UNIVERSIDAD DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

**Caracterização Multiparamétrica por Ultra-som do Processo
de Fermentação Alcoólica Mediante Sistema Híbrido de
Processamento de Sinais**

JULIÁN ANTONIO VILLAMARÍN MUÑOZ

São Carlos
2012

Caracterização Multiparamétrica por Ultra-som do Processo de Fermentação Alcoólica Mediante Sistema Híbrido de Processamento de Sinais

JULIAN ANTONIO VILLAMARÍN MUÑOZ

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, Programa de Engenharia Elétrica.

Área de Concentração:
Processamento de Sinais e Instrumentação

ORIENTADORA: Maria
Stela Veludo de Paiva, Ph. D.

São Carlos
2012

Trata-se da versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na EESC/USP que aloja o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Elétrica.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

V715 VILLAMARIN MUÑOZ, JULIAN ANTONIO
/ JULIAN ANTONIO VILLAMARIN MUÑOZ; orientador
Maria Stela Veludo de Paiva. São Carlos, 2012.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica e Área de Concentração em
Processamento de Sinais e Instrumentação -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2012.

1. Análise espectral. 2. Caracterização
Paramétrica. 3. Fermentação alcoólica. 4. Ultra-som. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **JULIAN ANTONIO VILLAMARIN MUÑOZ**.

Título da tese: "Caracterização multiparamétrica por ultra-som do processo de fermentação alcoólica mediante sistema híbrido de processamento de sinais".

Data da defesa: 06/12/2012

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a. **Maria Stela Veludo de Paiva (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Paulo Rogerio Scalassara**
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná/ UFTPR)

Prof. Titular **Paulo Seleglim Junior**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Rodrigo Capobianco Guido**
(Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-São José do Rio Preto)

Prof. Dr. **Rodrigo Lício Ortolan**
(Centro Federal de Educação Tecnológica/CEFET-MG)

Resultado:

APROVADO

APROVADO

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Protocolado em
Serviço de Pós-Graduação
EESC/USP

*Aos meus pais, Antonio e Ana Ruby que me ensinaram a lutar
com disciplina, compromisso e criatividade na procura do
do sucesso.*

*Aos meus avos Mario e Gladys, simbolos de sabiduría e
humildade na minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar a força espiritual neste longo caminho, aos meus pais Ana Ruby Muñoz e Antonio Villamarín por seus conselhos, por seu grande apoio incansável que me impulsionou para seguir na frente de qualquer obstáculo e principalmente por serem minha principal inspiração e motivo para seguir adiante em busca de triunfos neste caminho que é a vida.

Agradeço a minha irmã Diana Villamarín por as suas palavras e apoio espiritual nos momentos difíceis. Aos meus primos Diego e Natalhy pelo apoio incondicional.

Agradeço a minha família que sempre esteve me apoiando mas especialmente a minha avó Gladys García e ao meu avô Mario Sabas Muñoz (Q.E.P.D), a quem dedico este trabalho como homenagem a sua sabiduría.

Agradeço a minha orientadora, a professora Maria Stela Veludo de Paiva, por suas contribuições, conselhos, colaboração e compromisso na orientação deste trabalho.

Agradeço ao pessoal do laboratório de ensino do Instituto de Química de São Carlos (USP) pela sua colaboração, gentileza na disponibilização dos recursos para a condução dos experimentos neste estudo.

Agradeço aos meus amigos e colegas que sempre estiveram presentes contribuindo com ideias, discussões que permitiram a maturidade no desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa. Em especial agradeço aos meus amigos Cesar Vera e Fredy Morales por seus conselhos.

Agradeço a uma pessoa muito especial na minha vida que esteve espiritualmente comigo apesar da distância e que seja onde estiver estará torcendo por mim.

Agradeço à CAPES pela auxílio financeiro fornecido por meio da bolsa de estudo, concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

*O verdadeiro amante do conhecimento luta
naturalmenten pela verdade ...
e se eleva com luminosa e incansável paixão
até aprender a natureza essencial das coisas*
República 490^a

Resumo

VILLAMARÍN-MUÑOZ, J. A. **Caracterização Multiparamétrica por Ultra-som do Processo de Fermentação Alcoólica Mediante Sistema Híbrido de Processamento de Sinais**. 2012. 124 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A monitoração do processo de fermentação alcoólica para a obtenção de etanol é um tema de grande interesse pelo fato deste ser utilizado como fonte sustentável de energia na indústria. Os processos de monitoração convencionalmente utilizados na indústria são dispendiosos, baseados em medições supervisionadas de densidade e estimativas de parâmetros químicos mediante procedimentos *offline*. O uso de técnicas de monitoração não invasivas baseadas em ultra-som vem sendo desenvolvidas para esse fim, fazendo uso de estimativas de parâmetros clássicos como a velocidade de propagação acústica e a atenuação. No entanto, a evolução do processo fermentativo não é bem descrita por esses parâmetros. Devido a isso, o presente trabalho propõe um sistema híbrido de processamento de sinais de ultra-som que utiliza um conglomerado de parâmetros para uma caracterização mais eficiente do processo fermentativo. O sistema incorpora procedimentos computacionais para a detecção, caracterização e classificação das fases do mosto em fermentação, visto como uma suspensão sólido-líquido (fase dispersa e contínua). Esses procedimentos foram baseados em estimativas de estacionariedade dos sinais de retroespalhamento de ultra-som (teste de hipótese não paramétrico - Teste de Run), ajuste de curvas sobre a largura de banda espectral (técnica de *curve fitting*), assim como a extração de atributos espectrais tais como: frequência central, largura de banda e valores de amplitude da componente fundamental, entre outros, além de parâmetros ultra-sônicos como o coeficiente de atenuação (*slope*) e o coeficiente integrado de retro-espalhamento (IBC). Para a classificação foi utilizado o algoritmo *K-means*. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade na caracterização multiparamétrica não invasiva do fluido em fermentação, permitindo a identificação das principais fases do processo fermentativo. O trabalho contribui com uma metodologia alternativa para a avaliação da cinética do crescimento microbiano como indicador da evolução da fermentação alcoólica.

Palavras-chave: Análise Espectral, Caracterização Paramétrica, Fermentação Alcoólica, Ultra-som.

Abstract

VILLAMARÍN-MUÑOZ, J. A. **Multiparametric Characterization by Ultrasound of Alcoholic Fermentation Process by Hybrid System of Signal Processing**. 2012. 124p. Thesis (Ph.D.) - Department of Electrical Engineering, São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2012.

Monitoring of alcoholic fermentation process for the ethanol production is a topic of great interest because it can be used as a sustainable energy source in the industry. The monitoring process conventionally used in industry are expensive, based on supervised measurements of density and parameter estimates by chemical offline procedures. The use of noninvasive monitoring techniques based on ultrasound are being developed for this purpose, using estimates of classical parameters as the acoustic propagation velocity and attenuation. However, the time evolution of the fermentation process is not well described by these parameters. For this reason, this study proposes a hybrid system of ultrasound signal processing that uses a conglomerate of parameters aiming a more efficient characterization about the fermentation process. The system incorporates computational procedures for the detection, characterization and classification of the fermentation must phases, seen as a solid-liquid suspension (dispersed and continuous phases). These procedures were based on estimates of stationarity for ultrasound backscattered signals (non-parametric statistical test - Run Test), curve fitting on the spectral bandwidth, as well as spectral attributes extraction such as center frequency, bandwidth and energy values of the fundamental frequency and so on, plus ultrasonic parameters as the attenuation coefficient (slope) and the integrated back-scattering coefficient (IBC). For classification we used the k-means algorithm. The results showed the feasibility for the multiparametric noninvasive characterization of fluid in fermentation, identifying the main stages of the fermentation process. This work contributes with an alternative methodology to evaluate the kinetics of microbial growth as an indicator of the alcoholic fermentation evolution .

Keywords: Spectral Analysis, Parametric characterization, Alcohol Fermentation, Ultrasound.

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvii
1 Introdução	1
1.1 Justificativa	3
1.2 Objetivo Geral	4
1.2.1 Objetivos Específicos	4
1.3 Contribuições	5
1.4 Organização do Trabalho	6
2 Revisão Bibliográfica	7
2.1 Considerações Iniciais	7
2.2 Fermentação alcoólica no cenário industrial	7
2.3 Ultra-som na avaliação da fermentação	8
2.3.1 Parâmetros ultra-sônicos na monitoração da fermentação alcoólica . . .	9
2.4 Métodos de caracterização de biomassa	12
2.5 Considerações finais	14
3 Fundamentos Teóricos	17
3.1 Fermentação Alcoólica	17
3.1.1 Reator de mistura	20
3.2 Ondas de Ultra-som	21
3.3 Propagação acústica	22
3.3.1 Campo de ultra-som	23
3.4 Análise Espectral	25
3.5 Parâmetros acústicos	27
3.5.1 Velocidade de Propagação	27
3.6 Atenuação	28
3.7 Estimativa da Atenuação	30
3.8 Coeficiente de retroespalhamento (<i>backscattering coefficient</i>)	32
3.8.1 Derivação do Modelo para medir o coeficiente de <i>backscattering</i>	34

3.9	Teste de <i>Run</i>	37
3.9.1	Curve Fitting	39
4	Materiais e Métodos	41
4.1	Visão geral do sistema	41
4.2	Equipamentos do sistema de monitoração	42
4.3	Calibração	44
4.4	Experimentos de fermentação	47
4.5	Monitoração não destrutiva	50
4.6	Sistema de Caracterização - Técnicas de Processamento	52
4.6.1	Sistema de Detecção de partículas	52
4.6.2	Técnica de Caracterização	58
4.6.3	Classificação	61
5	Resultados e Discussões	69
5.1	Resultados Bioquímicos	69
5.2	Validação no meio de referência	74
5.3	Resultados no meio de cultura	81
5.4	Resultados do Sistema de Detecção na Fermentação.	83
5.5	Variação de parâmetros da fermentação alcoólica	87
5.6	Discussão do Sistema de Caracterização	91
5.7	Interpretação dos Atributos Espectrais	92
5.8	Resposta do Sistema de Classificação	94
5.9	Efeitos das bolhas gasosas	99
5.10	Avaliação da classificação	100
5.11	Aproximação Ultra-sônica - Evolução de Biomassa	101
5.12	Comparação do sistema em relação ao sistema de caracterização clássico	103
6	Conclusões	107
6.1	Sugestões para Trabalhos Futuros	110
6.2	Artigos Publicados	112
	Referências Bibliográficas	113
	Apêndice A - Tabelas de parâmetros	119
.1	Parâmetros no meio de Referência	119
.2	Parâmetros no meio de cultura	120

Lista de Figuras

3.1	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> . Organismo eucariota unicelular. Fonte adaptada (EGOROV, 2012).	18
3.2	Fases de fermentação em relação ao crescimento de biomassa. Fonte adaptada (SHULER; KARGI, 2002).	18
3.3	Perfis de agitação no fluido em fermentação. Fonte adaptada (GARCIA <i>et al.</i> , 2012)	21
3.4	Campo de ultra-som produzido por um transdutor plano.	24
3.5	Diâmetro do Feixe de ultra-som).	24
3.6	Angulo de divergência do feixe de ultra-som).	25
3.7	Medição da velocidade de propagação usando ToF.	28
3.8	Método da Diferença Espectral. Fonte adaptada Kuc e Schwartz (1979).	31
3.9	Geometria de espalhamento em região heterogênea. Fonte adaptada de Duck <i>et al.</i> (1998).	33
3.10	Geometria de espalhamento partícula espalhadora. Fonte adaptada Inasana <i>et al.</i> 1990. (1998).	35
3.11	Observações etiquetadas mediante as expressões Eq. 3.45 e Eq. 3.46 para a seqüência de dados N. Fonte adaptada (BENDAT, 1971).	38
3.12	Ajuste linear da curva (<i>linear curve fitting</i>) para a determinação da taxa de atenuação de energia espectral. Fonte adaptada (WILSON <i>et al.</i> , 1984).	40
4.1	Etapas desenvolvidas no projeto	41
4.2	Sistema de monitoração. 1.) Sistema de ultra-som. 2.) Osciloscópio. 3.) pHmetro Digital. 4.) Agitador Magnético. 5.) Transdutor de Ultra-som. 6.) Caldo de cana de açúcar. 7.) Sensor pHmetro.	42
4.3	Sistema de emissão e aquisição. (A) Sistema de ultra-som Panametrics 5800 configurado em modo pulso-eco. (B) Osciloscópio Tektronix TDS 3034B, utilizado para armazenamento dos sinais de ultra-som. (C) Transdutor de ultra-som de 4.5 MHz marca FUNBEC/ 7mm de diâmetro.	43
4.4	Resposta em frequência para o transdutor de ultra-som. (A) Impedancímetro Agilent 4294A com varredura em frequência entre 40 Hz a 110 MHz. (B) Apresenta as frequências amortecidas da cerâmica do transdutor, mostrando uma frequência de ressonância de 4.5 MHz aproximadamente.	43

4.5	(A) pHmetro Digimed DM20 com eletrodo (DME-CV1). (B) Agitador magnético com placa de aquecimento marca Fisatom modelo 258.	44
4.6	Ângulo de refração através de uma interface de vidro e água.	45
4.7	Ajuste do sistema no meio de Referência. (A) Acoplamento do transdutor no recipiente com água e alinhamento do feixe de ultra-som. (B) Mistura de água e fermento. (C) Identificação de sinais de ultra-som no meio de referência em agitação.	46
4.8	Sinais de ultra-som coletadas no meio de Referência.	47
4.9	Valores iniciais do caldo de cana de açúcar	47
4.10	Inoculação do mosto de caldo de cana de açúcar com fermento biológico seco comercial. (A) -(B) Partículas de levedura da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (C) - (D) Agregação de levedura no mosto.	48
4.11	Procedimento para estimar peso de biomassa seca. (A) Extração 20 ml do mosto (cálculo de densidade)). (B) Sistema de filtragem para a mistura líquida. (C) Extração da biomassa e secagem no forno. (D) Estimativa do peso de biomassa na balança (Shimadzu AY220).	49
4.12	Evolução da biomassa no meio de fermentação. Fotos obtidas mediante microscópio ótico marca Leica DMRX com magnificação de 2.5x. (a) Fase de adaptação celular. (b) - (f) Fase e fermentação principal. (g)-(i) Fase de pós-fermentação.	49
4.13	Acoplamento do transdutor de ultra-som.	50
4.14	Descrição do sinal de retroespalhamento de ultra-som no meio de fermentação. As reflexões 1 e 2 são associadas às paredes do vidro do recipiente. As reflexões 3 e 4 ocorrem na interface vidro líquido e vice-versa.	51
4.15	Evolução dos sinais de ultra-som na fermentação.(a) Sinal no caldo de cana sem levedura. (b)-(d) Fase de adaptação celular. (e)-(h) Fase tumultuosa. (i)-(l) Pós-fermentação.	52
4.16	Fluxograma de processos do sistema de caracterização da fermentação alcoólica.	53
4.17	Análise de ondas usando <i>curve fitting</i> sobre densidades de potencia espectral	53
4.18	Exemplo de detecção mediante o Teste de <i>Run</i> . (A) Sinal de retroespalhamento associado a um grupo de partículas de levedura suspensas na água. (B) Espectrograma. (C) Análise da estacionariedade no sinal. (D) Detecção de reflexão associada a partículas de levedura.	54
4.19	Estimativa de coeficientes angulares (<i>slope</i>) a partir de espectros estimados sobre reflexões associadas à fase dispersa e contínua.	56
4.20	Módulo de integração dos algoritmos de detecção. (A) Sinal de ultra-som de entrada coletado na RoI. (B) Operação de interseção, baseada na seleção de intervalos de sinais identicamente detectados nos procedimentos de <i>Curve Fitting</i> e o Teste de <i>Run</i>	57

4.21	Diferenças entre as reflexões ocasionadas por partículas de levedura e a fase aquosa.	58
4.22	Estimativa de parâmetros: IBC, <i>Slope</i> , Freq. Central, Energia espectral (Amplitude), em intervalos do sinal de ultra-som após da propagação na água com partículas.(A)-(B) Representam o sinal de ultra-som no tempo (coletado na RoI). (C)-(F) Apresenta a atribuição de valores paramétricos para intervalos de tempo do sinal. (C)IBC. (D) <i>Slope</i> . (E) Freq. Central. (F) Amplitude.	60
4.23	Estimativa de parâmetros em intervalos do sinal de ultra-som após da propagação no mosto em fermentação. (A)-(B) Representam o sinal de ultra-som no tempo. (C)-(F) Apresenta a estimativa quantitativa dos parâmetros: IBC, <i>Slope</i> , Freq. Central, Energia espectral (Amplitude) em distintos intervalos de tempo do sinal.	60
4.24	Atividades do algoritmo de clusterização <i>K-means</i> . (A)Diagrama de dispersão dos dados de entrada e inicialização aleatória dos valores dos centróides. (B) Atribuição de dados a um grupo com centroide mais próximo, usando como métrica a distância euclidiana. (C) Deslocamento de centroides com base na média dos dados que constituem cada grupo atual. (D) Dissociação dos elementos em cada grupo para recalcular a atribuição dos dados em relação aos novos centróides.	61
4.25	Representação das classes de um atributo normalizado a partir do resultado obtido com <i>K-means</i> . (A) Frequência Central. (B) Slope.	63
4.26	Identificação de fases no meio de fermentação e ecos associados. (A)-(B) Exibem um exemplo da distribuição das partículas de levedura em relação à fase aquosa de suspensão. Adicionalmente são apresentados sinais típicos de ultra-som gerados pelas fases do meio de cultura.	64
4.27	Configuração do meio de simulação. Configuração do sistema de ultra-som no Modo Pulso-Eco. Sinal de ultra-som incidente (Pulso Gaussiano) de 4.5 MHz, Tamanho do transmissor-receptor = 7 mm. Meio de propagação = mistura de água (velocidade longitudinal de 1497 m/s e impedância acústica de 1.49 Mrayl) com esferas de vidro (velocidade longitudinal 5640.26 m/s e impedância acústica de 12.63 Mrayl). Tempo de Simulação 30 μ s.	65
4.28	Simulação do processo de propagação de um campo de ultra-som de 4.5 MHz num meio com água e partículas dispersas	65
4.29	Simulação computacional do processo de espalhamento por partículas suspensas na água.	66

4.30	Exemplo da construção da aproximação ultra-sônica para avaliar a evolução do meio de fermentação. (A) Representa o sinal de retroespalhamento de ultra-som coletado num instante de tempo determinado. Observa-se que o sinal segmentado (linhas vermelhas) é classificado mediante K-means de acordo com intervalos associados à fase dispersa e contínua (marcação verde e azul respectivamente). (B) Ilustra a agregação do valor de percentagem de detecções atribuídas à fase dispersa em comparação com o valor de Biomassa estimado.	67
5.1	Valores médios normalizados dos parâmetros bioquímicos no processo de fermentação.	69
5.2	Mudanças na mistura líquida de fermentação. (A) Caldo de cana de açúcar. (B) Fase adaptação celular. (C)-(E) Fase de Fermentação principal (Tumultuosa). (F) Fase de Pós-Fermentação.	70
5.3	Evolução fase dispersa. (A) Caldo de cana de açúcar sem levedura. (B) Fase adaptação celular. (C)-(F) Fase de Fermentação principal. (G)-(H) Fase de Pós-Fermentação.	71
5.4	Perfil do peso da biomassa seca estimado em distintos processos de fermentação para 20 ml do meio de cultura.	71
5.5	Taxa crescimento de biomassa.	72
5.6	Perfil da eficiência do crescimento microbiano.	72
5.7	Perfil do pH em vários processos de fermentação alcoólica.	73
5.8	Perfil de densidade no processo de fermentação alcoólica.	74
5.9	Monitoramento de partículas de fermento quando transitam pelo campo de ultra-som na água em repouso.	74
5.10	Exemplo do tipo de sinal de ultra-som coletado durante a interação de partículas do fermento com o campo de ultra-som na água em repouso.	75
5.11	Detecção mediante o teste de Run do sinal estacionário que corresponde com o sinal refletido por partículas de levedura na água. (A) Espectrograma do sinal na RoI. (B) Identificação do sinal estacionário. (C) Extração de segmentos estacionários.	75
5.12	Detecção mediante <i>Curve Fitting</i> do sinal refletido por partículas de levedura na água.	76
5.13	Exemplo da identificação do sinal de ultra-som refletido por partículas de fermento durante a propagação na água em repouso.	77
5.14	Diferenças entre parâmetros normalizados na água em repouso, em agitação e com partículas.	78
5.15	Exemplo de detecção de partículas de levedura no meio de referência.	78

5.16	Exemplo de classificação de partículas no sistema de referência em repouso. (A) Variação da frequência central em diferentes segmentos da RoI. (B) Espectrograma. (C) Classificação esperada. (D) Classificação com <i>K-means</i>	79
5.17	Detecção da fase dispersa e contínua para a água em repouso usando <i>K-means</i> . (A) Água sem partículas de levedura. (B) Água com partículas de levedura. . .	80
5.18	Identificação das reflexões dadas por partículas de levedura suspensas na água sob agitação. (A) Exemplo 1 (B) Exemplo 2. (C) Exemplo 3.	80
5.19	Identificação da fase dispersa e contínua para o caldo de cana de açúcar usando <i>K-means</i> . (A) Sem fermento. (B) Agregação de fermento com líquido em repouso. (C) Agregação de fermento com líquido em agitação.	82
5.20	Detecção de sinais estacionários, associados a partículas de levedura no mosto de fermentação durante a fase de adaptação celular. (A) Espectrograma na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários (marcação vermelho). (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.	83
5.21	Detecção de sinais estacionários, associados a partículas de levedura no mosto de fermentação durante a fase de tumultuosa. (A) Espectrograma na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários. (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.	84
5.22	Exemplo de detecção de sinais estacionários durante a fase de pós-fermentação. (A) Espectrograma do sinal de retroespalhamento na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários atribuídos a partículas sólidas. (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.	85
5.23	Detecção de sinais associados a partículas sólidas de fermento mediante a estimativa de coeficientes angulares na fase adaptativa. (A) Exemplo 1. (B) Exemplo 2.	86
5.24	Detecção de incrementos de energia espectral no sistema de fermentação. (A) Detecção em fase tumultuosa (sistema com muita agitação). (B) Detecção na pós-fermentação.	86
5.25	Estimativa espectral na fase adaptativa. (A) Sinal de retroespalhamento de ultra-som no meio de cultura. (B) Espectro de Potência médio em região com alta concentração de partículas.	87
5.26	Espectros de potência ((I),(II),(III), (IV)) estimados sobre o sinal de retroespalhamento de ultra-som na fase tumultuosa.	87
5.27	Espectros de potência estimados na mistura líquida fermentada em repouso. . .	88
5.28	Espectros de potência estimados no meio de cultura em repouso na fase de pós-fermentação.	89
5.29	Espectros de potência ((I) e (II)) estimados sobre sinal de retroespalhamento de ultra-som na fase de pós-fermentação.	89

5.30	Varição paramétrica média estimada na RoI durante a evolução do processo de fermentação. (A) Variação da Frequência Central. (B) Variação do <i>Slope</i> . (C) Variação do Coeficiente angular médio estimado no <i>Curve Fitting</i> . (D) Variação do IBC. (E) Variação de amplitude da frequência fundamental. (F) Evolução da variância. (G) Variação da Largura de Banda.	90
5.31	Evolução de parâmetros espectrais no processo de fermentação.	93
5.32	Classificação da fase contínua e dispersa no meio de cultura. (A) Avaliação Frequência fundamental em intervalos do sinal de ultra-som. (B) Espectrograma do sinal na RoI. (C) Classificação predeterminada da fase dispersa e contínua. (D) Classificação mediante <i>K-means</i>	95
5.33	Classificação da fase contínua e dispersa durante a fase adaptativa. (A) Espectrograma. (B) Classificação "Correta"(predeterminada). (C) Classificação mediante <i>K-means</i>	96
5.34	Classificação de componentes na fase tumultuosa. (A)Espectrograma. (B) Classificação "Correta". (C) Classificação obtida mediante procedimentos computacionais implementados.	97
5.35	Classificação na fase de pós-fermentação com líquido em repouso (assentamento de leveduras no fundo do recipiente).(A) Espectrograma.(B) Identificação bolhas de gás e fase contínua.	98
5.36	Classificação na fase de pós-fermentação - meio em agitação.(A) Espectrograma.(B) Identificação de reflexões associadas a partículas sólidas e à fase contínua.	98
5.37	Espectros de potência na pós-fermentação para a mistura líquida em repouso. (I) - (II) representam espectros na fase contínua. (III) -(IV) mostra densidades de potência espectral de bolhas gasosas.	99
5.38	Eficiência do sistema de classificação de acordo com parâmetros de entrada em diferentes fases da fermentação alcoólica,	100
5.39	Aproximação ultra-sônica da evolução de biomassa em diferentes experimentos de fermentação: (A),(B) e (C).	102
5.40	Comparação da faixa dinâmica do parâmetro velocidade (reportado em Lok e Hitzmann (2004)-(A)) e o parâmetro indicador da evolução da biomassa estimado neste estudo para avaliar a evolução do processo de fermentação (B). . .	104
5.41	Relação entre biomassa e parâmetros. A curva do parâmetro velocidade foi adaptada da literatura (RESA <i>et al.</i> , 2009)	105
1	Varição paramétrica média estimada na RoI durante a evolução do processo de fermentação.	123

Lista de Tabelas

5.1	Diferença percentual entre parâmetros de uma amostra de água em repouso com e sem partículas. A Tabela 1 - Apêndice A apresenta os valores reais de parâmetros estimados para os meios.	76
5.2	Diferenças paramétricas dos sinais de ultra-som entre a água em repouso e com agitação. A Tabela 2 - Apêndice A apresenta os valores reais de parâmetros estimados.	77
5.3	Diferença percentual média entre os parâmetros estimados para a água com partículas em repouso e com agitação. A Tabela 3 - Apêndice A apresenta valores reais de parâmetros estimados para a água em agitação	77
5.4	Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em repouso e com agitação. O parâmetro Sist. Det. corresponde à detecção efetuada pelos procedimentos de <i>Curve fitting</i> e o Teste de <i>Run</i>	82
5.5	Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em estado de repouso com e sem partículas de fermento.	82
5.6	Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em repouso sem fermento e em agitação com fermento.	83
1	Parâmetros para uma amostra de água em repouso sem partículas de levedura. .	119
2	Parâmetros para uma amostra de água em repouso com partículas de levedura. .	119
3	Parâmetros para uma amostra de água em agitação.	119
4	Parâmetros para uma amostra de água em agitação com partículas de levedura. .	120
5	Parâmetros médios estimados para sinais de ultra-som sobre uma amostra de caldo de cana de açúcar em repouso. FC e FD indicam o número de sinais detectados como fase contínua e fase dispersa respectivamente.	120
6	Parâmetros médios estimados sobre sinais de ultra-som coletados para uma amostra de caldo de cana de açúcar em agitação.	121
7	Parâmetros médios estimados sobre sinal de ultra-som coletado para uma amostra de caldo de cana de açúcar em repouso com inoculação da levedura.	121
8	Parâmetros médios estimados sobre sinal de ultra-som coletado para uma amostra de caldo de cana de açúcar em agitação com inoculação da levedura.	121

9	Exemplos de parâmetros médios estimados sobre sinais de ultra-som coletados durante a evolução do processo fermentativo. <i>Curve Fit.</i> representa o coeficiente angular médio estimado sobre a largura de banda do espectro de potência médio calculado na RoI.	122
10	Exemplos de parâmetros médios estimados na RoI para partículas de biomassa no meio de cultura durante a fase de pós-fermentação. <i>Curve Fit.</i> representa o coeficiente angular médio estimado sobre a largura de banda do espectro de potência médio calculado na RoI.	123
11	Exemplos de parâmetros médios estimados na RoI para bolhas de gás dispersas na fase aquosa do meio de cultura durante a fase de pós-fermentação.	124
12	Exemplos da variação de parâmetros médios estimados na RoI no meio de cultura para um incremento de temperatura entre 28 °C a 29 °C	124

Capítulo 1

Introdução

As técnicas de caracterização ultra-sônica de materiais, a partir de técnicas de processamento de sinais de retro-espalhamento de ultra-som (*Ultrasound Backscattering*) tornaram-se ferramentas fundamentais para aplicações industriais (BOONKHAO; WANG, 2012), (CHEMAT *et al.*, 2011) e clínicas (GHOSHAI *et al.*, 2011), (LIPPERTS *et al.*, 2009), devido a suas vantagens como a possibilidade de realizar uma análise não destrutiva com alto desempenho e baixo custo, além de permitir a extração de parâmetros que caracterizam o meio de inspeção (JIRIK *et al.*, 2007).

No cenário industrial, a caracterização ultra-sônica pode ser empregada na análise de suspensões sólido-líquido, sistemas coloidais e outras substâncias complexas visando monitorar alterações de propriedades reológicas entre outras, as quais podem afetar os procedimentos de controle e consequentemente a qualidade de produtos industriais (WIKLUND *et al.*, 2007). Um exemplo claro é visto na manufatura de alimentos como chocolate, onde por meio de ondas de ultra-som são monitoradas condições de fluxo e estados do fluido durante os processos de pre-cristalização (OURIEV *et al.*, 2004).

