação, em que a constante de proporcionalidade é a viscosidade (White, n.d.). Após a finalização destas equações, foram levantadas algumas dúvidas quanto à plausibilidade das mesmas, sobre a descida de pressão em tubos, quando aplicadas a fluidos sob certas condições especiais. No entanto, Osborne Reynolds, ao investigar o escoamento de fluidos em tubos (trabalho publicado em 1883), mostrou que, apesar das características dos fluidos variarem com a velocidade, esses fenômenos estão incluídos nas equações de Navier-Stokes (Reynolds, 1971; Sabersky et al., n.d.). Na publicação de 1883, Reynolds estabeleceu dois tipos de escoamento: laminar e turbulento, através de uma simples experiência. Em tubos de vidro longos, em que a velocidade podia ser controlada, era possível injetar um fluxo de corante que permitisse avaliar o escoamento. No primeiro ensaio, deixou-se correr a água a baixa velocidade, observando-se que a tinta formava retas paralelas à parede do tubo, que se estendiam ao longo do mesmo e mantinham a sua integridade aquando uma ligeira inclinação do tubo. Estava-se perante um escoamento laminar. Ao aumentar a abertura à entrada do tubo, o fluxo de água aumentou, começando-se a observar redemoinhos formados perto da saída do tubo, fazendo com que o corante se misturasse pela água. À medida que se aumentou o fluxo de água, o local onde se concentravam os redemoinhos avançava na direção de saída. Estava-se perante o regime de escoamento turbulento (Reynolds, 1971). Assim, Reynolds demonstrou que o tipo de regime dependia não só da velocidade, mas também do diâmetro do tubo e da viscosidade cinemática, levando-o a determinar o número de Reynolds ($Re=V*d/v$) (Reynolds, 1971; Sabersky et al., n.d.). No início do século XX, prevalecia a ideia de que a tentativa de solucionar as equações de Navier-Stokes de um fluido viscoso para fluxos externos sobre um corpo era inútil, devido à sua complexidade. Por este motivo, Ludwig Prandtl investigou soluções aproximadas para fluidos com baixa-viscosidade, como ar e água e conseguiu obter sucesso na redução das dificuldades matemáticas dessas equações. A simplificação consistiu na divisão do domínio do fluxo em duas regiões: uma camada limite fina, que se desenvolve muito perto da camada sólida e na qual as forças de atrito são tão importantes como as forças

de inércia; e uma região externa, na qual o atrito do fluido é praticamente inexistente, podendo ser desprezado. (Eckert, 1975) Esta simplificação é conhecida como a teoria da camada-limite de Prandtl de 1904 que levou a um período fértil de desenvolvimento na mecânica de fluidos (tanto analítica como experimental), conduzindo a um melhor entendimento dos fluidos (Eckert, 1975; Sabersky et al., n.d.).

Na história da dinâmica de fluidos é preciso também mencionar Maxwell que, em 1866, com base na teoria cinética dos gases, desenvolveu expressões para os coeficientes de viscosidade e condutividade térmica. Saint Venant e Wantzel, que em 1839 publicaram os seus estudos sobre a saída de gases altamente pressurizados de vasos. Riemann, que em 1860 detalhou a propagação de ondas de amplitude finita no ar. Finalmente no período 1870-1881 a evolução da teoria de compressão de choque por Rankine e Hugoniot, com E. Mach descrevendo as ondas de choque oblíquas geradas por projéteis a velocidades supersônicas (Iannelli, n.d.).

Só na primeira parte do século XX, foram desenvolvidos os métodos numéricos para aplicação na resolução de equações diferenciais ordinárias e parciais (Zikanov, 2010). No entanto, a complexidade dessa “programação” face às capacidades dos recursos utilizados, materiais e humanos, levava a que só pudessem ser resolvidos problemas simples, de equações de primeira ordem. (Zikanov, 2010) O início do uso de CFD foi acionado pela disponibilidade de unidades de processamento centrais mais capazes, estando o seu processamento ainda hoje condicionado pelos avanços da tecnologia computacional (Blazek, 2005).

O desenvolvimento de computadores mais rápidos e de maiores dimensões foi motivado na sua maioria pela demanda militar, no estudo de ondas de choque provocadas por explosões ou os fluxos de ar provocados pela passagem de aviões a jato supersônicos (Zikanov, 2010).

Em ambiente industrial, a análise de CFD não passa pelo desenvolvimento de novos algoritmos, mas sim, pela utilização de códigos gerais pré-definidos que, fornecem um conjunto de ferramentas necessárias: solucionador de equações, gerador de malhas, turbulência, modelos multifásicos, modelos de pós-processamento e de computação paralela. Os dois fatores que contribuem para o sucesso na aplicação desses códigos são (Laurendeau, n.d.):

1. Entendimento dos aspetos físicos e de engenharia do processo a analisar.
2. Habilidade para conduzir o processo de CFD de forma a garantir uma solução eficiente e exata.

Hoje em dia, conseguimos deparar-nos com inúmeras opções de mercado relativamente a *softwares* de CFD, que podem ser agrupados em cinco categorias (“Comparing CFD Software,” n.d.):

- *Software* de *Open-Source*, permitem uma utilização sem custo, como a OpenFOAM;
- *Software wrappers open source*, mais *user friendly*, com recurso a uma *Graphical User Interfaces* (GUI), como por exemplo a HELYX, o simFlow e o mais recente SimScale;
- *Software* com CAD, como Solidworks e Inventor;
- *Software* de especialização, com recurso a códigos altamente sofisticados e especializados em diferentes tipos de problemas. São exemplos, o FloTHERM, 6Sigma ou o XFlowCFD;
- *Software* de pacotes de compreensão, como o Fluent da ANSYS e o Star-CCM+.

3.1.1 Equações Governantes da CFD

Do ponto de vista físico, as equações que descrevem o escoamento de fluidos e as transferências de massa e calor, são versões das leis da conservação, mais especificamente (Zikanov, 2010):

- Conservação de massa (Lei de Lavoisier);
- Conservação do momento (Segunda lei de Newton);
- Conservação de energia (Primeira lei da Termodinâmica).

Em casos especiais é necessário adicionar equações que tenham em conta outros fenómenos, como por exemplo a equação de balanço de entropia (segunda lei da termodinâmica) ou de campos magnéticos.

Um ponto de partida, poderá ser o conceito de meio contínuo (sólido ou líquido) que consiste em volumes elementares infinitesimais (do ponto de vista macroscópico), mas suficientemente grandes em comparação à distância entre moléculas, podendo assim ser considerado como meio contínuo. No caso de um escoamento de fluido, os volumes elementares podem também ser chamados de elementos fluidos, que se movem, rodam e deformam sob a ação de forças atuantes no escoamento. São manipulados como se da mesma molécula se tratassem (Zikanov, 2010).

As leis da conservação devem ser satisfeitas por qualquer elemento de fluido, o que pode ser matematicamente expresso de duas maneiras diferentes.

Pode ser seguida a abordagem Lagrangeana, em que as equações são diretamente formuladas em termos de propriedades de um dado volume elementar que se move no espaço, apesar de ser menos utilizada em CFD (Zikanov, 2010).

Ou, como é mais usual, utilizar a abordagem Euleriana, na qual os princípios de conservação aplicados a qualquer volume elementar são reformulados em termos de propriedades distribuídas, como massa específica $\rho(\mathbf{x}, t)$, temperatura $T(\mathbf{x}, t)$ ou velocidade $\mathbf{v}(\mathbf{x}, t)$, contabilizadas como vetores ou funções escalares no espaço \mathbf{x} e no tempo t (Zikanov, 2010).

Outro conceito importante é o da derivada material. Considerando um determinado elemento que se move com velocidade $\mathbf{V}(x, y, z, t)$ num fluido de massa específica $\rho(x, y, z, t)$ (outro campo escalar, em vez da massa específica pode ser utilizado, desde que não se perca a generalidade), tem-se que o vetor de posição do elemento no sistema de coordenadas cartesianas varia com o tempo $\mathbf{R}(t) = (x(t), y(t), z(t))$ (Zikanov, 2010).

A diferenciação de ρ em relação ao tempo fornece a taxa de alteração da massa específica dentro do elemento (Zikanov, 2010).

Ainda outro conceito importante está associado ao facto de, enquanto a massa de um elemento é conservada, o seu volume altera-se constantemente à medida que se move e se transforma no escoamento. Verifica-se que a alteração volúmica, ocorre devido à dependência espacial do campo de velocidade, fazendo com que os valores de velocidade em lados opostos do elemento sejam diferentes. (Zikanov, 2010).

Conservação de Massa

A primeira das equações governantes do movimento de fluido é a conservação de massa. Esta lei expressa que, num escoamento de massa específica $\rho(\mathbf{x}, t)$ e velocidade $\mathbf{V}(\mathbf{x}, t)$ considera-se para um elemento de fluido um volume $\delta\mathcal{V}$. Assim, e de acordo com a definição, o elemento consiste nas mesmas moléculas em todos os momentos, pelo que a sua massa deve permanecer constante $\delta m = \rho\delta\mathcal{V}$, verificando-se a equação (3.1) (Zikanov, 2010):

$$\frac{d(\rho\delta\mathcal{V})}{dt} = \delta\mathcal{V} \frac{D\rho}{Dt} + \rho \frac{d(\delta\mathcal{V})}{dt} = 0 \quad (3.1)$$

A derivada material é utilizada para representar a taxa de deformação da massa específica num elemento fluido. Dividindo por $\delta\mathcal{V}$ e aplicando a equação de alteração de volume por tempo com um campo de velocidade tridimensional, obtém-se a equação da continuidade como em (3.2) (Zikanov, 2010):

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \nabla \cdot \mathbf{V} = 0 \quad (3.2)$$

Que pode ser reescrita como na equação (3.3) (Zikanov, 2010):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \mathbf{V} \cdot \nabla \rho + \rho \nabla \cdot \mathbf{V} = \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{V}) = 0 \quad (3.3)$$

Se a compressibilidade do fluido puder ser desprezada, como é o caso de muitos escoamentos, pode-se assumir que a sua massa específica é constante ($\rho = \text{const}$), e por isso reduzir as equações para a equação da incompressibilidade, como mostra a equação (3.4) (Zikanov, 2010).

$$\nabla \cdot \mathbf{V} = 0 \quad (3.4)$$

Conservação de Espécies Químicas

Se o fluido for uma composição de espécies químicas, que se podem transformar devido a reações químicas, podem ser utilizadas as equações de transporte. O transporte é quantificado por um vetor campo $\mathbf{J}_i(\mathbf{x}, t)$ de um fluxo de espécies i , e que denota a direção e a taxa do fluxo de massa das espécies por unidade de área no ponto \mathbf{x} . A taxa de transformação por difusão de massa num elemento de fluido é $\nabla \cdot \mathbf{J}_i$. A concentração de espécies pode ser expressa em termos de fração de massa $m_i(\mathbf{x}, t)$, ou utilizar a concentração de espécies $C_i = m_i \rho$ como uma massa i por unidade de volume. Esta lei da conservação é expressa pela equação (3.5) (Zikanov, 2010).

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho m_i) + \nabla \cdot (\rho m_i \mathbf{V} + \mathbf{J}_i) = R_i \quad (3.5)$$

Em que R_i contabiliza a produção/consumo das reações químicas das espécies. Se for aplicada a lei de Fick admitindo variações de concentração fracas, a equação da conservação torna-se como na equação (3.6) (Zikanov, 2010):

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho m_i) + \nabla \cdot (\rho m_i \mathbf{V}) = R_i + \nabla \cdot (\Gamma_i \nabla m_i) \quad (3.6)$$

E ainda, no caso dos coeficientes de difusão de Fick (Γ_i) serem constantes, a equação simplifica-se para a equação (3.7) (Zikanov, 2010):

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho m_i) + \nabla \cdot (\rho m_i \mathbf{V}) = R_i + (\Gamma i \nabla^2 m_i) \quad (3.7)$$

Conservação do momento

O princípio físico em que se baseia esta conservação é a segunda lei de Newton, que diz que a taxa de transformação do momento de um corpo é igual à força atuar nele. É possível distinguir dois tipos de forças a atuar num elemento fluido (Zikanov, 2010):

Forças de corpo: Atuam diretamente sobre a massa do fluido e são originadas numa fonte remota, como a gravidade ou forças magnéticas. A força total do corpo a atuar num elemento fluido é proporcional à sua massa. Assumindo-se que as forças do corpo são agrupadas numa força única f por unidade de massa, a força por unidade de volume pode ser representada por ρf (Zikanov, 2010).

Forças de superfície: Forças de pressão e de fricção que ocorrem entre elementos vizinhos ou entre um elemento fluido e uma parede adjacente (Zikanov, 2010).

Após a separação do tensor de tensão em pressão isotrópica e parte viscosa (que existe apenas para fluido em movimento), a inclusão de um modelo para tensões viscosas, obtêm-se as formas finais destas equações: equações de Navier-Stokes (3.8) (Zikanov, 2010).

$$\begin{aligned} \rho \frac{Du}{Dt} &= \rho f_x - \frac{\partial p}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} \left[\mu \left(-\frac{2}{3} \bar{\nabla} \cdot \bar{\mathbf{V}} + 2 \frac{\partial u}{\partial x} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[\mu \left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \right) \right] \\ \rho \frac{Dv}{Dt} &= \rho f_y - \frac{\partial p}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial y} \left[\mu \left(-\frac{2}{3} \bar{\nabla} \cdot \bar{\mathbf{V}} + 2 \frac{\partial v}{\partial y} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial x} \left[\mu \left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z} \right) \right] \\ \rho \frac{Dw}{Dt} &= \rho f_z - \frac{\partial p}{\partial z} + \frac{\partial}{\partial z} \left[\mu \left(-\frac{2}{3} \bar{\nabla} \cdot \bar{\mathbf{V}} + 2 \frac{\partial w}{\partial z} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial x} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[\mu \left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z} \right) \right] \end{aligned} \quad (3.8)$$

Conservação da energia

O princípio da conservação de energia pode ser formulado para um elemento de fluido de uma maneira semelhante à conservação de massa e de momento, como na equação (3.9) (Zikanov, 2010):

$$\rho \frac{De}{Dt} = \bar{\nabla} \cdot \mathbf{q} - p(\bar{\nabla} \cdot \mathbf{V}) + \dot{Q} \quad (3.9)$$

Em que $e(\mathbf{x}, t)$ é a energia interna por unidade de massa, $\mathbf{q}(\mathbf{x}, t)$ o campo vetorial do fluxo de calor por condução térmica, $p(\bar{\nabla} \cdot \mathbf{V})$ que representa o trabalho e \dot{Q} a taxa de geração de calor interno. A condução do fluxo de calor pode ser descrita pela lei de condução de Fourier (Zikanov, 2010).

Equação de estado

Para finalizar o sistema das equações governantes da CFD, é necessário adicionar uma equação de estado que faz a conexão entre as variáveis termodinâmicas pressão p , massa volúmica ρ e temperatura T , através da constante universal dos gases R . É também necessário adicionar uma expressão para a energia interna e . A equação mais simples e mais utilizada é a do modelo de um gás ideal e de fluido incompressível, respetivamente (3.10) e (3.11) (Zikanov, 2010):

$$\frac{p}{\rho} = RT, e = e(T) \quad (3.10)$$

$$\rho = \text{constante}, e = CT \quad (3.11)$$

3.2 Dinâmica de Fluidos Computacional e o estudo de biorreatores

A maior parte das unidades de operação que são utilizadas em bioprocessos envolvem fluidos com múltiplas fases. Uma fase pode ser definida como o estado termodinâmico em que qualquer componente existe. Portanto, os fluxos multifásicos referem-se a escoamentos onde mais do que uma fase está presente (Krishna, 2002). Isto é particularmente verdade para reatores de agitação contínua (CSTR) que são comumente utilizados como biorreatores ou fermentadores. Nestes reatores, o gás é inserido no meio, que consiste num líquido e em células sólidas. Mistura inversa e passagem a gás, causadas por uma mistura pobre podem resultar em zonas estagnadas ou mortas. Estas zonas, por sua vez, criam gradientes dentro do meio de trabalho e resultam num suprimento inadequado de nutrientes e oxigénio para as células. O conhecimento da hidrodinâmica dos biorreatores é, portanto, essencial para a compreensão do fluxo não-ideal dentro do biorreator (“apifarma - Associação Portuguesa Da Industria Farmacêutica,” n.d.).

Ao lidar com escoamentos monofásicos, a dinâmica do fluido pode ser facilmente determinada pela resolução simultânea da equação de continuidade e da equação de Navier-Stokes. No caso de fluxos multifásicos, no entanto, a complexidade aumenta notavelmente e muitos fatores precisam ser levados em conta para se chegar a conclusões precisas. Estes incluem troca de momento entre fases, transferência de massa entre as fases e absorção de uma fase em outras.

A mistura adequada e a retenção de gás num biorreator detêm um papel importante na determinação do seu desempenho. A mistura perfeita é uma condição em que há uniformidade na concentração de todas as espécies no reator. A maioria dos reatores é projetada com base na suposição de mistura perfeita, o que resulta em erros entre as previsões

e medições reais, (sendo que os erros aumentam com o aumento do tamanho do reator) (Gnoth et al., 2007). Na realidade, o campo de fluxo dentro do reator é inerentemente instável devido à turbulência gerada. Para a obtenção de uma mistura uniforme, são realizados esforços consideráveis pela indústria. Uma boa mistura resulta na transferência eficiente de massa da fase dispersa para a fase contínua e também na concentração uniforme de todas as espécies no reator (Evaluate Pharma, 2016). Em geral, os biorreatores são equipados com impulsores que podem ser operados em diferentes rotações proporcionando melhor contacto entre as fases e consequente melhor coeficiente de transferência de massa. (Mandenius, 2016; Sales et al., 2015)

Na indústria de biotecnologia, os reatores aerotransportados são comumente usados para o crescimento de células microbianas e de mamíferos. O oxigénio é inserido através do meio usando um aspersor colocado no fundo do reator. Frequentemente, a formação de produto depende da taxa na qual o oxigénio é transferido de uma fase para outra. Para medir a transferência de oxigénio entre as fases, são utilizados normalmente parâmetros como o *hold-up* de gás (quantidade de gás no meio num determinado instante) e o coeficiente volumétrico de transferência de massa. A distribuição do tamanho da bolha também é um fator importante, pois afeta diretamente a área da interface entre as diferentes fases (Sales et al., 2015).

Na Figura 3-1 é ilustrado um biorreator com todas as características referidas anteriormente.

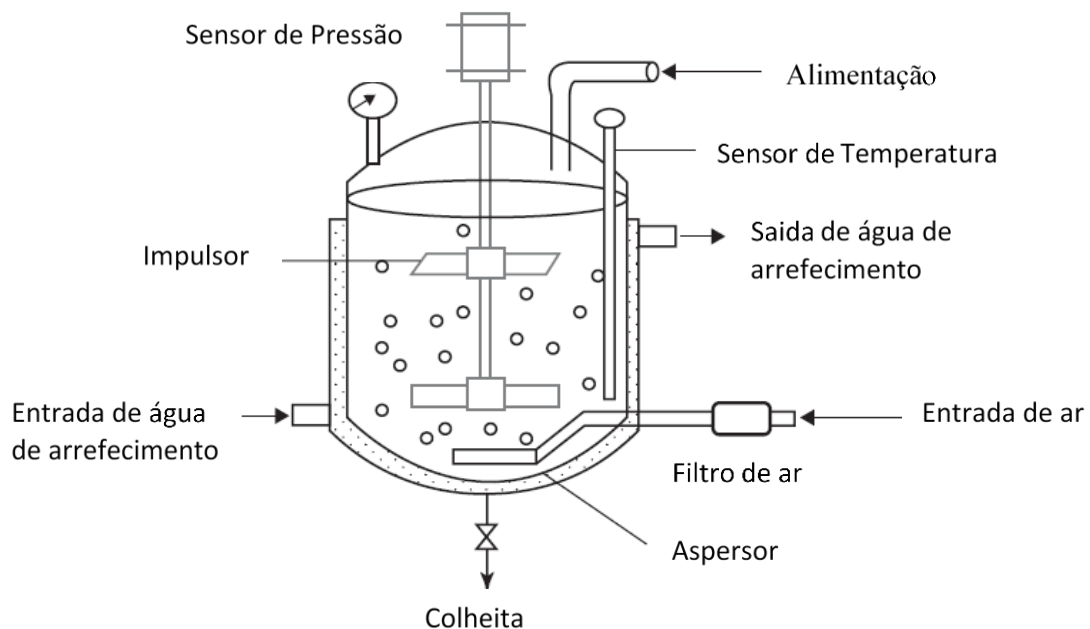


Figura 3-1 – Ilustração de um biorreator com introdução de ar (Mandenius, 2016)

A CFD é amplamente usada para simular a hidrodinâmica dentro do biorreator resolvendo as equações de continuidade e de Navier-Stokes simultaneamente. O volume do sistema é dividido em volumes de controle menores (chamados células) e as equações de momento são numericamente resolvidas para cada um dos volumes de controle (Mandenius, 2016).

