



YAGO GREGÓRIO SIQUEIRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
CONTROLADOR PREDITIVO MULTIVARIÁVEL PARA O
CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM
BIOPROCESSOS**

**LAVRAS – MG
2022**

YAGO GREGÓRIO SIQUEIRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CONTROLADOR PREDITIVO
MULTIVARIÁVEL PARA O CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM
BIOPROCESSOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Gilson Campani Junior
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

*À minha mãe Cristina e ao meu pai Edilson, pela educação,
apoio, carinho e incentivo durante toda a minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar com muita sabedoria e força para conseguir chegar a este momento.

Aos meus pais Cristina e Edilson, por me apoiarem em todos meus momentos, auxiliando em minhas dificuldades e me direcionando no caminho correto. Ensinaram-me a manter a fé, nunca desistir e sempre que possível ajudar a todos, mantendo a humildade essencial na vida.

À minha família que sempre me apoiou e me incentivou a não desistir de realizar tudo o que almejo.

Aos meus amigos que compartilharam comigo esta jornada.

Aos meus professores, pelo ensino e dedicação na minha formação acadêmica.

Ao meu orientador Gilson Campani Junior, por ter me abraçado no final da minha caminhada na graduação, por confiar em mim e dedicar seu tempo em meu auxílio. Sua ajuda foi extremamente decisiva para que eu pudesse chegar a este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras.

Muito obrigado!

RESUMO

O oxigênio dissolvido (OD) é um parâmetro muito importante e necessário para microrganismos aeróbios. Por ser pouco solúvel em água, o OD pode se tornar o fator limitante no processo, especialmente em sistemas com dinâmica não-linear. Seu controle, então, é exigido para favorecer o crescimento celular e posterior indução na produção de produtos, como a proteína recombinante PspA (Proteína de Superfície de Pneumocócica A). Largamente utilizados, controladores clássicos como o PID (Proporcional – Integral - Derivativo) são destinados a sistemas lineares ou aproximadamente lineares. Assim, para sistemas altamente não lineares e/ou sujeitos a restrições, a aplicação de métodos de controle avançados e robustos como o preditivo multivariável se torna necessária. O presente trabalho desenvolveu e avaliou o controlador preditivo por matriz dinâmica (DMC) multivariável (DMC/MISO) aplicado a um bioprocessamento aeróbio com uso de *Escherichia coli* modificada geneticamente para produção de PspA. Este controlador teve o desempenho comparado aos controladores PI e DMC/SISO (*single input single output*). Os controladores foram testados em problemas regulatórios. Encontrou-se as matrizes de peso ideais do controlador multivariável nas fases de crescimento e indução (pesos de 10^6 e 10^7 , respectivamente). Em geral, o controlador preditivo multivariável de malha MISO (*multiple input single output*) foi satisfatório no controle de OD nas fases de cultivo celular. Quando comparado aos outros controladores, o DMC/MISO demonstrou ter um desempenho próximo, mas estatisticamente abaixo do DMC/SISO e do PI, ao nível de 5% de significância.

Palavras-chave: Controle MISO. Controlador DMC. Bioprocessamento aeróbio. *Escherichia coli*. Biorreator.

ABSTRACT

Dissolved oxygen (DO) is a very important and required parameter for aerobic microorganisms. Because of being sparingly soluble in water, DO may be a limiting factor in the process, especially for nonlinear dynamic systems. Then, DO control is required to benefit cell growth and induction to produce products, such as PspA (*Pneumococcal surface protein A*). Widely used, classical controllers as PID (*proportional - integral - derivative*) are intended for linear or nearly linear dynamic system. Thus, for highly nonlinear and/or constrained systems, the application of advanced and robust control methods as multivariable predictive becomes required. This work developed and evaluated the multivariable DMC (*Dynamic Matrix Control*) (DMC/MISO) applied to an aerobic bioprocess using genetically modified *Escherichia coli* to produce recombinant protein PspA. The controller performance was compared to PI and DMC/SISO (*single input single output*) controllers. All of them were tested in regulatory problems. The ideal weight matrices for growth and induction phases were found (weights of 10^6 and 10^7 , respectively). In general, the MISO (*multiple input single output*) predictive controller was satisfactory for the DO control in both phases. Compared to the other controllers, DMC/MISO proved to perform closely, but statistically below DMC/SISO and PI performances, at the 5% level of significance.