O monitoramento por ultra-som em fenômenos dinâmicos complexos, como por exemplo os processos de produção de etanol, tem recebido uma grande atenção por diversos autores (KRAUSEA *et al.*, 2011), (VLAHOPOULOU, 2010), (SCHOCK; BECKER, 2010), (LAMBERTI *et al.*, 2009), (RESA *et al.*, 2009), (PANETTA *et al.*, 2006), (LOK; HITZMANN, 2004), (HENNING *et al.*, 2000) com o objetivo de melhorar o controle e desempenho do processo de fermentação alcoólica, envolvido na produção de etanol.

A importância de se obter melhor rendimento na produção de etanol, considerando a relação entre açúcares consumidos e álcool produzido, tem levado à modernização da monitoração do bioprocessamento de fermentação mediante a implementação de sistemas de monitoração ultra-sônica (HOCHE *et al.*, 2011), (VLAHOPOULOU, 2010), (LAMBERTI *et al.*, 2009), (RESA *et al.*, 2009), que permitem medições de parâmetros acústicos, que por sua vez são correlacionados com variáveis do processo como a concentração alcoólica, valores de pH e assim por diante (KRAUSEA *et al.*, 2011).

Parâmetros acústicos convencionais, tais como: a velocidade de propagação e atenuação têm sido usados como índices quantitativos na caracterização ultra-sônica para descrever as alterações no meio líquido em fermentação (KRAUSEA *et al.*, 2011), (RESA *et al.*, 2009), (RESA *et al.*, 2004), (LOK; HITZMANN, 2004) durante os processos de decomposição de açúcares em álcool e dióxido de carbono pela ação de células de levedura. No entanto, as análises da cinética de propagação de cepas de levedura, as quais comprometem o rendimento na produção de álcool em sistemas de fermentação, são limitadas mediante estimativas de velocidade (parâmetro usualmente calculado para descrever variações de concentração alcoólica em relação a variações de densidade do meio (JAN *et al.*, 2008)) devido ao fato que, através de medições do tempo de vôo da onda no meio de propagação, obtém-se variações pequenas da velocidade que não descrevem de forma adequada as mudanças dramáticas na heterogeneidade do fluido, especialmente na fase de fermentação principal ou tumultuosa. Por outro lado, a utilização da atenuação como único parâmetro de caracterização pode resultar em valores ambíguos por causa do relacionamento complexo com as propriedades do meio (HAUPTMANN *et al.*, 2002), o qual pode ser evidenciado no trabalho de Panetta *et al.* (2006), onde para incrementos de aproximadamente 25% da concentração de biomassa, os valores de atenuação tendem a permanecer sem variações.

Neste contexto, outras aproximações têm proposto sistemas de monitoração robustos, que utilizam um conjunto de sensores (gás, pH, temperatura, entre outros) que fornecem variáveis de entrada para caracterizar a dinâmica da fermentação, mediante a análise discriminante fatorial (CALDERON-SANTOYO, 2010) e métodos de aprendizado supervisionado, como o modelo de máquina de vetores de suporte (*support vector machine*) projetado por Wang *et al.* (2006).

Considerando que os métodos de caracterização ultra-sônica sugerem vantagens na monitoração do processo fermentativo na relação custo-benefício, quando comparado com sistemas configurados com múltiplos dispositivos eletrônicos de alto custo, neste estudo apresenta-se um método alternativo para a caracterização ultra-sônica do processo de fermentação alcoólica, o qual está relacionado com a monitoração da propagação de levedura no sistema de fermentação, a partir da análise da evolução de um sistema sólido-líquido de fermentação, composto por uma fase contínua (líquida) e dispersa (fermento).

A caracterização é realizada mediante a implementação de um híbrido de procedimentos computacionais que compreende: um sistema de detecção, caracterização e classificação. O sistema de detecção foi focado na identificação de partículas, com base no teste estatístico de Run e o ajuste de curvas (*Curve fitting*) sobre espectros de potência, predeterminando sinais ultra-sônicos modulados pela presença de partículas sólidas (leveduras).

O sistema de caracterização baseado na extração de uma série de parâmetros (ultra-sônicos

e espectrais) juntamente com o sistema de classificação (baseado no algoritmo de clusterização *K-means*), possibilitaram a identificação de reflexões acústicas associadas a grupos de partículas sólidas de levedura (fase dispersa) e sinais provenientes da solução aquosa (fase contínua), permitindo a estimativa de uma aproximação ultra-sônica que foi correlacionada com a cinética de crescimento microbiano, e que descreve a evolução do meio de cultura. Adicionalmente, a análise da evolução paramétrica do meio de fermentação, estimada a partir de sinais que correspondem à propagação na região de interesse (RoI) do meio, contribuiu para estimar as diferenças das principais fases do processo de fermentação, tais como fase de adaptação celular (Fase *lag*), fase tumultuosa (dada pelo rápido crescimento das células de levedura) e a fase de pós-fermentação, vista como a desaceleração da atividade fermentativa e na qual ocorrem mudanças das propriedades reológicas do fluido.

Assim, a metodologia proposta, apresenta-se como alternativa para descrever a dinâmica da fermentação, a partir da análise de diversos parâmetros estimados mediante um conjunto de técnicas de processamento de sinais onde é realizada a correlação semi-empírica entre valores quantitativos de parâmetros acústicos e bioquímicos. A metodologia proposta em comparação com sistemas convencionais de caracterização ultra-sônica da fermentação, permite uma melhor descrição da evolução do meio de cultura, em relação ao perfil da cinética de propagação de cepas de levedura no sistema de fermentação, devido às limitações da velocidade e a atenuação. Neste contexto, o método proposto apresenta uma nova abordagem que permite construir um perfil do crescimento de biomassa, como indicador da atividade fermentativa, a partir da detecção de reflexões relacionadas à presença de biomassa na RoI com o objetivo de descrever a cinética do crescimento microbiano como agente principal na qualidade do processo fermentativo.

1.1 Justificativa

A análise do processo de fermentação alcoólica na produção de etanol como biocombustível é um tema de grande interesse científico e tecnológico entre outros que está em expansão, notando-se, que a participação do etanol como fonte de energia sustentável no transporte, representa atualmente 19% no consumo de energia (QUAGLIO; SECCO, 2012).

A monitoração dos processos fermentativos mediante tecnologias não invasivas baseadas na utilização do ultra-som (RESA *et al.*, 2009), (LOK; HITZMANN, 2004), tem ganhado importância diante dos procedimentos convencionais operados na indústria baseados na medição supervisionada de densidade (refratometria) (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009), (JAN *et al.*, 2008). Geralmente, o método ultra-sônico mais empregado é baseado na medida da velocidade de propagação longitudinal, através da estimativa do tempo de vôo da onda no mosto de fermentação, que visa o cálculo da densidade e concentração alcoólica durante o processo de conversão dos

carboidratos em etanol (RESA *et al.*, 2004). No entanto, a monitoração ultra-sônica mediante estimativas da velocidade de propagação em relação às taxas de crescimento dos microorganismos (leveduras), considerados como o agente mais importante na obtenção do álcool (PACHECO, 2010), raramente se vê reportada na literatura (ZIPS; FAUST, 1989), o que reflete as limitações do parâmetro velocidade, e a incapacidade do parâmetro na avaliação da heterogeneidade do meio, devido à pequena variação da velocidade durante a fermentação, que dificilmente descreve a cinética de propagação dos agentes de transformação. Esta por sua vez está diretamente relacionada com a qualidade e rendimento do produto no processo fermentativo.

A importância da avaliação da cinética do crescimento das cepas de levedura nos processos de fermentação alcoólica, tem levado ao desenvolvimento de diversos estudos (PACHECO, 2010), (VIEIRA *et al.*, 2008), (CARVALHO *et al.*, 2008), (MUNDIM *et al.*, 2009) com o objetivo de analisar a eficiência na produção de etanol com variações de cepas industriais, concentrações de substratos entre outros e que requerem instrumentos que lhe permitam controlar, analisar e melhorar os processos envolvidos na produção de álcool, contribuindo com o crescimento do etanol como matriz energética alternativa. A aplicação do parâmetro atenuação, na avaliação da biomassa de misturas líquidas de fermentação, assim como apresentado por Panetta *et al.* (2006) e Zips e Faust (1989), mostra que esse parâmetro na avaliação experimental, apresenta ambigüidades durante incrementos de concentrações de biomassa, implicando no uso limitado em sistemas comerciais.

Considerando o mencionado, o presente trabalho propõe a implementação de uma nova metodologia não invasiva de caracterização ultra-sônica do processo fermentativo, como método alternativo na análise da cinética de propagação da biomassa, a qual, é alcançada com o aproveitamento da extração de informações paramétricas dos sinais de ultra-som que descrevem o comportamento interno do meio de fermentação, explorando técnicas de processamento de sinais focadas à discriminação de sinais ultra-sônicos associados à fase dispersa e contínua do meio de cultura.

1.2 Objetivo Geral

Projetar um sistema de caracterização ultra-sônica para analisar a dinâmica de fermentação alcoólica, a partir da implementação de um híbrido de procedimentos computacionais baseados no processamento de sinais de ultrassom.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Projetar o sistema de caracterização por ultra-som para a análise não destrutiva do sistema de fermentação.
- Detectar partículas sólidas de levedura da espécie *Saccharomyce Cerevisiae* no sistema

de fermentação a partir do teste de Run e técnicas de análise espectral.

- Caracterizar a fase dispersa e contínua do meio de cultura mediante a extração de parâmetros ultra-sônicos e espectrais sobre os sinais de retroespalhamento de ultra-som.
- Classificar as componentes da mistura líquida de fermentação durante a evolução temporal do processo de fermentação com o uso de K-means.
- Determinar as diferenças paramétricas por ultra-som entre as principais fases de fermentação para caracterizar a evolução do meio.
- Caracterizar a cinética de crescimento de biomassa a partir da quantificação da detecção de partículas.
- Determinar o desempenho do sistema implementado, vantagens e restrições em relação à literatura.

1.3 Contribuições

A principal contribuição deste trabalho está relacionada com o fornecimento de uma nova abordagem, que objetiva a monitoração não invasiva da dinâmica de fermentação alcoólica, mediante uma análise multiparamétrica, que permite descrever mudanças entre as principais fases de fermentação, possibilitando adicionalmente, a estimativa de uma aproximação ultra-sônica, através da qual é estimado um perfil do crescimento microbiano, como indicador da atividade fermentativa, mediante a análise da evolução das fases do meio (fase dispersa e contínua) registrada nos sinais de retroespalhamento de ultra-som, adquiridos durante a exposição do meio em fermentação a um campo acústico.

Em linhas gerais, o sistema implementado fornece a integração de técnicas de processamento de sinais que não tinham sido exploradas na caracterização de processos fermentativos, como a aplicação de um teste estatístico não paramétrico (para identificar modulações dadas por partículas), o ajuste de curvas nas larguras de banda de densidades de potência espectral (para prever mudanças de impedância acústica entre a fase aquosa e dispersa do meio) e a utilização de diversos parâmetros (ultra-sônicos e espectrais) úteis na avaliação das características de heterogeneidade, usados como variáveis de entrada em um classificador não supervisionado.

Diante do exposto, o presente trabalho contribui com uma abordagem híbrida na análise das principais etapas do processo de fermentação alcoólica para a obtenção de etanol, distinta de aproximações ultra-sônicas convencionais, possibilitando a construção de um perfil da evolução de biomassa como indicador da atividade fermentativa.

1.4 Organização do Trabalho

Este trabalho está organizado em seis capítulos. No primeiro capítulo foi apresentada a introdução para situar o leitor nos aspectos relacionados ao problema de caracterização a ser tratado e o posicionamento da proposta de pesquisa referente a outros trabalhos recentes.

No Capítulo 2 é apresentada uma breve revisão bibliográfica dos estudos relacionados às técnicas de caracterização ultra-sônica de processos de fermentação.

No capítulo 3 são apresentados os conceitos teóricos relacionados ao processo de fermentação alcoólica e à interação de ondas de ultra-som com o meio envolvido. Também são descritas a base matemática utilizada nos processos de caracterização do meio de estudo, vinculadas com parâmetros ultra-sônicos e espectrais.

No capítulo 4, são descritos os equipamentos utilizados e as características da mistura líquida de estudo, assim como a metodologia utilizada durante a calibragem do sistema de caracterização ultra-sônica, experimentos de fermentação conduzidos e a monitoração simultânea por ultra-som e coleta de parâmetros químicos. Finalmente é realizada a descrição dos algoritmos de caracterização propostos conformado por um sistema de detecção, caracterização e classificação de sinais de retroespalhamento de ultra-som.

No Capítulo 5 são apresentados os principais resultados e discussões que levaram às conclusões do estudo no Capítulo 6.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Considerações Iniciais

Neste capítulo são descritos os principais trabalhos relacionados à fermentação alcoólica, à aplicação do ultra-som na avaliação desse bioprocessos, e os métodos de caracterização de biomassa.

2.2 Fermentação alcoólica no cenário industrial

A análise e monitoração dos processos de fermentação alcoólica que visam à geração de etanol como biocombustível tem se tornado atualmente um tema de grande interesse científico e tecnológico, devido à necessidade de se criar ferramentas que permitam ampliar o uso de energias renováveis, como fontes alternativas ao uso de combustíveis fósseis. O objetivo é minimizar os efeitos negativos sobre o meio ambiente, tais como: emissões poluentes sobre atmosfera, contaminação hídrica e de solos, que geralmente ocorrem pela liberação de resíduos sólidos e solventes perigosos provenientes de processos industriais durante o processamento de fontes não renováveis (BARBOZA, 2001).

A produção de etanol como fonte bioenergética tem ganhado importância nos últimos anos, devido à necessidade de ampliar a capacidade industrial de geração de fontes energéticas mais sustentáveis e limpas em grande escala. Desse modo, atualmente a utilização de etanol em motores veiculares tem permitido uma diminuição de aproximadamente 50% do monóxido de carbono.

O Brasil vem se consolidando mundialmente como um dos maiores produtores de bioetanol devido a suas políticas internas na substituição de combustíveis convencionais e seu consistente trabalho de pesquisa, o qual lhe tem proporcionado uma ampla experiência no uso de etanol, que vem sendo projetada há mais de trinta anos (QUAGLIO; SECCO, 2012). Tais aspectos tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias agroindustriais como suporte aos processos de produção alcoólica, com uma atrativa relação de custo-benefício e o domínio de mercados

internacionais. Em termos dos processos de produção de etanol, uma das principais etapas da produção do mesmo é o processo denominado de "fermentação alcoólica", no qual substratos são convertidos, mediante leveduras, em resíduos metabólicos como o dióxido de carbono e etanol entre outros (RESA *et al.*, 2009).

No cenário industrial a análise e monitoração desse processo é importante para controlar de forma adequada a condução do bioprocessamento e melhorar o rendimento da produção de etanol em relação aos carboidratos consumidos (LOK; HITZMANN, 2004).

Diversos estudos (MALTA, 2006), (MUNDIM *et al.*, 2009) tem mostrado a importância e o interesse na avaliação do processo de fermentação alcoólica a partir da análise do comportamento de células de levedura dentro do sistema de fermentação. Assim, destacam-se estudos que envolvem a análise de parâmetros de propagação de leveduras (MALTA, 2006), comportamento das mesmas em altas concentrações de sacarose (MUNDIM *et al.*, 2009), crescimento das cepas de levedura em fermentadores com eficiência na homogeneização de seus componentes (MULLER *et al.*, 2007), quantificação da floculação de células de *saccharomyces cerevisiae* dada por bactérias contaminantes do processo de fermentação (LUDWIG *et al.*, 2001) e análise da cinética de fermentação dada por células de *saccharomyce cerevisiae* (VIEIRA *et al.*, 2008) entre outros.

Considerando a importância da monitoração do mosto (mistura líquida açucarada destinada à fermentação), vários estudos (PEREIRA, 1998), (HENNING, 2006), (LAMBERTI *et al.*, 2009), (CALDERON-SANTOYO, 2010), (HOCHE *et al.*, 2011) têm implementado sistemas com sensores que permitem estimativas de pressão, temperatura, densidade, pH e concentração de biomassa do fluido entre outros, durante a fermentação, visando assim a viabilidade da implementação em indústrias. As propostas de caracterização do processo fermentativo vão desde medidas de densidade mediante a estimativa da força impulsional através de células de carga, onde se mede o fenômeno físico que experimenta um corpo rígido submerso num fluido (PEREIRA, 1998) até estimativas não invasivas de parâmetros acústicos para determinar a concentração alcoólica (LAMBERTI *et al.*, 2009).

No entanto, industrialmente as análises de fermentação são efetuadas convencionalmente com procedimentos "offline", a partir dos quais são extraídas amostras para o cálculo de parâmetros como concentração do mosto e densidade, os quais são estimados mediante medições óticas de absorção (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

2.3 Ultra-som na avaliação da fermentação

A importância na monitoração dos processos de fermentação alcoólica tem impulsionado o desenvolvimento de métodos não invasivos, entre os quais, destaca-se o uso do ultra-som como

ferramenta potencial para a caracterização dos fenômenos complexos envolvidos na fermentação alcoólica (LOK; HITZMANN, 2004),(RESA *et al.*, 2009).

Neste contexto, o uso de ultra-som como método alternativo representa uma grande vantagem, porque permite uma caracterização não invasiva e não destrutiva de misturas líquidas complexas e de sistemas com concentrações de partículas em suspensões, evitando assim, a extração física de amostras e diminuindo o risco de contaminação em processos de fermentação, além de permitir medições mais efetivas em meios opacos, com amplas regiões de concentrações de partículas quando comparado com as medições óticas (PANETTA *et al.*, 2006).

As medições ultrassônicas têm sido bem sucedidas no monitoramento de diversos processos industriais: alimentares, farmacêuticos, químicos e biotecnológicos (HAUPTMANN *et al.*, 2002). Isto é devido aos diversos efeitos da propagação de ondas ultrassônicas em meios complexos, os quais tem sido modelados e estimados mediante parâmetros para permitir uma descrição quantitativa das características (molecular, distribuição da heterogeneidade etc.) de líquidos e materiais, a partir da interação das ondas com o meio de propagação (HAUPTMANN *et al.*, 2002).

Outras aproximações (PANETTA *et al.*, 2006), (RESA *et al.*, 2009) para a caracterização das propriedades acústicas de processos como a fermentação foram desenvolvidas com técnicas de caracterização quantitativa por ultra-som, as quais, são efetuadas através da análise sistemática dos sinais de retroespalhamento e que implicam o cálculo de alguns parâmetros como: velocidade de propagação, impedância acústica, coeficiente de atenuação, coeficiente de *backscattering* (HENNING, 2006), estimados com base em modelos teóricos complexos, relacionados à propagação de ondas (HALL *et al.*, 1990).

2.3.1 Parâmetros ultra-sônicos na monitoração da fermentação alcoólica

As primeiras análises empíricas que mostraram o uso de ultra-som para avaliar a concentração alcoólica, foram apresentadas por Winder *et al.* (1970). Nesses estudos, os autores indicaram como a variação do parâmetro "velocidade de propagação" é correlacionada com a concentração de sólidos solúveis e álcool. Estudos posteriores também utilizaram medições da velocidade de propagação ultra-sônica no controle do processo de fermentação de carboidratos contidos em soluções aquosas (LOK; HITZMANN, 2004), (RESA *et al.*, 2004), onde a técnica de medição consiste na medição clássica do tempo de voo (*Time of Flight*) da onda ao se propagar na mistura líquida. Assim, as medições das variações de fase do sinal são realizadas para calcular a velocidade no meio, o qual é correlacionado mediante um modelo semi empírico com valores de densidade, redução de carboidratos, formação de etanol e concentração dos principais componentes da mistura líquida de fermentação (RESA *et al.*, 2009).

A velocidade de propagação ultra-sônica é um parâmetro que vem sendo amplamente utilizado na determinação de concentrações alcoólicas. Por exemplo, Lamberti *et al.* (2009), descrevem uma técnica de monitoração do processo de fermentação alcoólica utilizando medições da velocidade de propagação a partir de transdutores configurados no método de transmissão, usando a técnica "*Time of Flight*". Nesse estudo basicamente estabelece-se uma relação empírica entre as propriedades químicas e elásticas do meio para encontrar valores quantitativos que explicam diferentes estados do processo de fermentação, tais como: o decremento do consumo de carboidratos, efeitos de emissões de dióxido de carbono, mudanças de viscosidade e turvação que estão associadas às variações da velocidade do som no meio de cultura.

Neste contexto, o estudo de Jan *et al.* (2008), mostra a aplicabilidade da automação do processo de fermentação alcoólica em escala industrial, utilizando a estimativa clássica da velocidade de propagação sobre diferentes concentrações de açúcar e de álcool em um processo simulado de fermentação alcoólica, baseado em soluções hidroalcoólicas. O sistema implementado composto por transdutores de ultra-som com frequências de ressonância de 54Khz, 500KHz e 1MHz, destaca um efeito de dispersão de frequências, dado pela propagação de diferentes frequências em diferentes velocidades (JAN *et al.*, 2008), onde se observa que para diferentes concentrações de soluções de sacarose e etanol existe uma diferença significativa. Adicionalmente, o estudo de Jan *et al.* (2008) reporta os efeitos da atenuação sobre o sinal devido às bolhas de CO_2 oriundas do processo de fermentação e que produzem uma atenuação média na faixa de 21 - 30 dB.

Em síntese, a maior parte de estudos recentes de monitoração de processos de fermentação alcoólica por ultra-som (HOICHE *et al.*, 2011), (KRAUSEA *et al.*, 2011), (RESA *et al.*, 2009), (SCHOCK; BECKER, 2010) tem sido centrados numa exploração ampla do parâmetro velocidade de propagação sobre esse processo. No entanto, outros estudos (VLAHOPOULOU, 2010), (PANETTA *et al.*, 2006) tem utilizado outros parâmetros ultrassônicos como por exemplo: a atenuação, para caracterizar o estado do meio de cultura em bioreatores de fermentação.

O parâmetro atenuação usualmente é estimado na avaliação de características de dispersão em emulsões, suspensões e outros fluidos industriais. Este parâmetro permite determinar concentrações de partículas, tamanho e distribuição das mesmas, geralmente a partir de medições espectrais (HAUPTMANN *et al.*, 2002). No monitoramento do processo de fermentação, este parâmetro tem sido estimado por vários trabalhos (PANETTA *et al.*, 2006), (ZBIGNIEW *et al.*, 2007), (LAMBERTI *et al.*, 2009), (VLAHOPOULOU, 2010) com o objetivo de inferir informações sobre a evolução das propriedades físicas do meio de cultura, como por exemplo a concentração de biomassa a partir da correlação com a absorção ultra-sônica (HAUPTMANN; HENNING, 1998). No entanto, a complexidade na estimativa da atenuação tem limitado o amplo uso deste parâmetro em sistemas comerciais, como por exemplo, o sistema analisador de partículas (OPUS), de

fabricação alemã, o qual é baseado em espectrometria ultrassônica (HAUPTMANN *et al.*, 2002). Neste contexto, a limitação do uso da atenuação como ferramenta de caracterização em equipamentos industriais é devido ao relacionamento complexo dos parâmetros do meio, tais como a viscosidade, o tamanho de partícula e a condutividade térmica entre outros, os quais influenciam os valores da atenuação (HAUPTMANN *et al.*, 2002).

A complexidade na estimativa da atenuação pode ser vista de forma analítica no estudo descrito por Epstein e Carhart (1953), no qual é apresentada uma modelagem matemática para o cálculo da atenuação acústica em fluidos com partículas suspensas. O modelo apresentado por Epstein e Carhart (1953) mostra uma aproximação teórica considerando efeitos de viscosidade e condutividade térmica que estão associados ao processo de absorção acústica do fluido. No entanto, apesar de seu modelo contribuir para a estimativa de perdas térmicas, este tem sido limitado por não ser aplicável em meios condensados com dispersões (ALLEGRA; HAWLEY, 1972).

Em conformidade com o anterior, parâmetros como: o coeficiente de atenuação e velocidade do som apresentam-se como indicadores úteis na caracterização de processos de fermentação e podem ser estimados mediante sistemas com multisensores acústicos, assim como reportado por (HENNING *et al.*, 2000). Adicionalmente, a caracterização de processos de fermentação também pode ser complementada com medidas de impedância acústica, a qual está relacionada com a densidade de misturas líquidas complexas em estudo (MENG *et al.*, 2012), sendo a estimativa deste parâmetro também muito importante na indústria alimentar. Desse modo, o cálculo da impedância acústica é efetuado por um algoritmo que analisa a amplitude de sinais refletidos baseado na teoria reportada por Hale (1988).

Por outro lado, um modelo que pode ser extrapolado para a caracterização de processos fermentativos encontra-se no estudo apresentado por Shukla e Rohani (2010). Esse modelo, destina-se à monitoração ultra-sônica de suspensões de partículas com aplicações em processos de cristalização e manufatura de alimentos. No estudo, se realça o uso de um modelo de predição da atenuação no regime de propagação intermédio (no qual o comprimento de onda é próximo do tamanho da partícula) para uma suspensão polidispersiva, na qual são calculados perdas de energia em termos de espalhamento de partículas monodispersas. O modelo estimado leva em conta o valor da frequência de excitação, tamanho da partícula e propriedades físicas das diferentes fases do meio de propagação. Por tanto, a atenuação final é dada pela superposição dos efeitos de atenuação dados por cada partícula (SHUKLA; ROHANI, 2010).

Considerando que a partir de sinais de retroespalhamento de ultra-som é possível estimar a distribuição do tamanho de partículas de uma mistura líquida em fermentação (VLAHOPOULOU, 2010), destaca-se que neste tipo de aplicação industrial, o parâmetro distribuição do tamanho de

partículas pode ser utilizado na caracterização ultra-sônica de partículas para meios altamente concentrados (LIU, 2010) visando a monitoração do perfil de crescimento microbiano. Tal parâmetro tem sido abordado com base em técnicas que permitem obtenção de modelos de distribuição a partir de espectros de sinais de ultra-som. Assim, a determinação deste parâmetro é efetuada mediante um modelo dependente da atenuação que demanda menos tempo computacional, e que consiste na aproximação dos parâmetros de um modelo de distribuição inicial que está relacionado com um modelo de atenuação (CARLSON, 2010), o qual, praticamente fornece um entendimento de como diferentes partículas contribuem com a atenuação do meio em estudo e, conseqüentemente, descreve as características de heterogeneidade do meio (KYTOMAA, 1995).

Complementando o assunto, a teoria de propagação de ondas acústicas em suspensões para a determinação de tamanho de partículas, pode ser bastante útil na caracterização de concentrações de fluidos em processos fermentativos. Esta teoria é descrita no trabalho apresentado por Kytomaa (1995), o qual apresenta modelos para determinar o tamanho de partículas, segundo os regimes de propagação de uma onda (*multiple scattering*, viscoso e inercial) em uma suspensão com partículas sólidas, os quais por sua vez dependem da relação do tamanho da partícula e o comprimento de onda do sinal de emissão (no regime de *multiple scattering*) e do número de Reynolds (no regime viscoso e inercial).

2.4 Métodos de caracterização de biomassa

Numa variedade de processos industriais onde são manipuladas suspensões líquido-sólido, faz-se necessário conhecer algumas características do meio como: tamanho de partículas, número de partículas por volume entre outras, as quais repercutem na qualidade dos produtos desejados (PANETTA *et al.*, 2006). Conforme o exposto, durante o controle da condução do processo de fermentação, cabe destacar a importância da caracterização da dinâmica da biomassa no meio de fermentação.

As estimativas de biomassa são importantes porque fornecem informações sobre a taxa de crescimento de microorganismos, os quais comprometem o rendimento e produção de substâncias desejadas no processo de fermentação (ZIPS; FAUST, 1989) e portanto podem ser observadas como um indicador do estado da fermentação.

O estudo reportado por Coleman *et al.* (1984) apresenta um método direto para determinar a biomassa num processo fermentativo a partir do aproveitamento das propriedades dielétricas de partículas de levedura na suspensão. Os autores apresentam uma aproximação baseada na densitometria por ressonância acústica, onde basicamente, o meio é representado como um sistema mola-massa, no qual, ocorre uma troca de energias que regula o processo de oscilação, quando

a mola se desloca. A oscilação harmônica apresenta mudanças proporcionais às mudanças na massa de carga do sistema. O resultado do estudo mostra uma relação linear do incremento da concentração de biomassa em relação a medidas realizadas por densidade ótica. Neste contexto, a densitometria por ressonância acústica é utilizada na predição de concentração de biomassa mediante o aproveitamento das diferenças de compressibilidade do meio em fermentação (KELL *et al.*, 1990).

O trabalho apresentado por Zips e Faust (1989) mostra que através de medições ultrassônicas de velocidade e atenuação, é possível determinar experimentalmente a concentração de biomassa de uma solução aquosa com suspensão de células de *sacharomyces Cerevisiae*. As estimativas de atenuação apresentadas por Zips e Faust (1989) foram realizadas medindo valores de amplitude do sinal refletido utilizando um sistema configurado no modo pulso-eco e um transdutor de 5 MHz. Seus resultados mostraram que o aumento do volume de fração de biomassa é diretamente proporcional à atenuação e apresenta uma resolução aproximada de 0,2 dB/m. Assim, a atenuação do meio de cultura nesse estudo foi estimada usando um modelo teórico que relaciona a frequência do sinal de inspeção e as propriedades acústicas do meio como a densidade, a compressibilidade e a fração de volume da fase contínua e dispersa, que compreende o sistema líquido-sólido.