Para evitar complexidade matemática, muitos investigadores assumem um tamanho de bolha única para a fase de gás no reator. Isso torna as simulações computacionalmente mais simples e, portanto, mais rápidas. Num processo real, no entanto, o tamanho da bolha muda à medida que a fase gasosa se move dentro do reator. As bolhas saem do aspersor e depois são decompostas em bolhas menores, à medida que passam pelas zonas de corte provocadas pelos impulsores. A área interfacial por unidade de volume do reator aumenta drasticamente quando isso acontece e isso é de fato responsável pelo aumento da taxa de transferência de massa no reator. Um modelo de equilíbrio populacional é, portanto, necessário ao realizar simulações de CFD para um biorreator (Sales et al., 2015). Sabe-se que vários parâmetros operacionais afetam a transferência de massa num biorreator. Estes incluem velocidade do impulsor, taxa de fluxo de entrada de gás e retenção de gás.

Com o aumento de fases presentes num biorreator, maior a complexidade do processo e também a capacidade matemática necessária para o resolver. Por esse motivo é necessário selecionar um *software* capaz e em permanente melhoria, oferecendo ao utilizador modelos que respondam aos problemas da vida real da forma mais correta e completa possível. O *software* da ANSYS Fluent, também referido como apenas Fluent, é, como se verificou anteriormente, um dos softwares mais utilizados no mundo, sendo capaz de oferecer múltiplas respostas ao utilizador. Além de ser um dos *softwares* mais completos do mercado, oferece versões gratuitas, ainda que limitadas a um determinado número de células. O Fluent foi o *software* escolhido para o estudo presente.

3.3 Software a ser utilizado

3.3.1 ANSYS

O benefício de utilizar CFD é que este método converte equações diferenciais parciais (que governam os problemas) em conjuntos de equações algébricas e problemas em função do tempo em equações diferenciais ordinárias, que são mais simples de resolver. Este método é considerado um processo de três passos. O primeiro passo é o pré-processamento onde se impõem as condições de fronteira, outros *inputs* e onde se gera a malha. O segundo passo é a solução para certas variáveis e pontos e o terceiro é chamado pós-processamento e inclui

a visualização e interpretação de resultados (Kalra & Mashuq-Un-Nabi, 2018). Os *softwares* atuais dispõem de modelos matemáticos que descrevem o problema físico a tratar, sendo que o processo fica facilitado. Estes passos estão esquematizados na Figura 3-2.

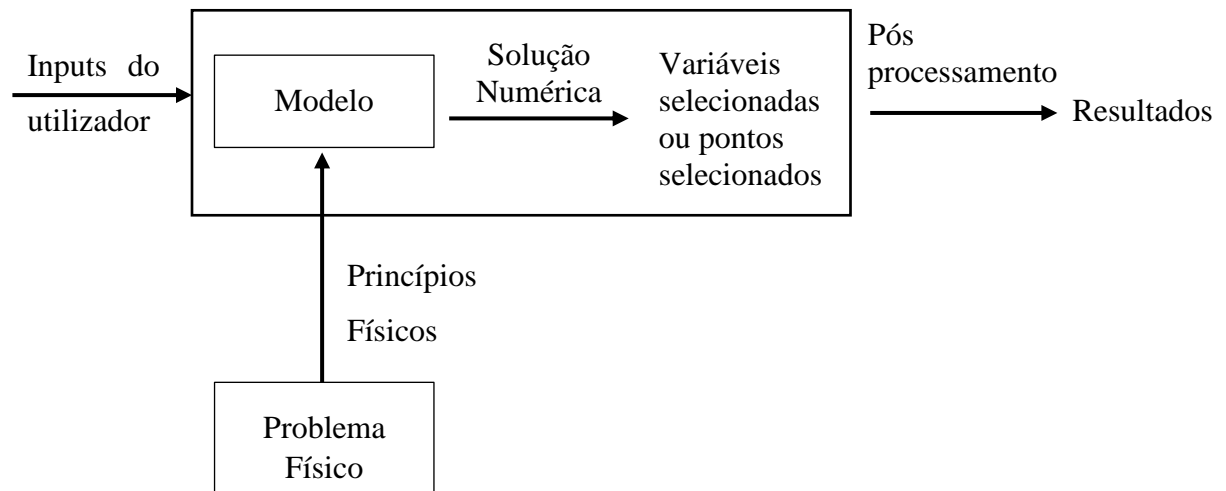


Figura 3-2 – Esquema do processo de modelação matemática

O *software* ANSYS Fluent apresenta diversos tipos de modelos para resolver problemas de escoamento de fluidos, sejam turbulentos ou laminares, compressíveis ou incompressíveis, e sejam análises transientes ou estacionárias. Para qualquer escoamento, o ANSYS Fluent resolve as equações de conservação de massa e momento. Adicionando outras equações dependendo do problema a tratar. No caso de se tratar de um escoamento multifásico, por exemplo, é necessário adicionar equações de transporte.

3.3.2 Modelos da ANSYS a utilizar

O problema físico que se pretende estudar é o escoamento de fluidos num biorreator de agitação com aspersão de ar em que os diversos tipos de fluidos, no caso simplificados para dois, água e ar (modelo multifásico), estão sujeitos a uma rotação por dois impulsores (modelo de múltiplos referenciais móveis (*MRF*)), que geram turbulência no escoamento (modelo turbulento). O problema original não simplificado trataria uma produção de bactérias *E. coli*, o que tornaria necessário a adição de um modelo de transporte de espécies.

Modelo de Turbulência

Dentro dos modelos de turbulência, podem ser encontrados vários submodelos, como o modelo de *Spalart-Allmaras*, *Large Eddy Simulation*, modelo de tensão de Reynolds (RSM) e, entre outros, o modelo $k - \varepsilon$ padrão (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

No Fluent o modelo $k - \varepsilon$ padrão, entra na classe de modelos de turbulência de duas equações (escala de comprimento de turbulência e de tempo). Tornou-se um dos modelos

mais utilizados para o cálculo de escoamentos, devido à sua robustez, economia e exatidão razoável para um grande número de escoamentos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). Foi também o modelo escolhido para o cálculo do presente estudo. O modelo padrão $k - \varepsilon$ é um modelo baseado em equações de transporte padrão para a turbulência, energia cinética (k) e a sua taxa de dissipação (ε). A equação de transporte padrão para k é derivada da equação exata, enquanto a equação de transporte padrão para ε é obtida utilizando um raciocínio físico e tem pouca semelhança com a sua contraparte matematicamente exata. Na derivação deste modelo, a suposição é de que o fluxo é totalmente turbulento e os efeitos de viscosidade molecular são insignificantes. O modelo padrão $k - \varepsilon$ é, portanto, válido apenas para escoamentos totalmente turbulentos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Equações de transporte para o modelo padrão $k - \varepsilon$

A energia cinética turbulenta k , e a taxa de dissipação ε são obtidas respetivamente através das equações (3.12) e (3.13) de transporte (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

$$\frac{\partial}{\partial t}(pk) + \frac{\partial}{\partial x_i}(pk u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + G_k + G_b - \rho \varepsilon - Y_M + S_k \quad (3.12)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(p\varepsilon) + \frac{\partial}{\partial x_i}(p\varepsilon u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} (G_k + C_{3\varepsilon} G_b) - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} + S_\varepsilon \quad (3.13)$$

Nestas equações, G_k representa a geração de energia cinética de turbulência devido aos gradientes de velocidade média. G_b é a geração de energia cinética de turbulência devido à flutuabilidade. Y_M representa a contribuição da flutuação de dilatação em turbulência compressível para a taxa de dissipação global. $C_{1\varepsilon}$, $C_{2\varepsilon}$, $C_{3\varepsilon}$ são constantes. σ_k e σ_ε são os números turbulentos de Prandtl para k e ε respetivamente. S_k e S_ε são termos definidos pelo utilizador.

A viscosidade turbulenta μ_t é calculada pela combinação de k e ε , representada na seguinte equação (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

$$\mu_t = \rho C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon} \quad (3.14)$$

Onde C_μ é uma constante.

As constantes do modelo $C_{1\varepsilon}$, $C_{2\varepsilon}$, C_μ , σ_k e σ_ε têm os seguintes valores por defeito de software:

$$C_{1\varepsilon} = 1,44, C_{2\varepsilon} = 1,92, C_\mu = 0,09, \sigma_k = 1,0 \text{ e } \sigma_\varepsilon = 1,3$$

Modelo multifásico

Na resolução de problemas multifásicos, é necessário numa primeira fase entender os regimes que melhor se aplicam. O Fluent apresenta dois tipos de abordagem possíveis, Euler-Lagrange e Euler-Euler (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). Na abordagem Euler-Euler, as diferentes fases são tratadas matematicamente como se estivessem continuamente interpenetradas, sendo as suas proporções determinadas pela fração volúmica. As frações volúmicas assumem-se como funções contínuas no espaço e tempo. Nesta abordagem existem três modelos diferentes que podem ser utilizados: modelo Volume of Fluid (VOF), modelo de mistura e modelo Euleriano. Nos casos em que se quer trabalhar com bolhas, gotículas ou fluxos de partículas em que as frações volúmicas das fases de mistura ou dispersas excedem 10%, utilizam-se os modelos de mistura ou o Euleriano (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

No caso de estudo do presente trabalho, é utilizado o modelo Euleriano, cujos pressupostos são os seguintes (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

- Uma única pressão é aplicada para todas as fases;
- As equações de momento e continuidade são resolvidas para cada fase;
- Alguns parâmetros como temperatura, tensões de corte e viscosidade, são possíveis de serem calculadas para cada fase granular;
- Coeficientes de atrito para várias interfases estão disponíveis;
- Todos os modelos de turbulência $k - \varepsilon$ e $k - \omega$ estão disponíveis para cada fase ou para a mistura.

As limitações deste modelo são (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

- O modelo turbulento da tensão de Reynolds não está disponível por fase;
- O rastreio de partículas interage apenas com a fase primária;
- As direções das correntes que ocorrem em escoamentos periódicos não podem ser modeladas, se com base em taxas de fluxo de massa específica (pode especificar-se uma queda de pressão);
- Escoamentos invíscidos não são permitidos;
- Derretimento e solidificação não são permitidos;
- Ao rastrear partículas em paralelo, o *Discrete Phase Model* (DPM) não pode ser usado se a opção de memória compartilhada estiver ativada.

Neste modelo incorpora-se o conceito de fração volúmica de cada fase, que representa o espaço ocupado por cada uma, e as leis de conservação de massa e momento. As equações

de massa, momento e energia são posteriormente tratadas individualmente nos casos em que as fases são fluídos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Para o cálculo de transferências de massa, momento e energia nas interfaces entre fases, para fases não granulares, o Fluent computa a área interfacial de uma das seguintes formas (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

- Utilizando uma equação de transporte para a concentração de área interfacial, permitindo a distribuição de diâmetros de bolhas e os efeitos de coalescência/quebra.
- Utilizando uma relação algébrica entre um diâmetro de bolha específico e a concentração de área interfacial.

A troca de momento entre fases baseia-se no valor de coeficientes de troca entre fluido-fluido (cuja fase secundária se assume de forma geral na forma de bolhas ou gotas). O cálculo desse coeficiente depende de uma função de atrito com um coeficiente de atrito específico para cada problema. Para descrever o melhor possível cada problema, o Fluent dispõe de 7 modelos de atrito (*Schiller and Naumann Model*, *Morsi and Alexander model*, *Symmetric Model*, *Grace et al. Model*, *Tomiyama et al. Model*, etc). Apesar de o modelo Schiller and Naumann ser um modelo geral, que pode ser utilizado para qualquer par de fases fluido-fluido, os modelos de *Grace* e *Tomiyama et al.*, são aplicáveis em domínios em que a fase secundária de bolhas pode assumir várias formas, sendo por isso modelos bastante utilizados no cálculo de modelos multifásicos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). O modelo de Grace foi no entanto, o escolhido para o cálculo.

O Fluent pode incluir forças de ascensão nas partículas/bolhas/gotas, que ocorrem devido aos gradientes de velocidade da primeira fase. Esta força só se torna relevante quando aplicada em cálculos com tamanhos de partículas grandes, sendo que se torna insignificante no caso oposto (comparando com as forças de atrito) (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). Também a força de *Wall Lubrification*, utilizada para escoamentos em que estão presentes fases secundárias com bolhas, o efeito de *wall lubrication force* pode ser aplicado, com o objetivo de reproduzir os efeitos de escorregamento junto às camadas limites das paredes (ou seja, obrigando o afastamento das bolhas da parede). Os modelos que melhor descrevem este acontecimento são *Antal et al*, *Tomiyama*, *Frank* e *hosokawa* (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). A força de dispersão turbulenta que é geralmente aplicável apenas em problemas que incluem fervura. A Força mássica virtual é aplicável quando a fase secundária sofre uma aceleração relativamente à primeira fase, fazendo com que a primeira fase exerça uma força mássica virtual sobre as partículas. No entanto, é apenas significativa quando a densidade da segunda fase é muito inferior à densidade da primeira

fase (como por exemplo numa coluna de bolhas transiente) (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Modelo de Múltiplos Referenciais Moveis

O Fluent resolve as equações de fluxo de fluido e transferência de calor, por defeito, numa janela de referência estacionária (inercial). No entanto, existem muitos problemas em que é vantajoso resolver estas equações num referencial móvel, como por exemplo quando se quer tratar problemas com laminas rotativas, impulsores ou paredes móveis. O fluxo em torno dessas partes móveis é o fluxo de interesse. Se se estudasse o caso a partir de janelas estacionárias, o problema seria instável, enquanto que com janelas móveis o fluxo em torno da parte móvel pode ser estudado como estacionário, relativamente à janela móvel (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Para muitos problemas, é possível tratar o domínio computacional inteiro com apenas um referencial móvel (SRF). No entanto, para geometrias mais complexas é necessário utilizar múltiplos referenciais móveis (MRF), como é o caso do estudo de biorreatores com agitação mecânica. Também se poderia utilizar o modelo de planos de mistura ou ainda o modelo de malha deslizante (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). No caso de estudo presente, que inclui várias partes móveis é necessário partir o modelo em diferentes zonas de células (fluidas ou sólidas), limitando as diferentes interfaces. Com as zonas separadas (zonas que contém os componentes móveis e zonas estacionárias) é possível recorrer às equações apropriadas para cada uma.

De acordo com a aplicação das equações na interface, existem diferentes abordagens suportadas pelo *software* (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013):

- Múltiplos Referenciais Móveis
 - Múltiplos Referenciais
 - Modelo de Plano de mistura
- Modelo de Malha deslizante

Ambas as abordagens dos modelos de múltiplos referenciais e de plano de mistura são aproximações de estado estacionário e diferem principalmente na maneira em que as condições nas interfaces são tratadas. A abordagem do modelo de malha deslizante é por outro lado, inerentemente transiente, devido ao movimento da malha com o tempo (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

O modelo MRF é talvez o mais simples das duas abordagens para zonas múltiplas. É uma aproximação de estado estacionário no qual zonas de células individuais podem ser

atribuídas a diferentes rotações e / ou velocidades de translação. O fluxo em cada zona de célula móvel é resolvido utilizando as equações do referencial móvel. Se a zona for estacionária ($\omega=0$), as equações reduzem-se às suas formas estacionárias.

Nas interfaces entre as zonas de células, uma transformação do referencial local é executada, para permitir que as variáveis do fluxo de uma zona sejam usadas para calcular fluxos no limite da zona adjacente. É de notar que a abordagem MRF não tem em conta o movimento relativo de uma zona móvel em relação às zonas adjacentes (que podem estar em movimento ou não) (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). Apesar da abordagem MRF ser apenas uma aproximação, pode providenciar um modelo razoável do fluxo de variadas aplicações. Por exemplo, o modelo MRF pode ser usado para aplicações de turbomáquinas nas quais a interação rotor-estator é relativamente fraca, e o fluxo é relativamente simples na interface entre as zonas móveis e estacionárias. Em tanques de mistura, desde que as interações do impulsor-defletor sejam relativamente fracas, os efeitos transientes em grande escala não estão presentes e assim o modelo MRF pode ser usado (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013). Outro uso potencial do modelo MRF é calcular um campo de fluxo que pode ser usado como condição inicial para um cálculo de malha deslizante transitória. Isso elimina a necessidade de um cálculo de inicialização (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

No caso do biorreator em estudo, existem dois conjuntos de pás diferenciadas no impulsor. Essa característica implica a existência de dois referenciais móveis, havendo no total três domínios: um domínio estacionário composto pela zona estacionária comum, à volta dos domínios de rotação, que existem separadamente para cada conjunto de pás, como se exemplifica na Figura 3-3 (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

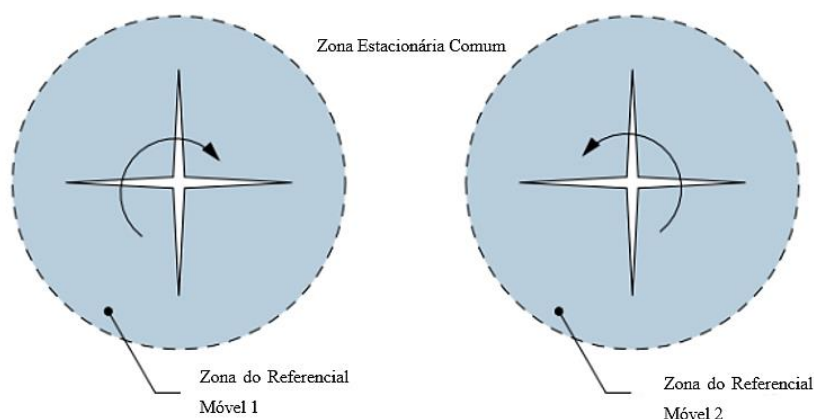


Figura 3-3 – Formulação dos Referenciais para impulsores duplos (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013)

A fórmula do modelo MRF aplicada às interfaces depende da formulação da velocidade que está a ser utilizada. O tratamento da interface aplica-se à velocidade e aos gradientes de

velocidade, uma vez que essas quantidades de vetor se alteram com as alterações no referencial (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Quantidades escalares, como temperatura, pressão, densidade, energia cinética turbulenta e etc., não necessitam de nenhum tratamento especial e por isso são calculados localmente sem alterações (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

Na implementação do modelo MRF do ANSYS Fluent, o domínio de cálculo é dividido em subdomínios, cada um dos quais pode estar a girar e/ou a traduzir o movimento relativamente ao referencial inercial. As equações governantes em cada subdomínio são escritas com relação ao referencial desse subdomínio (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

3.4 Metodologia de Simulação

Como referido no início deste trabalho, pretende-se desenvolver um modelo de simulação que permita o estudo de alguns parâmetros do biorreator. Uma vez que o modelo foi realizado recorrendo ao *software* Fluent da ANSYS, apresenta-se na Tabela 3.1 a estrutura do procedimento de simulação. São enunciados os passos tidos na simulação e a ferramenta utilizada para a sua realização.

Todas as ferramentas apresentadas fazem parte do *software* ANSYS e os exemplos de cada um destes passos será apresentado no capítulo seguinte.