Keywords: MISO control. DMC control. Aerobic bioprocess. *Escherichia coli*. Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biorreatores (a) tanque agitado e aerado e (b) <i>airlift</i>	3
Figura 2 – <i>Escherichia coli</i>	5
Figura 3 – Domínios na estrutura da PspA.....	6
Figura 4 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
Figura 5 – Diagrama de blocos de malha fechada de um controlador <i>feedback</i> genérico.	7
Figura 6 – Exemplos de sistemas multivariáveis.....	8
Figura 7 – Representação dos conceitos básicos do controle preditivo.	12
Figura 8 – Processo de cálculo do coeficiente da resposta ao degrau s_i	13
Figura 9 – Diagrama de blocos do controlador DMC/MISO.	19
Figura 10 – $\overline{\text{RMSE}}$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.	23
Figura 11 – $\overline{\text{RMCM}} (Q_{ar})$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.....	25
Figura 12 – $\overline{\text{RMCM}} (P)$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.....	25
Figura 13 – $\overline{\text{RMCM}} (Q_{O_2})$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.....	26
Figura 14 – $\overline{\text{RMSE}}$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.....	27
Figura 15 – $\overline{\text{RMCM}} (Q_{ar})$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.....	29
Figura 16 – $\overline{\text{RMCM}} (P)$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.	30
Figura 17 – $\overline{\text{RMCM}} (Q_{O_2})$ do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.....	30
Figura 18 – PI: Variável controlada (OD) na fase de crescimento.....	32
Figura 19 – PI: Variáveis manipuladas na fase de crescimento.	33
Figura 20 – DMC/SISO: Variável controlada (OD) na fase de crescimento.	33
Figura 21 – DMC/SISO: Variáveis manipuladas na fase de crescimento.	34
Figura 22 – DMC/MISO ($w = 10^6$): Variável controlada (OD) na fase de crescimento.	34
Figura 23 – DMC/MISO ($w = 10^6$): Variáveis manipuladas na fase de crescimento.....	35
Figura 24 – PI: Variável controlada (OD) na fase de indução.	36

Figura 25 – PI: Variáveis manipuladas na fase de indução.....	37
Figura 26 – DMC/SISO: Variável controlada (OD) na fase de indução.....	37
Figura 27 – DMC/SISO: Variáveis manipuladas na fase de indução.....	38
Figura 28 – DMC/MISO ($w = 10^7$): Variável controlada (OD) na fase de indução.....	38
Figura 29 – DMC/MISO ($w = 10^7$): Variáveis manipuladas na fase de indução.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de crescimento.	23
Tabela 2 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMSE} na fase de crescimento.	24
Tabela 3 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMCM} na fase de crescimento.	26
Tabela 4 – Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de indução.	27
Tabela 5 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMSE} na fase de indução.	28
Tabela 6 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMCM} na fase de indução.	31
Tabela 7 – \overline{RMSE} dos controladores na fase de crescimento.	35
Tabela 8 – Teste de Tukey: Comparação dos controladores na fase de crescimento.	35
Tabela 9 – \overline{RMSE} para os controladores na fase de indução.	39
Tabela 10 – Teste de Tukey: Comparação dos controladores na fase de crescimento.	39

LISTA DE SÍMBOLOS

a_k	Constante empírica	[h ⁻¹]
a_q	Constante empírica	[°C ⁻³ .h ⁻¹]
a_μ	Constante empírica	[°C.h ⁻¹]
$a_{\mu m}$	Constante empírica	[°C.h ⁻¹]
b_k	Constante empírica	[min]
b_q	Constante empírica	[h ⁻¹]
b_μ	Constante empírica	[h ⁻¹]
$b_{\mu m}$	Constante empírica	[h ⁻¹]
c	Sinal da saída do controlador	
\bar{c}	Bias do controlador	
c_k	Constante empírica	[min ⁻¹]
C_P	Concentração de PspA	[g.L ⁻¹]
C_S	Concentração de substrato	[g.L ⁻¹]
C_X	Concentração de células	[g.L ⁻¹]
DMC	Controlador preditivo por matriz dinâmica	
$d.m.s.$	Diferença mínima significativa	[% sat., L.min ⁻¹ , bar]
e	Erro em relação ao <i>set point</i>	
E	Vetor erro predito	
E_f	Vetor erro não forçado	
e_k	Erro no instante t_k	
e_{k-1}	Erro no instante t_{k-1}	
e_{k-2}	Erro no instante t_{k-2}	
K_c	Ganho proporcional do controlador	
k_{LA}	Coefficiente volumétrica de transferência de O ₂	[h ⁻¹]
k_m	Constante empírica	[gP.g _{ms} ⁻¹ .h]
K_S	Constante de Monod	[g.L ⁻¹]
M	Horizonte de controle	
m	Quantidade de variáveis manipuladas	
m_{O_2}	Coefficiente de consumo de O ₂ para manutenção celular	[h ⁻¹]