Uma revisão de métodos alternativos (aproximações óticas e elétricas) para a medição de biomassa celular em sistemas de fermentação é apresentada em Kell *et al.* (1990). Em tal estudo se realça a importância da estimativa de biomassa, como parâmetro fundamental na análise do rendimento do processo de fermentação, mostrando que as aproximações óticas exploram a biomassa a partir de medições de absorvância da intensidade de um feixe de luz com um comprimento de onda específico. Por outro lado, a abordagem elétrica é realizada com base nas propriedades elétricas passivas do meio tais como a capacitância e a condutância, sendo que a permissividade do meio associada à capacidade do meio de armazenar energia elétrica, incrementa com respeito ao crescimento de biomassa.

Outros estudos (LOK; HITZMANN, 2004),(CALDERON-SANTOYO, 2010) tem proposto diferentes técnicas para abordar de forma inovadora a análise da cinética da biomassa em processos fermentativos. Assim, Lok e Hitzmann (2004) apresentaram uma proposta para avaliar a cinética de cultivos de levedura do tipo *saccharomyce Cerevisiae* durante bioprocessos de fermentação em bioreatores, caracterizando as fases do processo como consumo de glicose e etanol utilizando um modelo de regressão multilinear e um filtro de Kalman, o qual utiliza a velocidade ultra-sônica para predizer variáveis como concentração de glicose e etanol.

Neste contexto, Calderon-Santoyo (2010) apresentaram uma aplicação inovadora, a qual descreve um sistema de identificação de *Saccharomyces Cerevisiae* mediante uma análise dis-

criminante fatorial de sinais coletados por um dispositivo eletrônico que utiliza sensores de gás, sendo tal dispositivo denominado "nariz eletrônico". O sistema apresentado por Calderon-Santoyo (2010) é uma alternativa ante as análises convencionais de fermentação determinadas em bioreatores por meio de medidas de densidade, pH, controle de temperatura e análises químicas *offline* sobre concentrações de biomassa e açúcares.

Por último, Panetta *et al.* (2006) descrevem um sistema de caracterização ultrassônica que visa a monitoração de partículas de biomassa que estão presentes nos processos de fermentação em escala industrial e que influenciam o rendimento da produção de álcool (ZIPS; FAUST, 1989) durante a transição das fases do processo de fermentação. O estudo apresenta que medições de sinais de retroespalhamento de ultra-som são úteis para determinar o crescimento de partículas, a partir de medidas de atenuação em função da frequência e valores de amplitude da frequência fundamental de espectros de potência. Assim, os autores concluíram que incrementos do sinal de *backscattering* estão correlacionados com o incremento do número e tamanho de células de levedura por volume durante a fase de fermentação principal e, o respectivo decremento é altamente correlacionado quando o processo alcança a fase de pós-fermentação (depleção das cepas de levedura devido às mudanças das propriedades reológicas do fluido) (PANETTA *et al.*, 2006).

2.5 Considerações finais

Os artigos apresentados na seção 2.3 evidenciam que as medições ultra-sônicas apresentam-se como ferramentas potenciais na caracterização de líquidos e fluidos dinâmicos de diferentes processo industriais, a partir do cálculo de uma série de parâmetros (velocidade, atenuação, distribuição do tamanho de partículas entre outras) que permitem inferir informações da heterogeneidade e outras propriedades do meio de inspeção.

Atualmente, as técnicas de caracterização quantitativa por ultra-som seguem sendo utilizadas por diversos estudos para abordar problemas que vão desde a inspeção ultrassônica para a detecção da adulteração de etanol em biocombustíveis (utilizando medidas de velocidade e atenuação) (FIGUEIREDO *et al.*, 2011) até a monitoração de processos de fermentação para a manufatura de produtos alimentares como iogurte (a partir da medida da diferença de fase do sinal) (OGASAWARA *et al.*, 2006), monitoração de biomassa (usando espectroscopia acústica) (LINDGREN; HAMP, 2006) e a caracterização de processos microbiológicos e bioquímicos em meios líquidos (usando valores de amplitude do espectro de potência e tempo de voo da onda ao se propagar no material (ELVIRA *et al.*, 2007)).

Considerando que aplicações industriais voltadas à caracterização ultra-sônica de partículas e à quantificação das mesmas em suspensões podem ser estendidas à caracterização de proces-

sos fermentativos, destaca-se os estudos de Goodenough (2005) e Shukla e Rohani (2010) os quais propuseram técnicas ultra-sônicas que contribuem para a quantificação de partículas insolúveis, presentes em um meio líquido multi-componente. Assim, no estudo de Goodenough (2005) observa-se que parâmetros como a velocidade de fase e a atenuação acústica (estimadas a partir da Transformada de Fourier) são também utilizados para correlacionar as diferentes concentrações de partículas e discernir as informações a respeito da solubilidade das partículas no meio.

Em linhas gerais, a utilização do ultra-som como ferramenta potencial na caracterização de processos de fermentação pode ser realizada pela estimativa de diversos parâmetros. No entanto, as estimativas individuais de tais parâmetros não fornecem uma caracterização ampla a respeito do meio em estudo. Como exemplo, o parâmetro velocidade de propagação, conforme reportado na literatura (JAN *et al.*, 2008), permite estimar a concentração alcoólica em processos fermentativos utilizando uma correlação semi-empírica. No entanto, a faixa dinâmica na estimativa deste parâmetro é bastante estreita durante a monitoração do processo de fermentação, assim como visto na literatura (LOK; HITZMANN, 2004), (RESA *et al.*, 2009), o que sugere que este parâmetro por apresentar valores com variações pequenas (na ordem de 1.87 m/s para cada hora de fermentação) limita a descrição da evolução das fases da fermentação. Além disso, o parâmetro deveria ter alta precisão para a detecção correta da fase da onda durante a medição do tempo de voo (HOICHE *et al.*, 2011).

Na literatura existem poucos estudos (LEE *et al.*, 2004), (PANETTA *et al.*, 2006) que tenham abordado mediante técnicas de ultra-som, uma análise multiparamétrica que permita uma caracterização mais ampla da fermentação. Observa-se que a caracterização paramétrica por ultra-som, em aplicações industriais como o controle da produção de alimentos e materiais, assim como o monitoramento de fluidos industriais (WIKLUND *et al.*, 2010), utiliza-se técnicas de processamento de sinais de ultra-som que tem origem nas aplicações biomédicas e que atualmente são lideradas pelas técnicas de análise espectral (BRAND; KLAUA, 2006), (BOONKHAO; WANG, 2012).

Considerando a cinética de propagação das partículas de levedura um agente fundamental no processo fermentativo (MALTA, 2006), é interessante ressaltar que técnicas de detecção e caracterização de partículas no âmbito biomédico, podem ser úteis na análise do crescimento das cepas de levedura suspensas no meio de cultura. Assim, observa-se que os princípios de detecção de partículas em fluidos dinâmicos baseados nas estimativas de incrementos de energia espectral (COWE *et al.*, 2006), extração de atributos espectrais (CULLINANE *et al.*, 2009), modelos de predição do erro a partir das características determinísticas dos sinais, podem ser extrapolados na caracterização dos processos de fermentação para fornecer uma melhor visão das propriedades do meio como a organização espacial, a concentração e a ecogenocidade das

partículas de dispersão entre outras.

Por fim, diante do exposto, no presente trabalho é proposto um sistema híbrido de caracterização ultrassônica cuja metodologia foi inspirada nas técnicas de análise e detecção de partículas mais recentemente utilizadas em aplicações industriais e biomédicas. O sistema foi aplicado na análise do processo de fermentação alcoólica.

Em comparação com sistemas atuais de monitoramento por ultra-som, como o apresentado por Hoche *et al.* (2011) o qual estuda o processo de monitoração alcoólica a partir de medidas do tempo de vôo da onda em modo pulso - eco, o presente trabalho aborda a caracterização do meio de cultura de fermentação, mediante a extração multi-paramétrica sobre sinais de retroespalhamento de ultra-som, que representam o comportamento da atividade fermentativa na região de interesse. Assim, mediante a estimativa de diversos parâmetros acústicos, espectrais e a classificação baseada em K-means, foi projetado uma abordagem híbrida que permite identificar sinais ultra-sônicos associados à presença de partículas de biomassa numa região de interesses do meio de fermentação. Portanto, a detecção de tais partículas que compreendem a fase dispersa do meio de cultura, possibilita a estimativa de uma aproximação ultra-sônica que fornece um indicador da evolução percentual de biomassa na RoI o que por sua vez caracteriza a evolução do processo fermentativo.

Capítulo 3

Fundamentos Teóricos

Neste capítulo são descritos os conceitos relacionados ao processo de fermentação alcoólica e os conceitos sobre ondas de ultra-som, características de propagação em misturas líquidas e modelos matemáticos utilizados para a caracterização paramétrica de materiais baseados na teoria de análise espectral. Também são descritos os conceitos teóricos que envolvem a detecção de sinais via o teste de hipótese de Run e a classificação de dados mediante K-means.

3.1 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um bioprocessamento no qual microorganismos tais como leveduras e algumas classes de bactérias em ausência de oxigênio (processo anaeróbico), processam carboidratos para obter como principais resíduos metabólicos etanol, dióxido de carbono e moléculas de ATP. A estequiometria da fermentação alcoólica é descrita pela equação de *Gay-Lussac* como a seguir (CASSANEGO *et al.*, 2008):

Durante a dissociação de açúcares, as moléculas de ATP são usualmente consumidas pelos microrganismos durante seu metabolismo celular permitindo assim, obter a energia necessária para crescer. Geralmente, a levedura mais utilizada nos processos fermentativos é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é um organismo eucariota unicelular com tamanho aproximado de 5-10 μm pertencente ao reino dos fungos, sendo utilizado na indústria para converter açúcares em álcool (MIGUEL, 2011) Fig. 3.1.

A produtividade dos processos fermentativos está relacionada com características das leveduras tais como a tolerância ao álcool e a velocidade de fermentação, sendo esta última dada pela relação entre a quantidade de substrato fermentado e a quantidade de levedura utilizada em um tempo determinado (PACHECO, 2010). Desse modo, a velocidade do processo fermentativo depende da densidade de população das leveduras (ALCARDE, 2012).

Figura 3.1: *Saccharomyces Cerevisiae*. Organismo eucariota unicelular. Fonte adaptada (EGOROV, 2012)

Por outro lado, o processo de fermentação alcoólica desenvolve-se em três fases principais denominadas de: 1) Fermentação pré eliminar ("Lag Phase") ou fase de adaptação celular; 2) fermentação principal ("Exponential Phase") ou fase tumultuosa e 3) Pós-fermentação composta por uma fase estacionária e uma fase de depleção, como ilustrado na Fig. 3.2 (SHULER; KARGI, 2002).

Figura 3.2: Fases de fermentação em relação ao crescimento de biomassa. Fonte adaptada (SHULER; KARGI, 2002).

Inicialmente, antes da condução do processo de fermentação, o líquido açucarado (denominado mosto), o qual é disposto para ser fermentado, deve apresentar uma concentração de açúcares totais, sólidos solúveis e um valor de pH que permita o desenvolvimento satisfatório das leveduras durante o processo fermentativo (ALCARDE, 2012). Desse modo, durante a fase de fermentação preliminar, o mosto é inoculado com as leveduras utilizando uma quantidade compatível de microrganismos que permitam a condução adequada da fermentação. Nesta fase,

ocorre um processo de adaptação das células de levedura no caldo açucarado e se caracteriza por uma lenta multiplicação de leveduras, as quais evidenciam um lento consumo de açúcares e produção de etanol. A finalização da fase preliminar e início da fase tumultuosa é marcada pelo início de uma intensa produção de álcool e emissão de dióxido de carbono em forma de gás (MIGUEL, 2011). A fermentação tumultuosa é acompanhada de aumento da temperatura, diminuição do valor de pH (aumento da acidez) do mosto e geração de espumas. Nesta fase, as células de levedura já têm sido adaptadas para seu novo meio e começam a se multiplicar e reproduzir com uma taxa de crescimento exponencial, conhecida como taxa específica de crescimento, a qual depende da dinâmica do microrganismo e da composição do caldo açucarado (GARCIA *et al.*, 2012). Matematicamente é representada pelo modelo cinético de primeira ordem (Eq. 3.1) (SHULER; KARGI, 2002):

$$r_x = \mu X = \frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) X \quad (3.1)$$

onde r_x é a taxa volumétrica de crescimento, X é a concentração de biomassa existente (concentração de células), μ é a taxa de crescimento de células, k_d é a taxa de morte celular. Geralmente a taxa de morte celular pode ser desconsiderada se seu valor for relativamente pequeno comparado com a taxa de crescimento. Usualmente, uma medida adequada do número de células por unidade de volume (calculada pela Eq. 3.2) é a concentração de biomassa, a qual depende do crescimento de células, sendo expressa em unidades de massa por unidade de volume.

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (3.2)$$

onde N é o número de células para um tempo específico e N_0 é o número de células no tempo $t = 0$. Desse modo pode-se estimar a concentração de biomassa em qualquer instante de tempo t .

A fase turbulenta ou tumultuosa é bem descrita pela equação de *Monod* (Eq. 3.3), a qual indica o crescimento da biomassa em função da disponibilidade do nutriente, descrevendo o efeito do crescimento limitante em função da taxa específica de crescimento (PACHECO, 2010):

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.3)$$

onde μ_{max} é a taxa de crescimento específico máxima, S é a concentração de substrato, K_s é a constante de *Monod* ou constante de saturação, a qual é igual à concentração de substrato que produz uma taxa de crescimento específico equivalente à metade da taxa do crescimento específico máxima. A finalização da fase tumultuosa é evidenciada pela diminuição da liberação de dióxido de carbono e turbulência do meio líquido.

Por outro lado, a fase de pós-fermentação é composta pela fase estacionária e de morte celular. A fase estacionária ocorre quando existe um equilíbrio entre o número de células se

multiplicando e as que estão se extinguindo, pelo qual pode ocorrer um decremento dos nutrientes do meio de cultura assim como também acumulo de toxinas. A fase de morte, conhecida também como fase de declive, é caracterizada por maior taxa de morte celular do que a taxa de multiplicação (SHULER; KARGI, 2002).

Em geral, a fase de pós-fermentação é caracterizada pelo decremento da temperatura do líquido fermentado, baixos valores de pH e diminuição da atividade fermentativa, devido ao esgotamento de carboidratos e aumento da concentração de toxinas e outras substâncias.

Um parâmetro importante para avaliar a afinidade entre o substrato e os microorganismos é coeficiente do rendimento do crescimento microbiano Y_{ps} . Este coeficiente é estimado mediante a expressão Eq. 3.4 e define a quantidade do produto P produzida a partir de uma quantidade de substrato S (CARVALHO *et al.*, 2008).

$$Y_{ps} = \frac{P_{final} - P_{Inicial}}{S_{final} - S_{inicial}} \quad (3.4)$$

Finalmente, os processos de fermentação alcoólica podem ser afetados por diversos fatores que prejudicam a eficiência da conversão de açúcar em álcool como: pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, substâncias inibidoras, agentes microbiológicos como concentração de levedura e contaminação por bactérias intrínsecas no processo de fermentação, produto de impurezas nos fermentos, impurezas nos equipamentos e contaminantes na matéria prima sem tratamento térmico adequado ou manipulação dos processos de fermentação sem controle de temperatura e pH (PACHECO, 2010). Assim, o desenvolvimento de bactérias induz a formação de substâncias não desejáveis, com diminuição do rendimento de produção de álcool acompanhado de substâncias estranhas diferentes.

3.1.1 Reator de mistura

Geralmente, o processo de agitação mecânica do mosto em fermentação é realizado em reatores onde se promove a mistura dos componentes do meio, mantendo a biomassa em suspensão, eliminando, mediante o processo de agitação, gradientes de temperatura e concentração, assim como desintegrando bolhas gasosas e possibilitando o incremento da área interfacial, definido como o espaço onde as fases do meio mantém contato (GARCIA *et al.*, 2012).

O processo de condução da fermentação neste estudo foi baseado no processo de batelada, denominado também processo descontínuo, caracterizado pela inoculação do mosto e o desenvolvimento dos microorganismos que possibilitam o processo biológico de fermentação, sem a alimentação de substratos que controlem a concentração de açúcar no meio (PACHECO, 2010).

A agitação mecânica envolve os processos de convecção, turbulência e difusão sobre o fluido no reator. O processo de convecção implica o movimento circulatorio no fluido, induzindo à distribuição uniforme da fase dispersa sobre a contínua, vista como uma uniformidade macroscópica do meio de fermentação. Já o processo de turbulência está relacionado com a energia cinética concentrada em regiões de escoamento rotacional de diversos tamanhos que coexistem dinamicamente, e que tendem a não sustentar o movimento rotacional e se formam na região do agitador³. Por fim, o processo de difusão conduz à uniformidade molecular do mosto em fermentação. Um exemplo do perfil do escoamento dado pelo agitador no fermentador é apresentado na Fig. 3.3.

Figura 3.3: Perfis de agitação no fluido em fermentação. Fonte adaptada (GARCIA *et al.*, 2012)

3.2 Ondas de Ultra-som

As ondas de ultra-som podem ser definidas como ondas mecânicas de alta frequência que precisam de um meio elástico (contendo moléculas ou partículas) para se propagarem, transferindo energia de um ponto a outro. Estas ondas viajam através do meio mediante compressões e rarefações, as quais produzem variações de pressão no meio de propagação e induzem a transmissão sucessiva de uma perturbação inicial que prossegue por si própria através do meio, mediante a vibração de suas partículas adjacentes. As ondas de ultra-som encontram-se fora do espectro audível e geralmente, na avaliação não destrutiva de materiais, o intervalo de frequências utilizado vai de 100 KHz a 50 MHz (OLYMPUS, 2006).

Segundo o tipo de propagação, estas ondas podem ser classificadas em dois tipos principais: longitudinais e transversais. No tipo de onda longitudinal, a vibração das partículas do meio

de propagação ocorre no mesmo sentido da propagação da onda. Desse modo, as partículas são deslocadas desde seu estado inicial de equilíbrio, com uma determinada velocidade de partícula, à medida que a onda perturba o meio de propagação (SZABO, 2004). No tipo de onda transversal, a vibração das partículas é perpendicular à direção de propagação. Assim, os tipos de onda mencionados podem ocorrer nos sólidos, no entanto, nos fluidos, o tipo de onda transversal é amortecido rapidamente e só se produzem ondas longitudinais (SZABO, 2004). Estas ondas podem ser caracterizadas por seus parâmetros de onda tais como: comprimento de onda (λ), frequência (f) e velocidade de propagação (c), os quais guardam a relação descrita na Eq. 3.5 (ZAGZEBSKI, 1996):

$$c = \lambda f \quad (3.5)$$

3.3 Propagação acústica

Quando um processo de propagação acústica ocorre num fluido, as características de elasticidade e inércia do meio são comprometidas. Enquanto a elasticidade implica em uma tendência do fluido para corrigir um desvio do estado de equilíbrio, a inércia implica na tendência do meio para ultrapassar tal correção, produzindo a necessidade de uma correção na direção oposta, permitindo portanto, o fenômeno de propagação acústica (BROWN; INSANA, 1992).

A equação que governa a propagação de ondas acústicas é conhecida como a equação de onda. Esta equação diferencial descreve a evolução da pressão como função do espaço e tempo. Sua expressão unidimensional na direção de propagação z é dada pela Eq. 3.6:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial z^2} = \frac{\rho}{b} \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} \quad (3.6)$$

onde P é a pressão, ρ é a densidade do meio, b é o módulo de compressibilidade (SHUNG; THIEME, 1993).

Embora a propagação de ondas em condições reais seja um processo mais complexo, os modelos matemáticos propostos para tipos idealizados de ondas (ondas planas) são necessários para aproximar e descrever o comportamento dos processo de propagação em meios determinados (SZABO, 2004). A solução senoidal da equação de onda para uma onda plana é descrita pela Eq. 3.7.

$$P = P_0 e^{j(\omega t \pm k z)} \quad (3.7)$$

onde $\omega = 2\pi f$ é a frequências angular, $k = \omega/c$ é o número de onda, $c = (B/\rho)^{1/2}$ representa

a relação entre a velocidade propagação acústica longitudinal, a densidade e o módulo de compressibilidade do meio (SHUNG; THIEME, 1993).

Durante a propagação de uma onda em um meio, a energia é reduzida em função da distância de propagação podendo ser esta refletida, espalhada ou absorvida. Assim, a perda total de energia é definida como a atenuação. Quando a onda atinge uma interface entre dois meios distintos (com diferentes impedâncias acústicas), a onda é refletida e refratada, podendo ocorrer alterações na direção de propagação que são explicadas através da lei de Snell (SHUNG; THIEME, 1993). Por outro lado, o processo de espalhamento (*scattering*) ocorre em meios com características heterogêneas (que apresentam uma variação aleatória das propriedades do meio), a partir da interação de ondas com as estruturas do meio as quais estão distribuídas aleatoriamente (ZISKIN; LEWIN, 1993). Assim, o processo de espalhamento é definido como um processo de retro-dispersão de uma onda acústica com propriedades diferentes da onda incidente (BROWN; INSANA, 1992). Enquanto o espalhamento acústico é dependente das flutuações espaciais de densidade e compressibilidade do meio de propagação, o processo de absorção está relacionado com a transformação de energia acústica em energia térmica (BROWN; INSANA, 1992).

Considerando só a dependência espacial da Equação de onda, a propagação de uma onda plana na direção z do meio, pode ser representada pela Eq.(3.8):

$$P_z = P_{z0}e^{-\alpha z} \quad (3.8)$$

onde P_{z0} é a pressão na distância $z = 0$ e α é o coeficiente de atenuação.

3.3.1 Campo de ultra-som

Geralmente o campo ultra-sônico utilizado em aplicações industriais é gerado a partir de transdutores construídos a partir de um material piezelétrico, sobre o qual é aplicado uma diferença de potencial, que gera uma deformação mecânica, a qual por sua vez, se transmite por meio de vibrações mecânicas de alta frequência no meio (HAUPTMANN *et al.*, 2002).

O campo ultra-sônico gerado por um transdutor é composto por duas regiões (Fig. 3.4): o campo próximo (região de Fresnel) e o campo distante (região de Fraunhofer). O campo próximo é um campo não homogêneo que corresponde a uma região que se caracteriza pela variação aleatória da amplitude da onda, que termina numa amplitude máxima durante uma distância N_d a partir do posicionamento da fonte de emissão (transdutor). N_d então é considerado o foco natural do transdutor (OLYMPUS, 2006). O campo próximo depende da frequência e diâmetro do transdutor, assim como da velocidade de propagação no meio. Esta área marca a transição entre o campo próximo e distante, sendo calculada através da Eq. 3.9.

$$N_d = D^2 f / 4c = D^2 / 4\lambda \quad (3.9)$$

onde D é o diâmetro do elemento piezoelétrico, N_d é o campo próximo.

Figura 3.4: Campo de ultra-som produzido por um transdutor plano.

Por outro lado, o campo distante é então definido como a área localizada após a distância N_d , onde a onda é mais uniforme e a sua amplitude decresce gradualmente. Parâmetros do campo ultra-sônico tais como o diâmetro do feixe e o comprimento da região focal, são importantes na determinação de um tipo específico de transdutor para uma dada aplicação de inspeção (OLYMPUS, 2006). Por exemplo, o diâmetro do feixe afeta a sensibilidade do transdutor, sendo que quanto menor for o diâmetro maior será a quantidade de energia refletida. O diâmetro do feixe Fx_d pode ser calculado pela Eq. 3.10:

$$Fx_d = 1.02 Fk / f D \quad (3.10)$$

onde Fk representa a distância de focalização, f é a frequência, D é o diâmetro do elemento piezoelétrico.

A região de focalização Fz é conformada pela distância entre dois pontos onde a amplitude do sinal gerado pelo transdutor no ponto focal diminui para -6dB (Fig. 3.5). Ela é determinada pela Eq. 3.11.

Figura 3.5: Diâmetro do Feixe de ultra-som).

$$Fz = N_d * Fl^2 [2 / (1 + 0.5SF)] \quad (3.11)$$

onde Fl é a distância desde o transdutor até um ponto de focalização e SF é distância focal normalizada dada pela relação: $SF = Fl/N_d$.

Um fenômeno físico responsável pela perda de energia ultra-sônica é a divergência do feixe de ultra-som. O ângulo de divergência do feixe transmitido pelo transdutor pode ser reduzido, selecionando um transdutor com uma frequência mais elevada ou com um maior diâmetro do elemento piezoelétrico^{1 2}. A Figura 3.6 apresenta uma vista simplificada de um feixe de ultra-som para um transdutor plano.

Figura 3.6: Ângulo de divergência do feixe de ultra-som).

Na Figura 3.6 pode ser observado, que no campo próximo, o feixe tem uma forma complexa que tende a ficar estreita, no entanto, no campo distante o feixe diverge. O ângulo de divergência α pode ser estimado mediante a Eq. 3.12:

$$\text{sen}(\alpha/2) = 0.514c/fD \quad (3.12)$$

3.4 Análise Espectral

A análise espectral de sinais é uma técnica matemática que permite realizar uma análise na dualidade tempo-frequência, baseado na estimativa da transformada de Fourier sobre os sinais de estudo (COHEN, 1995). Esta ferramenta objetiva a extração de informações que estão relacionadas com os fenômenos físicos representados pelos sinais analisados. Por exemplo, na análise da propagação de ondas mecânicas de alta frequência, as alterações na energia das componentes de alta frequência podem ser correlacionadas com processos de atenuação no meio de propagação envolvido.

Para as técnicas de processamento de sinais, a Transformada de Fourier é uma ferramenta matemática potencial, amplamente utilizada para decompor sinais no domínio do tempo em

¹http://www.globalst.com.br/bvg/en_mec/22.pdf

²<http://www.qualidadeaeronautica.com.br/princ.us.htm>

seus componentes de frequência (COHEN, 1995), sendo sua expressão dada pela Eq. 3.13:

$$TF[x(t)] \equiv X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (3.13)$$

onde $TF[x(t)]$ é a transformada de Fourier e é determinada se o sinal $x(t)$ cumpre a condição de estacionariedade para o qual a função integrável é finita. $X(f)$ é uma função complexa.

Considerando um sinal $x(t)$ a estimativa da Transformada de Fourier envolve o uso de uma janela $J(t)$ de duração finita, a qual delimita segmentos do sinal $x(t)$ considerado e conseqüentemente visa à obtenção de uma resposta desejada em frequência. Os efeitos de janelamento estão associados à melhora da qualidade da estimativa de $TF[x(t)]$, o que, na prática equivale a obter um espectro mais suavizado nos lóbulos principais e na largura de banda, minimizando a distorção dos picos de amplitude e a descontinuidade do espectro. Portanto, a Transformada de Fourier para um sinal janelado $\hat{x}(t) = x(t)J(t - \tau)$ é apresentada na Eq. 3.14:

$$TF[\hat{x}(t)] = \int_{-\infty}^{\infty} \hat{x}(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (3.14)$$

Conforme o exposto, define-se a densidade espectral de potência (*Power Spectral Density* - PSD), como a representação da distribuição de energia de um sinal determinado em função da frequência. Desse modo, o espectro de potência é calculado a partir da expressão quadrática da magnitude de Fourier (COHEN, 1995) (Eq. 3.15):

$$|TF[\hat{x}(t)]|^2 = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \hat{x}(t)e^{-i2\pi ft} dt \right|^2 = \frac{X(f)X^*(f)}{2\pi} \quad (3.15)$$

onde $X^*(f)$ é o conjugado complexo de $X(f)$.

A densidade espectral de potência também pode ser determinada pelo cálculo do periodograma, no qual é estimada a média da transformada de Fourier sobre segmentos do vetor de análise. Então, considerando um sinal discreto $x(n)$ de N amostras, o periodograma é calculado pela Eq. 3.16:

$$Per(f) = \frac{1}{N} |X(f)|^2 \quad (3.16)$$

Convencionalmente, a análise de sinais mediante o espectrograma é outra ferramenta útil de análise espectral, a qual representa de forma bidimensional a intensidade da distribuição de energia no domínio do tempo e frequência, mediante a estimativa da transformada de Fourier de curta duração (STFT) (COHEN, 1995). Em linhas gerais, a estimativa do espectrograma baseia-se no cálculo da Transformada de Fourier para um sinal janelado em pequenos segmentos temporais de curta duração, onde a somatória dos espectros estimados representa a variação da intensidade do conteúdo espectral no tempo. A estimativa do espectrograma considerando

um sinal discreto $x[n]$ é dada na Eq. 3.17:

$$STFTx[n](m, w) = \left| \sum_{-\infty}^{\infty} x[n] J[n - m] e^{-jwn} \right|^2 \quad (3.17)$$

onde $J[n - m]$ é a função de janelamento a qual define o nível de resolução do espectrograma. m corresponde a um índice de tempo de curta duração (COHEN, 1995).

3.5 Parâmetros acústicos

As técnicas de caracterização quantitativa por ultra-som (QUS) para a exploração de métodos de monitoramento e caracterização de processos industriais, tais como a manufatura de alimentos, produtos farmacêuticos, agroquímicos e a análise reológica de fluxos industriais entre outras (MARSHALL *et al.*, 2002), (OURIEV *et al.*, 2004), (WIKLUND *et al.*, 2007) são geralmente baseadas no cálculo de parâmetros acústicos sobre sinais de retro espalhamento de ultra-som, os quais podem descrever características e mudanças na estrutura do meio em questão (HALL *et al.*, 1990).