Tabela 3.1 – Estrutura do procedimento de simulação

| Fases | <i>Software</i> |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Modelação | Design Modeler |
| Discretização de Superfície | Mesh Modeler |
| Malha | Mesh Modeler |
| Modelação Física | Fluent |
| Condições de fronteira | Fluent |
| Simulação do escoamento | <i>Solving</i> do Fluent |
| Pós-processamento | <i>Postprocessing</i> do Fluent |

Na realização de qualquer modelação matemática é importante entendermos o processo iterativo necessário para a obtenção de resultados satisfatórios. É também necessário compreender que existem diversos passos a realizar que detêm uma determinada ordem.

Na Figura 3-4, mostra-se um fluxograma do sentido lógico a ter neste tipo de processos. Após a modelação geométrica do problema a tratar, gera-se uma malha com os elementos mais adequados à geometria e de seguida avalia-se a sua qualidade. Se a qualidade for aceitável procede-se para a modelação física, se não for aceitável volta a alterar-se os seus parâmetros.

Após a modelação física, definem-se as condições de fronteira e realiza-se a simulação com os algoritmos desejados. Se o resultado convergir e for aceitável, procede-se para o pós-processamento e guarda-se o projeto, caso contrário é necessário alterar a modelação física ou os parâmetros da malha novamente.

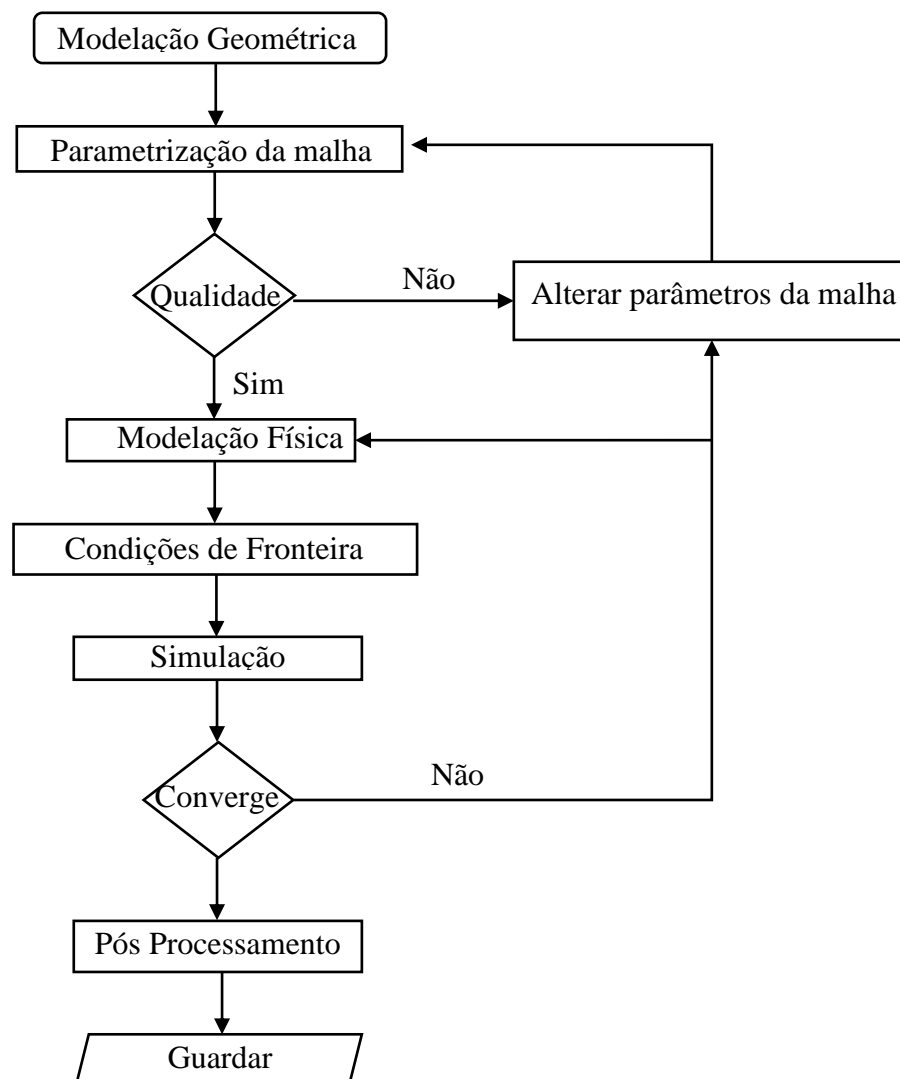


Figura 3-4 – Fluxograma do processo em CFD

3.5 Caso de Validação

Um dos problemas mais complexos da dinâmica de fluidos é o estudo de escoamentos multifásicos. Numa análise inicial simplificada, com o intuito de se observar e entender este tipo de problemas, podem-se fazer estudos de duas fases.

Olhando ao caso de estudo apresentado no capítulo 4, podem destacar-se duas fases presentes no biorreator, água líquida e ar em forma de bolhas que ascendem pelo meio líquido. Para verificar a aplicabilidade do modelo Euleriano, descrito no capítulo 3.3, a este tipo de problemas, recorreu-se a um artigo, presente no “Mechanical Engineering Research Journal”, publicado em Março de 2015, com o nome “A single Air Bubble Rise in Water: A CFD Study” (Islam et al., 2015). Esta publicação trata precisamente a ascensão de uma bolha de ar através de água líquida estagnada, (cujas propriedades podem ser verificadas na Tabela 3.2, através do modelo VOF em ANSYS Fluent, sendo por isso um documento capaz de validar comparativamente o método que se pretende aplicar.

O modelo VOF, é um dos três modelos propostos pelo *software* Fluent na resolução de problemas multifásicos que se inserem nas metodologias de Euler-Euler. Este modelo, que trabalha segunda uma técnica de rastreio de superfície numa malha Euleriana fixa, pode tratar dois ou mais fluidos imiscíveis e a zona de interesse é a interface entre eles. O artigo trata um modelo de combinação VOF com Level-Set, para 2 fases Eulerianas. O método de Level-Set é, tal como o VOF, uma técnica de rastreio de superfície, que trabalha superfícies complexas, através da função de Level-Set que consegue obter superfícies mais lisas e contínuas, fazendo com que os seus gradientes espaciais possam ser calculados com maior precisão e por isso obtendo resultados na interface das bolhas mais exato.

Tabela 3.2 – Propriedades dos fluidos em estudo

| Fase | Massa volúmica (kg/m ³) | Viscosidade (Pa.s) | Tensão Superficial entre fases (N/m) |
|------|-------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Água | 998,2 | 0,001 | 0,0728 |
| Ar | 1,225 | 1,78e-5 | |

O artigo utilizado pretende estudar o comportamento de três bolhas de ar de tamanhos diferentes (3 mm, 4 mm e 5 mm) num meio de água líquida estagnada, em dois tipos de geometria diferentes, quadrangular e trapezoidal. Para simplificação do estudo, serão apenas realizadas as análises para a bolha, que se assume ser circular, com um diâmetro de 3 mm, presente numa geometria quadrangular, de dimensão 100 mm x 50 mm.

A bolha em questão foi modelada no *Design Modeler* e parte da posição inicial de 10 mm no eixo x, e 25 mm no eixo y, como se pode verificar na Figura 3-5.

O modelo VOF resolve as equações de continuidade e de momento onde se inclui: o modelo de Força de Superfície Contínua (CSF), a função de fração volúmica para o estudo de interfaces recorrendo ao algoritmo *Piecewise Linear Interface Construction* (PLIC) e a função Level-Set. A massa volúmica e viscosidade para cada fluido são constantes, uma vez que se assume um fluido incompressível.

Relativamente às condições de fronteira, impôs-se às paredes laterais e inferior condições de *no slip walls* e à parede superior, uma condição de pressão de saída. A pressão de trabalho define-se como sendo igual à pressão ambiente e estabeleceu-se uma força gravitacional de $9,81 \text{ m/s}^2$ na direção $-y$.

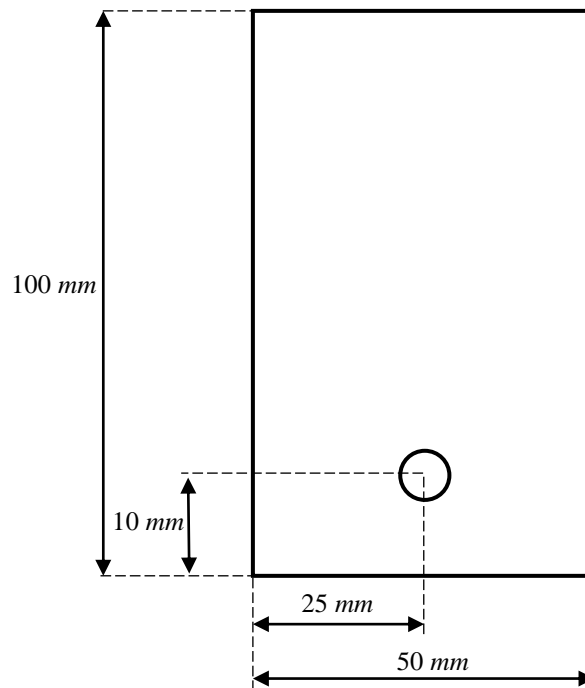


Figura 3-5 – Geometria utilizada no artigo para validação

Nas definições da solução para as equações de escoamento, foram utilizados os esquemas *upwind* de segunda ordem. Para a resolução do acoplamento pressão-velocidade foi utilizado o algoritmo *pressure implicit with splitting operators* (PISO). Para a resolução da pressão foi utilizado o esquema *body force weighted*, e ainda aplicado um tratamento de *implicit body force* para melhorar a convergência da solução. No cálculo da solução foi definido um *time step* de 0,0001 s para resultar num número de Courant de 0,25. Na Tabela 3.3 é possível verificar os passos dados para satisfazer as condições acima referidas.

Tabela 3.3 – Passos para satisfazer as condições utilizadas no artigo a validar

| | Artigo | Validação |
|------------------------|-----------------------|--|
| Método | VOF + Level-Set + CSF | PMM* VOF + Level-Set |
| Interfaces | PLIC | PMM* Explicit Formulation SSM* Volume Fraction: Geo Reconstruct |
| Equações de escoamento | 2order upwind-scheme | SSM* 2order upwind-scheme |
| Algoritmo | PISO | SSM* Scheme: PISO |
| Esquema de pressão | Body Force weighted | SSM* Pressure: Body Force Weighted |
| Tratamento de pressão | Implicit body force | PMM* Implicit Body Force |
| Time step | 0,0001 | SRC* Time Step: 0,0001 |
| Número de Courant | 0,25 | PMM* Courant Number: 0,25 |

PMM*: Models->Multiphase Model; SSM*: Solution ->Solution Methods; SRC*: Solution ->Run Calculation

Na Figura 3-6, é possível verificar a qualidade excelente da malha conseguida pelo artigo em estudo, com detalhe da malha da bolha e meio ao seu redor. No artigo não é feita nenhuma referência ao método utilizado para obtenção da malha ou ao modo como é conseguida uma delimitação tão precisa da circunferência representante da bolha.

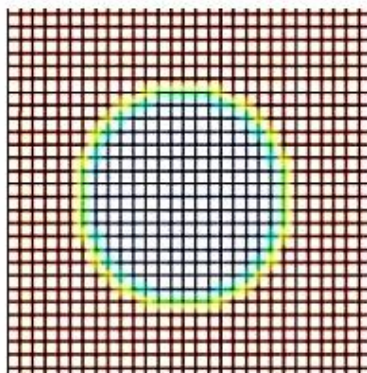


Figura 3-6 – Malha do artigo para validação com zoom na bolha (Islam et al., 2015).

De seguida, descreve-se o processo iterativo realizado desde a geometria, passando pela malha utilizada, modelação física, condições de zona e de fronteira, parâmetros de simulação, parâmetros de cálculo, até às definições de pós-processamento, para obtenção de resultados satisfatórios quando comparados aos referidos no artigo e acima mencionados.

A geometria do modelo foi definida no *Design Modeler* do ANSYS, de acordo com o referido anteriormente e esquematizado na Figura 3-5. Para isso foram explorados três processos, um primeiro onde se utilizaram as fronteiras geométricas para definição de diferentes superfícies, um segundo onde se utilizou a sobreposição de superfícies e um

terceiro onde apenas se definiu um retângulo, sendo que a bolha foi definida posteriormente em simulação.

a) No primeiro caso, representado na Figura 3-7, foi desenhado um retângulo com uma circunferência originando duas áreas diferentes e utilizando a função *surface from sketch* converteu-se a zona retangular sem a área circunferencial numa superfície representada a cinzento na figura. A área circunferencial, representativa da bolha, foi convertida em superfície através da função *surface from edge*. Para que houvesse ligação entre as duas superfícies ambas foram transformadas numa única parte, recorrendo à ferramenta *form new part from bodies*.

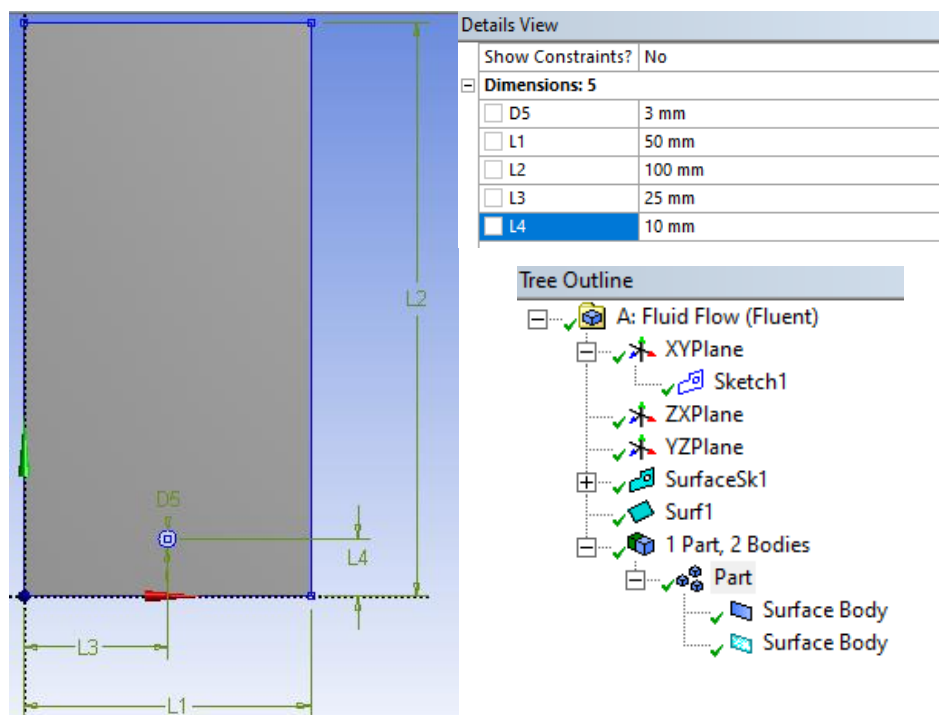


Figura 3-7 – Modelação de geometria do caso de estudo utilizando fronteiras geométricas para definição das superfícies.

b) No segundo caso, representado na Figura 3-8, foram desenhados um retângulo e uma circunferência em planos diferentes, originando duas áreas diferentes. Utilizando a função *surface from sketch* converteram-se as duas zonas, retangular e a circunferencial em duas superfícies diferentes. Para que houvesse ligação entre as duas superfícies ambas foram transformadas numa única parte, recorrendo à ferramenta *form new part from bodies*.

c) No terceiro caso, modelou-se apenas o rectângulo e recorrendo-se à função *surface from sketch* originou-se a superfície.

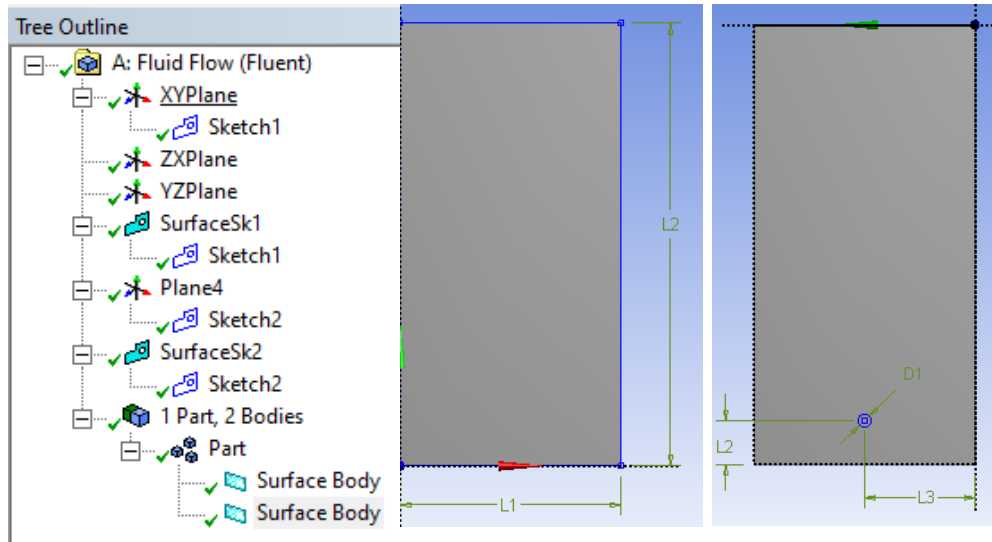


Figura 3-8 - Modelação de geometria do caso de estudo utilizando sobreposição de superfícies.

A definição da malha é um dos pontos que mais influencia os resultados finais das simulações, tendo sido por isso um passo no qual se dispensou bastante tempo. Os FEM dividem geometrias complexas em pequenos elementos que são resolvidos em função de cada um. De forma sucinta são enumerados, na Figura 3-9, os tipos de elementos que se podem determinar numa malha, nomeadamente para 1D (segmentos lineares), 2D (triangulares e quadrilaterais) e 3D (piramidais, tetraédricos, hexaédricos e prismas).

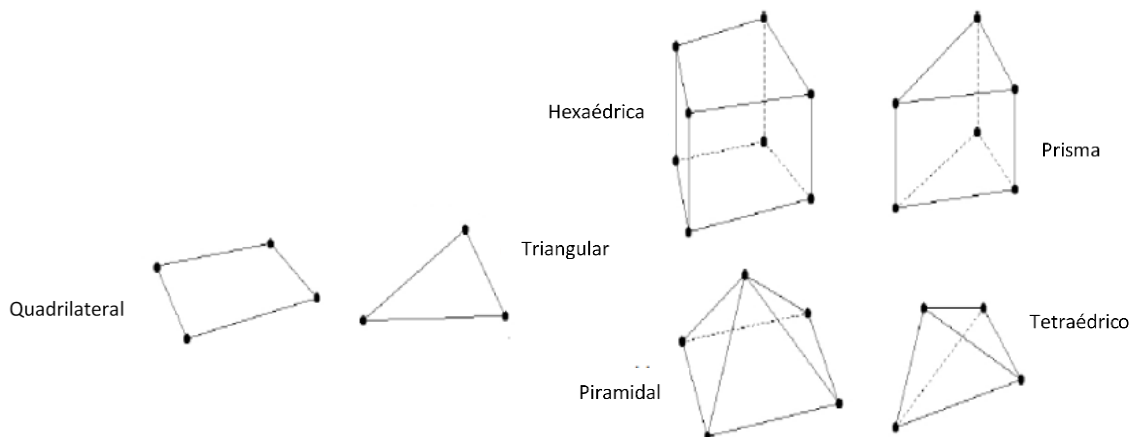


Figura 3-9 – Tipos de elementos de malha (Kalra & Mashuq-Un-Nabi, 2018)

Na tentativa de se conseguir uma malha com qualidade admissível, utilizaram-se vários métodos, de acordo com as geometrias acima definidas. É possível verificar, na Figura 3-10, para uma malha com método de zonas múltiplas quadrilaterais ou triangulares, elementos lineares e ainda com um elemento de malha quadrado de $2,5 \text{ mm}$, a diferença entre os três casos estudados (a, b e c). No primeiro caso, Figura 3-10-a., em que se utilizaram as fronteiras

geométricas para definição de diferentes superfícies e se uniram os dois corpos numa parte, percebe-se que existe uma continuidade da malha entre superfícies, e, por haver uma adaptação da malha à geometria da bolha, esta apresenta irregularidades, que podem ser determinantes no bom funcionamento da simulação. No segundo caso, Figura 3-10-b, onde se utilizou a sobreposição de superfícies, é possível verificar também a sobreposição das malhas (elementos estruturados sob elementos destrutturados). Percebe-se que não existe qualquer adaptação da malha envolvente à bolha, havendo por isso uma delimitação bem definida da mesma (risco branco). Apesar da qualidade e uniformidade da malha da geometria retangular, este caso resulta num deslocamento da bolha nulo, uma vez que não existe qualquer ligação entre superfícies. Finalmente no terceiro caso, em que foi modelada apenas a geometria representante do tanque, Figura 3-10-c., uma vez que se trata de uma geometria retangular consegue obter-se elementos quadrilaterais estruturados, sendo por isso uma qualidade de malha excelente, sendo que posteriormente se faz uma adaptação geométrica à zona da localização inicial da bolha, recorrendo à ferramenta *region adaption*, como anteriormente referido. Pode verificar-se que não existe uma adaptação da malha envolvente à bolha, e que não se consegue uma geometria circular. No entanto, uma vez que a malha representante da bolha está em perfeitas condições e não existe separação entre superfícies, estimou-se que esta seria a malha com melhores resultados. Para o estudo seguinte procedeu-se com o primeiro e terceiro caso, tendo-se automaticamente excluído o segundo. Em nenhuma das tentativas/estudos se conseguiu obter uma malha como referido e mostrado no artigo em estudo.