<i>MIMO</i>	Múltiplas entradas – múltiplas saídas	
<i>MISO</i>	Múltiplas entradas – uma saída	
<i>OD</i>	Concentração de oxigênio dissolvido	[g.L ⁻¹]
<i>OD*</i>	Solubilidade média de oxigênio no meio de cultivo	[g.L ⁻¹]
<i>OTR</i>	Taxa de transferência de oxigênio	[g.L ⁻¹ .h ⁻¹]
<i>OUR</i>	Taxa de consumo de oxigênio	[g.L ⁻¹ .h ⁻¹]
<i>P</i>	Horizonte de predição	
<i>P</i>	Pressão no reator	[bar]
<i>PI</i>	Controlador proporcional - integral	
<i>PID</i>	Controlador proporcional – integral – derivativo	
<i>q</i>	Valor tabelado do teste de Tukey	
<i>Q_{ar}</i>	Vazão de ar	[L.min ⁻¹]
<i>Q_{O2}</i>	Vazão de O ₂ puro	[L.min ⁻¹]
<i>q_{O2}</i>	Taxa de consumo de oxigênio específica	[h ⁻¹]
<i>QMR</i>	Quadrado médio residual	[% sat., L.min ⁻¹ , bar]
<i>r</i>	Número de repetições nos tratamentos	
<i>RMCM</i>	Raíz do movimento de controle quadrado médio	[L.min ⁻¹ , bar]
<i>RMSE</i>	Raíz do erro quadrado médio	[% sat.]
<i>s_i</i>	Coefficiente da resposta ao degrau no instante <i>t_i</i>	
<i>S_i</i>	Vetor coeficiente <i>s_i</i> das manipuladas	
<i>SISO</i>	Uma entrada – uma saída	
<i>T</i>	Temperatura do reator	[°C]
<i>t</i>	Tempo de processo	[h]
<i>t_{ind}</i>	Tempo de início da fase de indução	[h]
<i>t_k</i>	Instante de tempo no passo <i>k</i>	
<i>t_{k+1}</i>	Instante de tempo no passo <i>k+1</i>	
<i>T_{PX}</i>	Constante empírica	[h]
<i>T_{ref}</i>	Temperatura de referência	[°C]
<i>u</i>	Variável manipulada	
<i>u_k</i>	Variável manipulada no instante <i>t_k</i>	
<i>u_{k-N+1}</i>	Variável manipulada no instante <i>t_{k-N+1}</i>	
<i>V</i>	Volume do reator	[L]

W	Matriz peso	
w_i	Peso na variável manipulada i	
y	Variável controlada	
\hat{Y}	Vetor valor predito	
\hat{Y}_f	Vetor de resposta livre	
$y_{forçada}$	Variável medida controlada	
y_i	Variável controlada no instante t_i	
\hat{Y}_{k+i}	Valor predito da variável controlada no instante t_{k+i}	
\hat{Y}_{k+i}^f	Resposta livre das ações do controle atual	
y_{livre}	Variável medida livre das ações de controle	
Y_{sp}	Vetor <i>set point</i>	
y_{sp}	Valor do <i>set point</i>	
Y_{X/O_2}	Conversão de oxigênio a células	$[\text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{gO}_2^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
$Y_{X/S}$	Conversão de substrato a células	$[\text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{gS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
A	Nível de significância	
B	Constante empírica	$[\text{°C}^{-1}]$
Δt	Tempo amostral	$[\text{h}]$
Δu	Variação na variável manipulada	$[\text{L} \cdot \text{min}^{-1}]$ ou $[\text{bar}]$
Δu_k	Degrau aplicado em u no instante t_k	$[\text{L} \cdot \text{min}^{-1}]$ ou $[\text{bar}]$
Δy_{O_2}	Degrau aplicado na composição de O_2 no gás de alimentação	
E	Fator de correção	
Θ	Constante empírica	
M	Velocidade específica de crescimento celular	$[\text{h}^{-1}]$
μ_P	Velocidade específica de produção de PspA	$[\text{h}^{-1}]$
μ_m	Perda de viabilidade celular	$[\text{h}^{-1}]$
Φ	Função objetivo do controle preditivo	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Bioprocessos	2
2.1.1 Bioprocessos aeróbios.....	3
2.1.1.1 Controle do oxigênio dissolvido	4
2.2 <i>Escherichia coli</i> geneticamente modificada para produção de proteínas recombinantes	5
2.3 Proteína de superfície pneumocócica A (PspA)	5
2.4 Controle de processos.....	6
2.4.1 Malhas de controle.....	7
2.4.2 Tipos de controladores	8
2.4.2.1 PID (Proporcional – Integral – Derivativo)	9
2.4.2.2 DMC (<i>controlador preditivo por matriz dinâmica</i>).....	11
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 Dados experimentais e modelagem matemática do processo	16
3.2 Controle de OD	18
3.2.1 Variáveis de entrada e saída	18
3.2.2 Esquema do controlador DMC/MISO.....	19
3.2.3 Matriz peso (W)	19
3.3 Avaliação de desempenho: <i>RMSE</i> e <i>RMCM</i>	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Comparação da matriz peso	22
4.1.1 Fase de crescimento	22
4.1.2 Fase de indução.....	27
4.2 Comparação dos controladores PI, DMC/SISO e DMC/MISO	31
4.2.1 Fase de crescimento.....	32
4.2.2 Fase de indução.....	36
4.3 Considerações gerais	40
5 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE A – Código em MATLAB da simulação da fase de crescimento	44
APÊNDICE B – Código em MATLAB da simulação da fase de indução	54