Durante as últimas décadas a análise quantitativa por ultra-som tem sido baseada na estimativa de parâmetros acústicos convencionais como: a velocidade de propagação, a atenuação, o coeficiente de retrodispersão e a distribuição do tamanho de partícula entre outros. Esses parâmetros reportados convencionalmente na literatura, constituem a base das técnicas de caracterização quantitativa por ultra-som, por serem muito sensíveis às diferenças entre as propriedades acústicas de líquidos e materiais (JAVANAUD *et al.*, 1991), (COMBETTE *et al.*, 2001).

3.5.1 Velocidade de Propagação

A velocidade de propagação acústica de uma onda num meio determinado é um parâmetro que depende de propriedades do meio tais como a elasticidade (k) (devido ao deslocamento das partículas pela pressão aplicada) e a densidade (ρ), a qual determina a aceleração devida à força que atua sobre o meio de propagação (DUCK *et al.*, 1998). Para ondas longitudinais se propagando num líquido homogêneo a velocidade é calculada pela expressão da Eq. 3.18 (ZISKIN; LEWIN, 1993).

$$c = (k/\rho)^{1/2} \quad (3.18)$$

A velocidade de propagação aumenta em meios elásticos de propagação, com maior resistência à deformação e conseqüentemente diminui com a densidade do meio. Assim, a Equação 3.18 pode ser reescrita como visto na Eq. 3.19 (DUCK *et al.*, 1998):

$$c^2 = \frac{\partial P}{\partial \rho} \quad (3.19)$$

Convencionalmente, a velocidade é utilizada na caracterização de fluidos e materiais. Este parâmetro representa a distância percorrida por uma onda mecânica ao se propagar num meio elástico numa unidade de tempo (DUCK *et al.*, 1998). Portanto, sua estimativa é baseada na medida do tempo de voo (*ToF*).

Para um sistema em configuração pulso-eco, a estimativa envolve a medição do tempo decorrido para a onda atravessar duas vezes a espessura do material (Fig. 3.7). A expressão matemática é dada pela Eq. 3.20 (POVEY, 1997) :

$$c = 2 * x / t \quad (3.20)$$

onde x representa a espessura do meio de propagação e t equivale ao tempo de voo da onda acústica.

Figura 3.7: Medição da velocidade de propagação usando ToF.

3.6 Atenuação

A atenuação de uma onda mecânica relaciona todos os fenômenos envolvidos com a perda de energia em função da distância de propagação. Essa perda de energia está associada aos processos de espalhamento e absorção. Assim, a atenuação de uma onda acústica é expressa como (DUKHIN *et al.*, 2005):

$$\text{Atenuação} = \text{Espalhamento} + \text{Absorção}$$

onde o efeito de dispersão ou espalhamento depende das flutuações em densidade e das propriedades físicas da estrutura que caracterizam o meio (PAZIN *et al.*, 2003). Além disso, o espalhamento é multi-direcional e geralmente é considerado determinístico.

Em um fluido heterogêneo (sistema líquido-sólido), os mecanismos de atenuação são dependentes das propriedades físicas do meio tais como: a densidade, concentração de partículas, tamanho das partículas, viscosidade e condutividade térmica, entre outros (HAUPTMANN *et al.*, 2002). Conforme o exposto, existem vários modelos para predeterminar a atenuação (ALLEGRA; HAWLEY, 1972), (DUKHIN *et al.*, 2005), (KIM; VARGHESE, 2008), (SHUKLA; ROHANI, 2010). Um dos modelos analíticos, bastante utilizados para a predição da atenuação é o modelo ECAH (RICHTER *et al.*, 2006), o qual considera efeitos viscosos, de espalhamento e térmicos. Nesse modelo, a estimativa da perda total de energia é calculada com base na superposição da atenuação, determinada para uma única partícula do meio (SHUKLA; ROHANI, 2010). No entanto, o modelo ECAH não representa corretamente as interações de onda com partículas vizinhas, sendo um modelo não viável em meios com altas concentrações de partículas (RICHTER *et al.*, 2006).

Durante a propagação de ondas, a atenuação também depende dos regimes de propagação, os quais podem ser dados segundo a relação do comprimento da onda incidente e do tamanho do elemento espalhador no meio de propagação. Para meios com partículas espalhadoras maiores que o comprimento de onda, tem-se que a área de seção transversal $\sigma=1$. Por outro lado, para espalhadores muito menores que o comprimento de onda, então é definido que σ é equivalente a $k^4 a^6$, onde k é o número de onda e a é o raio da partícula espalhadora (ZISKIN; LEWIN, 1993). A interação do campo acústico com as partículas do sistema líquido-sólido de inspeção se encontram no regime de propagação onde o parâmetro de onda $Kr \gg 1$, indicando que as partículas são maiores que o comprimento de onda (SHUKLA; ROHANI, 2010) e, portanto, os efeitos de atenuação predominantes são os efeitos de espalhamento os quais são estritamente geométricos.

No contexto do que foi apresentado, para o presente trabalho foram considerados somente os processos de atenuação relacionados à reflexão e espalhamento, sendo desconsiderados os efeitos de absorção devido à relação do comprimento de onda com o tamanho das partículas e à baixa potência do campo acústico utilizado, para a qual os efeitos térmicos não são significantes. Assim, como mencionado nessa seção, a teoria ECAH não representa um modelo viável para o sistema de caracterização deste estudo, sendo que este é limitado para regimes de propagação onde o parâmetro $Kr \ll 1$ e onde os efeitos visco inerciais e de interação térmica são predominantes (RICHTER *et al.*, 2006).

Um modelo analítico para a predição da atenuação num sistema líquido-sólido com partículas de tamanho relativamente grande onde os efeitos de refração, difração e reflexão são predominantes pode ser obtido a partir da teoria de Faran (1951), o qual expressa um modelo matemático baseado na estimativa de coeficientes de espalhamento $\Re(A_n)$, propriedades elásticas do fluido (módulo de compressibilidade), e fração de volume de partículas do meio ϕ . O modelo é expresso pela Eq.3.21:

$$\alpha = -\frac{3\phi}{2(ka)^2a} \sum_{n=0}^{\infty} (2n+1) \Re(A_n) \quad (3.21)$$

3.7 Estimativa da Atenuação

A estimativa da atenuação é um dos parâmetros mais importantes na caracterização de materiais, sendo que valores de atenuação podem ser particulares para cada material. Considerando a propagação de uma onda harmônica plana, a equação que descreve a propagação num meio com perdas é dada pela Eq.3.22, onde a onda é multiplicada por um fator de perda que incrementa com a distância de propagação (HAUPTMANN *et al.*, 2002).

$$p(z, t) = p_0 e^{jw(t-\frac{z}{c})} e^{-\alpha z} \quad (3.22)$$

onde $w = 2\pi f$ é a frequência angular, z é a distância de propagação, c é a velocidade do som e α é a atenuação do meio, sendo que c e α descrevem as interações moleculares no meio de propagação com o campo acústico incidente.

Considerando a expressão anterior (Eq.3.22), é possível expressar o meio de caracterização como um sistema $A(f)$ no domínio da frequência, o qual é excitado por um sinal de entrada $U(f)$ e produz um sinal de saída $Y(f)$ (Eq.3.23):

$$Y(f) = U(f)A(f) \quad (3.23)$$

sendo $A(f) = e^{-(\alpha(f)z)}$ a função de transferência que representa a atenuação no meio (TREECE *et al.*, 2005) e α o coeficiente de atenuação, o qual é representado por uma lei de potência (Eq. 3.24):

$$\alpha = \beta f^n \quad (3.24)$$

onde β é o coeficiente de atenuação acústica dependente da frequência, dado em (dB/cm/MHz) e n é o valor da dependência da atenuação em relação à frequência f (KUC; SCHWARTZ, 1979). O modelo para estimar a atenuação no modo pulso - eco, relacionando o sinal de excitação e de saída do meio de propagação no domínio da frequência, é determinado pela Eq. 3.25:

$$\alpha(f) = \ln \left(\frac{Y(f)}{U(f)} \right) / 2z \quad (3.25)$$

Um método convencionalmente utilizado para a estimativa da atenuação, é o método da diferença espectral. Este método permite a estimativa do coeficiente de atenuação dependente da frequência β , o qual em meios moles e alguns fluidos incrementa linearmente com a frequência (KUC; SCHWARTZ, 1979). A estimativa de β é realizada a partir da diferença espectral logarítmica entre o sinal incidente e o sinal refletido pelo meio atenuante. O ajuste linear da curva resultante, obtida a partir da diferença logarítmica entre esses espectros de potência, fornece o valor do "slope", o qual é o coeficiente angular utilizado neste estudo como parâmetro para diferenciar variações no meio de cultura. Desse modo, a partir da estimativa do *slope*, pode ser calculado o coeficiente de atenuação β , que por sua vez é um parâmetro bastante útil na caracterização de materiais, fluidos e tecidos moles em aplicações industriais e biomédicas. A Figura 3.8 ilustra o método da diferença espectral.

Figura 3.8: Método da Diferença Espectral. Fonte adaptada Kuc e Schwartz (1979).

Outra forma de medição da atenuação é a estimativa baseada na medida da variação da frequência central f_c do espectro de potência de um sinal de ultra-som, ao se propagar em diversas profundidades (SHUNG; THIEME, 1993). O modelo matemático para medir o coeficiente de atenuação considera uma dependência linear da frequência, retroespalhamento uniforme e velocidade de propagação constante na RoI.

A derivação de tal modelo é dada pela Eq.3.25 na qual, $U(f)$ é considerado como um sinal de excitação que apresenta em seu espectro uma forma gaussiana expressa como: $U(f) = e^{-\frac{(f-f_c)^2}{2\sigma^2}}$ (KIM; VARGHESE, 2008), onde σ é a variância. Assim, quando o sinal de en-

trada se propagar no meio, o sinal é modificado por uma função de atenuação que representa as propriedades de dispersão do meio em questão, que podem ser expressos em forma exponencial como uma série de Taylor, visando a estimativa do deslocamento no domínio da frequência. Assim, a função de atenuação no meio pode ser determinada mediante um modelo comparativo, o qual utiliza um meio de referência que permite corrigir os efeitos de acoplamento, não paralelismo e difração do feixe de ultra-som incidente. O modelo de atenuação é expresso pela Eq. 3.26 (KIM; VARGHESE, 2008):

$$A(f) = e^{-\frac{(n_x - n_r)(f^2 - 4f_c f)}{2f_c^2}} e^{-4(\beta_x - \beta_r)fz} \quad (3.26)$$

onde os subíndices x e r são associados ao meio de propagação e de referência respectivamente.

Conforme o exposto, o sinal atenuado de saída é expresso pela Eq. 3.27:

$$Y(f) = e^{-\frac{\Lambda}{2\sigma^2 f_c^2}} \quad (3.27)$$

onde Λ é expresso pela Eq. 3.28:

$$\Lambda = (f - f_c)^2 f_c^2 + \sigma^2 (n_x - n_r)(f^2 - 4f_c f) + 8\sigma^2 f_c^2 (\beta_x \beta_r) f z \quad (3.28)$$

Assim, a partir da Eq.(3.28) pode ser determinada que a variação da frequência central (Δf_c) é relacionada ao efeito de atenuação e adicionalmente, assim como descrito por Kim e Varghese (2008), a variação da frequência central é linearmente proporcional ao produto das diferenças dos coeficientes angulares ("*slope*") e a distância de propagação, como vista na Eq. 3.29:

$$\Delta f_c \cong f_c - 4\sigma^2 (\beta_x - \beta(r))z \quad (3.29)$$

3.8 Coeficiente de retroespalhamento (*backscattering coefficient*)

Quando uma onda que se propaga num meio heterogêneo encontra um obstáculo, uma parte de sua energia é defletida a partir de sua trajetória inicial produzindo-se uma distorção da onda que é acompanhada de um processo de dispersão multidirecional (MORSE; INGARD, 1968). Para obstáculos maiores que o comprimento de onda, a metade da onda espalhada se dispersa de forma mais ou menos uniforme para todas as direções do obstáculo, enquanto a outra parte espalhada da onda se concentra detrás do obstáculo (MORSE; INGARD, 1968) e interfere de forma destrutiva com a onda que se propaga detrás do obstáculo, formando uma onda de interferência que se caracteriza pela formação geométrica de um campo acústico chamado de *Sharp-edged shadow*. Para obstáculos pequenos comparados com o comprimento de onda, toda a onda espa-

lhada é propagada em todas as direções sem formação de sombras.

Os processos de espalhamentos são fenômenos de dispersão multidirecionais ocasionados pelos mecanismos de interação entre as ondas incidentes e as características de distribuição da heterogeneidade do meio de propagação (PAZIN *et al.*, 2003). Os processos de espalhamento podem ser descritos em termos de um coeficiente de retroespalhamento (*backscattering coefficient*), o qual representa a intensidade espalhada pela seção transversal para uma unidade de volume do meio alvo (DUCK *et al.*, 1998). A estimativa do índice de retroespalhamento permite avaliar as propriedades do meio, relacionadas à estrutura e à heterogeneidade. Assim, a potência de espalhamento W_s refletida em certa direção por uma partícula (considerada como objeto espalhador em um meio de propagação heterogêneo), pode ser estimada a partir da relação descrita na Eq. 3.30:

$$W_s = I_i \sigma_s \quad (3.30)$$

onde o termo σ_s é a área total da seção transversal de espalhamento com geometria esférica, I_i é a intensidade incidente por unidade de ângulo sólido (Fig.3.9).

Tendo em conta que a potência de espalhamento é proporcional ao número de espalhadores contidos no volume do meio (DUCK *et al.*, 1998), é possível definir que para um meio com um número discreto de partículas n_{si} , o coeficiente diferencial de espalhamento u_{ds} , o qual representa a quantidade de energia retroespalhada por unidade de intensidade incidente, por unidade de volume e por unidade de ângulo sólido é dado pela Eq. 3.31 (DUCK *et al.*, 1998):

$$u_{ds}(\theta, \varphi) = \sum_i n_{si} \sigma_{dsi}(\theta, \varphi) \quad (3.31)$$

Figura 3.9: Geometria de espalhamento em região heterogênea. Fonte adaptada de Duck et al. (1998).

onde $n_{si}(\sigma_{dsi})$ descreve a distribuição de densidade dos espalhadores para uma determinada

área da seção transversal. Neste contexto, considerando que a potência de espalhamento por unidade de ângulo sólido é determinada dividindo por 4π (o qual corresponde a número de esteroradiano numa esfera), o coeficiente total de retroespalhamento pode ser estimado mediante a expressão (ver Eq. 3.32):

$$u_s = \int_{4\pi}^0 \mu_{ds}(\theta, \varphi) d\Omega (\text{onde : } d\Omega = \sin\theta d\theta d\varphi). \quad (3.32)$$

Por último, o coeficiente diferencial de espalhamento para $\theta = \pi$ e $\varphi = 0$ representa o coeficiente de retroespalhamento ou *backscattering coefficient*, o qual indica a quantidade de energia retroespalhada em direção ao sistema de transmissão.

Os coeficientes que representam a perda de energia coerente como o coeficiente de atenuação (α) e o coeficiente de retroespalhamento (u_{bs}) podem ser expressos na Eq. 3.33, a qual, representa a propagação de uma onda plana num meio com perdas:

$$P = P_0 e^{-(2\alpha + u_{bs})x} = P_0 e^{-2\alpha_T x} \quad (3.33)$$

onde α_T representa a perda total de energia, onde se incluem as contribuições pelo espalhamento do meio dado pelo coeficiente σ (SHUNG; THIEME, 1993). O coeficiente de *backscattering* é um parâmetro que pode ser definido como a quantidade de potência dispersa por unidade diferencial de volume do meio de propagação e é estimado em unidades de centímetro por esteroradiano ($cm^{-1} sr^{-1}$).

3.8.1 Derivação do Modelo para medir o coeficiente de *backscattering*

Para determinar o modelo que permita a estimativa do coeficiente de retroespalhamento, parte-se do modelo de espalhamento apresentado por Insana *et al.* (1990), no qual se considera a propagação de uma onda plana incidente sobre um meio não homogêneo de volume V contendo partículas espalhadoras. Desse modo, o processo de espalhamento existirá devido às variações na compressibilidade (k) e densidade do meio (ρ). Tendo em conta que o processo de espalhamento é descrito em termos da seção transversal de espalhamento a qual relaciona a quantidade de energia espalhada por partícula por unidade incidente de intensidade (Fig. 3.10), define-se que, o campo acústico espalhado por cada partícula do meio em um ponto determinado r é descrito pela Eq. 3.34 (INSANA *et al.*, 1990):

$$p_s(r) = (e^{ikR}/R) \Phi(K) \quad (3.34)$$

onde $k = 2\pi/\lambda$ é o número de onda, λ é o comprimento de onda. $\Phi(K)$, é um fator denominado de amplitude complexa de espalhamento e descreve a dependência espacial da frequência

da onda espalhada; Φ é dada em função do vetor de espalhamento K o qual apresenta uma magnitude descrita pela expressão: $2k \sin \theta / 2$, onde θ é o ângulo do espalhamento entre a onda plana incidente e o ponto de observação.

Figura 3.10: Geometria de espalhamento partícula espalhadora. Fonte adaptada Inasana *et al.* 1990. (1998).

Conforme descrito por Insana *et al.* (1990), $\Phi(K)$ é estimado a partir da Eq. 3.35 mediante a utilização da função de Green (*Green's function approach*), a qual permite estimar a pressão gerada por partículas dispersoras, fazendo-se a soma individual de ondas de retroespalhamento de partículas do meio (SHUNG; THIEME, 1993).

$$\Phi(K) \approx k^2 / 4\pi \int_V \gamma(\hat{r}) e^{jK\hat{r}} d\hat{r} \quad (3.35)$$

onde $\gamma(\hat{r}) = \gamma_k(\hat{r}) + \gamma_p(\hat{r}) \cos \theta$. Sendo que γ_k e γ_p representam a variação fracional de compressibilidade e densidade do meio. V é o volume que contem a partícula dispersora; nesse volume, se a partícula do meio for debilmente dispersora então as contribuições de espalhamento dadas pela compressibilidade e densidade são idênticas. Portanto, cada campo de pressão dado por partículas individuais distribuídas randomicamente no meio é dado pela Eq. 3.36:

$$p_s(r) = e^{ikR} / R \sum_N^{j=1} \Phi_j(K) e^{iKr_j} \quad (3.36)$$

onde r_j é a posição da partícula e N é o total do número de partículas no volume do meio. $p_s(r)$ é uma função randômica da posição r e pode ser reescrito como a soma do espalhamento coerente $\langle p_s \rangle$ e o espalhamento incoerente (campo flutuante) $\check{p}_s$ como visto na Eq.3.37:

$$p_s(r) = \langle p_s(r) \rangle + \check{p}_s(r) \quad (3.37)$$

Com o objetivo de determinar o modelo que permita a estimativa do coeficiente de retro-espalhamento, define-se inicialmente a relação que existe entre $\langle p_s(r) \rangle$ e a intensidade de espalhamento média $\langle I \rangle$, dada pela Eq. 3.38:

$$\rho c \langle I \rangle = \langle |p_s|^2 \rangle \quad (3.38)$$

Assim, considerando o descrito por Insana *et al.* (1990), utilizando a Eq.(3.38), descreve-se o modelo que representa o diferencial da seção transversal de espalhamento u_{ds} e que se define como a potência espalhada dentro de um ângulo sólido dividida pelo produto da intensidade incidente e o volume de espalhamento (Eq. 3.39):

$$u_{ds} = \frac{R^2}{V} \frac{\langle I \rangle}{I_0} = \frac{1}{V} \langle |\Phi(K)|^2 \rangle \quad (3.39)$$

Assim, substituindo o valor de $\Phi(K)$ (expresso na Eq. 3.35) na Eq. 3.39, obtém-se a Eq. 3.40:

$$u_{ds} = \frac{k^4}{16\pi^2 V} \left\langle \int_V \gamma(\hat{r}_1) e^{jK\hat{r}_1} \tilde{d}\hat{r}_1 \int_V \gamma(\hat{r}_2) e^{jK\hat{r}_2} \tilde{d}\hat{r}_2 \right\rangle \quad (3.40)$$

onde a função $\gamma(\hat{r})$ decreve a distribuição de partículas espalhadoras no volume do meio. O valor de σ_s pode ser reescrito em termos da função de autocorrelação ($B_\gamma(\Delta r)$) como apresentado na Eq. 3.41:

$$u_{ds} = \frac{k^4}{16\pi^2} \int_V B_\gamma(\Delta r) e^{-iK\Delta r} \tilde{d}\Delta r \quad (3.41)$$

Finalmente, segundo o desenvolvimento matemático apresentado em Insana *et al.* (1990) a partir da organização dos termos da Eq. 3.41 u_{ds} é determinado como visto na Eq. 3.42:

$$u_{ds} = \frac{k^4}{16\pi^2} \left(\left| \langle \gamma \rangle \int_V e^{-iK\tilde{r}} \tilde{d}\tilde{r} \right|^2 + \langle |\gamma - \langle \gamma \rangle|^2 \rangle \int_{-\infty}^{\infty} b_\gamma(\Delta r) e^{-iK\Delta r} \tilde{d}\Delta r \right) \quad (3.42)$$

onde o primeiro termo expressa a componente coerente e o segundo termo a componente incoerente. Portanto, se for definido que o meio é randômico e isotrópico, então a componente

coerente é desprezível e u_{ds} apresenta um espalhamento inteiramente incoerente. Para um espalhamento incoerente onde cada partícula no volume do meio vibra independentemente das outras, a variância em γ é dada pela variação média quadrática da impedância acústica por partícula γ_0^2 vezes o volume fracional de espalhamento no volume V , $\approx \bar{n}V_s$, onde $\bar{n}$ é o número médio de partículas por unidade de volume e V_s é o volume medio da particula. Portanto, o diferencial da seção transversal por unidade de volume é expresso na Eq. 3.43:

$$u_{ds} = \frac{k^4 V_s}{16\pi^2} \bar{n} \gamma_0^2 \int_{-\infty}^{\infty} b_{\gamma}(\Delta r) e^{-iK\Delta r} \tilde{d}\Delta r = 4\pi^4 k^4 \bar{n} \Gamma^2(\mathbf{K}) \quad (3.43)$$

onde $\Gamma^2(\mathbf{K})$ é a densidade de potência espectral para a flutuação do meio, a qual permite descrever a estrutura do meio e fornece a dependência espacial da frequência.

A partir do conhecimento do modelo matemático visto na (Eq. 3.43), o qual permite a estimativa do coeficiente de *backscattering*, o estudo apresentado por Lebertre *et al.* (2000), deriva o modelo expresso na Eq.3.44, o qual considera as características geométricas do transdutor e outras como a diretividade do feixe e espectro de potência do sinal retroespalhado. Portanto, o modelo experimental utilizado para a estimativa do coeficiente de *backscattering* é dado a seguir:

$$u_{bs}(f, z) = L^2 / (Ar_0 \Delta z) W(f, z) \quad (3.44)$$

onde z é a distância desde o transdutor até a superfície do meio a ser inspecionado. Ar_0 representa a superfície ativa do transdutor e Δz é a distância axial de propagação da onda sobre o meio. $W(f, z)$ equivale ao espectro de potência médio estimado para um sinal de retroespalhamento, o qual é corrigido por um espectro de referência determinado a partir de uma reflexão especular em um meio não atenuante.

3.9 Teste de *Run*

O teste de *run* é um teste estatístico não paramétrico que verifica a dependência mútua entre valores de uma sequência de dados (BENDAT, 1971). Tal teste é normalmente usado para avaliar a hipótese de aleatoriedade de uma distribuição ou avaliar a estacionariedade de um sinal entre outros. Para explicar o modo de operação do teste de *run*, inicialmente é considerada uma variável h descrita através de uma sequência de N valores observados. Cada uma das observações é *clusterizada* exclusivamente para uma das duas classes preestabelecidas através de um estimador que permita avaliar a condição de igualdade entre dados adjacentes da sequência N de valores inspecionados. Uma condição de avaliação pode ser dada através de um estimador como a média $\bar{h}$, para a qual sendo $h_i = 1, 2, 3, \dots, N$, cada observação é categorizada e etiquetada mediante o símbolo (+) ou (−) segundo os seguintes critérios de seleção (Eq. 3.45 e Eq.

3.46), (BENDAT, 1971):

$$Se\ h_i \geq \bar{h} \rightarrow + \quad (3.45)$$

$$Se\ h_i \leq \bar{h} \rightarrow - \quad (3.46)$$

Contudo, para a seqüência de observações descrita na Figura 3.11, pode ser definido o *run* como a seqüência de idênticas observações e/ou valores diferentes que procedem na seqüência avaliada (BENDAT, 1971). Desse modo, o número de *runs* torna-se um indicador da independência de observações aleatórias da mesma variável. Na Figura 3.11 existem 12 runs para uma seqüência de 19 observações (N).

++	-	++	-	+++	-	+	--	+	--	+	--
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Figura 3.11: Observações etiquetadas mediante as expressões Eq. 3.45 e Eq. 3.46 para a seqüência de dados N. Fonte adaptada (BENDAT, 1971).

Para a distribuição do número de *runs* na seqüência dos dados de análise, a média e a variância podem ser descritas como a seguir, pelas expressões Eq. 3.47 e Eq. 3.48 (BENDAT, 1971):

$$\mu_{sequ_{run}} = 2N_1N_2/N + 1 \quad (3.47)$$

$$\sigma_{sequ_{run}} = \frac{2N_1N_2(2N_1N_2 - N)}{N^2(N - 1)} \quad (3.48)$$

onde N_1 é o número de observações identificado com (+) e N_2 equivale ao número de observações (-).

Neste estudo o estimador estatístico utilizado para etiquetar o número de *runs* foi baseado na análise de homogeneidade de variâncias, a qual permite uma medida da dispersão da variabilidade dos dados de análise. Assim, a análise de variância entre duas amostras foi realizada aplicando o teste estatístico F de *Snedecor*, no qual avalia-se uma hipótese nula (H_0), referida como a condição na qual as variâncias de duas observações (σ_1^2 e σ_2^2), apresentam significativamente variâncias homogêneas $\rightarrow \sigma_1^2 = \sigma_2^2$.

O teste de hipótese F para análise de duas variâncias é formulado nos seguintes passos (BENDAT, 1971):

1. Formulação da hipótese Nula: $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ e Alternativa $H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$
2. Predeterminar o nível de significância ς que está relacionado com a probabilidade de rejeitar a hipótese Nula.

3. Determinar o valor crítico F_L na distribuição de probabilidade F *Snedecor* a partir do grau de liberdade (L) das amostras de estudo.
4. Estimar o *Score* (F_{Score}) dado pelo quociente das variâncias enviesada $\rightarrow F_{Score} = S_1^2/S_2^2$, considerando $S_1^2 > S_2^2$.
5. Comparar o *score* em relação ao valor crítico, rejeitando a hipótese nula no caso em que o *score* seja maior que o valor crítico.

Os resultados obtidos com a aplicação do teste de hipótese F, num nível de significância determinado, são utilizados como estimadores estatísticos na avaliação de estacionariedade dos dados mediante o teste não paramétrico de Run.

3.9.1 Curve Fitting

O ajuste de curvas ou *curve fitting* é um dos processos que envolve a obtenção de uma função matemática que representa o melhor ajuste para uma série de dados, a partir da determinação de coeficientes específicos que aproximam a função aos dados de análise. A construção de funções pode ser do tipo linear, polinomial, exponencial, senoidal entre outras (STEARN; DAVID, 1988). A operação no ajuste de curvas de uma série de dados consiste portanto em encontrar os valores dos coeficientes que minimizam a expressão Eq. 3.49 :

$$\sum_i \left(\frac{y - y_i}{\sigma_i} \right) \quad (3.49)$$

sendo y o valor ajustado para um determinado ponto y_i dos dados e σ_i corresponde à estimativa do desvio padrão para y_i .

Neste estudo é aplicado o ajuste de curvas na análise e interpretação dos perfis das curvas obtidas nas larguras de banda de densidades de potência espectral, determinadas sobre sinais de retroespalhamento de ultra-som. O cálculo de coeficientes angulares via *curve fitting* é utilizado para descrever as flutuações de energia espectral, indicando taxas da atenuação de energia (vista por meio de mudanças na largura de banda espectral, conforme visto na Fig. 3.12) e que por sua vez, está relacionada com as propriedades de dispersão do meio (WILSON *et al.*, 1984).

Figura 3.12: Ajuste linear da curva (*linear curve fitting*) para a determinação da taxa de atenuação de energia espectral. Fonte adaptada (WILSON *et al.*, 1984).

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritas as características dos equipamentos utilizados para a caracterização da fermentação do caldo de cana de açúcar. Também são apresentados os procedimentos realizados para conduzir o processo de fermentação e a metodologia empregada para o processamento e a análise dos dados coletados na RoI.

4.1 Visão geral do sistema

Neste trabalho foi implementado um sistema para a caracterização não destrutiva por ultra-som da fermentação do caldo de cana de açúcar, utilizando um híbrido de técnicas de processamento de sinais. A metodologia compreende três etapas ilustradas na Fig. 4.1.