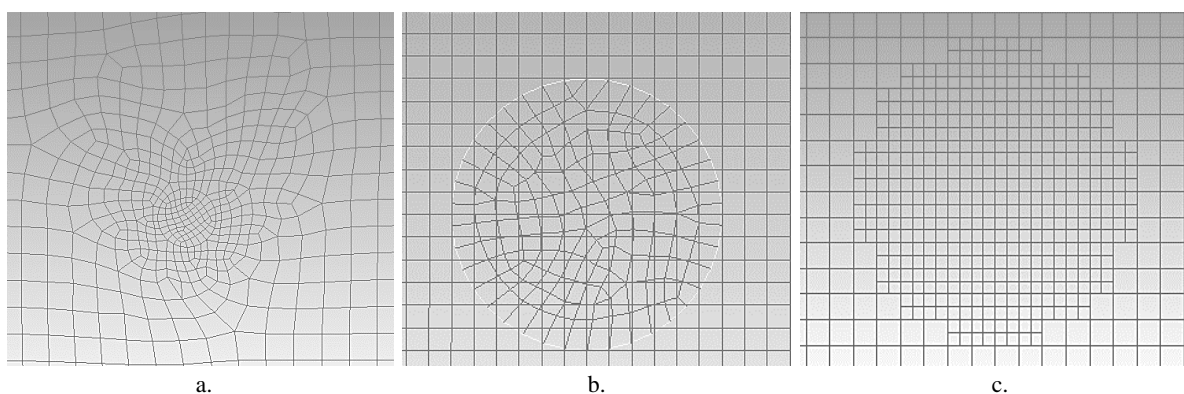


Figura 3-10 – Malha na fronteira DesignModeler

Para a continuação descritiva dos passos dados, de entre cerca de 100 simulações, reuniram-se um conjunto de 16 simulações com as decisões mais importantes dadas e com os resultados relativamente à posição/tempo da bolha, para a escolha final de um método.

Atendendo à Tabela 3.4 e à Tabela 3.5, verifica-se que após a determinação de todos os parâmetros definidos no estudo do artigo, a simulação que apresenta melhores resultados é a 9 (última linha da tabela, tempo de ascensão). Apesar do tempo menor de ascensão da bolha até ao topo ser o apresentado na simulação 13, a bolha foi formulada com recurso à ferramenta de *region adaption*, (não mencionada na bibliografia) que não tem em consideração os algoritmos que o modelo VOF proporciona à geometria. Além disso, essas simulações foram realizadas para um esquema da *Level-set function* de primeira ordem, contrariando o artigo. Por esse motivo, para a continuação da apresentação do modelo VOF, utiliza-se a simulação 9.

Após a obtenção da malha, mostrada na Figura 3-10-a., deu-se continuação ao processo no Fluent e avaliou-se a qualidade da malha como mostra a Figura 3-11

Mesh Quality:

```
Minimum Orthogonal Quality = 7.49633e-01
(To improve Orthogonal quality , use "Inverse Orthogonal Quality" in Fluent Meshing,
 where Inverse Orthogonal Quality = 1 - Orthogonal Quality)

Maximum Aspect Ratio = 3.66988e+00
```

Figura 3-11 – Qualidade da malha, simulação 9A VOF

A qualidade mínima ortogonal, com o valor de 0,75 está dentro da classificação de muito boa, segundo o espetro mostrado na Figura 3-12

| Skewness mesh metrics spectrum | | | | | |
|--|------------|------------|------------|-----------|--------------|
| Excellent | Very good | Good | Acceptable | Bad | Unacceptable |
| 0-0.25 | 0.25-0.50 | 0.50-0.80 | 0.80-0.94 | 0.95-0.97 | 0.98-1.00 |
| Orthogonal Quality mesh metrics spectrum | | | | | |
| Unacceptable | Bad | Acceptable | Good | Very good | Excellent |
| 0-0.001 | 0.001-0.14 | 0.15-0.20 | 0.20-0.69 | 0.70-0.95 | 0.95-1.00 |

Figura 3-12 – Espetro de qualidade de avaliação da qualidade da malha, (Mat & Asmuin, 2018).

De seguida foram seleccionadas as opções como descritas anteriormente ao longo do presente capítulo e resumidas na Tabela 3.3 e procedeu-se à simulação. Nesta simulação pôde observar-se um *zig zag* constante da bolha, tomando velocidades mais baixas relativamente às do artigo, levando a um tempo de ascensão da bolha até ao topo do tanque de 1 s, mais do dobro conseguido pelo artigo.

Tabela 3.4 – Tabela resumo das simulações mais estudadas, caso VOF (1/2)

| Nºsimulação | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
|-------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| Malha | Tamanho de Elemento [m] | 1,4e-03 | 1,4e-03 | 1,4e-03 | 1,4e-03 | 1,4e-03 | 5e-4 | 2,5e-04 | 2,50E-04 | |
| Geral | 2D Space | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | |
| | Regime | Trans. | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | |
| | Solver Type | Press. | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | |
| | Velocity Formulation | Abso | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | |
| | Gravity | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | |
| Multifásico | Type | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | |
| | Coupled Level Set + VOF | - | - | - | x | x | x | x | x | |
| | Formulation | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | |
| | Volume Fraction Cutoff | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | |
| | Courant Number | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | |
| | Body Force Formulation | - | - | x | x | x | x | x | x | |
| | Type Interface Modeling | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | |
| | Fases | 1 | Water | Water | Water | Water | Water | Water | Water | Water |
| | | 2 | Air | Air | Air | Air | Air | Air | Air | Air |
| Interaction | - | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | | |
| Viscoso | Type | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | |
| Condições de Fronteira | Parede Superior | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | |
| | Paredes Laterais e Inferior | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | |
| | Bolha | interior | interior | interior | interior | interior | interior | interior | interior | |
| | Operating Conditions Reference location | - | - | - | - | 0,1 m (y) | 0,1 m (y) | 0,1 m (y) | 0,1 m (y) | |
| Solution Methods | Scheme | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | |
| | Gradient | Least Sq | Least Squa | Least Squa | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | |
| | Pressure | Presto! | Presto! | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | |
| | Momentum | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | |
| | Volume Fraction | Geo-rec | Geo-recons | Geo-recons | Geo-reconst | Geo-reconst | Geo-reconst | Geo-reconst | Geo-reconst | |
| | Level-Set Function | - | - | - | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 2 nd order | |
| | Transient Formulation | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | |
| Solution Controls | Pressure | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | |
| | Density | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Body Forces | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Momentum | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | |
| | Level-Set Function | - | - | - | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | |
| Solution Initialization | Gauge Pressure | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | X Velocity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Y Velocity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Level-Set Function | - | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Air-phase Volume Fraction | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | air-phase - Volume - Bubble | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| Patch | Time Step Size | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | |
| Run Calculation | Nº Time Steps | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 | 100000 | |
| | Resultados, tempo [seg] | - | 0.87 | - | 1 | - | - | - | - | |

Tabela 3.5 – Tabela resumo das simulações mais estudadas, caso VOF (2/2)

| Nºsimulação | | 9 A | 9 B | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
|-------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| Malha | Tamanho de Elemento [m] | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | 2,50E-04 | |
| Geral | 2D Space | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | Planar | |
| | Regime | Trans | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | Transient | |
| | Solver Type | Press | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | Pressure | |
| | Velocity Formulation | Abs | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | Absolute | |
| | Gravity | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | 9,81 (-y) | |
| Multifásico | Type | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | VOF | |
| | Coupled Level Set + VOF | x | x | x | x | x | x | x | x | |
| | Formulation | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | Explicit | |
| | Volume Fraction Cutoff | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | 1,00E-06 | |
| | Courant Number | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | |
| | Body Force Formulation | x | x | x | x | x | x | x | x | |
| | Type Interface Modeling | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | Sharp | |
| | Fases | 1 | Water | | Water | Water | Water | Water | Water | |
| | | 2 | Air | | Air | Air | Air | Air | Air | |
| Interaction | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | 0.0728 | | |
| Viscoso | Type | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | Laminar | |
| Condições de Fronteira | Parede Superior | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | outlet | |
| | Paredes Laterais e Inferior | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | no slip | |
| | Bolha | interior | interior | interior | interior | interior | Region A4 | Region A5 | *Region A | |
| | Operating Conditions Reference location | - | - | - | - | 0,1 m (y) | - | - | - | |
| Solution Methods | Scheme | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | PISO | |
| | Gradient | Least Sq. | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | Least Squares | |
| | Pressure | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | Body F. | |
| | Momentum | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | |
| | Volume Fraction | Geo-rec | Geo-recons | Geo-recons | Geo-recons | Geo-recons | Geo-recons | Geo-recons | Geo-recons | |
| | Level-Set Function | 2 nd order | 1 st order | 2 nd order | 2 nd order | 2 nd order | 1 st order | 1 st order | 2 nd order | |
| | Transient Formulation | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | 1 st order | |
| Solution Controls | Pressure | 0,3 | 0,3 | *Flex | 0.5 *Flex | *Flex | 0.3 | *Flex | *Flex | |
| | Density | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Body Forces | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Momentum | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | |
| | Level-Set Function | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | |
| Solution Initialization | Gauge Pressure | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | X Velocity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Y Velocity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Level-Set Function | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Air-phase Volume Fraction | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | air-phase - Volume - Bubble | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| Patch | Time Step Size | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | |
| Run Calculation | Nº Time Steps | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 | |
| | Results: tempo | 1 | 1 | 1,11 | 1,11 | - | 0,61 | 0,65 | - | |

Método Euleriano

Como foi referido anteriormente, o objetivo deste trabalho é desenvolver um procedimento de simulação para um biorreator de mistura mecânica 3D, onde estará presente um domínio multifásico. Também foi mencionado anteriormente que o melhor método de cálculo para este tipo de sistemas é o Euleriano. Por esse motivo foi estudada a sua aplicação no caso tratado pelo artigo, que se pretende validar. De seguida mostram-se detalhadamente os passos dados para a obtenção de resultados satisfatórios nessa validação.

A metodologia utilizada para a obtenção da geometria rectangular foi a mesma utilizada para o processo em VOF, ou seja, a modelação de um retângulo com as dimensões pretendidas, seguido de uma malha com um *body sizing* de elemento quadrado de $2,5e-4$ mm, com uma função uniforme e um método *multizone quad/tri*, com tipos de malha das faces *quad/tri*, resultando numa qualidade de malha excelente, com uma qualidade mínima ortogonal máxima, com valor igual a 1. A bolha foi modelada a posteriori, com recurso à ferramenta *region adaption*, na simulação.

O modelo Euleriano foi definido para duas fases, com uma formulação *implicit*. As duas fases correspondem à água (primeira fase) e ao ar (segunda fase). Aquando da alteração dos materiais, é exigido neste modelo a colocação do diâmetro das bolhas a estudar, por esse motivo foi colocado o valor de 3×10^{-3} m. Os painéis de inserção dos dados acima, podem ser visualizados na Figura 3-13.

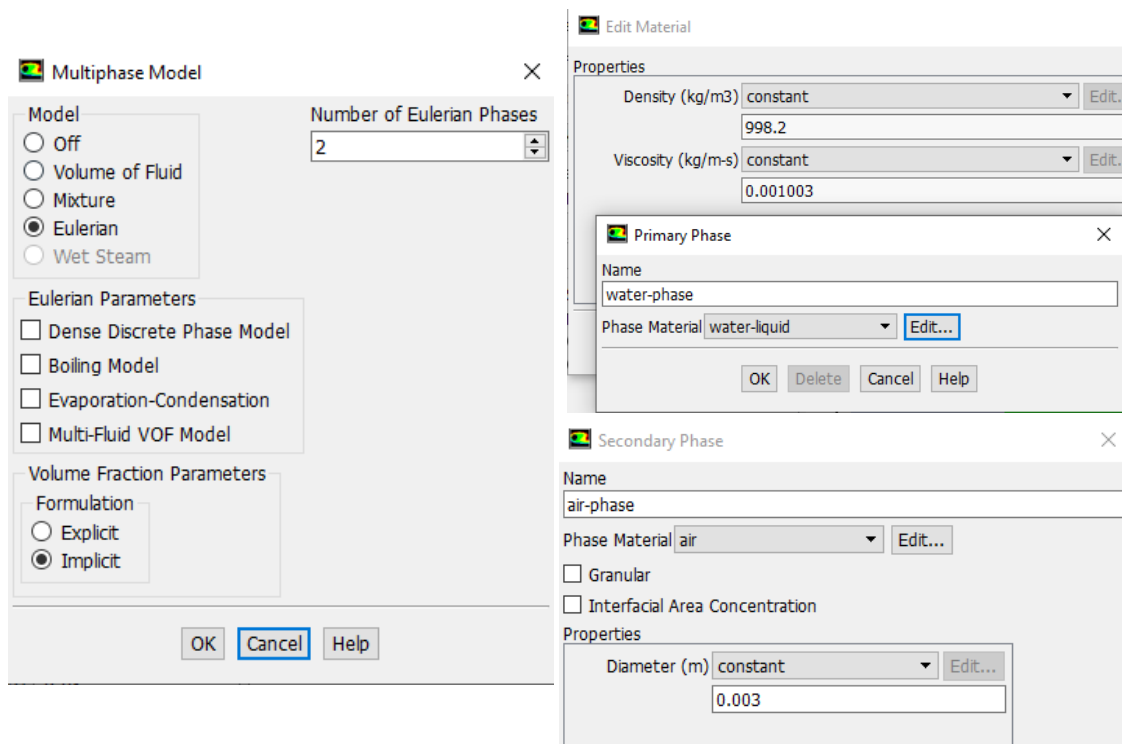


Figura 3-13 – Painel Modelo multifásico Euleriano e fases

Após a inserção dos materiais foi necessário definir as interações entre superfícies, nomeadamente o efeito de massa virtual, o coeficiente de atrito e a tensão entre superfícies. O efeito de massa virtual ocorre quando a fase dispersa é acelerada relativamente à fase contínua e tem mais significância quanto maior for o rácio entre as fases. Para escoamentos invíscidos, em que o escoamento se dá à volta de uma esfera o valor é de 0,5, no entanto não existe nenhum valor padrão para escoamentos de bolhas entre ar e água (Suh, Choi, Kim, Lee, & Joo, 2017).

O coeficiente de atrito é definido pelo modelo Grace, uma vez que este contabiliza os efeitos externos que podem deformar a bolha, aceitando que esta pode tomar outras formas que não a esférica, nomeadamente os efeitos de Reynolds, Eotvos e Morton.

Não foi atribuído um valor específico à força de impulso nem à . força de escorregamento de parede , uma vez que se admitem paredes com condições de não escorregamento.

A modelação de *surface tension* é escolhida com o modelo de *Continuum Surface Force*, com um coeficiente entre o ar e a água, de 0,0728 N/m.

Uma vez que a geometria definida foi apenas um retângulo, está-se perante três condições de fronteira, condição de fronteira de zona interior, que corresponde ao fluido e à zona 3, da Figura 3-14, condição de parede sem escorregamento, nas paredes laterais e inferior, como mostra o número 2 na mesma figura, e ainda condição de pressão de saída, que corresponde ao número 1. A zona 4 pertence à região a adaptar em simulação para a bolha.

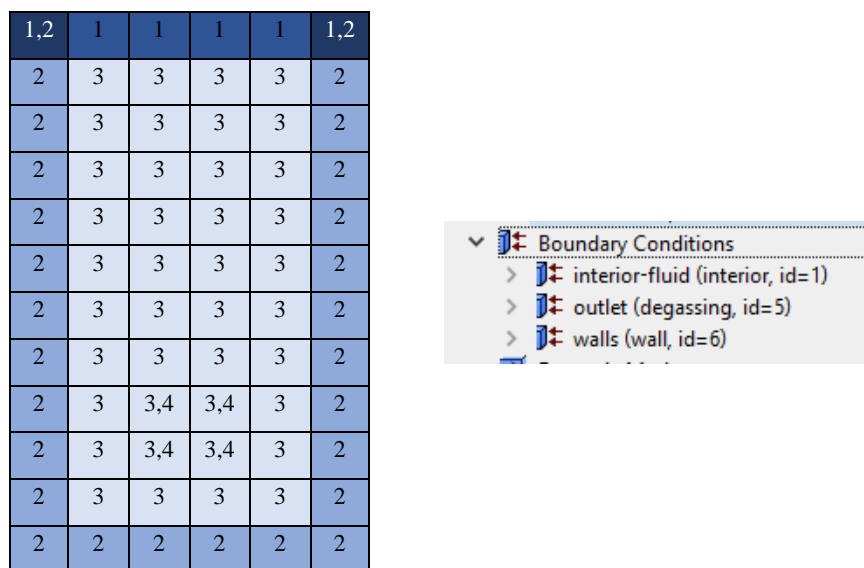


Figura 3-14 – Condições de fronteira, modelo Euleriano

Para o algoritmo de simulação foi utilizado um esquema *Coupled*, que resolve as equações de momento e com base na pressão em conjunto.

No cálculo, foi utilizado um time step de 0,0001 para 4000 *time steps*, o que equivale a 0,4s (tempo em que a bolha deveria atingir o topo da geometria).

Resultados

Após o cálculo da simulação, podemos ver, através da animação criada, a posição da bolha a cada 100 *time steps*. A partir dessas imagens e utilizando a resolução providenciada pelo *software*, foi possível calcular a posição do seu centro geométrico e para cada *step* o cálculo da velocidade.

Na Figura 3-15 está exemplificado o movimento de ascensão da bolha, (a vermelho está representada a fase líquida e a azul a fase gasosa, sendo que existe uma difusão de parte do ar para a água) desde a sua posição inicial até ao topo do tanque, tendo esta demorado 0,38s a atingi-lo, menos 0,02 s do que no artigo a validar.

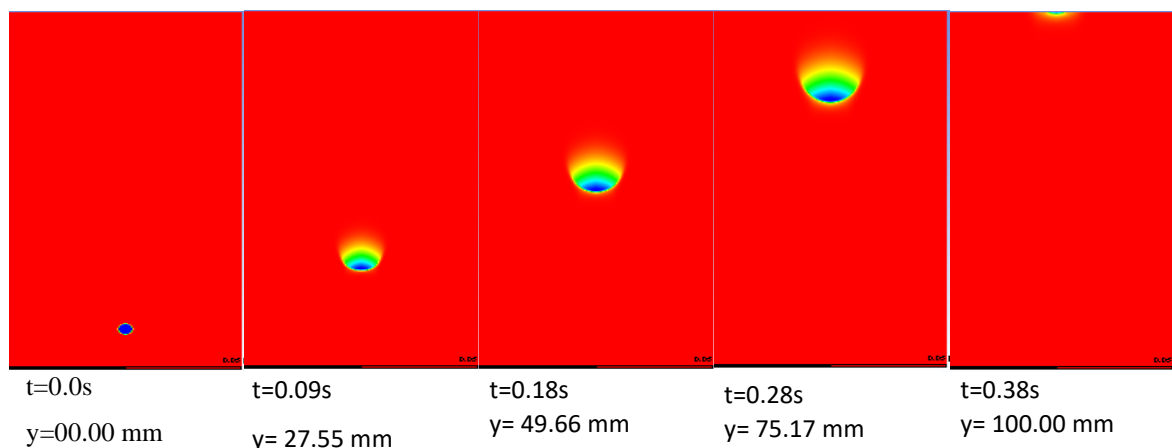


Figura 3-15 – Ascensão da bolha em 0,4s, método Euleriano

Fazendo uso de todos os pontos conseguidos pela simulação, bem como os dados inerentes a cada um, foi possível elaborar o gráfico mostrado na Figura 3-16, de velocidade (m/s). Neste gráfico é possível observar os pontos discretos e a equação aproximada da velocidade, que nos indica (tal como esperado) que a velocidade do ar neste meio comporta-se de forma exponencial, tendo um aumento acentuado nos primeiros 0,1s e após esse tempo, tende a estabilizar os seus valores, oscilando entre os 0,23 e os 0,27 m/s (em torno dos 0,25 m/s).

Esta velocidade é superior à obtida no artigo, uma vez que a velocidade do mesmo, nos primeiros 0,1 s desde a posição inicial ($v_0 = 0 \text{ m/s}$) foi de cerca de $v_{0,1} = 0,18 \text{ m/s}$, a partir da qual não se verificaram diferenças elevadas, tendo esse valor oscilado em torno dos $0,20 \text{ m/s}$.

A oscilação da velocidade da bolha de ar no meio aquoso é por isso esperada, explicada pelo próprio comportamento da bolha e também (a nível quantitativo) pelo erro associado ao método de medição.

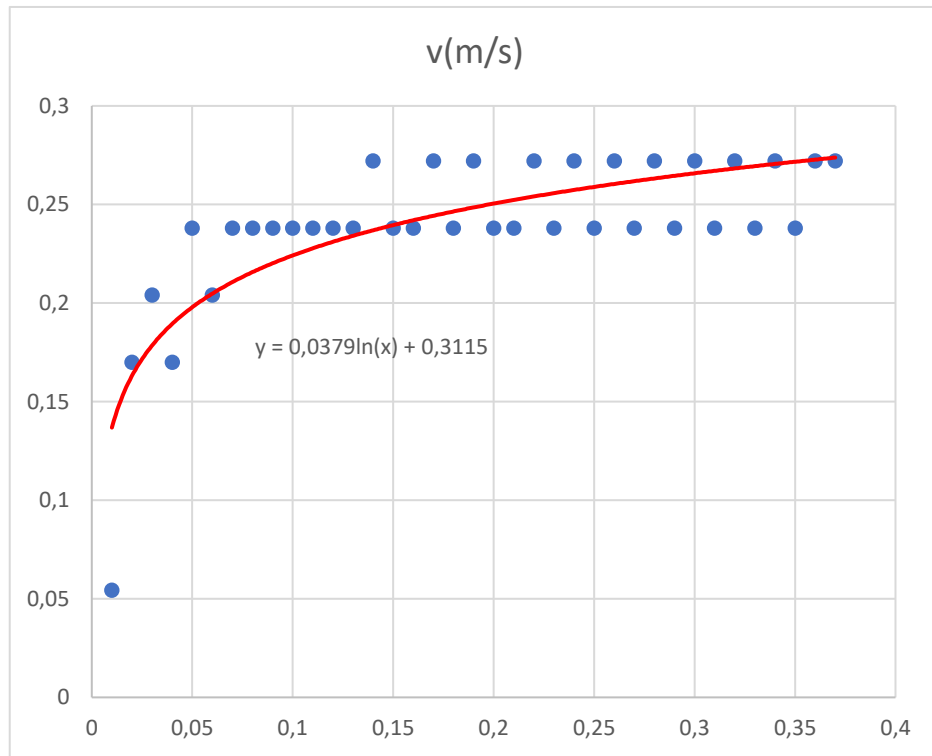


Figura 3-16 – Curva de velocidade da bolha em 0,4s, método Euleriano

4 Modelo Proposto

Neste capítulo 4 serão demonstrados o modelo utilizado e os passos dados na resolução computacional do estudo.

4.1 Influência de parâmetros isolados

O conhecimento da hidrodinâmica dos biorreatores é essencial no conhecimento do escoamento ideal do biorreator, uma vez que é fulcral obter uma mistura homogênea no mesmo. Uma má mistura resulta em zonas estagnadas ou mortas no domínio, criando gradientes no meio de trabalho e resultando num suprimento inadequado de nutrientes e oxigênio às células. Uma mistura perfeita é assim, a condição em que há uniformidade na concentração de todas as espécies ao longo do biorreator. Para assegurar a qualidade da mistura é necessário estudar os parâmetros que a influenciam como a geometria do tanque e seus acessórios, geometria das pás, distância entre impulsores, velocidades de rotação, inserção de oxigênio, entre outros (Mandenius, 2016).

Estudar esses efeitos a nível industrial representariam custos excessivos, pelo que se tentam reproduzir as condições de mistura homogênea a nível laboratorial. No entanto, esta replicação a nível laboratorial permanece um desafio para o processo de *design*, e os métodos de mudança de escala atuais podem não providenciar dados suficientemente confiáveis (Machado & Kresta, 2013). Se estes métodos fossem totalmente corretos, as condições à escala laboratorial deveriam indicar as condições exatas da operação industrial, mas isto é limitado pelas diferenças de escala de várias ordens de magnitude quer relativamente ao tempo, quer à quantidade produzida e à geometria dos equipamentos (Machado & Kresta, 2013).

A proposta de correlações adequadas entre parâmetros para determinar a mistura, por exemplo mais impulsores, configurações não padrão, misturas multifásicas e outros, são questionáveis devido ao grande número de variáveis envolvidas. O uso de correlações empíricas é então limitado, uma vez que não podem ser utilizadas na predição da evolução de homogeneização nos vários locais dentro de um biorreator, ao longo do tempo. Por estas razões têm sido desenvolvidos vários modelos que contêm o progresso da homogeneização líquida nos tanques de agitação (Jahoda, Tomášková, & Moštěk, 2009).

Qualquer estudo que envolva vários parâmetros pode ser dividido em etapas que facilitem o processo e o entendimento da influência de cada um. Neste estudo, foram determinadas três etapas chave, para a convergência da solução que podem ser visualizadas na Figura 4-1.

A primeira etapa no estudo que envolveu os métodos CFD foi o escoamento de uma única fase líquida, devido à rotação de dois conjuntos de pás, com recurso aos modelos de MRF e turbulência $k - \epsilon$. Após resultados conclusivos desse estudo, adicionou-se uma fase gasosa, com recurso a um modelo multifásico Euleriano, e reavaliou-se a fase primária líquida. Na literatura, os estudos de escoamentos multifásicos em tanques de agitação focam-se maioritariamente na fase dispersa (como as bolhas de gás), sendo que os resultados da simulação CFD da evolução temporal da homogeneização líquida, ou seja, da fase primária são apresentados raramente. Finalmente o último passo, seria realizar um estudo das condições iniciais, com os nutrientes totais e percentagem de bactéria inicial (uma vez que a partir desse ponto, em termos mássicos, não haverá alteração no meio). No entanto, por motivos de capacidade computacional não foi possível, verificando-se apenas experimentalmente e propondo-se o mesmo como trabalho futuro.

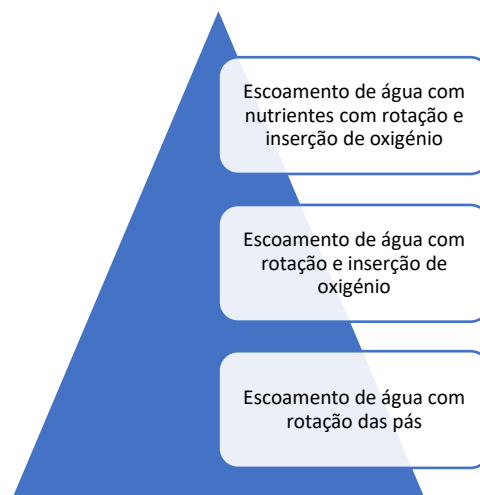


Figura 4-1– Convergência do estudo realizado

Os seguintes subcapítulos tem por base a utilização do software Fluent da ANSYS.

4.1.1 Geometria

O estudo do escoamento de um biorreator começa pela sua geometria. Para a modelação e definição das zonas de rotação (mais tarde definidas para o modelo MRF) utilizou-se o Design Modeler do Fluent. As medidas utilizadas foram as referidas no capítulo 2.2 e o resultado da modelação pode ser verificado na Figura 4-2.

A geometria representa um dos principais influenciadores nos resultados de uma boa mistura, bem como os acessórios escolhidos para cada biorreator, como por exemplo a existência de defletores ou a escolha das pás dos impulsores. No que toca à escolha de pás, apesar da utilização de impulsores Rushton, que são um dos tipos de pás mais utilizados pelo seu simples *design*, têm sido desenvolvidos outros com desempenho superior e com coeficientes de transferências de massa mais elevados (Jahoda et al., 2009). A alteração destas pás poderia ser um estudo a realizar.

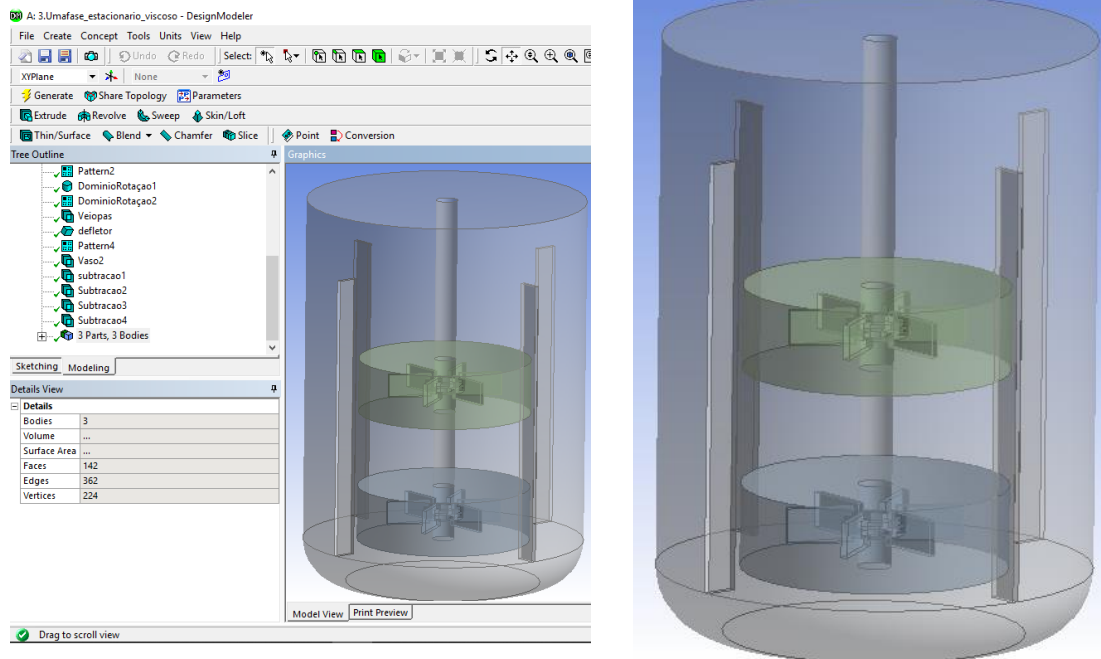


Figura 4-2 – Modelação do Biorreator

4.1.2 Malha

Dependendo da complexidade da geometria, que no caso em estudo se considera elevada, podem ser necessárias modelar malhas não estruturadas, em que as células não são uniformemente distribuídas e são geralmente tetraédricas (em casos 3D) e triangulares (em casos 2D). Apesar da exatidão da solução depender da qualidade da malha, também a capacidade computacional e o tempo são fatores a ter em conta na modelação da malha (Mandenius, 2016). No caso em estudo, após a nomeação das regiões e das faces de interesse (para facilitar a aplicação das respetivas condições associadas a cada), foi aplicado um método de elemento tetraédrico nos três corpos gerados (domínio estacionário e domínios de rotação superior e inferior) e ainda aplicadas duas regiões de contacto (uma para cada domínio de rotação), para gerar elementos de tamanho relativamente aproximados entre regiões, evitando grandes discrepâncias na malha. Relativamente às definições gerais da malha, foi definido um centro de relevância médio, com um valor de malha refinada de 50 numa gama de -100 a 100, e um *smoothing* médio, evitando o elevado tempo computacional

de geração de malha para parâmetros de qualidade elevada. A malha acima referida pode ser verificada na Figura 4-3.

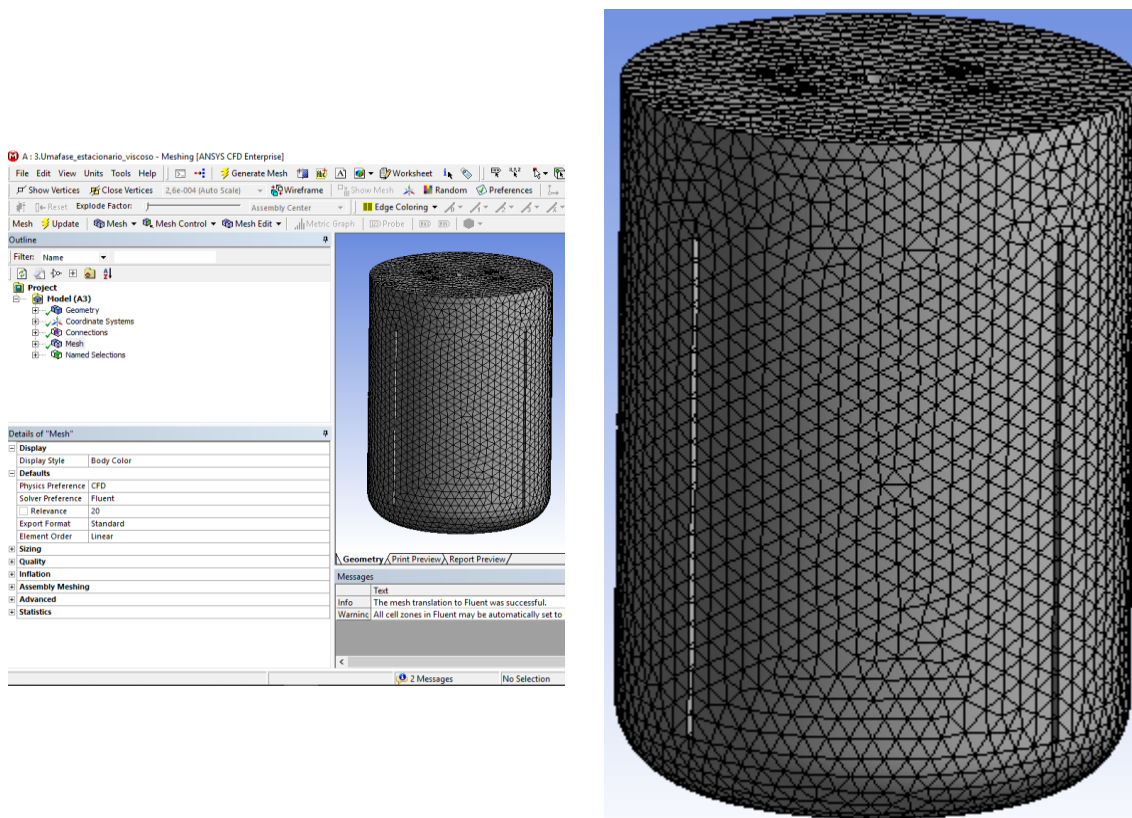


Figura 4-3 – Edição da Malha do Biorreator

A verificação da malha e qualidade respetiva, que permitirão identificar quaisquer erros antes do início da simulação, pode ser posteriormente realizada no Fluent, em *Setting Up Domain -> Mesh -> Check*.

Na verificação da malha, o ANSYS Fluent retorna os valores mínimos e máximos de x e y, e os resultados sobre o volume da malha, como demonstrado na Figura 4-4. É necessário que este volume seja positivo, para que o software consiga iniciar o cálculo (uma vez que um volume negativo indica que uma ou mais células tem uma conectividade incorreta).

```

Domain Extents:
  x-coordinate: min (m) = -6.500000e-02, max (m) = 6.500000e-02
  y-coordinate: min (m) = -6.500000e-02, max (m) = 6.500000e-02
  z-coordinate: min (m) = 0.000000e+00, max (m) = 1.800000e-01
Volume statistics:
  minimum volume (m3): 1.250000e-09
  maximum volume (m3): 5.548779e-08
  total volume (m3): 2.325231e-03
Face area statistics:
  minimum face area (m2): 1.500000e-06
  maximum face area (m2): 3.790441e-05
Checking mesh.....
Done.

```

Figura 4-4 – Definições da malha

Relativamente à malha, sabe-se que a sua qualidade está diretamente relacionada com o refinamento dos seus elementos. Existem dois parâmetros que devem ser avaliados para a satisfação da mesma: a geometria de um elemento e a sua qualidade ortogonal, mostrados na Figura 4-5. *Skewness* é o parâmetro que permite avaliar a geometria de um elemento.

Valores de *skewness* (ou ortogonalidade) devem variar entre 0 e 1, sendo que valores próximos de 0 são considerados de excelente qualidade e valores próximos de 1 de baixa qualidade. O valor mínimo de ortogonalidade não deve estar abaixo de 0,01 e o seu valor médio deverá ser bastante mais elevado. A qualidade ortogonal avalia a qualidade do elemento, em que os valores de ortogonalidade devem variar entre 0 e 1 (quanto mais baixo, pior a qualidade).

O valor obtido de 0,16 está classificado, segundo a Figura 3-12 no capítulo 3.5, na categoria aceitável. Não foi possível melhorar este parâmetro devido à complexidade da geometria e da capacidade computacional limitada.

Mesh Quality:

```
Minimum Orthogonal Quality = 1.60627e-01  
(To improve Orthogonal quality , use "Inverse Orthogonal Quality" in Fluent Meshing,  
where Inverse Orthogonal Quality = 1 - Orthogonal Quality)
```

```
Maximum Aspect Ratio = 1.98692e+01
```

Figura 4-5 – Qualidade da malha

4.1.3 Modelo turbulento com MRF

As divisões realizadas na modelação do biorreator, foram implementadas com base no modelo MRF.

Setup da simulação (Setup) da ANSYS Fluent

Numa primeira fase é necessário definir quais as unidades em que queremos trabalhar e visualizar os resultados. No ANSYS Fluent é possível trabalhar em qualquer sistema de unidades, que se podem definir da seguinte forma:

Setting Up Domain -> Mesh -> Units

Na resolução deste problema (e como é objetivo estudar o impacto da rotação das lâminas) é definido para a velocidade angular, a medida de rotações por minuto, rpm.

Numa segunda fase, é necessário definir-se o tipo de análise de fluido e especificar o tipo de solução numérica a utilizar, que consiste em três determinações e para isso recorre-se ao grupo ***Setting Up Physics-> Solver***.

Para o presente estudo, pretende-se realizar uma análise estacionária.

Relativamente ao tipo de solução é selecionada uma solução com base na pressão, que aplica um algoritmo inserido nos métodos de projeção. Os métodos de projeção utilizam as equações de pressão para obter as restrições de continuidade do campo de velocidade. A equação de pressão é derivada das equações de continuidade e de momento, garantindo a continuidade. As equações são resolvidas até à convergência da solução.

Finalmente, sobre a formulação de velocidade, é aconselhável que, para biorreatores em que os impulsores são de pequenas dimensões e que resultam em magnitudes de velocidade baixas para maiores afastamentos dos fluidos relativamente aos impulsores, como se pode verificar à esquerda na Figura 4-6, se utilize uma formulação de velocidade absoluta.