Figura 4.1: Etapas desenvolvidas no projeto

A etapa de calibração consiste na adaptação do sistema de ultra-som ao sistema de fermentação e na identificação de sinais de ultra-som refletidos num meio de referência (água com

fermento).

Na etapa de monitoração ultra-sônica e coleta de dados foram realizados os experimentos de fermentação alcoólica e simultaneamente foram adquiridos parâmetros químicos e sinais de retroespalhamento de ultra-som para posterior análise.

Na última etapa, foram implementados procedimentos computacionais para avaliar os sinais coletados na etapa anterior.

Essas etapas serão descritas com mais detalhes nas seções seguintes.

4.2 Equipamentos do sistema de monitoração

A monitoração do caldo de cana de açúcar durante a fermentação foi realizada utilizando o conjunto de equipamentos ilustrados na Fig. 4.2.

Figura 4.2: Sistema de monitoração. 1.) Sistema de ultra-som. 2.) Osciloscópio. 3.) pHmetro Digital. 4.) Agitador Magnético. 5.) Transdutor de Ultra-som. 6.) Caldo de cana de açúcar. 7.) Sensor pHmetro.

A emissão do campo acústico e a aquisição de sinais compreende os componentes ilustrados na Fig. 4.3: um osciloscópio, um sistema de ultra-som e um transdutor de ultra-som de 4.5 MHz.

Figura 4.3: Sistema de emissão e aquisição. (A) Sistema de ultra-som Panametrics 5800 configurado em modo pulso-eco. (B) Osciloscópio Tektronix TDS 3034B, utilizado para armazenamento dos sinais de ultra-som. (C) Transdutor de ultra-som de 4.5 MHz marca FUNBEC/ 7mm de diâmetro.

A resposta em frequência do transdutor de ultra-som foi determinada com o uso de um sistema analisador de impedância, sendo a largura de banda do transdutor estimada em 1 MHz aproximadamente (Fig. 4.4).

Figura 4.4: Resposta em frequência para o transdutor de ultra-som. (A) Impedancímetro Agilent 4294A com varredura em frequência entre 40 Hz a 110 MHz. (B) Apresenta as frequências amortecidas da cerâmica do transdutor, mostrando uma frequência de ressonância de 4.5 MHz aproximadamente.

A monitoração do pH do caldo de fermentação (após da calibragem do aparelho) é feita por um equipamento denominado pHmetro, e a agitação mecânica é realizada por um agitador magnético (Fig. 4.5).

(A)

(B)

Figura 4.5: (A) pHmetro Digimed DM20 com eletrodo (DME-CV1). (B) Agitador magnético com placa de aquecimento marca Fisatom modelo 258.

4.3 Calibração

O processo de calibração do sistema de ultra-som ao sistema de fermentação é realizado inicialmente através do acoplamento da área efetiva de radiação do transdutor de ultra-som (7 mm de diâmetro) à parede do recipiente que contém a amostra líquida de estudo. O acoplamento é efetuado através da aplicação de um biogel hidrossolúvel (composto pela mistura de carbopol e água) utilizado em ultrassonografia.

Posteriormente é realizado o alinhamento do feixe de ultra-som a partir da localização de reflexões estacionárias (de maior amplitude) dadas pelas paredes de vidro do recipiente. O efeito de divergência do feixe de ultra-som, calculado segundo o modelo apresentado na seção 3.3.1 é mínimo, apresentando um ângulo de divergência de 2.52° o qual sugere uma mínima abertura do feixe desde a fonte de emissão e a varredura de uma área que se encontra dentro da geometria do elemento ativo do transdutor.

Em relação ao acoplamento do transdutor, também foi considerado o efeito de refração devido à mudança de impedância acústica entre a parede de vidro do recipiente e o líquido de referência (água) contido na calibração do sistema. Assim, a mudança angular, calculada apli-

cando a Lei de Snell é negligenciável devido a valor pequeno do ângulo estimado, sendo este de 0.133° (Fig. 4.6).

Figura 4.6: Ângulo de refração através de uma interface de vidro e água.

Dentro da etapa de calibração também foram avaliados inicialmente num meio de referência (água + partículas de levedura), os procedimentos computacionais implementados para caracterizar o processo de fermentação. Assim, com o conhecimento prévio das propriedades acústicas do meio de referência foi alcançado o ajuste das subrotinas que adicionalmente, contribuíram com a extração de características espectrais do fermento.

Conforme o exposto, a Figura 4.7 representa as atividades envolvidas no ajuste do sistema de caracterização proposto.

Figura 4.7: Ajuste do sistema no meio de Referência. (A) Acoplamento do transdutor no recipiente com água e alinhamento do feixe de ultra-som. (B) Mistura de água e fermento. (C) Identificação de sinais de ultra-som no meio de referência em agitação.

Adicionalmente é apresentada nas Figuras 4.8 (a) e (b), a influência do efeito de agitação mecânica no meio de referência, mostrando uma mínima variação do sinal de ultra-som no domínio do tempo e da frequência. Também, as diferenças entre o sinal coletado na RoI para o meio de referência em agitação com e/sem partículas, é ilustrado na Fig. 4.8 (c) e (d), apresentando que a faixa dinâmica é de aproximadamente 16,82 dB. Isto implica que as mudanças no sinal dado pela presença de partículas de levedura possibilitaria a detecção da fase dispersa no meio aquoso.

Figura 4.8: Sinais de ultra-som coletadas no meio de Referência.

4.4 Experimentos de fermentação

Os experimentos de fermentação alcoólica, a partir do mosto de caldo de cana de açúcar comercial foram conduzidos no sistema apresentado na Fig. 4.2. Antes de dar início ao processo de fermentação, foram determinados os valores das propriedades químicas do caldo de cana de açúcar tais como densidade (ρ), pH e concentração de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Bx}$), para determinar as condições iniciais do meio de fermentação (Fig. 4.9).

Valores médios –caldo de cana de açúcar

pH : 5.3225

ρ : 1.0379 g/ml

$^{\circ}\text{Bx}$: 10.46

Figura 4.9: Valores iniciais do caldo de cana de açúcar

O processo de fermentação inicia com a inoculação de 4.14 g de cepas de levedura comercial da espécie *Saccharomyces cerevisiae* sobre um volume de 500 ml do mosto de caldo de cana de açúcar (ver Fig. 4.10). Após essa preparação, a mistura líquida em fermentação (meio de cultura) foi colocada no agitador magnético com agitação orbital (120 rpm) visando a mistura dos componentes do meio de fermentação, a eliminação dos gradientes de concentração, promovendo a agitação uniforme, assim como a suspensão da biomassa no meio.

Figura 4.10: Inoculação do mosto de caldo de cana de açúcar com fermento biológico seco comercial. (A) -(B) Partículas de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. (C) - (D) Agregação de levedura no mosto.

O meio de cultura foi mantido num intervalo de temperatura de 28 a 30 graus centígrados. A fermentação foi conduzida durante 5 horas aproximadamente e, em diferentes instantes das fases da fermentação, foram medidos valores de pH do mosto. Adicionalmente foram extraídas amostras de 20 ml, para estimativas de densidade do mosto e peso da biomassa. As amostras de biomassa obtidas após a filtragem de 20 ml do meio de fermentação foram colocadas no forno de secagem (marca FANEM) a uma temperatura de 100 ° C, visando a obtenção do peso da biomassa seca nas distintas fases da fermentação (Fig. 4.11).

Um exemplo da evolução da biomassa seca extraída em diversos instantes da fermentação pode ser vista na Fig. 4.12. Inicialmente, no instante de tempo de 26 minutos a Fig. 4.12 (a) ilustra a fase de adaptação celular. Posteriormente, observa-se que nos instantes de tempo entre 55 a 205 minutos ocorre a fermentação principal acompanhada mediante o crescimento da densidade de biomassa. Finalmente, nos instantes de tempo entre 236 a 300 minutos, associados à pós-fermentação, observa-se uma depleção da densidade de partículas de biomassa que corresponde à fase de "morte celular".

Figura 4.11: Procedimento para estimar peso de biomassa seca. (A) Extração 20 ml do mosto (cálculo de densidade)). (B) Sistema de filtragem para a mistura líquida. (C) Extração da biomassa e secagem no forno. (D) Estimativa do peso de biomassa na balança (Shimadzu AY220).

Figura 4.12: Evolução da biomassa no meio de fermentação. Fotos obtidas mediante microscópio ótico marca Leica DMRX com magnificação de 2.5x. (a) Fase de adaptação celular. (b) - (f) Fase e fermentação principal. (g)-(i) Fase de pós-fermentação.

4.5 Monitoração não destrutiva

O processo de fermentação alcoólica do caldo de cana de açúcar foi monitorado mediante ondas de ultra-som. O sistema de monitoração não destrutiva por ultra-som, configurado no modo pulso-eco, foi acoplado de forma externa ao meio de fermentação (Fig. 4.13), posicionando o transdutor de ultra-som de forma perpendicular à parede do vidro do recipiente (contendo o mosto), usando como meio de acoplamento um gel composto por carbopol, assim como descrito previamente na seção de calibração.

Figura 4.13: Acoplamento do transdutor de ultra-som.

O campo de ultra-som aplicado no meio de interesse é de baixa potência ($100 \mu J$), o qual sugere que não se produz nenhum efeito inibitório de enzimas ou microorganismos no processo fermentativo. Isto é devido ao fato que durante a aplicação do campo de ultra-som, nenhum efeito de cavitação se apresenta, nem efeitos térmicos associados à exposição acústica do meio, os quais são algumas das principais condições que devem existir nos procedimentos de esterilização e inativação microbiana por ultra-som (CHEMAT *et al.*, 2011), (KWIATKOWSKA *et al.*, 2011).

Desse modo, com fins de caracterização do meio, sinais de retroespalhamento de ultra-som foram coletados em distintos instantes do processo de fermentação, utilizando o osciloscópio (Tektronix TDS 3034B) como sistema de aquisição de dados. Os sinais foram armazenados em forma de arquivos com extensão ".csv" com uma taxa de amostragem de 50 MS/s.

Um exemplo das características do sinal de ultra-som coletado na monitoração do mosto é apresentada na Fig.4.14.

Figura 4.14: Descrição do sinal de retroespalhamento de ultra-som no meio de fermentação. As reflexões 1 e 2 são associadas às paredes do vidro do recipiente. As reflexões 3 e 4 ocorrem na interface vidro líquido e vice-versa.

Observa-se que as reflexões estacionárias de alta amplitude (reflexões 1 e 2) representam a propagação das ondas de ultra-som no vidro. Enquanto isso, as reflexões 3 e 4 representam a diferença da impedância acústica que existe entre as interfaces vidro-líquido. A Figura 4.14 também apresenta a região de interesse do sinal de ultra-som, a qual foi determinada considerando a região do campo próximo do transdutor, onde a variação aleatória da intensidade do feixe de ultra-som não é desejável e portanto, as estimativas nesta região não são confiáveis.

A Figura 4.15 apresenta exemplos dos tipos de sinais de retroespalhamento de ultra-som coletados durante as principais fases de fermentação, os quais foram analisados para a extração de parâmetros que permitiram caracterizar o meio de cultura.

Figura 4.15: Evolução dos sinais de ultra-som na fermentação. (a) Sinal no caldo de cana sem levedura. (b)-(d) Fase de adaptação celular. (e)-(h) Fase tumultuosa. (i)-(l) Pós-fermentação.

4.6 Sistema de Caracterização - Técnicas de Processamento

O sistema implementado para a extração de informações sobre os sinais de ultra-som após a propagação no meio de fermentação é composto por três itens denominados: a) sistema de detecção, b) sistema de caracterização e c) sistema de classificação. A Figura 4.16 ilustra o fluxograma geral dos processos envolvidos no sistema proposto.

4.6.1 Sistema de Detecção de partículas

O sistema de detecção de partículas foi projetado para realizar uma análise predeterminada da presença de partículas sólidas não solúveis no meio de fermentação, a partir da análise de reflexões de ultra-som geradas pelo trânsito das partículas no campo de ultra-som. Dessa forma, o sistema de detecção proporciona informações sobre os vetores de ultra-som coletados na RoI, fornecendo assim, parâmetros de entrada no sistema de classificação, que favorecem a discriminação de ecos associados às partículas de biomassa em relação à fase aquosa (denominada fase contínua). O sistema de detecção compreende um algoritmo para análise da estacionariedade em pequenos intervalos do sinal de ultra-som e um algoritmo baseado no ajuste de curvas (*Curve*

Figura 4.16: Fluxograma de processos do sistema de caracterização da fermentação alcoólica.

Fitting) sobre larguras de banda de espectros de potência, estimados em diferentes intervalos de tempo do sinal de retroespalhamento de ultra-som (Fig.4.17).

Figura 4.17: Análise de ondas usando *curve fitting* sobre densidades de potencia espectral

A análise de estacionariedade em determinados intervalos do sinal é realizada devido ao fato de que os mecanismos de interação onda-partícula produzem sinais que estão relacionados com as diferenças de compressibilidade entre as partículas em suspensão e a fase líquida do meio de cultura, sendo que as reflexões geradas pela pulsação cíclica de partículas sólidas, ao interagir com o campo acústico incidente, produzem sinais com incrementos de energia espectral, os quais são de curta duração devido ao trânsito de partículas.

Os sinais produzidos pelas partículas apresentam características estacionárias, quando comparadas com as características dos sinais obtidos na propagação da fase aquosa. Um exemplo da detecção de uma reflexão estacionária no sinal de retroespalhamento mediante a aplicação do teste de Run é apresentada na Fig. 4.18.

Figura 4.18: Exemplo de detecção mediante o Teste de *Run*. (A) Sinal de retroespalhamento associado a um grupo de partículas de levedura suspensas na água. (B) Espectrograma. (C) Análise da estacionariedade no sinal. (D) Detecção de reflexão associada a partículas de levedura.

O algoritmo de estacionariedade é baseado na aplicação do teste estatístico de Run sobre uma sequência de segmentos do vetor de ultra-som a ser analisado. Desse modo, é avaliada a independência mútua entre N segmentos, determinando o número de sequências com características estatísticas consideradas como idênticas (Runs) para um nível de significância $\varsigma = 0.90$. O estimador utilizado para avaliar a independência entre os intervalos do sinal de retroespalhamento foi a variância, avaliada mediante o teste de hipótese F para análise de variâncias (BENDAT, 1971).

A determinação da condição estacionária para um intervalo determinado do sinal de ultra-som é realizada comparando o número de Runs em relação a um valor pré-determinado a partir da distribuição de Run, dentro de um intervalo estimado para $R_n; 1 - \varsigma/2 - R_n; \varsigma/2$; onde N equivale ao número de sequências (observações) num intervalo de tempo do sinal de ultra-som e $n=N/2$.

Os passos executados pelo algoritmo baseado no teste de Run é apresentado no Algoritmo 1.

Algorithm 1 Detecção de intervalos estacionários no sinal de ultra-som usando o Teste de Run

INICIO

- Entrada: Sinal RF após a propagação axial na RoI do mosto $\rightarrow x[n]$
- Saída: Identificação de segmentos estacionários $\rightarrow y[n]$

Passo 1 :

Dividir sinal $x[n]$ em M segmentos com tamanho equivalente à largura do pulso do sinal de ultra-som incidente (dado pelo equipamento).

Subdividir os M segmentos em N intervalos de igual tamanho

Passo 2 :

Estimar a variância em cada intervalo N

Realizar análise de variância entre segmentos (N) adjacentes mediante Teste de Hipóteses F

Avaliar a sequência de N segmentos identificados com variâncias idênticas = Número de Runs

Passo 3:

Avaliar na Distribuição de Run, o número de Runs encontrados em cada intervalo N definindo os segmentos estacionários $\rightarrow y[n]$

END

Por outro lado, o algoritmo baseado em *curve fitting* foi utilizado para realizar uma análise do sinal de retroespalhamento na RoI com características atenuantes, induzidas pela presença de densidades de partículas. Isto foi conseguido através do cálculo de coeficientes angulares, determinados sobre as larguras de banda de densidades de potência espectral dos sinais de ultra-som. Assim, a perda de energia acústica dada pela interação onda - partícula, reflete o efeito de atenuação, que é observado mediante a diminuição da largura de banda espectral, a qual é associada

a coeficientes angulares maiores quando comparado com os coeficientes determinados nos espectros da fase aquosa onde não há presença de partículas (Fig. 4.19).

Figura 4.19: Estimativa de coeficientes angulares (*slope*) a partir de espectros estimados sobre reflexões associadas à fase dispersa e contínua.

Os processos executados pelo Algoritmo de *curve fitting* são apresentados no Algoritmo 2.

O resultado final do sistema de detecção é constituído pela integração dos resultados fornecidos pelos algoritmos de *curve fitting* e análise de estacionariedade (Teste de Run), sendo a operação de integração, baseada na estimativa do fator comum entre as respostas proporcionadas pelos algoritmos. Desse modo, só os segmentos do sinal de retroespalhamento na RoI, identificados igualmente nos dois algoritmos, são considerados na predição de sinais ultra-sônicos correlacionados com a presença de partículas sólidas (Fig. 4.20).

Na Figura 4.20, os sinais etiquetados em retângulos verdes representam segmentos detectados identicamente nos dois algoritmos de detecção. Os intervalos do sinal etiquetados em marcação preta com preenchimento azul, indicam que as respostas dos algoritmos (segmentos do sinal) não correspondem e portanto implica a discriminação desses sinais como representações de reflexões dadas por frações da fase dispersa.

Algorithm 2 Curve fitting**INICIO**

- Entrada: Sinal RF após a propagação axial na RoI do mosto $\rightarrow x[n]$
- Saída: Identificação de segmentos $y[n]$ com coeficientes angulares (*slope*) $> 0,5$

Passo 1 :

Extrair segmentos do sinal $x[n]$ com tamanho M equivalente à largura do pulso do sinal de ultra-som incidente.

Passo 2 :

Estimar densidades de potência espectral (DPS) para todos os valores de $M(1..J)$

Passo 3:

for $M(1..J)$ **do**

$\rightarrow |TF| [M_{[1..j]}(t)] = M(f)M^*(f)/2\pi 0$

for $|TF| [M_{[1..j]}(t)]$ **do**

$|TF| [M_{[1..j]}(t)] 0$ SLOPE $F + B$. (Estimar o slope na largura de banda mediante o ajuste linear).

end for

Considerar os segmentos com $\text{slope} > 0,5$

end for

END

Figura 4.20: Módulo de integração dos algoritmos de detecção. (A) Sinal de ultra-som de entrada coletado na RoI. (B) Operação de interseção, baseada na seleção de intervalos de sinais identicamente detectados nos procedimentos de *Curve Fitting* e o Teste de Run.

4.6.2 Técnica de Caracterização

O sistema de caracterização permite extrair sobre os sinais de ultra-som, atributos espectrais como frequência central, largura de banda, valores de amplitude da fundamental e parâmetros de ultra-som como o *slope* (a partir da diferença espectral logarítmica) e o coeficiente integrado de *backscattering* (IBC). Os atributos espectrais foram determinados a partir de estimativas do espectro de potência em distintos intervalos do sinal de ultra-som. Um exemplo das diferenças que existem entre sinais coletados na fase contínua e dispersa é vista na Fig.4.21, onde destaca-se que o espectro dado por partículas, apresenta dentro da largura de banda do transdutor, uma frequência fundamental superior quando comparado com a fase aquosa, a qual é caracterizada por um sinal de baixa amplitude com uma concentração de sua energia espectral numa frequência mais baixa.

Figura 4.21: Diferenças entre as reflexões ocasionadas por partículas de levedura e a fase aquosa.

No sistema de caracterização, obtêm-se parâmetros sobre intervalos do sinal de ultra-som, os quais são avaliados posteriormente no sistema de classificação, para determinar se esses intervalos podem estar relacionados com as reflexões ocasionadas pela presença de partículas sólidas não solúveis ou se pertencem à fase aquosa do meio de fermentação.

Assim, estimativas de parâmetros como o *slope*, foram realizadas com base no método da diferença espectral logarítmica (Seção 3.7), utilizando um espectro de referência, que por sua vez foi calculado a partir de uma reflexão especular dada por uma base de alumínio durante a propagação na água.

Por outro lado, o parâmetro IBC foi determinado de forma experimental, utilizando o modelo descrito na seção 3.8, sendo para a estimativa desse parâmetro, consideradas as características do transdutor e a relação entre o espectro de referência coletado num meio não atenuante

(água) e a estimativa de espectros de potência médios, calculados em diferentes regiões do sinal de retroespalhamento analisado. O algoritmo que descreve os processos efetuados para a caracterização paramétrica é apresentado no Algoritmo 3.

Algorithm 3 Caracterização paramétrica de segmentos do sinal de ultra-som na RoI

INICIO

- Entrada: Sinal RF após a propagação axial na RoI do mosto $\rightarrow x[n]$. Sinal de Referência $R[n]$
- Saída: Slope, IBC, Frequência Central, Largura de Banda, Amplitude da Freq. Fundamental

Passo 1 :

Dividir o sinal $x[n]$ em $M=[N1...Nj]$ segmentos com tamanho equivalente à largura do pulso do $R[n]$.

Calcular a densidade de potência espectral para $R[n] \rightarrow DPSR[n]=SR(f)$

Passo 2 :

for $k=1 \dots j$ **do**

$PDSM[k] \rightarrow$ Extrair atributos espectrais: Freq. Central, Amplitude ...

end for

Passo 3: (Estimativa slope)

for $DPSM[k]$ **do**

$\rightarrow \log(DPSM[1...j]/DPSR[n])=Y(f)$. (Diferença espectral logarítmica).

Determinar o coeficiente angular (slope) $\rightarrow Y(f)=slope+b$

end for

Passo 4: (Estimativa IBC)

Introduzir valor de focalização do transdutor(L), distância de propagação(Δz), superfície ativa do transdutor($Ar0$)

for $q=1:p:j$ **do**

, sendo p o incremento

Calcular espectro de potência médio $W(f)$ a partir da $DPSM[q]$, utilizando um *overlap* do 50%

Estimar $IBC=L^2/(Ar0)*(\Delta z)*W(f)/SR(f)$

end for

END

Adicionalmente, a Figura 4.22 e 4.23 apresentam exemplos da estimativa de parâmetros para a água com partículas de fermento e para o meio de cultura, onde é evidenciada a diferença paramétrica entre regiões relacionadas com a fase aquosa e dispersa do vetor de ultra-som.

Figura 4.22: Estimativa de parâmetros: IBC, *Slope*, Freq. Central, Energia espectral (Amplitude), em intervalos do sinal de ultra-som após da propagação na água com partículas. (A)-(B) Representam o sinal de ultra-som no tempo (coletado na RoI). (C)-(F) Apresenta a atribuição de valores paramétricos para intervalos de tempo do sinal. (C) IBC. (D) *Slope*. (E) Freq. Central. (F) Amplitude. .

Figura 4.23: Estimativa de parâmetros em intervalos do sinal de ultra-som após da propagação no mosto em fermentação. (A)-(B) Representam o sinal de ultra-som no tempo. (C)-(F) Apresenta a etimativa quantitativa dos parâmetros: IBC, *Slope*, Freq. Central, Energia espectral (Amplitude) em distintos intervalos de tempo do sinal.

4.6.3 Classificação

Considerando a obtenção dos parâmetros determinados pelo sistema de caracterização, neste estudo foi empregado o algoritmo de classificação *K-means* para diferenciar os sinais refletidos pelo trânsito de partículas de biomassa em relação aos sinais dados pela fase contínua. O uso deste algoritmo não supervisionado foi selecionado visando a partição dos dados em *clusters* onde a similaridade dos dados é maximizada. O algoritmo é baseado no cálculo da distância euclidiana $d_e(At, C) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (At_i - C_i)^2}$ entre n atributos de entrada (At) e os centróides que correspondem à média dos elementos que constituem as classes de saída. Assim, foram fixadas duas classes de saída (fase aquosa e dispersa), as quais representam de forma geral, o mosto em fermentação como um sistema binário líquido-sólido. Uma representação do modo de operação do algoritmo *K-means*, utilizando dois atributos de entrada é vista na Fig. 4.24.

Figura 4.24: Atividades do algoritmo de clusterização *K-means*. (A) Diagrama de dispersão dos dados de entrada e inicialização aleatória dos valores dos centróides. (B) Atribuição de dados a um grupo com centróide mais próximo, usando como métrica a distância euclidiana. (C) Deslocamento de centróides com base na média dos dados que constituem cada grupo atual. (D) Dissociação dos elementos em cada grupo para recalcular a atribuição dos dados em relação aos novos centróides.

Os processos descritos na Figura. 4.24 são realizados de forma iterativa até a estabilização das médias dos clusters. O algoritmo 4 aplicado na identificação dos sinais pertencentes à fase líquida e dispersa é apresentado a seguir:

Algorithm 4 Partição da fase contínua e dispersa mediante *K-means*

INICIO

- Entrada: Parâmetros (Slope, IBC, Frequência Central, Largura de Banda, Amplitude da Freq. Fundamental) de M intervalos do sinal de ultra-som avaliado
- Saída: Cluster de sinais associados à fase dispersa e contínua

Passo 1 :

Fornecer o número K de centroides $\rightarrow 2$ (Duas Classes)

Normalização dos parâmetros de entrada para M (Observações) intervalos do sinal

Passo 2 :

Geração de Matriz de distâncias $M \times K$ entre os centroides e as observações

Posicionamento de cada observação nas classes de saída preestabelecidas segundo o seu valor de distância euclidiana

Passo 3:

Refinamento das coordenadas dos centroides a partir da média estimada para as observações que pertencem à classe

Passo 4:

Repetir desde o Passo 2 de forma iterativa até a convergência

END

Um exemplo do relacionamento dos valores dos atributos: frequência central e slope sobre o processo de classificação utilizando o algoritmo *K-means* é evidenciado na Fig. 4.25. A classificação é obtida a partir do conhecimento prévio dos valores dos atributos que pertencem aos sinais de retroespalhamento de ultra-som relacionados para cada fase do meio de fermentação (aquosa e dispersa).

Assim, na Figura 4.25. (A), observa-se que existem dois valores do atributo frequência central, classificado de forma errada pelo sistema devido à proximidade dos valores dos elementos com a classe vizinha. Por outro lado, a Figura 4.25. (B) representa que o processo de classificação utilizando o atributo slope, torna-se complexo ao evidenciar que valores dos elementos que pertencem à fase contínua, também podem apresentar valores associados à fase dispersa e vice-versa.

Figura 4.25: Representação das classes de um atributo normalizado a partir do resultado obtido com *K-means*. (A) Frequência Central. (B) Slope.

Conforme o exposto, o processo de classificação fornece duas classes de saída que contêm intervalos de sinais de ultra-som com características ecogênicas dadas pela interação das ondas com a biomassa suspensa e com a fase líquida (Fig. 4.26).

A partir da percentagem de reflexões de partículas de biomassa, detectadas pelo classificador na RoI em distintos instantes de tempo do processo fermentativo, neste trabalho foi estimado o

Figura 4.26: Identificação de fases no meio de fermentação e ecos associados. (A)-(B) Exibem um exemplo da distribuição das partículas de levedura em relação à fase aquosa de suspensão. Adicionalmente são apresentados sinais típicos de ultra-som gerados pelas fases do meio de cultura.

perfil da percentagem de detecções de sinais, associados à presença de biomassa. A estimativa do perfil é realizada considerando que o incremento da concentração de biomassa durante a evolução da fermentação (Fig. 4.12) implica na diminuição da área interfacial e em um incremento do processo de espalhamento da onda de ultra-som incidente, o qual se traduz na geração de um maior número de reflexões na RoI, que podem ser associadas à presença de partículas de biomassa transitando no meio. Isto pode ser visto na simulação efetuada mediante o programa Wave2000 Pro ¹, onde é realizada uma simulação computacional numa mistura líquida com partículas dispersas, que mostram como as diferenças de compressibilidade dos componentes do meio geram processos de espalhamento, que podem ser detetados para avaliar de forma quantitativa a fase dispersa do meio (Fig. 4.27, Fig. 4.28 e Fig. 4.29).

¹Software para simulação computacional de ultra-som desenvolvido por Cyberlogic

Figura 4.27: Configuração do meio de simulação. Configuração do sistema de ultra-som no Modo Pulso-Eco. Sinal de ultra-som incidente (Pulso Gaussiano) de 4.5 MHz, Tamanho do transmissor-receptor = 7 mm. Meio de propagação = mistura de água (velocidade longitudinal de 1497 m/s e impedância acústica de 1.49 Mrayl) com esferas de vidro (velocidade longitudinal 5640.26 m/s e impedância acústica de 12.63 Mrayl). Tempo de Simulação 30 μ s.

Figura 4.28: Simulação do processo de propagação de um campo de ultra-som de 4.5 MHz num meio com água e partículas dispersas

Complementando o assunto, observa-se na Fig. 4.29 que segundo o incremento de partículas dispersas no meio, uma série de reflexões (atribuídas às partículas) são proporcionadas sendo que estas correspondem com a presença física de partículas no campo acústico incidente

e portanto, sugere-se que podem ser utilizadas para avaliar a percentagem da fase dispersa.

(a) Propagação campo de ultra-som de 4.5 MHz na água com partículas suspensas. (A) representação bidimensional. (B) Sinal refletido

(b) Reflexão por uma partícula.

(c) Identificação de reflexões por diversas partículas.

Figura 4.29: Simulação computacional do processo de espalhamento por partículas suspensas na água.