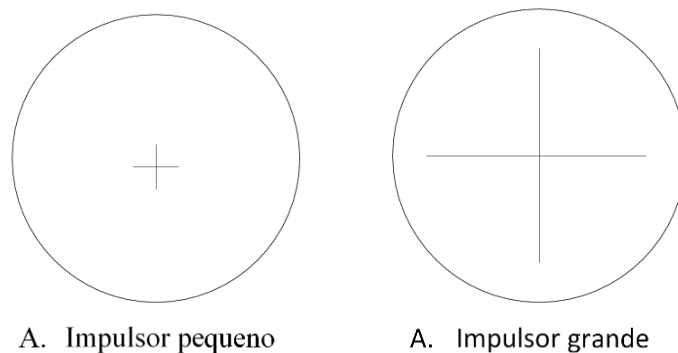


Figura 4-6 – Geometria dos impulsores

De seguida, é necessário especificar o modelo ou modelos a utilizar. Pretende-se apenas estudar o escoamento que acontece devido à rotação das pás, sem influência de marcadores secundários (como seria por exemplo a inserção de uma fase secundária como ar ou partículas). Deste modo, e sabendo que é necessário estar perante um regime de turbulência para melhorar a mistura dentro deste equipamento, e assim melhor reproduzir as condições que se obtêm em biorreatores industriais, escolhe-se um modelo de turbulência.

Para se definir um modelo viscoso turbulento, padrão $k - \epsilon$, seleciona-se em *Setting Up Physics -> Models -> Viscous -> k-epsilon (2eqn)*. De seguida define-se a opção padrão para este modelo, com um tratamento junto às paredes aumentado, para melhorar os efeitos junto às mesmas e verificam-se as constantes utilizadas (que deverão ser como as referidas no capítulo 3.3.1).

Posteriormente é necessário estabelecer as propriedades do material que se pretende estudar. Para isso, recorre-se ao painel *Setting Up Physics -> Materials -> Create/Edit*.

Por definição, o Fluent tem pré-selecionado o ar como material padrão. No entanto, após a definição da água líquida (através da biblioteca do Fluent), este material fica também disponível para uso e deve verificar-se posteriormente nas condições de zona de células qual o material indicado. Apesar do ar ficar sempre ativo no painel, pode ser desprezado, não fazendo parte de cálculos futuros.

A respeito dos respectivos comandos, após aparecer o painel de edição de material, seleciona-se o *Fluent Database -> water-liquid (h2o<l>) -> Copy -> Close*.

Condições das zonas da célula

Para se definir as condições das diferentes zonas criadas (domínio estacionário que representa o tanque e os domínios de rotação controlados pelo modelo MRF, que se ativa nestes comandos), é necessário ir a *Setup -> Cell Zone Conditions -> Domínio -> Edit*. É na especificação das condições de zona das células que se define o movimento de cada componente em cada referencial.

Como indica a Figura 4-7, na imagem à esquerda, para o “dominio_interior”, que representa a parte estacionária que envolve os dois domínios de rotação, apenas é necessário escolher o material presente (no caso, água líquida). Por ser uma zona estacionária no quadro de referência absoluto não se procede a mais alterações. Também na mesma figura, mas à direita, tem-se a aplicação do modelo MRF, que é a aplicação de uma *Frame Motion* (referencial móvel), com origem de rotação no referencial $(0,0,0)$ e direção de rotação no referencial $(0,0,-1)$ e com velocidade de 1000 rpm, que representa uma velocidade utilizada para culturas avançadas muito viscosas. O mesmo acontece para o domínio de rotação 2.

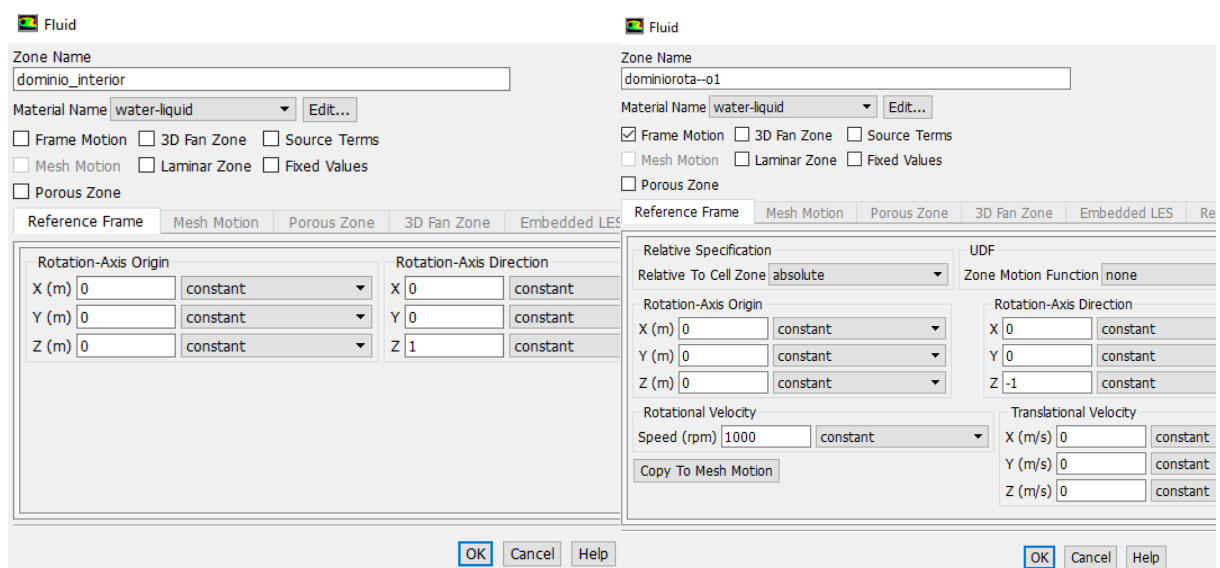


Figura 4-7 – Condições de zona de células

Condições de fronteira

Ainda respeitante a Setting up Physics, é necessário definir as condições de fronteira. Qualquer condição de fronteira que fique localizada dentro de uma área definida por uma condição de zona usa o mesmo referencial que a própria célula. Por esse motivo, as paredes de cada domínio são consideradas estacionárias. O mesmo não acontece às paredes das pás e à zona do eixo que está dentro da área dos domínios de rotação. Sendo por isso consideradas condições de paredes móveis, com movimento rotacional, relativo à zona de célula adjacente. Estas definições podem ser feitas para cada parede, individualmente em **Setup – } Boundary Conditions – } ‘parede a alterar’ – } Edit**.

Parâmetros da Solução

No sentido de se obter uma solução numérica convergente, são disponibilizados algoritmos em que as equações governantes são resolvidas de forma iterativa. O algoritmo Pressure-Velocity Coupling resolve num único passo o sistema de equações de momento e continuidade, fazendo com que a convergência da solução melhore significativamente, ainda que seja necessária uma memória computacional mais elevada (ANSYS FLUENT 13 User’s Guide, 2013).

O esquema de precisão de segunda ordem utiliza uma abordagem de reconstrução linear multidimensional. Com este método obtém-se uma precisão superior de resultados, através da expansão da serie de Taylor, com solução centrada na célula ou em torno dela (ANSYS FLUENT 13 User’s Guide, 2013). Para a seleção destes métodos de solução é necessário ir a **Solution – } Methods**.

Se se quiserem alterar os valores a partir dos quais se pode assumir convergência, é necessário ir até **Solution – } Monitors – } Residual**. Geralmente para a convergência da solução é necessária uma descida dos valores residuais até aos indicados, seguida de um congelamento da evolução dos mesmos.

Finalmente para se iniciar a solução, é necessário ir a **Solution – } Initialization**. Uma vez que estamos a resolver uma simulação para um escoamento estacionário de uma fase, o ANSYS por definição seleciona uma inicialização híbrida, que pode ser alterado se pretendido. A inicialização híbrida trata-se de um conjunto de métodos iterativos de condições de fronteira que utiliza a equação de Laplace para produzir um campo de velocidade que beneficia geometrias complexas e ainda um campo de pressão que faz

ligações entre valores dispares de pressão no domínio computacional (ANSYS FLUENT 13 User's Guide, 2013).

É uma boa prática julgar a convergência não apenas pelo valor do próprio resíduo, mas pelo seu comportamento. Deve-se garantir que os valores residuais continuam a diminuir (ou permanecer com um valor baixo) por várias iterações (50 ou mais) antes de se concluir que a solução convergiu.

Realizaram-se 600 iterações para a convergência, apesar de se conseguir verificar estabilidade nos dados a partir das 400. Em pós processamento, é possível formular gráficos ilustrativos caracterizantes do comportamento do escoamento dentro do biorreator.

Na Figura 4-8 é possível verificar os fluxos de velocidade que ocorrem dentro do biorreator. As zonas de maior velocidade dão-se nas zonas onde foram impostos os modelos de múltiplos referenciais moveis (MRF). Sendo que quanto mais afastada uma zona, menor a velocidade. Verificam-se também zonas de rotação, que circundam os impulsores e que atingem velocidades de 0,9m/s.

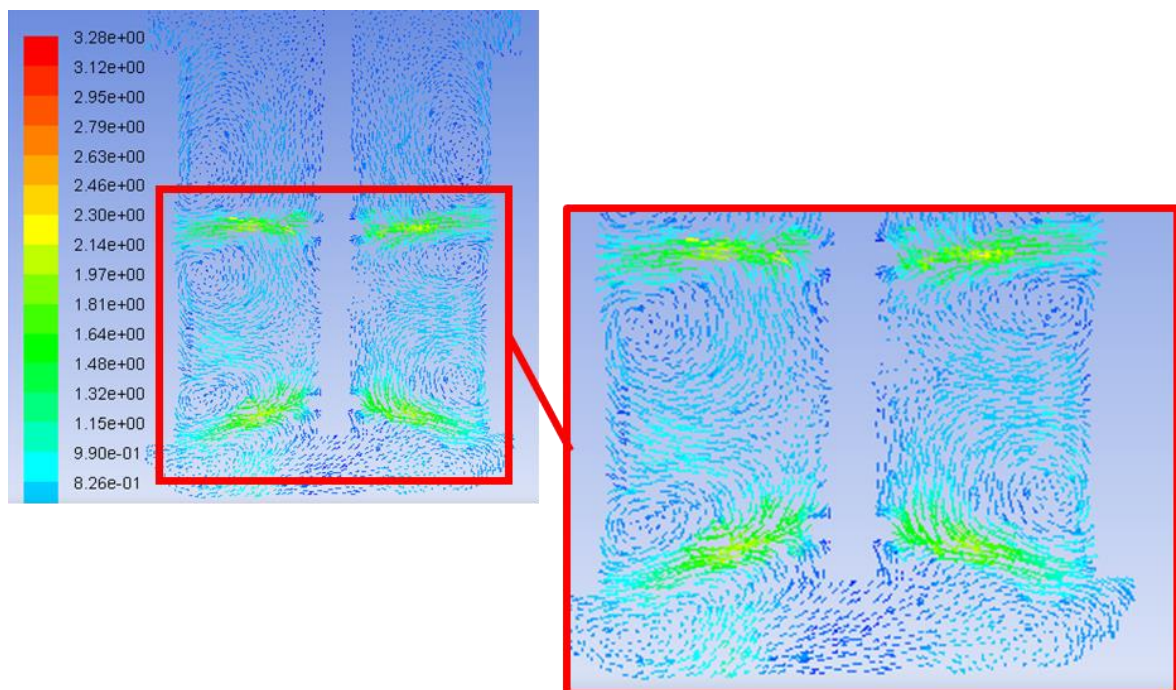


Figura 4-8 – Fluxo e vetor velocidade (m/s)

Constata-se que mesmo para as zonas afastadas do impulsor se conseguem visualizar vetores de movimento rotacional, o que indica que quanto maior a velocidade de rotação maior a área de influência. Apesar de poder ser um indicativo de melhor mistura é necessário ter em conta outros parâmetros como a pressão dinâmica, para verificar o impacto que esse escoamento poderá ter nas células.

4.1.4 Modelo multifásico turbulento com MRF

De seguida realizou-se o mesmo estudo com a adição de uma fase gasosa, o ar. Ou seja, realizou-se um estudo transiente, multifásico, turbulento, com recurso ao modelo de múltiplos referenciais moveis. Uma vez que os modelos referidos já foram explicados anteriormente, procede-se apenas a uma breve descrição do caso a tratar.

Relativamente à geometria, e devido ao aumento de capacidade computacional exigido pela introdução de um modelo multifásico, foi reduzida em altura para 135 mm, que equivaleria a um volume de fase líquida equivalente a 1,5 L (a ser utilizado semelhantemente a nível experimental). Adicionou-se ainda um aspersor (que mais tarde foi simplificado para uma entrada de 3 mm na superfície inferior). O estudo que se segue foi resolvido com um algoritmo de pressão, com uma formulação de velocidade absoluta, um estado transiente e aceleração gravítica $9,81 \text{ m/s}^2$ na direção -z. O modelo multifásico escolhido foi o Euleriano-Euleriano, com duas fases e uma formulação implícita. O diâmetro das bolhas de ar que constituem a segunda fase têm o valor de 0,1 mm. Relativamente às interações entre o ar e água, tem-se um coeficiente de massa virtual constante igual a 0,5, um modelo de atrito de *Grace*, e um modelo de tensão entre superfícies CSF (Continuum Surface Force) de 0,0728 N/m. O modelo de turbulência escolhido foi o *modelo padrão k-epsilon (2 eqn)*, com um tratamento de proximidade às paredes melhorado. As constantes do modelo são as pré-definidas e referidas anteriormente. Relativamente às condições de zona, temos para os domínios de rotação 1 e 2, uma rotação de 300 rpm, em torno do eixo z, com direção negativa. As condições de fronteira são para as regiões de contacto interfaces, nas paredes dos impulsores paredes móveis rotacionalmente, com movimento relativo às zonas adjacentes. O mesmo se aplica para o rotor. Existe uma condição de *degassing* no topo, que assume a abertura do biorreator em contacto com o ar, permitindo o escape das bolhas de ar. Esta condição de *degassing* facilita a aplicação do modelo de Euler. Ainda é imposta uma condição de entrada de velocidade, com entrada total de ar e uma velocidade de 0,05 m/s. Este valor é imposto tendo em conta as condições do ensaio experimental, como dito no capítulo 4.1.5, uma vez que é inserido um volume de ar de 1,5 L/min nos 1,5 L de água presentes no biorreator, pelas 12 entradas existentes no aspersor. Devido à capacidade computacional elevada que seria necessário para reproduzir a mesma quantidade de entradas, fez-se a simulação para uma entrada de ar, de 3mm, imposta na superfície inferior do biorreator, com valor de volume de ar aproximado a apenas uma entrada de ar real.

Foi utilizado nos métodos de solução um esquema *Coupled*. Para o cálculo de gradiente o modelo *Green-Gauss Cell Based*, para o momento e a energia cinética turbulenta, o *Second*

Order Upwind, e para a fração volúmica e a taxa de dissipação turbulenta, o *First Order Upwind* (uma vez que para um cálculo multifásico a memória necessária já é bastante elevada). Para o cálculo da simulação foi utilizado um *time step* de 0,01. Uma vez que os processos de *design* geométrico, modelação da malha e interface do *software* Fluent foram anteriormente descritos e ilustrados, de seguida apresentam-se apenas os resultados tratados no pós-processamento.

Na Figura 4-9 é possível verificar a evolução de fração volúmica do ar no biorreator, nos primeiros 1,1 s, a partir de uma entrada com aproximadamente 3 mm de diâmetro, com velocidade de entrada aproximada de 0,05 m/s. A vermelho está representada a fase líquida e a azul escuro a parte gasosa. Observa-se que o ar se mantém concentrado ao sair da entrada e inicia uma difusão até atingir os impulsores, momento a partir do qual se difunde por completo no meio. Atingindo este ponto de contacto com o impulsor, mesmo para tempos superiores de simulação, não se deram alterações ao nível desta reação. Também é possível verificar que este modelo responde ao problema em estudo, uma vez que mostra o fenómeno de difusão do ar no meio. Esta baixa difusão, pode dever-se ao baixo caudal de ar inserido, que corresponde aproximadamente a um décimo do valor real. Ainda a modificação da geometria pode ser uma das causadoras deste efeito, já que a modelação foi simplificada relativamente à forma como o ar é injetado. Na realidade existe um aspersor que é concêntrico ao eixo de rotação, evitando que as bolhas colidam com o próprio. No entanto, nesta simplificação optou-se por modelar uma entrada exatamente abaixo do eixo, havendo por isso um contacto direto após a ascensão do ar.

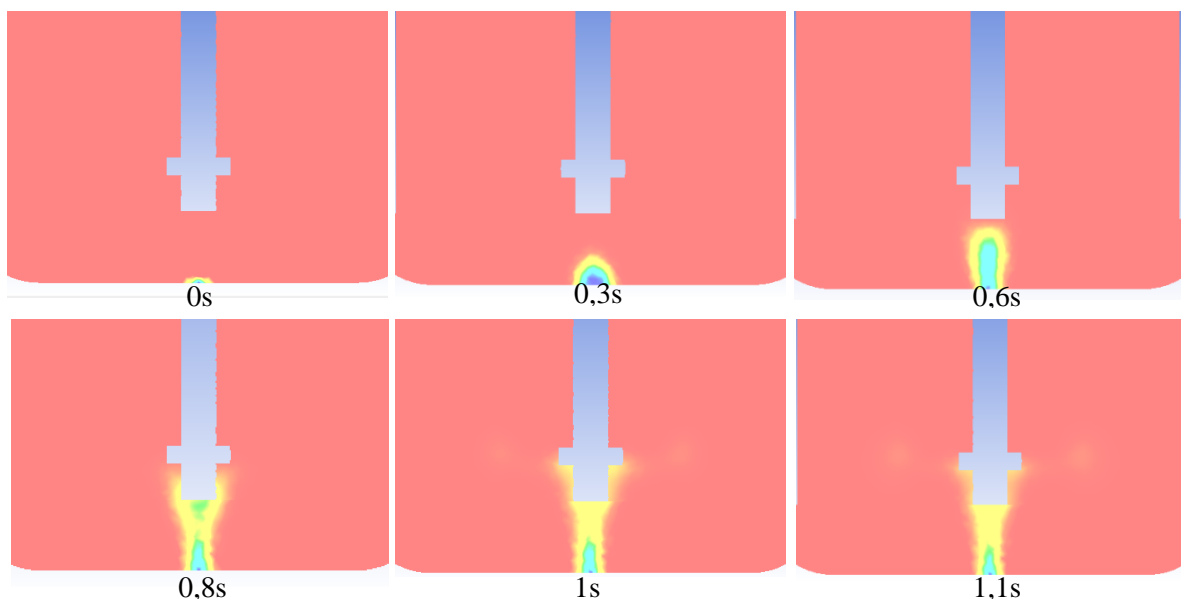


Figura 4-9 – Fração Volúmica do ar no biorreator durante 1,1s

Esta análise da simulação permite avaliar a difusão do ar e por isso, através de iterações será possível maximizar este efeito, através das alterações referidas anteriormente como modificações na geometria (para aproximar à forma real) ou de entrada de caudal, alteração do diâmetro de bolha, entre outros.

A Figura 4-10 é o resultado ilustrativo da velocidade do ar no biorreator. Como anteriormente verificado, o ar difunde-se praticamente de forma total quando atinge o primeiro impulsor (impulsor inferior), não se verificando a sua presença no impulsor superior. Por esse motivo a velocidade do ar no impulsor superior é zero, tal como em quase toda a região à volta do mesmo e até ao topo do biorreator.

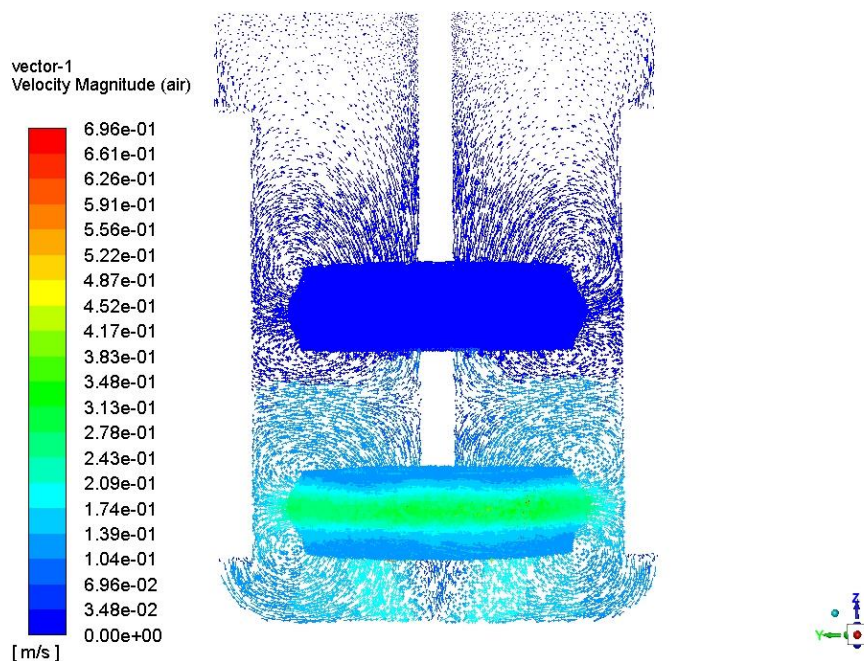


Figura 4-10 – Velocidade do ar no biorreator [m/s]

Tal como esperado é possível verificar que existe uma maior velocidade do ar na zona onde foram aplicados os métodos de MRF, e, olhando à Figura 4-11 é também possível perceber que a velocidade máxima se encontra nas pontas das pás dos impulsores, que rodam a 300 rpm (atingindo cerca de 0,65 m/s).

Ainda na Figura 4-10 é possível perceber que as zonas mais afastadas dos impulsores, têm velocidades muito inferiores, como por exemplo no topo do biorreator. Este fenómeno não é desejável já que demonstra uma distribuição não uniforme de dissipação de energia, podendo levar a alguns problemas como acumulação de constituintes do meio. Uma combinação de diferentes geometrias e diâmetros dos impulsores, ou distância entre eles podem melhorar a distribuição de partículas e transferência de massa entre o ar. No entanto, no que toca às diferentes geometrias também pode causar falhas na homogeneidade do meio

(Machado & Kresta, 2013). Para utilização normal do biorreator o nível de líquido nunca atinge o topo, ficando apenas a cobrir o impulsor superior.

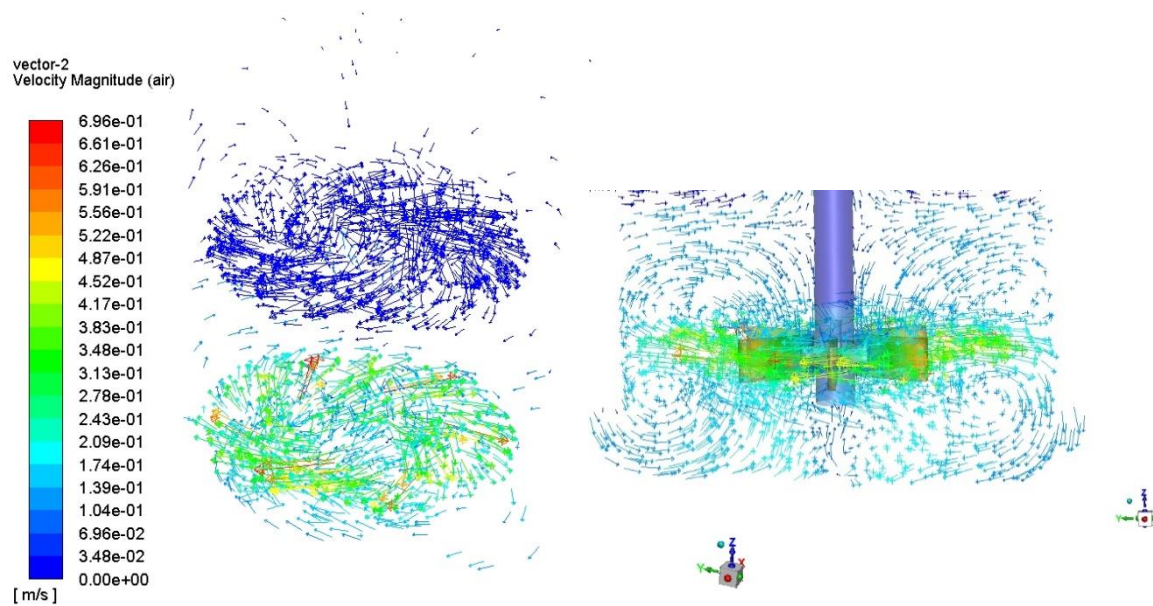


Figura 4-11 – Pormenor de velocidade do ar nos impulsores do biorreator [m/s]

Em ambas as figuras (Figura 4-11 e Figura 4-10) é possível verificar as direções dos vetores no plano, conseguindo-se perceber a interação entre fluidos nas zonas de rotação e ainda os movimentos circunferenciais turbulentos que promovem a mistura do meio, e ainda com maior importância onde estes fenômenos não acontecem, indicando pontos menos eficientes na homogeneização da cultura.

Também em ambas as figuras mencionadas e em especial na Figura 4-11, por apresentar uma imagem mais limpa do perfil de velocidades é possível analisar melhor o movimento das partículas. Devido à ação das pás, que se movem apenas de forma transversal e em rotação em torno do eixo, as partículas são empurradas contra a parede. Que devido à condição de não escorregamento () as partículas são guiadas para as zonas de menor energia, que correspondem às zonas superiores e inferiores dos impulsores (por não haver transferência de energia direta no eixo z, como aconteceria com lâminas com inclinação) e posteriormente por sucção para a zona interior (junto ao eixo) dos impulsores. Criando assim um ciclo rotativo.

Na Figura 4-12 mostra-se a pressão dinâmica do ar e da água no biorreator. Mais uma vez e como referido anteriormente é possível verificar que o ar só atinge o primeiro impulsor, observando-se uma pressão de 0,1 Pa. Relativamente à pressão dinâmica da água, esta atinge os 110 Pa. Os fenômenos de pressão dinâmica são importantes para perceber o tipo de dano que podem infligir à cultura do meio. Nesta figura é possível identificar zonas em que a

pressão dinâmica é aproximadamente zero, representando uma baixa turbulência e consequente baixa homogeneização do meio.

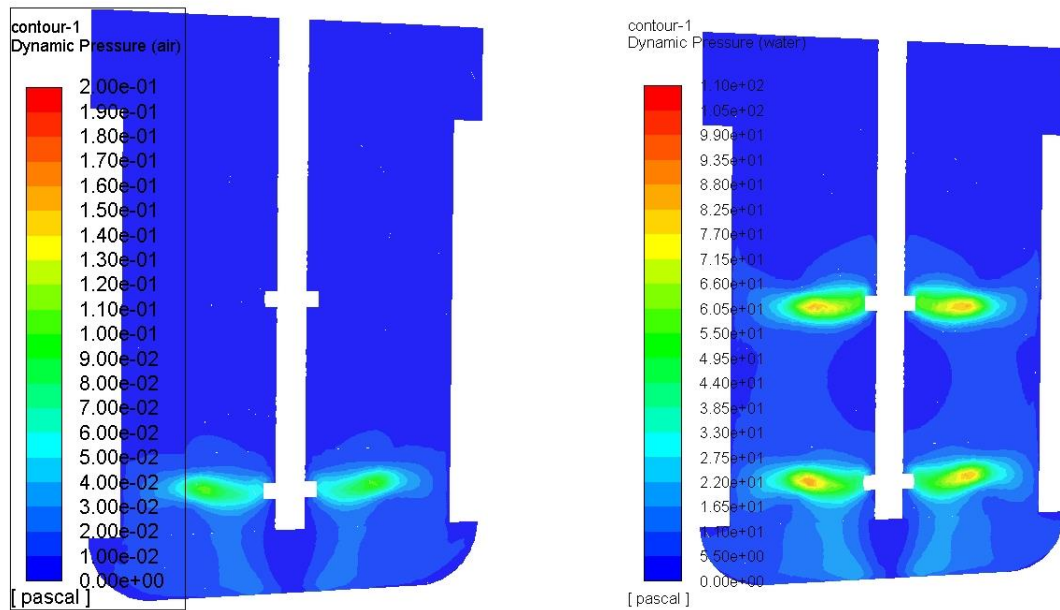


Figura 4-12 – Pressão Dinâmica do ar e da água no biorreator [Pa]

4.1.5 Ensaios Experimentais

Para se tentar comparar as simulações realizadas com os ensaios experimentais em laboratório, foram realizadas várias experiências com o objetivo de entender o melhor possível o escoamento.

Num primeiro ensaio depositou-se 1,5 L de água, valor utilizado para a realização das últimas simulações em CFD e ligaram-se os impulsores com uma velocidade de rotação igual a 300 rpm. Como se pode verificar na Figura 4-13-a, as conclusões a retirar dessa experiência são inconclusivas devido às próprias propriedades da água. Por esse motivo pensou-se numa segunda experiência em que se colocaria um marcador, Figura 4-13-b, que no caso presente incidiu num corante alimentar de cor verde, numa quantidade desprezável. A homogeneização do meio deu-se a partir do primeiro contacto da seringa utilizada, não demorando mais do que 2 s até à coloração total da água de forma homogénea. Apesar de ser um teste que permite quantificar o tempo de homogeneização da mistura (desde o tempo inicial até à estabilização da cor), não permite uma conclusão exata devido ao erro quantitativo, uma vez que se trata de um teste visual e não se possuem meios de registo vídeo de alta velocidade. Uma forma de quantificar a homogeneização da mistura no biorreator seria reproduzir os testes realizados em (Jahoda et al., 2009), em que se utilizou uma sonda para medir a condutibilidade do meio (água) que variou com injeção de uma solução

concentrada de *NaCl* e assim obter o tempo de homogeneização no biorreator, que se trata de um dos parâmetros de caracterização mais importantes.

Na terceira experiência já foi colocada uma fase secundária a atuar no meio, que funcionou como marcador na detecção e entendimento do escoamento. A injeção de ar, com o caudal de 1,5 L/min permitiu identificar os padrões de escoamento realizados e que se podem verificar na Figura 4-13-c, através dos pontos a laranja. Com este ensaio foi possível perceber o caminho percorrido pelo ar e identificar as zonas em que a transferência de massa entre estes materiais é nula e onde é mais incidente.

Na Figura 4-13-d tem-se um meio de água líquida com rotação e injeção de ar, ao qual foi novamente adicionado o corante alimentar verde. Para meios multifásicos, como o que se verifica na figura, é necessário perceber onde deve ser realizada a injeção de nutrientes com melhor detalhe, uma vez que vai influenciar a rapidez de homogeneização da mistura. Após várias análises de inserção do corante em diferentes pontos do biorreator, percebeu-se empiricamente que o local onde melhor se dava a mistura era entre os impulsores, junto às paredes.

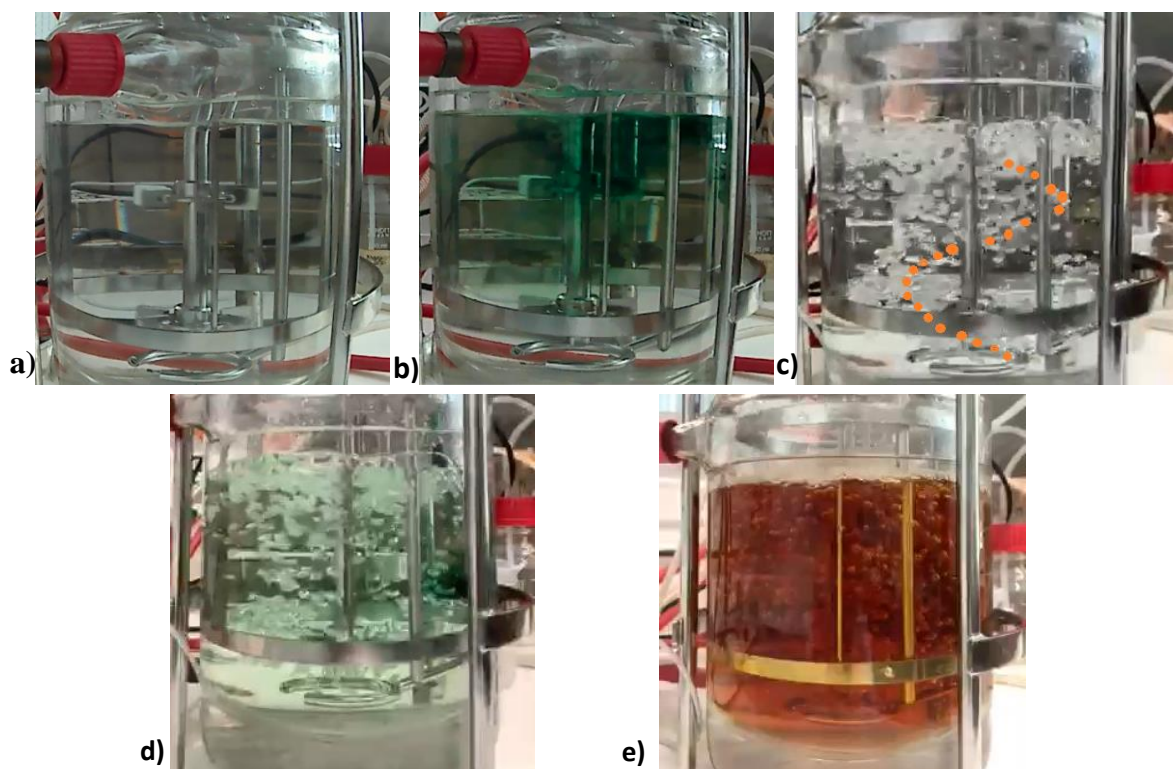


Figura 4-13 - Impulsores em rotação com: a) água; b) inserção de corante; c) injeção de ar na água; d) injeção de ar na água e inserção de corante; e) injeção de ar num meio nutritivo e bactéria *E. coli*

Finalmente na Figura 4-13-e, pode verificar-se um ensaio realizado com 1,5 L de água, os nutrientes utilizados num meio de cultura com a bactéria *E. Coli* (extrato de levedura,

Triptona Bacto e glicose) e ainda com uma população de bactéria *E. coli* e inserção de oxigênio com um volume de 1,5 L/min.

A partir do momento inicial em que se colocam os nutrientes necessários ao crescimento da bactéria bem como a própria bactéria não existem mais alterações ao nível da conservação da massa, pelo que poderia ter sido realizado um ensaio computacional caracterizante deste meio. No entanto, devido à grande capacidade computacional exigida tal não foi possível. A nível qualitativo, foi possível verificar experimentalmente que o fluido ganhou propriedades diferentes, como maior viscosidade. É possível verificar na figura que o movimento realizado pelas bolhas de ar é muito diferente do verificado anteriormente, estando mais dispersas sem seguir um padrão definido. Também é verificável uma maior resistência a fenómenos de rutura da bolha. Neste sentido é possível perceber que é necessário realizar múltiplos estudos independentes para os diferentes estágios da cultura.

Na Figura 4-14 é possível verificar o comportamento das bolhas mencionado na descrição da Figura 4-11 e da Figura 4-12, ou seja, um movimento transversal à chegada do impulsor, causada pelo movimento das pás, seguida de uma ascensão das mesmas. Essa ascensão dá-se tendencialmente longe das paredes, causando zonas de menor turbulência junto às mesmas. Esta disparidade entre turbulência de zonas pode causar vórtices e manchas de concentração do meio, não havendo homogeneização do meio. Estes problemas podem ser minimizados com alterações realizadas ao nível da geometria das pás dos impulsores, da geometria do próprio impulsor, da geometria do vaso, da forma de aspensão (que tem influência na área interfacial e tempo de residência das bolhas), entre outros.

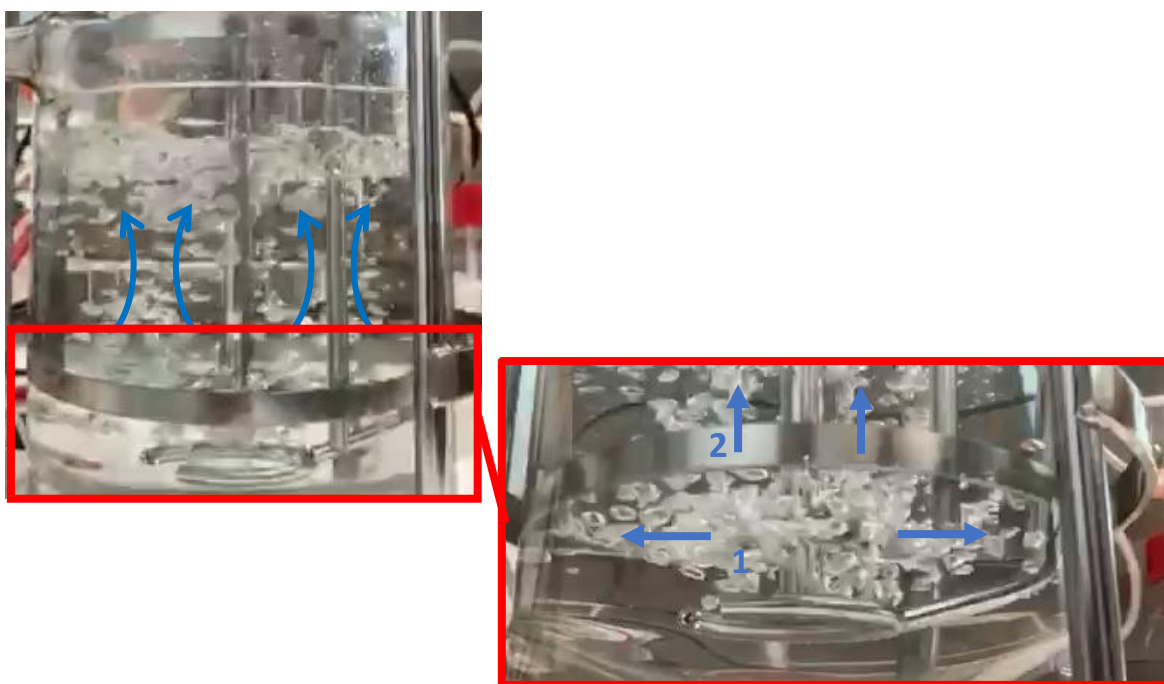


Figura 4-14 – Movimento realizado pelas bolhas de ar

Também é possível perceber, pela Figura 4-15 que os resultados obtidos experimentalmente vão de encontro aos de simulação, havendo uma maior pressão dinâmica tendencialmente afastada das paredes e do eixo, tal como verificado a nível experimental e com incidência nas zonas de rotação. As zonas de menor energia verificam-se nas zonas inferiores do tanque e junto às paredes, sendo por isso zonas críticas onde poderá existir deposição de partículas e desse modo danificar a homogeneização da mistura.

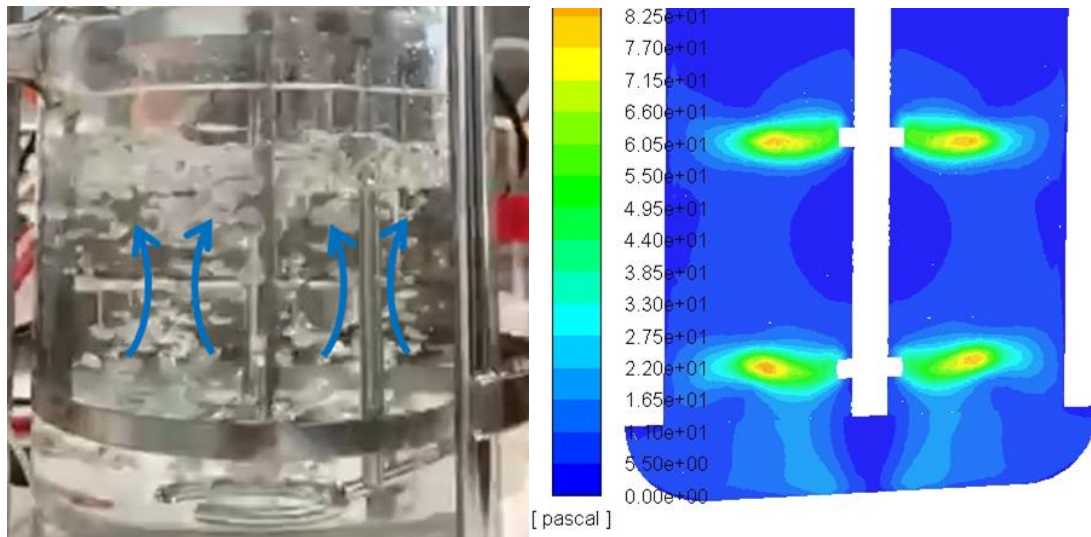


Figura 4-15 – Comparação da pressão dinâmica Ensaio Experimental vs Simulação

Finalmente também ao nível do movimento das partículas é possível fazer uma comparação entre Ensaio Experimental e Simulação, através da Figura 4-16 perceber um primeiro movimento radial, seguido de uma ascensão, realizada longe das paredes.