Diante do exposto, o perfil da evolução de biomassa no meio de fermentação, é determinado pelos procedimentos computacionais propostos e, apresenta uma tendência semelhante à curva que descreve a cinética de crescimento da biomassa durante as principais fases de fermentação e portanto, pode ser usado como um índice que descreve a atividade fermentativa. Assim, uma representação da construção do perfil de detecção de partículas com base na detecção de reflexões de ultra-som é ilustrada na Fig. (4.30).

Figura 4.30: Exemplo da construção da aproximação ultra-sônica para avaliar a evolução do meio de fermentação. (A) Representa o sinal de retroespalhamento de ultra-som coletado num instante de tempo determinado. Observa-se que o sinal segmentado (linhas vermelhas) é classificado mediante K-means de acordo com intervalos associados à fase dispersa e contínua (marcação verde e azul respectivamente). (B) Ilustra a agregação do valor de percentagem de detecções atribuídas à fase dispersa em comparação com o valor de Biomassa estimado.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

Neste capítulo, inicialmente são apresentados os valores de parâmetros bioquímicos do processo de fermentação mostrando que seus resultados foram compatíveis com valores reportados na literatura. Posteriormente, é apresentada a validação do sistema de detecção, caracterização e classificação de partículas de levedura e da fase contínua no meio de referência. E por último, são apresentados os resultados da caracterização do processo de fermentação alcoólica mediante os procedimentos computacionais propostos.

5.1 Resultados Bioquímicos

O processo de fermentação induz mudanças nas propriedades do caldo de cana de açúcar em fermentação tais como variações de pH, densidade, viscosidade entre outras. Um exemplo dos valores médios de parâmetros químicos determinados nos processos de fermentação são vistos na Fig. 5.1.

Figura 5.1: Valores médios normalizados dos parâmetros bioquímicos no processo de fermentação.

Mudanças a nível macroscópico no meio de cultura como variações na coloração do fluido, turvação na fase de fermentação principal e a homogeneidade macroscópica na fase de pós-fermentação são apresentadas na Fig. 5.2. A sequência dessas mudanças físicas ilustram mudanças abruptas durante a evolução da fermentação que são relacionadas à depleção dos parâmetros vistos na Fig. 5.1.

Figura 5.2: Mudanças na mistura líquida de fermentação. (A) Caldo de cana de açúcar. (B) Fase adaptação celular. (C)-(E) Fase de Fermentação principal (Tumulutosa). (F) Fase de Pós-Fermentação.

Por outro lado, a Figura 5.3 apresenta as mudanças da fase dispersa do meio de fermentação, as quais refletem as variações do crescimento da biomassa (extraída a partir de 20 ml) nas principais fases do processo.

O perfil de biomassa médio em relação aos experimentos de fermentação alcoólica conduzidos mostrou (segundo a Fig. 5.1), um crescimento médio de biomassa de aproximadamente 59,15%. Adicionalmente observa-se na Fig. 5.1, que posterior à fase de fermentação principal, aparece a fase de pós-fermentação (em aproximadamente 200 minutos), composta pela fase estacionária e a fase de morte celular, ocorrendo nesta última uma depleção da percentagem de biomassa de aproximadamente 17,44%. Os resultados expostos, são coerentes em relação aos resultados de crescimento de biomassa reportados no estudo de Wang *et al.* (2006), no qual é evidenciado uma diferença da biomassa inicial e final que oscila entre 40-50%.

Figura 5.3: Evolução fase dispersa. (A) Caldo de cana de açúcar sem levedura. (B) Fase adaptação celular. (C)-(F) Fase de Fermentação principal. (G)-(H) Fase de Pós-Fermentação.

A caracterização do peso da biomassa seca de distintos experimentos de fermentação alcoólica que foram conduzidos, é apresentada na Figura 5.4.

Figura 5.4: Perfil do peso da biomassa seca estimado em distintos processo de fermentação para 20 ml do meio de cultura.

O rendimento do crescimento de biomassa médio, calculado a partir da biomassa média formada no final da fase de fermentação principal (9,0512 g) e a biomassa média inicial (3,1237 g) utilizada, foi de aproximadamente 65,49% durante a fermentação de 500 ml de caldo de cana de açúcar. Assim, a taxa de crescimento da biomassa durante as fases de fermentação inicial e tumultuosa foi de 0,0218 g por minuto e pode ser vista na Fig. 5.5. É importante indicar que a

taxa de crescimento mostra a eficiência do crescimento microbiano em relação às condições do meio de cultura como concentração de substratos, condições de pH entre outras.

Figura 5.5: Taxa crescimento de biomassa.

Também foi estimado o rendimento médio do crescimento microbiano em relação à depleção de nutrientes do meio de cultura (Fig. 5.6), sendo este de aproximadamente $0,12 \text{ g.g}^{-1}$ e representando uma eficiência de aproximadamente 68,28%, calculada a partir da relação da biomassa formada e a massa dos nutrientes.

Figura 5.6: Perfil da eficiência do crescimento microbiano.

Em relação ao perfil de pH obtido nos experimentos, observou-se variações do pH de 5,3 (valor no caldo de cana em estado natural) até 3,59 depois de aproximadamente 5 horas de fermentação. As variações de pH medidas encontram-se de acordo com variações estimadas no estudo de Carvalho *et al.* (2008), no qual é reportada uma variação de pH entre 5,2 a 3,6. Assim, as curvas da variação do pH em diversos experimentos são apresentadas na Fig. 5.7 mostrando comportamentos coerentes em vários ensaios. A caracterização das fases de fermentação alcoólica mediante estimativas do perfil de pH, mostra que este parâmetro bioquímico pode ser utilizado como um bom indicador da atividade fermentativa. No entanto, o método convencional para o cálculo deste parâmetro, implica um procedimento invasivo, o qual sugere um alto risco de contaminação no mosto de fermentação para procedimentos em escala industrial.

Figura 5.7: Perfil do pH em varios processos de fermentação alcoólica.

O perfil da concentração de sólidos solúveis dado através da curva de graus Brix apresentou conforme o consumo de substratos pelas cepas de levedura, uma depleção como vista na Fig. 5.1. A curva foi estimada a partir da relação da densidade do caldo (em distintos instantes da fermentação) e a tabela de *stammer* para a conversão em graus Brix.

Finalmente, a Figura 5.8 apresenta curvas de valores de densidade durante diferentes processos de fermentação. A mistura líquida de fermentação apresentou assim, uma queda média em densidade de aproximadamente 13.20% em relação ao valor máximo.

Figura 5.8: Perfil de densidade no processo de fermentação alcoólica.

5.2 Validação no meio de referência

Inicialmente, os algoritmos implementados foram validados para um meio de referência (água) em estado de repouso e agitação com agregação de partículas de fermento.

Figura 5.9: Monitoramento de partículas de fermento quando transitam pelo campo de ultra-som na água em repouso.

Desse modo, para o monitoramento na água em repouso (Figura 5.9) a partir de um campo de ultra-som de $100 \mu J$, coletaram-se sinais de ultra-som semelhantes ao sinal apresentado na Fig. 5.10.

Figura 5.10: Exemplo do tipo de sinal de ultra-som coletado durante a interação de partículas do fermento com o campo de ultra-som na água em repouso.

A partir dos sinais de ultra-som coletados durante a propagação na água foram aplicados procedimentos para a detecção de partículas de levedura com base no uso do: teste estatístico de *run* e a aplicação de *curve fitting* sobre a largura de banda de espectros de potência.

Exemplos dos resultados obtidos nos procedimentos mencionados são apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12.

Figura 5.11: Detecção mediante o teste de Run do sinal estacionário que corresponde com o sinal refletido por partículas de levedura na água. (A) Espectrograma do sinal na RoI. (B) Identificação do sinal estacionário. (C) Extração de segmentos estacionários.

Na Figura 5.11.(B) observa-se que o sinal em marcação vermelha representa o sinal de-

tectado pelo algoritmo baseado no teste de Run, sendo que o sinal refletido de alta amplitude é devido a um grupo de partículas de levedura presentes no meio. O sinal detectado corresponde com um alto espalhamento de energia espectral, assim como visto no espectrograma (Fig. 5.11.(A)) com uma frequência de ressonância na faixa de 5 MHz. A Figura 5.11.(C) representa com valores em zero, a fase aquosa do meio (fase contínua) mostrando que a maior percentagem do sinal apresenta características não estacionárias com exceção do intervalo de amostras (920 a 1212) do sinal de ultra-som que pode ser considerado como ruído estacionário.

Figura 5.12: Detecção mediante *Curve Fitting* do sinal refletido por partículas de levedura na água.

Na Figura 5.12, o sinal de ultra-som de alta amplitude e curta duração (sinal em marcação azul) é refletido por um grupo de partículas de fermento. Esse sinal apresenta valores de coeficientes angulares maiores que outros segmentos do sinal de ultra-som que correspondem à propagação na água sem presença de partículas. Tal resultado sugere que valores altos de coeficientes angulares são devidos à variação das larguras de banda dos espectros.

Por outro lado, objetivando demonstrar que existem diferenças paramétricas entre o meio de referência com e sem partículas, foram executados os procedimentos de caracterização com base nas estimativas de atributos espectrais, os quais forneceram uma diferença média entre parâmetros de aproximadamente 47,46% (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Diferença percentual entre parâmetros de uma amostra de água em repouso com e sem partículas. A Tabela 1 - Apêndice A apresenta os valores reais de parâmetros estimados para os meios.

Parâmetros					
	Frequência Central	<i>Slope</i>	<i>IBC</i>	Amplitude	Largura de Banda
Percentagem	30,11 %	17,45 %	62,36 %	96,30 %	31,09 %

Considerando as diferenças paramétricas apresentadas na Tabela 5.1, o procedimento de classificação (baseado em *K-means*) permitiu diferenciar a componente dispersa (partículas suspensas na água) dentro da fase contínua (água). O resultado do processo de classificação para segmentos do sinal de ultra-som associados às reflexões de partículas na água são ilustrados na Fig. 5.13.

Figura 5.13: Exemplo da identificação do sinal de ultra-som refletido por partículas de fermento durante a propagação na água em repouso.

Contudo, visando a análise dos efeitos induzidos pela agitação do meio de referência em relação ao meio em repouso, foram analisadas as diferenças paramétricas sobre os sinais de ultra-som coletados. Desse modo, a diferença média entre os parâmetros tais como: frequência central, *slope*, largura de banda (*Bw*) e valores de energia da frequência fundamental para a água em repouso e com agitação foi de aproximadamente 4,40% (Tab. 5.2).

Tabela 5.2: Diferenças paramétricas dos sinais de ultra-som entre a água em repouso e com agitação. A Tabela 2 - Apêndice A apresenta os valores reais de parâmetros estimados.

Parâmetros				
	Frequência Central	<i>Slope</i>	Energia	Bw
Porcentagem	0,80 %	5,88 %	1,76 %	9,16%

Neste contexto, a variação média dos parâmetros entre a água em repouso e agitação com a agregação de partículas foi de aproximadamente 17,67% (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Diferença percentual média entre os parâmetros estimados para a água com partículas em repouso e com agitação. A Tabela 3 - Apêndice A apresenta valores reais de parâmetros estimados para a água em agitação .

Parâmetros					
	Frequência Central	<i>Slope</i>	<i>IBC</i>	Amplitude	Largura de Banda
Porcentagem	1,00%	1,54%	19,83 %	51,35 %	18,14 %

Considerando as variações que existem entre os parâmetros determinados sobre os sinais de ultra-som para o meio de propagação em estado de repouso e agitação, a Fig. 5.14 ilustra a percentagem de variação média dos parâmetros, mostrando que mediante estas diferenças, os procedimentos computacionais de detecção e caracterização espectral propostos permitem identificar as componentes da fase dispersa dentro do sistema líquido - sólido (água-partículas) independente do seu estado (repouso ou agitação) a partir da identificação de sinais transientes de alta amplitude gerados por partículas do fermento, quando estas transitam pelo campo ultrassônico de inspeção.

Figura 5.14: Diferenças entre parâmetros normalizados na água em repouso, em agitação e com partículas.

Exemplos dos resultados obtidos pelo sistema de classificação (baseado no algoritmo *K-means*) durante a tarefa de identificação dos sinais de ultra-som associados ao trânsito de partículas e à fase contínua na água em repouso e agitação são apresentados nas Fig. 5.15 e 5.16

Figura 5.15: Exemplo de detecção de partículas de levedura no meio de referência.

Figura 5.16: Exemplo de classificação de partículas no sistema de referência em repouso. (A) Variação da frequência central em diferentes segmentos da RoI. (B) Espectrograma. (C) Classificação esperada. (D) Classificação com *K-means*.

Na Figura 5.16 apresenta-se um exemplo onde é conferida a correta identificação de sinais de ultra-som refletidos por partículas de fermento na água sob agitação. A identificação correta pelo classificador no sistema de referência é possível devido à diferença de compressibilidade entre a fase dispersa e contínua a qual, é vista através das mudanças nas componentes em frequência dos sinais de ultra-som, e também pelo fato da atenuação na água ser considerada quase nula. Assim, a identificação de altos espalhamento de energia espectral são só relacionados às partículas. A classificação esperada corresponde à prévia identificação dos segmentos do

signal de ultra-som na RoI, que estão relacionados com a presença de biomassa ou fase líquida. Tal caracterização foi realizada mediante uma análise dispendiosa de espectrogramas, inspeção visual de formas de ondas no domínio do tempo e a análise quantitativa de parâmetros extraídos para o meio de referência (Apêndice A).

Outros exemplos dos resultados de classificação para o sistema de referência (água + partículas de levedura) em repouso e sob agitação são ilustrados nas Fig. 5.17 e 5.18.

Figura 5.17: Detecção da fase dispersa e contínua para a água em repouso usando *K-means*. (A) Água sem partículas de levedura. (B) Água com partículas de levedura.

Figura 5.18: Identificação das reflexões dadas por partículas de levedura suspensas na água sob agitação. (A) Exemplo 1 (B) Exemplo 2. (C) Exemplo 3.

Os resultados apresentados nas Figuras 5.17 e 5.18 foram obtidos usando como atributos de entrada os parâmetros fornecidos pelos procedimentos de detecção (Teste de *Run - Curve Fitting*) e caracterização espectral.

Conforme o exposto, a correta identificação de partículas do fermento na água em repouso e agitação estimadas mediante análises de estacionariedade do sinal, *curve fitting* e caracterização espectral foram corroboradas medindo as diferenças paramétricas encontradas entre os sinais associados à presença de grupos de partículas e aqueles selecionados como fase contínua do meio de referência.

A detecção de partículas pelo sistema implementado é alcançada a partir das diferenças de impedância acústica entre as partículas (fase dispersa) e o meio de suspensão das mesmas (fase contínua), as quais geram sinais de retroespalhamento de ultra-som com características diferentes às da fase contínua. A diferença paramétrica entre os componentes do meio de interesse é evidenciada por uma percentagem de diferença média de 30,60% aproximadamente, para atributos espectrais como: frequência fundamental e largura de banda (assim como visto na Tabela 4 - Apêndice A). Os critérios de operação do sistema de detecção são semelhantes ao modo de operação de sistemas de detecção ultra-sônica de partículas no cenário clínico (PALANCHON, 2004), no qual a detecção é realizada mediante o aproveitamento de características dos sinais como efeitos transitórios de amplitude de curta duração (vistos na dualidade tempo-frequência como incrementos de energia espectral de curta duração), larguras de banda mais estreitas com componentes em frequência de maior energia em relação a espectros com características ruidosas oriundas da fase contínua.

5.3 Resultados no meio de cultura

Visando a obtenção dos parâmetros de referência do líquido a ser fermentado e objetivando a análise dos efeitos de distorção induzidos nos sinais devido à agitação do líquido e ao trânsito de partículas pelo campo ultra-sônico de inspeção, foram inicialmente analisados os sinais de ultra-som coletados no caldo de cana de açúcar em estado de repouso, agitação e com adição de partículas do fermento. Assim, na Figura 5.19 apresentam-se exemplos do resultado final de classificação para tipos de sinais coletados no caldo de cana de açúcar antes da fermentação.

A classificação da fase dispersa e contínua apresentada nas Figuras 5.16, 5.17, 5.18 é possível devido à percentagem média de variação entre os parâmetros dos sinais de ultra-som coletados em estado de repouso, agitação e com agregação do fermento, o que pode ser visto nas tabelas 5.4, 5.5 e 5.6, a partir da qual se pode destacar que os efeitos de agitação induzem numa variação dos parâmetros do caldo de aproximadamente 11,70%. No entanto a variação média entre os parâmetros do caldo de cana de açúcar com e sem fermento é de 43,54 % aproximada-

Figura 5.19: Identificação da fase dispersa e contínua para o caldo de cana de açúcar usando *K-means*. (A) Sem fermento. (B) Agregação de fermento com líquido em repouso. (C) Agregação de fermento com líquido em agitação.

mente. Esta diferença entre os parâmetros estimada para o caldo de cana de açúcar em repouso e agitação, com e sem fermento, permite discernir com o uso do classificador, os sinais refletidos por partículas dentro do sistema de fermentação.

Tabela 5.4: Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em repouso e com agitação. O parâmetro Sist. Det. corresponde à detecção efetuada pelos procedimentos de *Curve fitting* e o Teste de *Run*

Parâmetros					
Frequência Central	<i>Slope</i>	Sist. Det	<i>IBC</i>	Energia	Largura de Banda
3,04%	0,89%	14,86%	22,83%	18,39%	10,17%

Tabela 5.5: Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em estado de repouso com e sem partículas de fermento.

Parâmetros					
Frequência Central	<i>Slope</i>	Sist. Det	<i>IBC</i>	Energia	Largura de Banda
11,69%	9,37%	34,94%	53,50%	82,11%	36,69%

Valores absolutos dos parâmetros obtidos experimentalmente para os sinais de ultra-som coletados no caldo de cana açúcar em distintos estados são apresentados no Apêndice A.

Tabela 5.6: Percentagem de variação média entre parâmetros para o caldo de cana de açúcar em repouso sem fermento e em agitação com fermento.

Parâmetros					
Frequência Central	<i>Slope</i>	Sist. Det	<i>IBC</i>	Energia	Largura de Banda
45,54%	8,88%	33,6%	53,31%	85,18%	34,69%

5.4 Resultados do Sistema de Detecção na Fermentação.

Exemplos dos resultados obtidos mediante a aplicação do teste de Run são ilustrados nas Figuras 5.20, 5.21, 5.22.

Figura 5.20: Detecção de sinais estacionários, associados a partículas de levedura no mosto de fermentação durante a fase de adaptação celular. (A) Espectrograma na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários (marcação vermelho). (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.

A Figura 5.20 apresenta a identificação automática obtida pelo algoritmo de detecção baseado na análise de estacionariedade. A maior percentagem dos segmentos do sinal de ultra-som identificados pelo algoritmo, correspondem com altos incrementos de energia espectral (Fig. 5.20.(A)) com valores altos de frequência central dentro da largura de banda do transdutor. Portanto, esse tipo de reflexões pode ser atribuída ao trânsito de partículas sólidas não solúveis no campo acústico.

A Figura 5.20. (C) evidência um erro relacionado à não identificação de um sinal (atribuído a partículas) com um incremento de energia espectral de curta duração (ocorre no instante de

tempo de aproximadamente $39 \mu s$ na Figura 5.20. (B)). A não identificação pode estar relacionada com os valores críticos selecionados na distribuição de Run, o que limita a designação da condição estacionária sobre segmentos do sinal de ultra-som que não se encontrem dentro do intervalo de confiança e que por sua vez dependem do tamanho da janela selecionada no teste de Run para a análise da variância.

Adicionalmente, na Figura 5.20.(C), é vista a identificação de um sinal estacionário (sinal em marcação verde), que não está associado com características espectrais usualmente induzidas pela presença de partículas, sendo que esse sinal pode ser atribuído como ruído estacionário para posteriormente ser considerado como um falso positivo mediante a análise de *curve fitting* e estimativas das características espectrais.

A Figura 5.21, apresenta um exemplo do comportamento do sistema de detecção mediante o teste de Run na fase tumultuosa do meio de fermentação. O espectrograma é utilizado como ferramenta de inspeção visual para determinar a presença de possíveis grupos de partículas, permitindo a comparação com os sinais com características estacionárias detectados durante a operação do algoritmo.

Figura 5.21: Detecção de sinais estacionários, associados a partículas de levedura no mosto de fermentação durante a fase de tumultuosa. (A) Espectrograma na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários. (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.

A Fig.5.22 mostra um exemplo da detecção na fase de pós-fermentação. Observa-se que existem sinais identificados como estacionários que não estão relacionados com incrementos de

energía espectral de curta duração, a qual é uma das características da interação entre o trânsito de partículas e ondas de ultra-som. No entanto, a análise das características espectrais no sistema de detecção possibilita posteriormente a discriminação dos sinais considerados como ruído estacionário.

Figura 5.22: Exemplo de detecção de sinais estacionários durante a fase de pós-fermentação. (A) Espectrograma do sinal de retroespalhamento na RoI. (B) Identificação dos segmentos estacionários atribuídos a partículas sólidas. (C) Extração de segmentos para caracterização espectral.

Exemplos do tipo de detecção de partículas de fermento no líquido de fermentação sob agitação baseados na estimativa de *Curve fitting* sobre os sinais de retroespalhamento de ultra-som no sistema de fermentação são vistos nas Figuras 5.23 e 5.24.

Nas Figuras 5.23 e 5.24 a estimativa de coeficientes angulares sobre o sinal de retroespalhamento de ultra-som permite uma aproximação para predeterminar reflexões que correspondem à interação da onda com partículas suspensas na mistura líquida nas diferentes fases de fermentação. Adicionalmente, observa-se na Fig. 5.24, que trechos do sinal de ultra-som com coeficientes angulares superiores a 0.5, correspondem com altos espalhamentos de energia espectral que podem ser relacionados à presença de partículas uma vez que estas exibem também características espectrais semelhantes às estimadas no meio de referência.

Figura 5.23: Detecção de sinais associados a partículas sólidas de fermento mediante a estimativa de coeficientes angulares na fase adaptativa. (A) Exemplo 1. (B) Exemplo 2.

Figura 5.24: Detecção de incrementos de energia espectral no sistema de fermentação. (A) Detecção em fase tumultuosa (sistema com muita agitação). (B) Detecção na pós-fermentação.

5.5 Variação de parâmetros da fermentação alcoólica

Nas Figuras 5.25, 5.26, 5.27 e 5.29 são apresentados exemplos de sinais de retroespalhamento de ultra-som e seus respectivos espectros de potência, sobre os quais foram calculados parâmetros espectrais durante as principais fases de fermentação (Adaptativa, Tumultuosa e de Pós-fermentação).

Figura 5.25: Estimativa espectral na fase adaptativa. (A) Sinal de retroespalhamento de ultra-som no meio de cultura. (B) Espectro de Potência médio em região com alta concentração de partículas.

Figura 5.26: Espectros de potência ((I),(II),(III), (IV)) estimados sobre o sinal de retroespalhamento de ultra-som na fase tumultuosa.

Observa-se que na fase de adaptação celular e fermentação principal, representadas pelas Figuras 5.25 e 5.26, as frequências fundamentais de reflexões dadas por grupos de partículas

de levedura são maiores que as dada pela fase assumida como contínua. Entretanto, as larguras de banda espectral entre a fase contínua e dispersa apresentam uma relação mais difusa, uma vez que as características ruidosas da fase contínua podem apresentar espectros de potência com larguras de banda semelhantes às da fase dispersa. Ainda assim, as características médias estimadas nas larguras de banda espectral para a fase contínua durante as primeiras fases da fermentação são aproximadamente 8.52 % maiores em relação à fase dispersa.

Na fase de pós-fermentação variações nas propriedades reológicas do fluido induzem o assentamento de leveduras. No entanto, a emissão de bolhas gasosas é notória e influencia os processo de espalhamento das ondas no meio de fermentação.

As Figuras 5.27 e 5.28, correspondem a exemplos do sinal de retroespalhamento de ultrassom coletado na fase de pós-fermentação para a mistura líquida em repouso. Observa-se que os sinais transientes de alta amplitude estão relacionados a efeitos de bolhas gasosas e esses apresentam frequências fundamentais semelhantes às estimadas na fase contínua. No entanto, as larguras de banda espectral dadas pelos efeitos de bolhas gasosas são em média aproximadamente 11,53% maiores quando comparadas com a fase contínua.

Figura 5.27: Espectros de potência estimados na mistura líquida fermentada em repouso.

Figura 5.28: Espectros de potência estimados no meio de cultura em repouso na fase de pós-fermentação.

A Figura 5.29 apresenta um exemplo das características dos sinais de ultra-som após sua propagação no meio de cultura sob agitação durante a fase de pós-fermentação.

Figura 5.29: Espectros de potência ((I) e (II)) estimados sobre sinal de retroespalhamento de ultra-som na fase de pós-fermentação.

Considerando as características dos sinais observados nas Figuras 5.27, 5.28 e 5.29, destaca-se que na etapa de pós-fermentação, as características espectrais de bolhas gasosas são semelhantes à fase contínua, por conseguinte, a identificação dos sinais associados às partículas sólidas de biomassa circulando no fluido foi possibilitada, devido à diferença entre os seguintes parâmetros espectrais de partículas de levedura e de bolhas gasosas no meio: frequência fundamental (a diferença varia entre 18,51% e 23,07%) e lagura de banda (a diferença varia entre 10,34% e 25%).

Uma visualização geral das variações paramétricas na evolução do processo de fermentação alcoólica é ilustrada na Fig. 5.30, na qual, as estimativas de parâmetros ultra-sônicos e atributos espectrais foram realizadas a partir de espectros de potência médios estimados na RoI do meio em fermentação. Assim, é evidenciada como variações físicoquímicas no meio de cultura se manifestam por meio de variações paramétricas (Fig. 1 - Apêndice A) entre os distintos instantes de tempo da fermentação, mostrando que o aproveitamento das diferenças paramétricas pode ser de utilidade na análise de estados fermentativos.

Figura 5.30: Variação paramétrica média estimada na RoI durante a evolução do processo de fermentação. (A) Variação da Frequência Central. (B) Variação do *Slope*. (C) Variação do Coeficiente angular médio estimado no *Curve Fitting*. (D) Variação do IBC. (E) Variação de amplitude da frequência fundamental. (F) Evolução da variância. (G) Variação da Largura de Banda.

Considerando as variações paramétricas na Fig. 5.30, foi estimado a variação percentual

média dos parâmetros entre as fases de fermentação, sendo a diferença entre a fase adaptativa e tumultuosa de 31,90% aproximadamente. Já a variação entre a fase adaptativa e a fase de pós-fermentação foi de 25,06 %. Finalmente a diferença estimada entre a fase tumultuosa e de pós-fermentação foi de 15,56% aproximadamente. Assim, observa-se que as variações de parâmetros durante as fases de fermentação apresentaram em média uma diferença percentual de aproximadamente 24.17%, sendo tal diferença um indicador da viabilidade de discernir as mudanças do estado do meio de cultura durante a evolução da fermentação por meio dos procedimentos computacionais implementados.

5.6 Discussão do Sistema de Caracterização

A metodologia empregada na caracterização do meio de fermentação apresenta uma abordagem baseada na combinação de diversos parâmetros que permitem discernir características da fase dispersa em relação à fase contínua do meio de estudo e desta forma inferir o estado do sistema de fermentação.

Estudos recentes como os de Jan *et al.* (2008), Panetta *et al.* (2006), Lindgren e Hamp (2006), Lamberti *et al.* (2009) e Hoche *et al.* (2011), baseiam-se na caracterização ultra-sônica com o uso de parâmetros clássicos (velocidade e atenuação). Mas o sistema de detecção de partículas proposto no presente trabalho, apresenta uma metodologia, a qual, considera os princípios das técnicas de detecção de partículas (mediante aproximações ultra-sônicas) usadas em aplicações biomédicas e que são estendidas para esta aplicação industrial de fermentação alcoólica. Desse modo, resultados de parâmetros como largura de banda, amplitude da frequência central entre outros utilizados reportados na literatura, podem ser correlacionados com os obtidos na análise experimental. Como exemplo, o recente estudo de Benoudjit *et al.* (2011) apresentou que na diferenciação de partículas sólidas e gasosas, a largura de banda espectral pode ser difusa evidenciando valores bastante próximos, fato que também foi observado neste estudo ao comparar as características espectrais de bolhas gasosas e partículas de levedura na fase de pós-fermentação. Assim, o relacionamento difuso entre certos parâmetros espectrais, justifica a estimativa de outros (parâmetros estatísticos e ultra-sônicos) e o emprego de um sistema de classificação que permita a adequada identificação das componentes do meio de cultura.

Adicionalmente, dado que as técnicas de análise espectral constituem uma ferramenta potencial na caracterização ultra-sônica é importante destacar que contrário às desvantagens comentadas por Chen e Wang (2008), no que se refere às inexatidões e variações das técnicas de análise espectral na estimativa de atributos como frequência central, largura de banda, (devido ao tamanho da janela , *overlap*), no presente trabalho a combinação do cálculo dos parâmetros espectrais estimados usando uma janela *blackman Harris* com tamanho equivalente à largura do pulso do sinal de ultra-som dado pelo equipamento, permitiu uma diferenciação razoável das

componentes do meio de cultura para diversos instantes da fermentação.