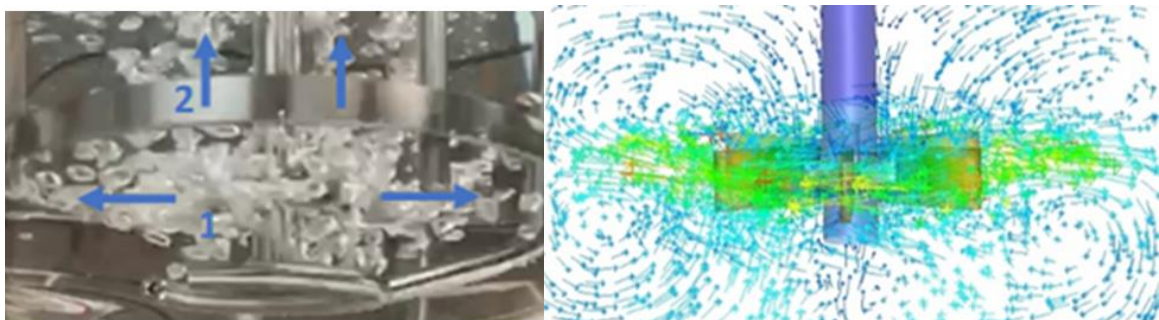


Figura 4-16 – Comparação do movimento de partículas Ensaio Experimental vs Simulação

5 Conclusão

Um dos grandes desafios do mundo atual é o desenvolvimento de tratamentos outrora impensáveis, para a cura de doenças complexas. Cada vez mais são utilizados produtos biotecnológicos, para o combate desse problema. O processo de desenvolvimento para estes medicamentos apresenta um grande número de restrições devido à complexidade das estruturas moleculares e da sua atividade biológica, necessitando por isso de equipamentos capazes de responder a essa complexidade. Os biorreatores são os equipamentos mais utilizados na produção de bioprodutos, pela sua diversidade, baixo custo e eficiência no entanto, quando fabricados a nível industrial demonstram alguns problemas como a fraca mistura existente, levando a respostas biológicas muito diferentes. É neste sentido que se têm vindo a desenvolver técnicas que permitem estudar com exatidão a reação dos fluidos perante alterações do meio. A CFD é uma ferramenta útil no estudo dos parâmetros envolvidos no desempenho do biorreator, desde o seu *design* até aos estudos de transferência de massa a ocorrer no mesmo.

No presente trabalho pretendeu-se realizar um modelo matemático que quantificasse o impacto de alguns dos parâmetros que mais influenciam a capacidade de mistura de um biorreator, como geometria, velocidade de rotação das pás e inserção de oxigénio, que consequentemente influenciam a eficiência na produção de microrganismos e os seus produtos. Da literatura expõe-se alguns problemas com a geometria do biorreator utilizado para o presente trabalho como simplicidade das pás de rotação, que limitam o desempenho do impulsor e consequente produção, tendo já sido desenvolvidas alternativas com pares de impulsores com rotações contrárias para diminuição de vórtices, aumento de área de interface e aumento da transferência de massa com laminas perfuradas. A forma de aspensão de oxigénio é outro parâmetro a ter em conta, já que para bolhas menores, maior a área superficial por volume e maior área interfacial, uma mais fácil e rápida dissolução e também um maior tempo de residência. Aspersores do tipo anel, como o utilizado formam bolhas comparativamente maiores, não sendo apropriados para biorreatores de laboratório. Também a posição do aspersor relativamente aos impulsores pode ser crítica.

Devido à elevada exigência de capacidade computacional e tempo necessário para a realização dos cálculos, não foi possível realizar estudos iterativos que permitissem fazer uma análise comparativa para convergência dos melhores parâmetros a utilizar, atingindo-se apenas o ponto de validar conceitos relativos aos métodos referenciados em literatura como os mais adequados para o presente estudo. Também foram seguidos vários modelos

que se mostraram incapazes de serem continuados, como o método de Volume de Fluido, a partir do qual não se conseguiram atingir os resultados da literatura e o método Lagrangeano devido à exigência dos dados necessários. Assim este trabalho conclui, com a validação das metodologias CFD, que estas permitem a previsão do comportamento mecânico do sistema em estudo. Utilizando-se um modelo multifásico com recurso às equações de Euler, aplicando o método de múltiplos referenciais moveis (MRF) e aplicando um modelo de turbulência *k - ε standard*, conseguiu-se simular a influência da rotação dos impulsores bem como a da inserção de ar, no escoamento do meio aquoso. Permitindo avaliar parâmetros do fluxo dos fluidos como velocidades e direções, que permitem avaliar a homogeneização do sistema, pressões que permitem precaver danos à cultura e capacidade de difusão do ar no meio.

Verificou-se que a velocidade dentro das zonas onde foi aplicado o método de MRF é superior às zonas adjacentes, sendo o seu valor máximo encontrado no extremo das pás dos impulsores. Quanto mais afastada a zona do impulsor, menor a velocidade, pelo que é importante verificar o espaçamento entre impulsores e nível de líquido, para se obter uma velocidade o mais homogénea possível ao longo do biorreator. Também é verificável zonas de baixa energia, devido à baixa turbulência nessas regiões, podendo causar alguns problemas de acumulação de componentes do meio.

Os ensaios experimentais não permitiram uma avaliação quantitativa, mas possibilitaram a validação do escoamento. Para análises com recurso ao corante alimentar foi avaliado o tempo de homogeneização do meio e para análises só com a injeção de ar foi avaliado o comportamento direcional das bolhas. Foi possível verificar para uma injeção num local exato do biorreator uma mistura rápida e eficiente do corante. Quanto ao movimento confirmou-se um primeiro movimento transversal à chegada do impulsor, seguido de uma ascensão tendencialmente longe das paredes. Não obstante, constatou-se sempre um movimento ascensional e radial por parte das bolhas. Em último realizou-se um ensaio para os nutrientes necessários ao crescimento da bactéria *E. coli* em proporções ideais, a própria bactéria, e inserção de oxigénio. Neste ensaio verificou-se uma alteração das propriedades do fluido levando a que o comportamento das bolhas de ar se alterasse, estando mais dispersas no meio, sem seguir um padrão definido. Concluindo-se que é necessário realizar múltiplos estudos independentes para os diferentes estágios da cultura.

Devido à exigência computacional e tempo necessário à realização de certos cálculos não foi possível realizar simulações mais completas e pormenorizadas. Isto correlaciona-se com o trabalho futuro que passa por detalhar mais o sistema em estudo, começando pela melhoria

da malha. Seguido da alteração da injeção de ar para vários pontos distribuídos, tal como no sistema real, e adição de componentes que obstruem este fluxo como o próprio tubo de injeção de ar. A nível de grau de complexidade de simulação poderá ainda ser adicionado partículas flutuantes que poderão representar as células ou substrato e acrescentar os fenómenos térmicos envolventes. Por último a validação quantitativa das simulações com ensaios experimentais. E com tudo isto e de forma iterativa elaborar alterações ao sistema de modo a melhorar o seu comportamento, como por exemplo modificar o tipo de inserção de ar/ oxigénio e o design dos impulsores.

Bibliografia

- Al-mashhadani, M. K. H., Wilkinson, S. J., & Zimmerman, W. B. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chemical Engineering Science*, 137, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.06.032>
- Andrews, G. (1988). Fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6(1), 151–178. <https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647847>
- ANSYS FLUENT 13 User's Guide. (2013). Ansys Fluent Theory Guide. ANSYS Inc., USA, 15317(November), 724–746.
- apifarma - Associação Portuguesa Da Industria Farmacêutica. (n.d.). Retrieved February 1, 2019, from <https://www.apifarma.pt/Paginas/Home.aspx>
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D. R. M., & Kumar, D. S. (2017). Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9(May 2016), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Bach, C., Yang, J., Larsson, H., Stocks, S. M., Gernaey, K. V, Albaek, M. O., & Krühne, U. (2017). Evaluation of mixing and mass transfer in a stirred pilot scale bioreactor utilizing CFD. *Chemical Engineering Science*, 171, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.05.001>
- Bates, P. D., Lane, S. N., & Ferguson, R. I. (Eds.). (n.d.). *Computational Fluid Dynamics Applications in Environmental Hydraulics*. Wiley.
- Bezzo, F., & Macchietto, S. (2004). A general methodology for hybrid multizonal / CFD models Part II . Automatic zoning. 28, 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2003.08.010>
- Bezzo, F., Macchietto, S., & Pantelides, C. C. (2004). A general methodology for hybrid multizonal / CFD models Part I . Theoretical framework. 28, 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2003.08.004>
- Biotech, S. S. (2012). *Operating Manual UniVessel*.
- Blazek, J. (2005). Computational Fluid Dynamics: Principles and Applications: Second Edition. In *Computational Fluid Dynamics: Principles and Applications: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-008044506-9/50003-5>

- Casali, N., & Preston, A. (2010). E.coli Plasmid Vectors. In *Methods in molecular biology* (Vol. 253). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-820-1_12
- Casey, M., & Wintergerste, T. (Eds.). (2000). *Best Practice Guidelines*. ERCOFTAC - European Research Community on Fluid, Turbulence And Combustion.
- Ceccarelli, M. (2014). Contributions of Archimedes on mechanics and design of mechanisms. *Mechanism and Machine Theory*, 72, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.mechmachtheory.2013.10.005>
- Comparing CFD Software. (n.d.).
- Concepts, B. (n.d.). *Bioprocess Engineering* (L. M. Shuler & F. Kargi, Eds.).
- Darmana, D., Deen, N. G., & Kuipers, J. A. M. (2005). Detailed modeling of hydrodynamics, mass transfer and chemical reactions in a bubble column using a discrete bubble model. *Chemical Engineering Science*, 60(12), 3383–3404. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.01.025>
- Darrigol, O., & Frisch, U. (2008). From Newton's mechanics to Euler's equations. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 237(14–17), 1855–1869. <https://doi.org/10.1016/j.physd.2007.08.003>
- Delafosse, A., Collignon, M. L., Calvo, S., Delvigne, F., Crine, M., Thonart, P., & Toye, D. (2014). CFD-based compartment model for description of mixing in bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 106, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.033>
- Eaker, S., Abraham, E., Allickson, J., Brieva, T. A., Baksh, D., Heathman, T. R. J., ... Zhang, N. (2017). Bioreactors for cell therapies: Current status and future advances. *Cytotherapy*, 19(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.011>
- Eckert, E. R. G. (1975). Tribute to Ludwig Prandtl. *Int J Heat Mass Transfer*, 18(August 1953), 1333–1336.
- Eghbali, H., Nava, M. M., Mohebbi-Kalhari, D., & Raimondi, M. T. (2016). Hollow fiber bioreactor technology for tissue engineering applications. *International Journal of Artificial Organs*, 39(1), 1–15. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000466>
- Eibl, R. E. S. W. D. (n.d.). *Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications*.
- Evaluate Pharma. (2016). World Preview 2016, Outlook to 2022. *Evaluate Pharma*, (9th Edition), 1–49. Retrieved from <http://info.evaluategroup.com/rs/607-YGS-364/images/wp16.pdf>

- Faleiro, F. G. (2011). Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In *Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*.
- Fleming, A., & Wong, J. (2003). *GIANTS IN THE FIELD OF MICROBIOLOGY SERIES AND THE DISCOVERY OF PENICILLIN*. (00), 124–126. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(00\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(00)00006-4)
- Fletcher, D. F., McClure, D. D., Kavanagh, J. M., & Barton, G. W. (2017). CFD simulation of industrial bubble columns : Numerical challenges and model validation successes R. *Applied Mathematical Modelling*, 44, 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2016.08.033>
- Geddes, A. M. (2006). *The history of smallpox*. 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.009>
- Gnoth, R., Jenzsch, S., Simutis, M., & Lubbert, A. (2007). Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *Biotechnol.*
- Hogan, A. J. (2015). From Precaution to Peril : Public Relations Across Forty Years of Genetic Engineering. *Endeavour*, 40(4), 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2016.09.002>
- Hu, H. H. (2012). Computational Fluid Dynamics. *Fluid Mechanics*, 421–472. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382100-3.10010-1>
- Hutmacher, D. W., & Singh, H. (2008). *Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture*. (February). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.11.012>
- Iannelli, J. (n.d.). *Characteristics Finite Element Methods in Computational Fluid Dynamics*. Springer.
- Islam, M. T., Ganesan, P., Sahu, J. N., Uddin, M. N., & Mannan, A. (2015). A Single Air Bubble Rise in Water : a CFD Study. *Mechanical Engineering Research Journal*, 9(March), 1–6.
- Jahoda, M., Tomášková, L., & Moštek, M. (2009). CFD prediction of liquid homogenisation in a gas-liquid stirred tank. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(4), 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.12.006>
- Kalra, S., & Mashuq-Un-Nabi. (2018). Study of coronary stent deformation using finite

- element method. *11th International Conference on Industrial and Information Systems, ICIIS 2016 - Conference Proceedings, 2018-Janua*(April 2019), 404–407. <https://doi.org/10.1109/ICIINFS.2016.8262974>
- Kantarci, N., Borak, F., & Ulgen, K. O. (2005). *Bubble column reactors*. 40, 2263–2283. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.10.004>
- Kariyama, I. D., Zhai, X., & Wu, B. (2018). Influence of mixing on anaerobic digestion efficiency in stirred tank digesters: A review. *Water Research*, 143, 503–517. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.065>
- Kosmann-Schwarzbach, Y. (n.d.). *Siméon-Denis Poisson* (L'École po).
- Krishna, S. H. (2002). *Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media*. 20, 239–267.
- Lapin, A., Schmid, J., & Reuss, M. (2006). *Modeling the dynamics of E. coli populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor — A structured – segregated approach*. 61, 4783–4797. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.03.003>
- Laurendeau, F. K. E. (n.d.). T.Cebeci J.RShao F. Kafyeke E. Laurendeau Computational Fluid Dynamics for Engineers. *Fluid Dynamics*.
- Ligon, B. L., & Ph, D. (2002). *Louis Pasteur: A Controversial Figure in a Debate on Scientific Ethics insights gained from both supporters and critics of the new biography by Gerald L.* 13(2), 134–141. <https://doi.org/10.1053/spid.2002.125138>
- Lima, N., & Mota, M. (2003). *Biotechnologia Fundamentos e Aplicações*.
- Little, M., Kipriyanov, S. M., Gall, F. Le, & Moldenhauer, G. (2000). *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies*. 5699(8), 293–299.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., ... Scott, M. P. (2014). *Biologia Celular e Molecular* (7th ed.). artmed.
- Machado, M. B., & Kresta, S. M. (2013). The confined impeller stirred tank (CIST): A bench scale testing device for specification of local mixing conditions required in large scale vessels. *Chemical Engineering Research and Design*, 91(11), 2209–2224. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.06.025>
- Mandenius, C.-F. (2016). *Bioreactors - Design, Operation and Novel Applications*. <https://doi.org/10.1002/9783527683369>
- Manual, O. (2014). *Biostat* ® b.

- Mat, M. N. H., & Asmuin, N. (2018). Optimum design of nozzle geometry of dry ice blasting using CFD for the reduction of noise emission. *International Journal of Integrated Engineering*, 10(5), 130–135.
- Merchuk, C. (1990). *Why use air-lift bioreactors?* 8(March), 66–71.
- Mitchell, D. A., Krieger, N., & Berovič, M. (2006). Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation. In *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. <https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2>
- Mota, M., & Tramper, J. (2005). *Multiphase Bioreactor Design* (J. M.S.Cabral, Ed.). Taylor & Francis.
- P.Ward, O. (1992). *Fermentation Biotechnology*. WILEY.
- Pukkella, A. K., Vysyaraju, R., Tammishetti, V., Rai, B., & Subramanian, S. (2019). Improved mixing of solid suspensions in stirred tanks with interface baffles: CFD simulation and experimental validation. *Chemical Engineering Journal*, 358(October 2018), 621–633. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.020>
- Report, F. (2017). *Impeller Performance in Stirred Tanks*. (August).
- Reynolds, O. (1971). OSBORNE REYNOLDS, 1842-1912, AND THE FLOW OF FLUIDS THROUGH TUBES. *British Journal of Anaesthesia*, 43(12), 1175–1182. <https://doi.org/10.1093/bja/43.12.1175>
- Rzehak, R., Krauß, M., Kováts, P., & Zähringer, K. (2017). International Journal of Multiphase Flow Fluid dynamics in a bubble column: New experiments and simulations. *International Journal of Multiphase Flow*, 89, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2016.09.024>
- Sabersky, R. H., Acosta, A. J., Hauptmann, E. G., & Gates, E. M. (n.d.). *FLUID FLOW A first course in fluid mechanics* (Fourth Edi). Prentice Hall.
- Sales, K. C., Rosa, F., Sampaio, P. N., Fonseca, L. P., Lopes, M. B., & Calado, C. R. C. (2015). In situ near-infrared (NIR) versus high-throughput mid-infrared (MIR) spectroscopy to monitor biopharmaceutical production. *Applied Spectroscopy*, 69(6), 760–772. <https://doi.org/10.1366/14-07588>
- Sarkar, J., Shekhawat, L. K., Loomba, V., & Rathore, A. S. (2016). CFD of mixing of multi-phase flow in a bioreactor using population balance model. *Biotechnology Progress*, 32(3), 613–628. <https://doi.org/10.1002/btpr.2242>
- Sharma, A. K., & Tripathi, K. (2016). *Loop reactors- Advancing reactors realm realm : A*

review reactors. (December).

- Spier, M. R., Vandenberghe, L. P. de S., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2012). *Application of different types of bioreactor in bioprocesses* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000114141.37640.37>
- Stamatiou, I., & Muller, F. L. (2018). Determination of mass transfer resistances in trickle bed reactors. *Chemical Engineering Journal*, (xxxx), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.194>
- Suh, J. W., Choi, Y. S., Kim, J. H., Lee, K. Y., & Joo, W. G. (2017). Multiphase flow analysis for air-water bubbly flow in a multiphase pump. *American Society of Mechanical Engineers, Fluids Engineering Division (Publication) FEDSM, 1A-2017*(July). <https://doi.org/10.1115/FEDSM2017-69239>
- Villiger, T. K., Neunstoecklin, B., Karst, D. J., Lucas, E., Stettler, M., Broly, H., ... Soos, M. (2018). Experimental and CFD physical characterization of animal cell bioreactors : From micro- to production scale. *Biochemical Engineering Journal*, 131, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.004>
- Warmeling, H., Behr, A., & Vorholt, A. J. (2016). Jet loop reactors as a versatile reactor set up - Intensifying catalytic reactions: A review. *Chemical Engineering Science*, 149, 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.04.032>
- Werner, S., Kaiser, S. C., Kraume, M., & Eibl, D. (2014). Computational fluid dynamics as a modern tool for engineering characterization of bioreactors. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(1), 85–99. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.60>
- White, F. M. (n.d.). *Mecânica dos Fluidos* (6ª Edição). Bookman.
- Yao, T. (2017). *cell culture media : History , characteristics , and current issues*. (January), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Zhou, Y., Han, L., He, H., Sang, B., Yu, D., & Feng, J. (n.d.). *Effects of Agitation , Aeration and Temperature on Streptomyces kanasensis ZX01 and Scale-Up Based on*. 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23010125>
- Zikanov, O. (2010). Essential computational fluid dynamics. In *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=e7fR2yu3HvQC&oi=fnd&pg=PR15&dq=Essential+Computational+Fluid+Dynamics&ots=sDyvXtL5tM&sig=->

stn0knXqaf03hUjG7b49bavB0I