5.7 Interpretação dos Atributos Espectrais

Os parâmetros espectrais estimados na fase de caracterização como frequência central, amplitude da fundamental e largura de banda espectral fazem parte do conjunto de atributos que atualmente são utilizados em caracterizações experimentais por ultra-som de processos industriais conforme visto em Hauptmann *et al.* (2002), Panetta *et al.* (2006), Shukla e Rohani (2010). Os resultados das variações de parâmetros espectrais estão associadas aos mecanismos de atenuação, no entanto, os valores dos parâmetros podem ser difusos apresentando em alguns instantes da fermentação, diferenças paramétricas de 0.98% para a frequência central e de 0.99% para o *slope* entre diferentes estados do meio de cultura devido ao fato da atenuação depender de diversas variáveis (tamanho de partícula, viscosidade, densidade etc.), assim como descrito por Hauptmann *et al.* (2002).

A partir de tipos de espectros de potência como os apresentados nos exemplos das Figuras 5.25 e Fig. 5.26, foi estimado que diferenças percentuais médias entre a fase contínua e dispersa do meio de fermentação utilizando parâmetros como o *slope* e a frequência central são de 17.47% e 11.309% respectivamente. A leitura dessas diferenças é possível devido à diferença entre a compressibilidade de partículas de fermento e o meio de suspensão, que induzem a uma variação paramétrica. Este resultado é compatível com o reportado por Zips e Faust (1989), onde apresenta-se que na determinação de biomassa mediante estimativas de atenuação, existem diferenças entre a fase dispersa (maior atenuação) e contínua do meio de fermentação, sendo que tal diferença incrementa com a concentração da fração de biomassa.

Considerando que nas diferentes fases da fermentação foram extraídos parâmetros os quais objetivaram a descrição quantitativa das mudanças do meio, na Fig.5.31 é apresentado o resultado da variação de parâmetros espectrais médios normalizados durante o processo de fermentação, onde os primeiros valores (tempo = 0) representam valores dos parâmetro do caldo de cana de açúcar em estado natural.

Na Figura 5.31 observa-se que durante a fase de adaptação (aproximadamente primeiros 30 min) ocorre uma mudança dos parâmetros e entende-se que tal variação é dada pelas características de espalhamento de energia acústica afetadas pela agregação da levedura no caldo. Complementando o assunto, já durante o início da fase exponencial, marcada pela depleção dos três parâmetros, nota-se uma diminuição da largura de banda e deslocamento da frequência central que está associada ao efeito de atenuação por dispersão. A duração da fase exponencial é marcada até ao instante do tempo no qual ocorre a estabilização de parâmetros como largura de banda e frequência central, evidenciando o início da fase estacionária (na fase de

Figura 5.31: Evolução de parâmetros espectrais no processo de fermentação.

pós-fermentação) onde as características do caldo apresentam uma tendência à homogeneidade (minuto 200).

Durante a fase exponencial, ocorrem os maiores valores de atenuação devido ao incremento da biomassa e efeitos de perturbação do caldo como emissão de bolhas de CO_2 entre outras que induzem a larguras de banda estreitas com a atenuação de altas componentes de frequência. Mudanças das propriedades reológicas do caldo (incremento de viscosidade, valores de acidez etc.) durante a finalização da fase tumultuosa e início da pós-fermentação, são indicadores da desaceleração da atividade fermentativa, a qual se manifesta com a tendência à estabilização das variações paramétricas dos parâmetros frequência central e largura de banda (Fig. 5.31) e que adicionalmente sugerem o estado de homogeneização do meio. Também, cabe destacar que a frequência central e a largura de banda mostraram uma diferença percentual entre o estado inicial e final de fermentação de 2,97% e 34,70% respectivamente, apresentando uma variação média de 12,57% para a largura de banda espectral e de 4,56% para a frequência central durante as distintas fases de fermentação. Entretanto, a estimativa média do parâmetro *slope* (na RoI), obtido a partir de uma regressão linear da diferença espectral logarítmica entre o meio de cultura e um meio de referência, apresentou um comportamento aleatório.

Neste contexto, os parâmetros espectrais foram interpretados visando a obtenção de informações adicionais sobre comportamento da fermentação. Contudo, os parâmetros apresentaram grandes variações, especialmente durante a fase tumultuosa. A leitura de tais parâmetros indicam mudanças no meio de fermentação que não são triviais de interpretar, evidenciando a necessidade da utilização um sistema de classificação que permita obter um melhor entendimento

das mudanças dentro do fluido de fermentação de estudo.

5.8 Resposta do Sistema de Classificação

Na etapa de classificação, considerando os atributos espectrais, os parâmetros ultra-sônicos e os resultados fornecidos pelo sistema de detecção, foram identificados sobre sinais de retroespalhamento de ultra-som, intervalos de sinais associados à movimentação de grupos de partículas de fermento, os quais representam a atividade da biomassa (partículas de levedura) dentro da mistura líquida de fermentação. Exemplos do resultado de identificação da fase dispersa e contínua no meio de fermentação são vistos nas Fig. 5.32, 5.33, 5.34.

Na Figura 5.32 apresenta-se um exemplo do resultado de classificação das fases no meio de cultura durante a adaptação celular (fase inicial de fermentação). A Figura 5.32.C. apresenta a classificação de controle, considerada como a classificação correta da fase contínua e dispersa no sinal de ultra-som. A classificação de controle foi empregada para avaliar o desempenho do sistema híbrido proposto e sua estimativa foi realizada com base na análise dispendiosa do espectrograma (Figura 5.32.B.), análise de parâmetros acústicos e a inspeção visual de formas de ondas no domínio do tempo.

Já a Figura 5.32.D. mostra a classificação obtida com os procedimentos de detecção, caracterização e classificação propostos. Neste contexto, realizando uma comparação dos segmentos coincidentes entre a classificação de controle e a obtida com os procedimentos computacionais propostos, verificou-se uma acurácia de 66,66% aproximadamente. Essa taxa de acerto é considerada no trabalho como um indicador da eficiência do sistema de classificação.

No exemplo visto na Figura 5.33, a eficiência no sistema de classificação da fase dispersa foi de 88% durante a fase de adaptação celular.

Figura 5.32: Classificação da fase contínua e dispersa no meio de cultura. (A) Avaliação Frequência fundamental em intervalos do sinal de ultra-som. (B) Espectrograma do sinal na RoI. (C) Classificação predeterminada da fase dispersa e contínua. (D) Classificação mediante *K-means*.

Na fase tumultuosa para um tempo de fermentação de aproximadamente 190 minutos, é apresentado um exemplo do comportamento do sistema de classificação, ilustrado na Fig. 5.34. Determinou-se a eficiência do sistema de classificação como sendo 85,71%.

No processo final de fermentação, efeitos da interação de bolhas gasosas com ondas de ultra-som foram identificados pelo sistema proposto. O resultado é visto na Fig. 5.35 onde são diferenciadas reflexões de bolhas de gás em relação aos sinais de retroespalhamento da fase contínua da mistura líquida fermentada em estado de repouso, após aproximadamente 300 minutos de fermentação.

Figura 5.33: Classificação da fase contínua e dispersa durante a fase adaptativa. (A) Espectrograma. (B) Classificação "Correta"(predeterminada). (C) Classificação mediante *K-means*.

Na Figura 5.36, observa-se o resultado da classificação do fluido sob agitação na fase de pós-fermentação.

Nota-se que incrementos de energia espectral na faixa de 3,90 a 4,00 MHz não correspondem às características da biomassa, o que sugere-se que tais efeitos podem estar associados à emissão de bolhas de gás dispersas na fase contínua sem presença de partículas sólidas. Entretanto, outros incrementos transitórios de energia espectral (Fig. 5.36) nas frequências fundamentais de 4,88 a 5,22 MHz estão associados às partículas de biomassa, sendo esta uma das características espectrais por meio da qual o sistema proposto neste estudo permite uma dife-

Figura 5.34: Classificação de componentes na fase tumultuosa. (A)Espectrograma. (B) Classificação "Correta". (C) Classificação obtida mediante procedimentos computacionais implementados.

renciação entre as fases do meio de fermentação.

O processo de espalhamento do sinal incidente no meio de fermentação é também afetado pela geração de bolhas gasosas além da biomassa, especialmente na fase de pós-fermentação, onde ocorre a sedimentação de partículas de biomassa e onde efeitos de emissão de bolhas de CO_2 são notórios.

Assim como visto nas Figuras 5.35 e 5.36, as diferenças entre partículas sólidas e gaso-

Figura 5.35: Classificação na fase de pós-fermentação com líquido em repouso (assentamento de leveduras no fundo do recipiente). (A) Espectrograma. (B) Identificação bolhas de gás e fase contínua.

Figura 5.36: Classificação na fase de pós-fermentação - meio em agitação. (A) Espectrograma. (B) Identificação de reflexões associadas a partículas sólidas e à fase contínua.

As foram determinadas na fase de pós-fermentação de forma separada realizando a análise dos sinais de ultra-som para o fluido em repouso (onde se destacam só os efeitos de emissão de bolhas gasosas devido ao assentamento da levedura no fundo do recipiente) e para o meio em agitação. Embora em média as características espectrais entre bolhas de gás e partículas

de biomassa sejam bem diferenciadas (Fig. 5.27, 5.29), os efeitos de interação do campo de ultra-som com esses agentes físicos atuando juntos durante a fermentação, podem gerar sinais com características bastante difusas devido à proximidade entre seus parâmetros espectrais. Tal fato é evidenciado na Fig. 5.37, na qual, características espectrais de bolhas de gás apresentam valores próximos dos fornecidos por partículas de biomassa, mostrando diferenças estreitas de aproximadamente 1.77% para frequências fundamentais.

Figura 5.37: Espectros de potência na pós-fermentação para a mistura líquida em repouso. (I) - (II) representam espectros na fase contínua. (III) - (IV) mostra densidades de potência espectral de bolhas gasosas.

5.9 Efeitos das bolhas gasosas

Durante a fermentação, bolhas gasosas de CO_2 são produzidas como resultado metabólico do consumo de açúcar (fenômeno oriundo na fase tumultuosa e de pós-fermentação). Assim, durante a monitoração acústica do processo fermentativo, os efeitos relacionados à baixa solubilidade de CO_2 produziram variações paramétricas (Tabelas 10 e 11 do Apêndice A) nos sinais de retroespalhamento de ultra-som, assim como visto na Fig. 5.37.

Características espectrais médias da interação do campo de ultra-som de 4,5 MHz com a emissão de bolhas foram medidas pelos algoritmos de caracterização, mostrando que existe uma variação média da frequência central e da largura de banda espectral de aproximadamente 0,9 MHz e 80 KHz respectivamente, em relação às características espectrais dadas pela interação de partículas de levedura com o campo de ultra-som. Desse modo, utilizando o conjunto de parâmetros espectrais e acústicos foi possível realizar a discriminação de partículas de biomassa em relação a bolhas gasosas dispersas na fase aquosa, o qual apresenta uma vantagem com respeito à impossibilidade na identificação de bolhas de gás mediante parâmetros convencionais como a

velocidade de propagação, especialmente pelo fato deste parâmetro não ser alterado para ondas com frequências maiores que a frequência de ressonância das bolhas (LOK; HITZMANN, 2004).

5.10 Avaliação da classificação

A seguir na Fig. 5.38 é apresentada a eficiência do sistema na identificação da fase dispersa e contínua do meio de cultura durante as distintas fases de fermentação. Observa-se que para a fase de adaptação celular e pós-fermentação, a maior eficiência do sistema é alcançada mediante a utilização de todos os parâmetros como atributos de entrada ao sistema de classificação apresentando uma eficiência média de 82.84%. De outro modo, na fase tumultuosa, o desempenho do sistema usando todos os parâmetros envolvidos na caracterização da fase dispersa e contínua foi de 70%. Isto é razoável considerando que nesta fase, os efeitos de turbulência do fluido são intensos devido à intensa multiplicação de leveduras e liberação de gás, o qual induz erros na distinção das componentes do meio de fermentação.

Por outro lado, a utilização de unicamente parâmetros espectrais como atributos de entrada ao sistema de classificação, mostrou uma eficiência média de aproximadamente 65.35% para as fases tumultuosa e de pós-fermentação. Já para a fase de fermentação inicial, a eficiência foi de 77.77%. Em conformidade com o anterior, observa-se que durante as fases de fermentação principal e pós-fermentação pode existir um relacionamento difuso entre parâmetros espectrais de partículas de biomassa e do líquido de suspensão, conduzindo ao baixo desempenho do sistema assim como visto na Fig.5.38.

Figura 5.38: Eficiência do sistema de classificação de acordo com parâmetros de entrada em diferentes fases da fermentação alcoólica,

Complementando o assunto, usando como atributo de entrada os valores fornecidos pelos procedimentos de *curve fitting* e o teste de *run*, o desempenho médio do sistema nas distintas fases de fermentação foi de 72.41%. Neste contexto, a eficiência média do sistema utilizando

unicamente parâmetros ultra-sônicos foi de 67.23%.

Em síntese, o conjunto de parâmetros utilizados foi favorável ao aumentar o desempenho do sistema na classificação dos segmentos ultra-sônicos que correspondem a partículas sólidas insolúveis.

5.11 Aproximação Ultra-sônica - Evolução de Biomassa

Em conformidade com a quantidade de sinais de ultra-som identificados como reflexões produzidas por partículas de biomassa (na RoI do meio de fermentação) a través dos processos de detecção, caracterização e classificação, neste estudo foi possível estimar a percentagem de sinais associados à fase dispersa e à fase contínua na RoI em diferentes instantes de tempo do processo fermentativo.

A estimativa da percentagem de sinais associados ao trânsito de partículas de levedura foi considerada como um indicador da evolução da biomassa dentro do meio de cultura. Isto é porque conforme ocorrem incrementos ou decrementos da presença de biomassa em diferentes regiões da RoI submetida ao campo acústico, o processo de espalhamento de energia acompanhará as variações apresentando um número determinado de reflexões ao longo do vetor de ultra-som coletado na RoI.

Diante do exposto, a Figura 5.39 ilustra a aproximação ultra-sônica estimada como indicador do crescimento da biomassa a partir da detecção dos sinais de retro espalhamento de ultra-som relacionados a partículas sólidas da fase dispersa. A aproximação ultra-sônica como indicador, foi comparada com a evolução temporal da biomassa sólida seca, extraída em diferentes instantes do processo fermentativo.

Observa-se na Figura 5.39 que para experimentos diferentes de fermentação alcoólica, a aproximação ultra-sônica implementada neste estudo, apresentou um erro quadratico médio de 17.67% (Fig. 5.39.A), 8.53% (Fig. 5.39.B) e 14.66% (Fig. 5.39.C). Adicionalmente, a aproximação ultra-sônica descrita na Figura (5.39), acompanha as tendências (incrementos e decrementos) da curva experimental que descreve a cinética do crescimento da biomassa (a qual está relacionada com a atividade fermentativa). A aproximação ultra-sônica calculada com base nas estimativas paramétricas sobre sinais de retroespalhamento de ultra-som, associados à fase dispersa, sugerem a viabilidade do sistema implementado para descrever a evolução da biomassa e identificar as fases do processo de fermentação alcoólica. Este resultado é alcançado devido ao fato que os procedimentos computacionais visam à detecção física de grupos de partículas dentro da região de interesse do líquido, com base na discriminação paramétrica entre a fase dispersa e contínua do meio.

Figura 5.39: Aproximação ultra-sônica da evolução de biomassa em diferentes experimentos de fermentação: (A),(B) e (C).

Assim, na Figura 5.39 foi determinado que entre a fase de adaptação celular e a fase tumultuosa, a taxa média de crescimento microbiano nos experimentos de fermentação foi de aproximadamente 0.0010 g/min (por cada 20 ml), representando um crescimento percentual médio de 0.0124% em relação ao valor máximo da biomassa formada. Em comparação com a medida da evolução de biomassa descrita mediante a aproximação ultra-sônica, foi estimado que a taxa média de crescimento microbiano foi de 0.035% em relação ao valor máximo.

Neste contexto, assim como visto na Figura (5.39), os procedimentos computacionais implementados mostraram a capacidade do sistema proposto para detectar sinais refletidos por uma fração de biomassa suspensa no meio de fermentação e fornecer a viabilidade de monitorar a cinética de propagação do fermento, a qual, basicamente consiste na análise da evolução no tempo da concentração da biomassa (fermento) dentro do sistema de fermentação.

Finalmente, a análise de partículas no sistema de fermentação é importante, já que a viabilidade das células de levedura e as velocidades de aumento do volume de massa celular são fatores determinantes na eficiência da produção de etanol. Portanto, o decremento no rendimento de bi-

omassa pode ser visto como indicador de uma inadequada condução da fermentação a qual por sua vez, pode ser associada à falta de nutrientes e processos de contaminação bacteriana entre outros. Um exemplo, é a queda do rendimento por contaminação bacteriana (floculação), o qual consiste no assentamento das leveduras dentro do recipiente de fermentação e que consequentemente diminui o rendimento de produção de etanol (LUDWIG *et al.*, 2001). Assim, mediante os procedimentos computacionais desenvolvidos, este tipo de problemas poderia ser evidenciado, a partir da análise da diminuição do espalhamento de energia na fase de fermentação principal, a variação de parâmetros ultra-sônicos e consequente diminuição de detecções de partículas.

5.12 Comparação do sistema em relação ao sistema de caracterização clássico

Neste estudo, a caracterização das fases de fermentação foi realizada a partir da estimativa de vários parâmetros. Os resultados obtidos mostraram que em comparação com o estudo apresentado por Lok e Hitzmann (2004), (o qual caracteriza as fases mediante estimativas da velocidade de propagação ultra-sônica), o parâmetro estimado apresenta uma faixa dinâmica menor para a diferenciação do meio de cultura em distintos instantes da fermentação quando comparado com o parâmetro (indicador da evolução de biomassa) estimado na aproximação ultra-sônica vista na Fig.5.39, a qual descreve maiores variações no meio de fermentação como visto na Fig. 5.40.

Portanto, a Fig. 5.40, mostra que existe uma pequena variação da velocidade de propagação ultra-sônica a qual, segundo Lok e Hitzmann (2004) oscila entre valores de 1505-1525 m/s, sendo tais valores usados para descrever as variações do processo fermentativo. Segundo o reportado por Lok e Hitzmann (2004), durante as primeiras 7 horas do processo de fermentação a velocidade permanece quase constante (não varia significativamente) pelo qual a extração de informações durante fases importantes como a fase de adaptação e tumultuosa se torna complexa. No entanto, no presente estudo observa-se que durante as fases de adaptação e tumultuosa, os procedimentos computacionais mostraram diferenças paramétricas significativas de aproximadamente 23.21% que permitem caracterizar a evolução do meio.

Resultados semelhantes em relação à estreita variação da velocidade durante as fases de adaptação e tumultuosa também tem sido reportados nos estudos apresentados por Resa *et al.* (2004), Resa *et al.* (2009). No entanto, as variações são mais significativas após da etapa de esgotamento dos carboidratos, apresentando variações de aproximadamente 13 m/s (LOK; HITZMANN, 2004). Apesar da estreita variação da velocidade de propagação para caracterizar mudanças bioquímicas do meio de fermentação como o esgotamento de carboidratos, diminuição da densidade entre outros como visto experimentalmente na Fig. 5.1; vários estudos (RESA *et al.*, 2004), (RESA *et al.*, 2009), (LOK; HITZMANN, 2004) tem optado pelo uso deste parâmetro devido a sua praticidade e atribuída confiabilidade.

Figura 5.40: Comparação da faixa dinâmica do parâmetro velocidade (reportado em Lok e Hitzmann (2004)-(A)) e o parâmetro indicador da evolução da biomassa estimado neste estudo para avaliar a evolução do processo de fermentação (B).

Sendo a velocidade um parâmetro amplamente utilizado em estudos recentes (JAN *et al.*, 2008), (RESA *et al.*, 2009), (LAMBERTI *et al.*, 2009) para monitorar os processos de fermentação, é então realizada uma análise comparativa das aproximações usadas para estimar o crescimento de biomassa inferido mediante estimativas de velocidade e os procedimentos computacionais implementados neste estudo. Assim, no estudo apresentado por (RESA *et al.*, 2009), a velocidade de propagação apresenta uma relação linear de acordo ao crescimento de biomassa mostrando incrementos de velocidade pequenos na ordem de 0.025 m/s, que estão associados a uma variação de aproximadamente 0.99% do valor máximo. Em comparação com os resultados obtidos mediante a aproximação ultra-sônica (vista na Fig. 5.39) usada neste estudo para descrever a evolução da fração de biomassa, observa-se que, o incremento do parâmetro em relação ao crescimento de biomassa pode ser ajustado de forma linear (com exceção do experimento 1). O coeficiente angular médio que descreve a aproximação da variação desse parâmetro em re-

lação ao crescimento percentual de biomassa foi de 0.93% aproximadamente. O anteriormente comentado é exibido na Fig. 5.41, na qual se apresenta a relação entre a evolução do crescimento de biomassa referente ao parâmetro velocidade reportado na literatura (RESA *et al.*, 2009) (usado convencionalmente em estudos de caracterização do processo de fermentação alcoólica) e à evolução do parâmetro de detecção de biomassa (calculado neste estudo mediante a aproximação ultra-sônica de detecção de reflexões associadas à fase dispersa).

Figura 5.41: Relação entre biomassa e parâmetros. A curva do parâmetro velocidade foi adaptada da literatura (RESA *et al.*, 2009)

Finalmente, assim como reportado por Zips e Faust (1989), a biomassa é um importante parâmetro que está associado com a eficiência de processos fermentativos e portanto a detecção física da biomassa (principal agente precursor da fermentação) permite uma caracterização mais direta da atividade fermentativa, vista a partir da mudanças da heterogeneidade do meio de cultura (Fig. 5.39), onde se representa de forma razoável mediante uma aproximação ultra-sônica a evolução da biomassa do meio de fermentação. Assim, a monitoração do processo de fermentação mediante o método não invasivo apresentado neste estudo poderia ser aperfeiçoado e extrapolado a uma implementação industrial, o que representaria vantagens na relação custo - benefício quando comparado com os métodos implementados em Wang *et al.* (2006), (COLEMAN *et al.*, 1984) e (CALDERON-SANTOYO, 2010), nos quais foram implementados sistemas de monitoramento invasivos baseados em sistemas eletrônicos complexos com o uso de vários sensores de alto custo entre outros.

Capítulo 6

Conclusões

Neste trabalho foi projetado e implementado um sistema para monitorar e caracterizar de forma não invasiva o processo de fermentação alcoólica do caldo de cana de açúcar, a partir da utilização de cepas de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os procedimentos envolvidos neste trabalho compreendem três etapas importantes, são elas: a calibração do sistema de monitoração por ultra-som num meio de referência, a condução e monitoração por ultra-som dos experimentos de fermentação e a implementação dos procedimentos computacionais para a análise e caracterização do meio de cultura.

A etapa de calibragem foi executada objetivando o acoplamento externo do sistema de ultra-som (transdutor) ao recipiente contendo o meio de interesse, de forma a permitir o monitoramento não invasivo, útil na diminuição da contaminação do sistema de fermentação. Adicionalmente, a etapa de calibragem também possibilitou a análise da interação ondas-partículas (levedura), durante a suspensão das mesmas na água, sendo esta utilizada como meio de referência devido ao conhecimento prévio de suas propriedades acústicas, também já reportadas na literatura, como por exemplo os valores baixos de atenuação acústica. Na calibragem também foi medido o efeito de agitação mecânica induzido no fluido para impedir o assentamento da biomassa. Conforme exposto, a variação paramétrica calculada sobre os sinais de ultra-som que representaram o meio sob agitação, foi de aproximadamente 4,40% para o meio de referência e de 11,70% para o caldo de cana de açúcar, evidenciando uma variação relativamente baixa quando comparada com a variação paramétrica estimada no meio de fermentação sob agitação, que foi de 43,54% aproximadamente.

Na etapa referente à condução e monitoração por ultra-som do processo de fermentação alcoólica, inicialmente foram estimados em distintos experimentos de fermentação, parâmetros químicos como pH, densidade, concentração de sólidos solúveis e de biomassa. Os cálculos desses parâmetros químicos foram úteis ao descrever o comportamento da atividade fermentativa, fornecendo valores de referência do processo, sendo esses valores coerentes com a literatura, assim como descrito na Seção 5.1. Simultaneamente à condução dos experimentos, o processo de fermentação foi monitorado por um campo acústico a partir do qual, foram coletados sinais

de retroespalhamento de ultra-som que permitiram a análise da evolução da mistura líquida de fermentação.

O controle de temperatura aplicado no mosto de fermentação entre 28 °C a 30 °C graus mostrou que variações de temperatura de aproximadamente 1°C produzem mudanças paramétricas médias de aproximadamente 0,85%, 1,96% e 3,44 % para parâmetros como a frequência central, o coeficiente angular e IBC respectivamente (Tab. 12 - Apêndice A). Desse modo foi considerado que variações de temperatura na faixa de controle foi desprezível.

Por fim, foi projetada a etapa relacionada à implementação de procedimentos computacionais voltados à caracterização do meio de fermentação, visando o desenvolvimento de uma nova estratégia de monitoração, composta por um híbrido de técnicas de processamento de sinais de ultra-som, baseadas principalmente por técnicas de análise espectral, que possibilitaram uma abordagem alternativa para a caracterização do processo de fermentação, em comparação com a caracterização acústica realizada mediante parâmetros convencionais (velocidade e atenuação). Neste contexto, a proposta de pesquisa foi focalizada na avaliação do meio de fermentação, visto como um sistema bifásico (líquido-sólido) composto por uma fase aquosa (chamada de fase contínua) e uma fase dispersa (partículas de biomassa). Assim, a estratégia de monitoração do meio de cultura, objetivou a identificação de sinais ultra-sônicos atribuídos ao trânsito de partículas de biomassa que por sua vez permitiram a análise da cinética de propagação da levedura como índice da atividade fermentativa.

O sistema de caracterização implementado é composto por três etapas: detecção, caracterização e classificação. Os algoritmos propostos na detecção e caracterização forneceram uma caracterização paramétrica do meio de cultura nas principais fases de fermentação, sendo que as variações médias entre as transições da fase de adaptação celular à fase de fermentação tumultuosa e a transição entre a fase tumultuosa à fase de pós-fermentação, apresentaram variações médias de 31,90% e 15,56 % respectivamente.

Diferenças médias de parâmetros como a frequência central e o *slope* entre a fase dispersa e contínua, exibiram variações de 11,3% e 17,4% que contribuíram para as análises de discriminação dos sinais ultra-sônicos, atribuídos ao trânsito de partículas de biomassa na RoI.

Por outro lado, foi visto que a eficiência obtida pelo sistema de classificação foi maximizada com a utilização de todos os parâmetros estimados nos módulos de detecção e caracterização, mostrando que na fase de fermentação principal e pós-fermentação, o rendimento dos processos de classificação foi de 82.84%, enquanto o rendimento na fase de fermentação principal foi do 70%. A queda de rendimento deve-se a efeitos do fluido tais como turbulência, liberação intensa de gás e incremento da atenuação, associado ao aumento progressivo da concentração

de partículas que consequentemente, levam a diferenças difusas (0.98% - 1.77%) de parâmetros espectrais e ultra-sônicos entre a fase aquosa e a biomassa dispersa no meio, ao longo do processo fermentativo.

Por fim, a partir da detecção da fase dispersa no sistema de fermentação mediante as técnicas de processamento de sinais propostas, foi estimada uma aproximação ultra-sônica que permitiu a geração de um índice quantitativo (percentagem de detecção de partículas) para monitorar a cinética de propagação numa fração de biomassa, que por sua vez descreve o aumento da velocidade de massa celular como indicador da eficiência da produção de etanol. A aproximação ultra-sônica apresentou um erro quadrático médio de 13.62% nos experimentos realizados quando comparado com o perfil de crescimento microbiano, calculado experimentalmente mediante medidas de concentração da biomassa seca.

Conforme o exposto anteriormente, pode-se formular as principais conclusões deste trabalho de pesquisa como segue:

- A monitoração ultra-sônica da fermentação objetiva a extração não destrutiva de informações que estão relacionadas com as mudanças bioquímicas do processo, visando a obtenção sistemática do estado fermentativo e minimizando processos dispendiosos na monitoração convencional, como por exemplo a extração de amostras do meio de cultura para a análise de refratometria ótica e outras propriedades do meio. Assim, o presente estudo mostrou a viabilidade na monitoração não invasiva do fluido em fermentação, mediante exposição a um campo acústico, que permitiu a identificação das principais fases de fermentação por meio das diferenças nos processos de espalhamento.
- A análise ultra-sônica da cinética da biomassa no sistema de fermentação pode ser realizada com base em técnicas de processamento de sinais que permitam uma exploração dos sinais refletidos por densidades de partículas sólidas não solúveis no fluido, utilizando a aplicação de um híbrido de procedimentos computacionais que possibilitam uma aproximação da quantificação de biomassa (concentração) no meio de cultura, fornecendo assim um indicador da evolução do processo de fermentação. Portanto, o presente estudo evidencia que o volume de crescimento microbiano está associado com o incremento gradual da percentagem de sinais refletidos pela biomassa dispersa na RoI monitorada, mostrando a viabilidade da construção de um perfil que caracteriza a atividade fermentativa do caldo de cana de açúcar.
- Finalmente, a análise quantitativa (extração paramétrica) para os sinais de retroespalhamento, vistos como representações do comportamento do sistema em fermentação, mostraram que um amplo aproveitamento das diferenças paramétricas espectrais, estatísticas

e ultra-sônicas, podem ser relacionadas e combinadas para caracterizar de forma eficiente o processo de fermentação alcoólica, além de sugerir a exploração de outros fenômenos físicos envolvidos na manipulação de fluídos em aplicações industriais.

Destaca-se como uma das principais contribuições da metodologia proposta, a construção de um indicador da evolução do processo de fermentação alcoólica, possibilitada por uma abordagem multiparamétrica diferente de outros estudos reportados na literatura que utilizam os parâmetros velocidade e atenuação, os quais apresentam comportamentos insuficientes para descrever a evolução do meio principalmente nas primeiras fases da fermentação alcoólica (LOK; HITZMANN, 2004), (RESA *et al.*, 2004), (RESA *et al.*, 2009).

Apesar do trabalho ter sido desenvolvido para uma aplicação específica, a metodologia pode ser utilizada para outras aplicações, principalmente as que requeiram uma monitoração não invasiva.

6.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

Algumas sugestões são propostas visando trabalhos futuros que pretendam a monitoração acústica da fermentação alcoólica.

- Inicialmente, em relação à instrumentação, sugere-se que seja considerada a utilização de transdutores com larguras de banda mais amplas de forma tal a permitir uma melhor análise do conteúdo espectral do meio caracterizado, como por exemplo as análises de amplitude do segundo harmônico, as quais podem estar relacionadas com os efeitos de propagação não linear, podendo ser úteis na caracterização complementar do meio em estudo. Adicionalmente, sugere-se a realização de testes de caracterização acústica no mosto, utilizando transdutores de ultra-som em outras frequências de ressonância, com o fim de obter um melhor entendimento das mudanças paramétricas nos sinais retroespalhados segundo as variações do meio de cultura na evolução do processo de fermentativo.
- Em relação às características técnicas do sistema de ultra-som, sugere-se a utilização de um sistema de maior potência para compensar a perda de energia dada durante o acoplamento da impedância acústica entre o transdutor e a parede do recipiente de fermentação. Isto favorecerá a caracterização do mosto em grandes recipientes de metal utilizados convencionalmente na indústria, onde uma alta perda de energia seria dada pelo acoplamento acústico com as paredes da dorna de metal e a distância de propagação relacionada com a dimensão do recipiente. Também, cabe sugerir a utilização de um sistema de aquisição de dados que permita uma maior coleta de sinais por minuto e que por sua vez possibilite a adaptabilidade do sistema para o monitoramento "on-line".
- A implementação computacional do sistema de caracterização utilizando outros atributos de entrada, como por exemplo a distribuição do tamanho de partículas e o parâmetro

de não linearidade entre outros, poderia diferenciar características no meio que talvez não são visíveis mediante os parâmetros explorados neste estudo. Assim, considerando o cálculo de novos atributos, também é razoável apontar a adaptação de classificadores não lineares, como por exemplo a utilização de sistemas *fuzzy*, os quais poderiam ser úteis na melhora dos processos de inferência ao avaliar os sinais produzidos por concentrações de partículas no fluido de interesse.

6.2 Artigos Publicados

VILLAMARIN, J. A.; MACIEL, C. D. Algoritmo fuzzy para classificação de estruturas biológicas a partir de sinais de retroespalhamento de ultra-som. Proceedings of the 8th. Brazilian Congress on Dynamics, Control and Applications (DINCON), Bauru, Brazil, 2009.

VILLAMARIN, J. A.; MOSQUERA, J. A. Estimativa da Atenuação Ultrassônica em Estruturas Biológicas mediante a aplicação do Filtro de Wiener. Proceedings of the 9th Brazilian Conference on Dynamics, Control and their Applications (DINCON), Serra Negra, Brazil, 2010. p. 232-237.

VILLAMARIN, J. A.; MOSQUERA, J. A.. Characterization of a Time-Varying Medium by Ultrasonic Parameter Variations. Proceedings of the 17 th International Conference on Systems, Signals and Image Processing (IWSSIP2011), Rio de Janeiro, Brazil, 2010. p. 207-211.

VILLAMARIN, J. A.; VELUDO de PAIVA, M. S. Técnica híbrida de processamento de sinais de ultra-som para detecção e caracterização de partículas: aplicação em sistema hemodinâmico. Proceedings of the XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB 2010), Tiradentes, Brazil, 2010. p. 344-347.

VILLAMARIN, J. A.; VELUDO de PAIVA, M. S. Ultrasonic Signal Processing Hybrid Technique for Analysis of Alcoholic Fermentation Process. Proceedings of the World Congress on Engineering (WCE 2012), London, U.K., 2012. p. 1235-1239.

Referências Bibliográficas

- ALCARDE, A. R. *Agência de Informação Embrapa*. set. 2012. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG0110522122006154841.html>. Último acesso em 18/09/2012.
- ALLEGRA, J. R.; HAWLEY, S. A. Attenuation of sound in suspensions and emulsions: Theory and experiments. *The Journal of Acoustic Society of America*, v. 51, p. 145–1564, 1972.
- BARBOZA, M. J. *Impactos ambientais do refino de Petróleo*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ-RJ), Brasil, 2001.
- BENDAT, J. S. *Random Data: Analysis and Measurements procedures*. 1. ed. [S.l.]: Wiley-Interscience, 1971.
- BENOUDJIT, N. *et al.* In vitro microemboli classification using neural network models and rf signals. *Ultrasonics*, v. 51, p. 247–252, 2011.
- BOONKHAO, B.; WANG, X. Z. Ultrasonic attenuation spectroscopy for multivariate statistical process control in nanomaterial processing. *Particuology*, v. 10, p. 196–202, 2012.
- BRAND, S.; KLAUA, R. Ultrasonic detection and quantitative analysis of microscopic bubbles and particles in solution: enhanced by attenuation compensation. *IEEE Ultrasonic Symposium*, p. 1840–1843, 2006.
- BROWN, D. G.; INSANA, M. F. Acoustic scattering theories applied to biological tissues. *J. Acoust. Soc. Am.*, v. 91, p. 2406–2406, 1992.
- CALDERON-SANTOYO, M. Identification of *saccharomyces cerevisiae* strains for alcoholic fermentation by discriminant factorial analysis on electronic nose signals. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 1–12, 2010.
- CARLSON, J. E. Estimation of particle size distribution in solid/liquid suspension based on wide-band ultrasound attenuation measurements. *IEEE International Ultrasonic Symposium Proceedings*, p. 707–710, 2010.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; ALMEIDA, J. B. de. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal. *Braz. J. Food Technol.*, p. 1–7, 2008.
- CASSANEGO, E. *et al.* *Rendimento e Eficiência da Fermentação Alcoólica na Produção de Hidromel*. Corumbá, Brasil, 2008.
- CHEMAT, F.; HUMA, Z.; M.KHAN. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 813–835, 2011.

- CHEN, Y.; WANG, Y. Doppler embolic signal detection using the adaptative wavelet packet basis and neurofuzzy classification. *Pattern Recognition Letters*, v. 29, p. 1589–1595, 2008.
- COHEN, L. *Time-Frequency Analysis*. 1. ed. [S.l.]: **Prentice Hall PTR**, New Jersey, 1995.
- COLEMAN, B. B. *et al.* Direct monitoring of reactor biomass in fermentation control. *UK trends in analytical chemistry*, v. 3, p. 229–235, 1984.
- COMBETTE, P.; ROUDIL, D.; DESPAUX, G. Emulsion characterisation by focused ultrasonic waves. *Ultrasonics*, v. 39, p. 329–334, 2001.
- COWE, J. *et al.* Rf signal provide additional information on embolic events recorded during tcd monitoring. *Ultrasound in Medicine & Biology*, n. 5, p. 613–623, 2006.
- CULLINANE, M. *et al.* Evaluation of new online automated embolic signal detection algorithm, including comparison with panel of international experts. *Stroke Journal*, v. 2000, n. 31, p. 1335–1341, 2009.
- DUCK, F. A.; BAKER, A.; STARRIT, H. *Ultrasound in Medicine*. 1. ed. [S.l.]: **IoP**, 1998. ISBN: 978-0-7503-0593-8.
- DUKHIN, A.; GOETZ, P. J.; TRAVERS, B. Use of ultrasound for characterization dairy products. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1320 – 1334, 2005.
- EGOROV, S. *Drugs Information Online*. 2012. Website. http://drugline.org/img/term/saccharomyces-cerevisiae-13140_2.jpg. Último acesso em 09/11/2012.
- ELVIRA, C. D. L. *et al.* Ultrasonic measurement device for the characterization of microbiological and biochemical processes in liquid media. *Meas. Sci. Technol.*, v. 18, p. 2189–2196, 2007.
- EPSTEIN, P.; CARHART, R. The absorption of sound in suspensions and emulsions. *The Journal of Acoustic Society of America*, v. 25, p. 556–565, 1953.
- FARAN, J. Sound scattering by solid cylinders and spheres. *J. Acoust. Soc. Am.*, v. 23, p. 405–418, 1951.
- FIGUEIREDO, K. *et al.* Biofuel ethanol adulteration detection using an ultrasonic measurement method monique. *Ultrasonics*, v. 43, p. 1–4, 2011.
- GARCIA, F.; FERREIRA, L.; BORGES, R. *Portal de laboratórios virtuais de processos biológicos*. 2012. Website. http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=92&Itemid=196#6. Último acesso em 08/11/2012.
- GHOSHAI, G. *et al.* Temperature dependent ultrasonic characterization of biological media. *J. Acoust. Soc.*, v. 130, p. 2203–2211, 2011.
- GOODENOUGH, T. Detection and quantification of insoluble particles by ultrasound spectroscopy. *Ultrasonics*, v. 43, p. 231–23, 2005.
- HALE, J. Ultrasonic density measurement for process control, accuracy and it is nearly independent of large differences ultrasonics. *Ultrasonics*, v. 26, p. 356, 1988.

- HALL, T. J. *et al.* Imaging and structural properties of soft tissues using ultrasound. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, v. 12, p. 0327–0328, 1990.
- HAUPTMANN, P.; HENNING, R. L. and Bernd. Ultrasonic sensors for process control. **Sensors update.**, v. 3, p. 163–207, 1998.
- HAUPTMANN, P.; HOPPE, N.; PUTTMER, A. Review article application of ultrasonic sensors in the process industry. **Meas. Sci. Technol.**, v. 13, p. R73–R83, 2002.
- HENNING, B. Process monitoring using ultrasonic sensor systems. **Ultrasonics**, v. 44, p. e1395–e1399, 2006.
- HENNING, B. *et al.* In-line concentration measurement in complex liquids using ultrasonic sensors. **Ultrasonics**, v. 38, p. 799–803, 2000.
- HOCHE, S. *et al.* Time of flight prediction for fermentation process monitoring. **Engineering in life sciences**, v. 4, p. 417–428, 2011.
- INSANA, M. *et al.* Describing small-scale structure in random media using pulse-echo ultrasound. **J. Acoustic Soc. Am.**, p. 179 – 192, 1990.
- JAN, M. V. S. *et al.* Ultrasound based measurements of sugar and ethanol concentrations in hydroalcoholic solutions. **Food Control**, v. 19, p. 31–35, 2008.
- JAVANAUD, C. *et al.* Experimental and theoretical values of the ultrasonic properties of dispersion effect of particle. **Ultrasonics**, v. 29, p. 331–337, 1991.
- JIRIK, R.; TAX, T.; JAN, J. Characterization of the ultrasonic attenuation coefficient and its frequency dependent in polymer gel dosimeter. **Phys. Med. Biol.**, v. 52, p. 6747–6759, 2007.
- KELL, D. B. *et al.* Real-time monitoring of cellular biomass: methods and applications. **UK trends in analytical chemistry**, v. 9, p. 190–194, 1990.
- KIM, H.; VARGHESE, T. Hybrid spectral domain method for attenuation slope estimation. **Ultrasound in medicine and biology**, v. 11, p. 1808–1819, 2008.
- KRAUSEA, D. *et al.* Ultrasonic characterization of aqueous solutions with varying sugar and ethanol content using multivariate regression method. **Journal of Chemometrics**, v. 25, p. 216–223, 2011.
- KUC, R.; SCHWARTZ, M. Estimating the acoustic attenuation coefficient slope for liver from reflected ultrasound signals. **IEEE transactions on sonics and ultrasonics**, v. 26, 1979.
- KWIATKOWSKA, B. *et al.* Stimulation of bioprocess by ultrasound. **Biotechnology Advances**, p. 1–13, 2011.
- KYTOMAA, H. K. Theory of sound propagation in suspensions: a guide to size and concentration characterization. **Powder Technology**, v. 82, p. 115–121, 1995.
- LAMBERTI, N. *et al.* An ultrasound technique for monitoring the alcoholic wine fermentation. **Ultrasonics**, v. 49, p. 94–97, 2009.
- LEBERTRE, M. *et al.* Human dermis ultrasound characterization: Backscattering parameters between 22–45 mhz. **Proceedings Ultrasonics Symposium**, p. 1371–1374, 2000.

- LEE, S.; NOLTE, L. P.; CAMPANELLA, O. Determination of ultrasonic-based rheological properties of dough during fermentation. *Journal of Textures studies*, v. 35, p. 33–51, 2004.
- LINDGREN, T.; HAMP, S. Biomass monitoring using acoustic spectroscopy. *IEEE Sensors Journal*, v. 6, 2006.
- LIPPERTS, M. *et al.* Microemboli detection using ultrasound backscatter. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 3, p. 395–402, 2009.
- LIU, L. Population balance modelling for high concentration nanoparticle sizing with ultrasound spectroscopy. *Powder Technology*, v. 203, p. 469–476, 2010.
- LOK, Y.; HITZMANN, B. Ultrasonic measurements and its evaluation for the monitoring of *saccharomyces cerevisiae* cultivation. *Food Research International*, v. 1, p. 16–29, 2004.
- LUDWIG, K.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. Quantificação da floculação de *saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, p. 63–68, 2001.
- MALTA, H. L. *Estudos de parâmetros de propagação de fermento (Saccharomyces cerevisiae) para produção de cachaça de alambique*. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 2006.
- MARSHALL, T.; CHALLIS, R.; TEBBUTT, J. Monitoring and modeling of ultrasonic wave propagation in crystallizing. *Review of Quantitative Nondestructive Evaluation*, v. 31, p. 1735–1741, 2002.
- MENG, R. *et al.* On line monitoring of yogurth fermentation using acoustic impedance method. *UApplied mechanic and materials*, v. 101, p. 737–742, 2012.
- MIGUEL, A. S. *Fermentación de Malta empleando um sistema semicontínuo en el proceso de elaboración de cerveza*. Dissertação (Mestrado) — Universidad Tecnológica de la Mixteca, México, 2011.
- MORSE, P. M.; INGARD, K. U. *Theoretical Acoustic Concepts. International series in pure and applied physics*. [S.l.]: **Mcgraw Hill**, 1968. 927 pag., New York.
- MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, L. L. Marina da S. Comparison of *saccharomyces boulardii* growth in an air-lift fermentor and in a shaker. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, p. 688–693, 2007.
- MUNDIM, J. *et al.* Contribuicao ao estudo da fermentacao alcoolica em altas concentracoes iniciais de sacarose. *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, p. 1–5, 2009.
- OGASAWARA, H. *et al.* Acoustical experiment of yogurt fermentation process. *Ultrasonics*, v. 44, p. e727–e730, 2006.
- OLYMPUS. *Ultrasonic Transducers Technical Notes*. North Americ, USA, 2006.
- OURIEV, B.; BRAUN, P.; BIRKHOFFER, B. Industrial application of ultrasound based in-line rheometry: from stationary to pulsating pipe flow of chocolate suspension in precrystallization process. *Review of Scientific Instruments*, p. 3164–3168, 2004.

- PACHECO, T. fraga. *Fermentação alcoólica com levedura de características floculantes em reator tipo torre escoamento*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2010.
- PALANCHON, P. C. *Ultrasound Harmonic Classification of Microemboli*. Dissertação (Mestrado) — Universiteit Rotterdam, Netherlands, 2004.
- PANETTA, P. D.; PAPPAS, R. A.; TUCKER, B. Process monitoring and particle characterization with ultrasonic backscattering. *Patente No. US 7,114,375 B2*, p. 1–17, 2006.
- PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. Estudo do processo fermentativo em usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. *Revista de Ciencia e Tecnologia*, v. 16, p. 59–68, 2009.
- PAZIN, A. *et al.* Caracterização ultra-sônica tecidual miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 81, p. 319–325, 2003.
- PEREIRA, A. J. M. *Medição em tempo real da densidade em fermentações alcoólicas com sensores inteligentes da densidade*. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de engenharia Universidade do Porto, 1998.
- POVEY, M. *Ultrasonic techniques for fluids charcaterization*. 1. ed. [S.l.]: **Academic Press**, 1997. ISBN: 9780125637305.
- QUAGLIO, S.; SECCO, A. *Análise Energia*. 2012. Website. http://issuu.com/analiseeditorial/docs/energia_2012?mode=window&backgroundcolor=%23222222. Último acesso em 08/10/2012.
- RESA, P.; ELVIRA, L.; ESPINOSA, F. M. de. Concentration control in alcoholic fermentation processes from ultrasonic velocity measurements. *Food Research International*, v. 37, p. 587–594, 2004.
- RESA, P. *et al.* On-line ultrasonic velocity monitoring of alcoholic fermentation kinetics. *Bioprocess Biosyst*, v. 32, p. 321–331, 2009.
- RICHTER, A.; BABICK, F.; STINTZ, M. Polydisperse particle size characterization by ultrasonic attenuation spectroscopy in the micrometer range. *Ultrasonics*, v. 44, p. e483–e490, 2006.
- SCHOCK, T.; BECKER, T. Sensor array for the combined analysis of water-sugar-ethanol mixtures in yeast fermentations by ultrasound. *Food Control*, v. 21, p. 362–369, 2010.
- SHUKLA, A. P. A.; ROHANI, S. Particle size monitoring in dense suspension using ultrasound with an improved model accounting for low-angle scattering. *AIChE Journal*, v. 56, p. 2825–2837, 2010.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2. ed. [S.l.]: **Prentice Hall**, 2002. Upper Saddle River, NJ.
- SHUNG, K. K.; THIEME. *Ultrasonic Scattering in Biological tissues*. 1. ed. [S.l.]: **CRC Press**, 1993.
- STEARNS, S.; DAVID, R. *Signal processing algorithms*. 1. ed. [S.l.]: **Prentice Hall, Inc**, 1988. ISBN: 0-13-809435-7.

SZABO, T. L. Diagnostic ultrasound imaging: inside out. *Elsevier Academic Press. London*, 2004.

TREECE, G. M.; PRAGER, R.; GEE, A. Ultrasound attenuation measurement in the presence of scatter variation. *IEEE Transactions on Ferroelectrics and Frequency Control*, v. 52, p. 2346–2360, 2005.

VIEIRA, N. *et al.* Estudo de cinética de fermentação alcoólica por células de *saccharomyces cerevisiae* em mel diluído. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 10, 2008.

VLAHOPOULOU, J. Ultrasonic monitor for a bioreactor. *Patent Number 20100206079*, A1, 2010.

WANG, J.; YU, T.; JIN, C. On-line estimation of biomass in fermentation process using support vector machine. *Chinese J. Chem. Eng.*, v. 14, p. 383–388, 2006.

WIKLUND, J.; STADING, M.; TRAGARDH, C. Monitoring liquid displacement of model and industrial fluids in pipes by in-line ultrasonic rheometry. *Journal of Food Engineering*, v. 99, p. 330–337, 2010.

WIKLUND, J.; STANDING, M.; TRAGARDH, C. Ultrasound doppler based in line-rheometry for processing applications. *Annual Transaction of the Nordic Rheology Society*, v. 15, p. 1–5, 2007.

WILSON, L.; ROBINSON, D.; DOUST, B. Frequency domain processing for ultrasonic attenuation measurement in liver. *Ultrasonic Imaging*, v. 6, p. 278–292, 1984.

WINDER, W. C.; AULIK, D. J.; RICE, A. C. An ultrasonic method for direct and simultaneous determination of alcohol and extract content of wines. *Am. J. Enol. Vitic*, v. 21, p. 1–11, 1970.

ZAGZEBSKI, J. *Essentials of ultrasound physics*. 1. ed. [S.l.]: **Mosby,Inc.**, 1996.

ZBIGNIEW, J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. Application of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, v. 6, p. 89–99, 2007.

ZIPS, A.; FAUST, U. Determination of biomass by ultrasonic measurements. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 1801–1807, 1989.

ZISKIN, M.; LEWIN, P. *Ultrasonic exposimetry*. 1. ed. [S.l.]: **CRC Press.**, 1993.

Apêndice A - Tabelas de parâmetros

.1 Parâmetros no meio de Referência

Neste apêndice são apresentados exemplos dos valores reais de parâmetros acústicos e espectrais obtidos sobre sinais de retroespalhamento de ultra-som no meio de referência e o mosto em fermentação, a partir dos procedimentos computacionais de detecção e caracterização.

Tabela 1: Parâmetros para uma amostra de água em repouso sem partículas de levedura.

Parâmetros				
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
3,17	23,86	0,036	10,53	390
4,68	24,51	0,103	12,92	430
3,12	26,14	0,045	12,30	310

Tabela 2: Parâmetros para uma amostra de água em repouso com partículas de levedura.

Parâmetros				
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
5,42	18,31	0,333	0	510
5,27	19,77	0,088	0,95	480
5,02	23,43	0,069	0,36	650

Tabela 3: Parâmetros para uma amostra de água em agitação.

Parâmetros				
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
4,00	30,25	0,069	12,22	430
4,44	30,29	0,088	12,03	510

Tabela 4: Parâmetros para uma amostra de água em agitação com partículas de levedura.

Parâmetros				
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
5,42	18,31	0,333	0	510
5,27	19,77	0,088	0,95	480
5,02	23,43	0,069	0,36	650
5,12	21,73	0,251	2,62	390
5,32	19,73	0,126	2,43	330
5,12	19,21	0,073	2,28	350
5,17	22,63	0,073	0,74	720
5,37	19,10	0,091	0	340
5,27	18,90	0,086	0	350
5,02	21,74	0,0501	0	400
5,22	22,06	0,091	0	320

.2 Parâmetros no meio de cultura

Tabela 5: Parâmetros médios estimados para sinais de ultra-som sobre uma amostra de caldo de cana de açúcar em repouso. **FC** e **FD** indicam o número de sinais detectados como fase contínua e fase dispersa respectivamente.

Parâmetros					
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	Sist. Det # detecções	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
4,46	41,65	FC:45,FD:13	0,084	7,02	340
4,51	27,56	FC:47,FD:9	0,039	5,35	740
4,53	16,30	FC:42,FD:17	0,016	6,47	590
4,35	29,30	FC:50,FD:5	0,040	2,42	440
4,34	17,83	FC:22,FD:19	0,022	1,38	340
4,75	62,38	FC:23,FD:5	0,059	3,77	340
4,79	47,95	FC:21,FD:7	0,029	2,36	340
4,83	20,93	FC:15,FD:8	0,080	4,03	380
4,78	24,10	FC:16,FD:7	0,052	3,33	300
4,93	27,81	FC:20,FD:4	0,061	4,77	520

Tabela 6: Parâmetros médios estimados sobre sinais de ultra-som coletados para uma amostra de caldo de cana de açúcar em agitação.

Parâmetros					
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	Sist. Det # detecções	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
4,21	16,53	FC:31,FD:7	0,044	8,9	280
4,33	30,70	FC:34,FD:13	0,070	2,77	400
3,95	26,14	FC:32,FD:15	0,028	1,62	480
4,15	25,84	FC:17,FD:3	0,067	1,46	370
4,93	26,55	FC:22,FD:5	0,053	2,77	470
4,97	25,46	FC:18,FD:6	0,059	3,01	460

Tabela 7: Parâmetros médios estimados sobre sinal de ultra-som coletado para uma amostra de caldo de cana de açúcar em repouso com inoculação da levedura.

Parâmetros					
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	Sist. Det # detecções	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
4,93	48,51	FC:18,FD:9	0,060	2,85	440
4,65	33,78	FC:19,FD:7	0,080	1,12	340

Tabela 8: Parâmetros médios estimados sobre sinal de ultra-som coletado para uma amostra de caldo de cana de açúcar em agitação com inoculação da levedura.

Parâmetros					
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	Sist. Det # detecções	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Largura de Banda (KHz)
4,69	45,1	FC:18,FD:8	0,040	1,85	390
4,63	44,54	FC:17,FD:6	0,070	2,95	639
4,63	52,88	FC:20,FD:8	0,061	3,99	390
4,54	45,06	FC:18,FD:8	0,093	7,75	200
4,62	48,83	FC:24,FD:5	0,030	1,55	350
4,67	55,51	FC:11,FD:5	0,080	3,04	340
4,40	36,20	FC:23,FD:5	0,090	3,51	330
4,78	28,34	FC:21,FD:19	0,002	5,10	360
4,59	27,22	FC:36,FD:6	0,020	6,41	320

Tabela 9: Exemplos de parâmetros médios estimados sobre sinais de ultra-som coletados durante a evolução do processo fermentativo. *Curve Fit.* representa o coeficiente angular médio estimado sobre a largura de banda do espectro de potência médio calculado na RoI.

Parâmetros						
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>Curve Fit.</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Variância (Volts)	Largura de Banda (KHz)
5,07	29,94	0,336	0,04	0,51	0,001	320
5,07	35,25	0,369	0,03	0,27	0,006	370
4,93	33,32	0,305	0,04	0,21	0,001	330
5,02	32,84	0,3372	0,04	0,33	0,003	340
5,07	34,14	0,43	0,040	1,28	0,002	350
4,93	29,52	0,40	0,042	0,63	0,001	380
4,98	30,91	0,34	0,042	0,51	0,002	360
4,99	31,53	0,39	0,041	0,81	0,002	363
5,02	31,14	0,44	0,051	0,55	0,003	370
5,02	34,49	0,37	0,055	0,60	0,003	260
4,98	34,35	0,43	0,069	0,08	0,002	400
5,07	34,78	0,34	0,058	0,08	0,001	350
5,02	33,69	0,39	0,058	0,15	0,002	345
4,15	25,91	0,31	0,056	0,06	0,003	460
4,49	23,41	0,33	0,050	0,003	0,002	450
5,17	27,77	0,31	0,052	0,00	0,002	390
5,27	24,31	0,35	0,061	0,06	0,002	380
4,00	26,03	0,28	0,050	0,40	0,004	370
4,10	26,13	0,24	0,062	0,35	0,003	370
5,07	19,17	0,32	0,059	0,03	0,002	430
4,61	24,67	0,31	0,056	0,13	0,002	403
5,01	29,52	0,34	0,062	0,11	0,002	330
4,19	29,41	0,28	0,053	0,00	0,003	440
4,10	30,37	0,26	0,057	0,07	0,002	330
4,43	29,77	0,29	0,057	0,06	0,003	366

Figura 1: Variação paramétrica média estimada na RoI durante a evolução do processo de fermentação.

Tabela 10: Exemplos de parâmetros médios estimados na RoI para partículas de biomassa no meio de cultura durante a fase de pós-fermentação. *Curve Fit.* representa o coeficiente angular médio estimado sobre a largura de banda do espectro de potência médio calculado na RoI.

Parâmetros						
Frequência Central (MHz)	Slope (dB/MHz)	Curve Fit. (dB/MHz)	IBC (1/cm-sr)	Energia (dB)	Variância (Volts)	Largura de Banda (KHz)
4,98	28,36	0,50	0,330	0,38	0,001	490
5,02	21,99	0,42	0,500	0,38	0,002	420
5,02	30,84	0,62	0,330	0	0,001	350
5,02	32,07	0,31	0,330	0	0,009	420
5,17	27,86	0,54	0,099	0	0,002	420
4,93	25,27	0,44	0,330	0	0,006	400
5,02	26,81	0,47	0,500	0	0,003	400
5,02	36,57	0,56	0,501	0	0,003	410
5,12	24,24	0,49	0,500	0	0,001	330
5,02	27,15	0,41	0,259	0	0,002	390

Tabela 11: Exemplos de parâmetros médios estimados na RoI para bolhas de gás dispersas na fase aquosa do meio de cultura durante a fase de pós-fermentação.

Parâmetros						
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>Curve Fit.</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Variância (Volts)	Largura de Banda (KHz)
4,05	26,37	0,36	0,180	0,80	0,004	460
3,80	28,33	0,48	0,250	0,620	0,003	360
3,71	25,65	0,40	0,328	0	0,004	430
4,15	37,09	0,36	0,330	0	0,003	420
3,95	23,33	0,32	0,330	0,03	0,001	400
4,05	25,89	0,38	0,33	0	0,001	400
3,95	24,78	0,34	0,21	0,61	0,003	430

Tabela 12: Exemplos da variação de parâmetros médios estimados na RoI no meio de cultura para um incremento de temperatura entre 28 °C a 29 °C .

Parâmetros para 28 °C						
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>Curve Fit.</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Variância (Volts)	Largura de Banda (KHz)
5,22	20,56	0,2648	0,043	0,57	0,0012	340
Parâmetros para 29 °C						
Frequência Central (MHz)	<i>Slope</i> (dB/MHz)	<i>Curve Fit.</i> (dB/MHz)	<i>IBC</i> (1/cm-sr)	Energia (dB)	Variância (Volts)	Largura de Banda (KHz)
5,27	22,28	0,2596	0,052	0,65	0,0013	340