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais frequente nas indústrias, bioprocessos vêm ganhando importância no cenário mundial. Desde a produção de alimentos e combustíveis até medicamentos e vacinas, os produtos gerados pelos bioprocessos estão fazendo parte do cotidiano das pessoas (MUENZ, 2021). Estes utilizam enzimas ou células, sejam animais, vegetais ou microbianas para a geração de novos produtos (DORAN, 2010). Quando esta célula utiliza oxigênio para seu crescimento e metabolismo, dá-se o nome de bioprocessamento aeróbio.

Para que o meio de cultivo possibilite a otimização do crescimento e metabolismo celular é necessário controlar parâmetros que significativamente os afetam, como o pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido (OD), vazão de ar, pressão no interior do biorreator, entre outros (SCHMIDELL, 2021). Para um bioprocessamento aeróbio a exigência de uma transferência de O₂ adequada faz com que uma ação de controle de OD seja necessária (SCHMIDELL, 2021).

Em bioprocessamentos aeróbios envolvendo a produção de proteínas recombinantes, como a PspA (Proteína de Superfície Pneumocócica A) por meio do cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada, o controle do OD é essencial, uma vez que suspensões com elevada concentração celular exigem um alto fornecimento de oxigênio (CAMPANI, 2014). Para isso, Campani (2018) propôs a manipulação das vazões de ar e oxigênio e a pressão para atender à alta demanda celular de OD em cultivos de *E. coli* e, com isso, controlar essa variável no processo.

É comum em bioprocessamentos o uso de controladores PID (proporcional-integral-derivativo) com malhas de controle com uma entrada e uma saída (SISO – *single input single output*) para variáveis do ambiente de cultivo, como o OD (SCHMIDELL, 2021). Porém, o PID tem uso adequado em sistemas lineares (ou aproximadamente), o que geralmente não ocorre em bioprocessamentos (ALFORD, 2006). Controladores mais robustos e avançados, como o preditivo DMC, têm ganhado espaço nas indústrias por terem a capacidade de se adequarem às restrições das variáveis de processos não-lineares, principalmente em sistemas multivariáveis (SEBORG, 2016).

Assim este trabalho tem como objetivos desenvolver e avaliar *in silico* um controlador DMC multivariável com malha MISO (*multiple input single output*) para o controle de OD, com diferentes matrizes peso, manipulando a vazão de ar, a fração molar de oxigênio na corrente de alimentação de gás e a pressão no biorreator, seguida de uma comparação deste controlador com os controladores PI e DMC com malha SISO. Como estudo de caso, esse sistema será aplicado ao bioprocessamento aeróbio para produção de proteínas recombinantes PspA por *Escherichia coli*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioprocessos

O avanço dos conhecimentos humanos evoluiu os processos e produtos que antigamente não se tinha alguma forma de alcançar. A cada dia mais utilizada, a biotecnologia utiliza da manipulação direta da genética celular para gerar produtos de interesse (LIU, 2013; SHULER; KARGI, 2002).

Bioprocessos foram gerados através da aplicação da biotecnologia em vários campos de atuação, como na agricultura, na indústria química, na medicina, entre outros (LIU, 2013). Eles utilizam células (animais, vegetais ou microbianas) para gerar produtos de interesse, tornando-se parte essencial de muitas indústrias, como sucroalcooleiras, farmacêuticas, alimentícias, entre outras (DORAN, 2010).

Por conta do uso de organismos vivos, tem-se a necessidade de assegurar e controlar fatores que afetam seu crescimento. Fatores como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido e agitação afetam diretamente a dinâmica de crescimento celular e produção do produto (BORZANI *et al.*, 2001). Além disso, há a necessidade de esterilização dos materiais e aparelhos utilizados no bioprocessos, juntamente com a manutenção do ambiente sem microrganismos contaminantes (VITOLLO *et al.*, 2015).

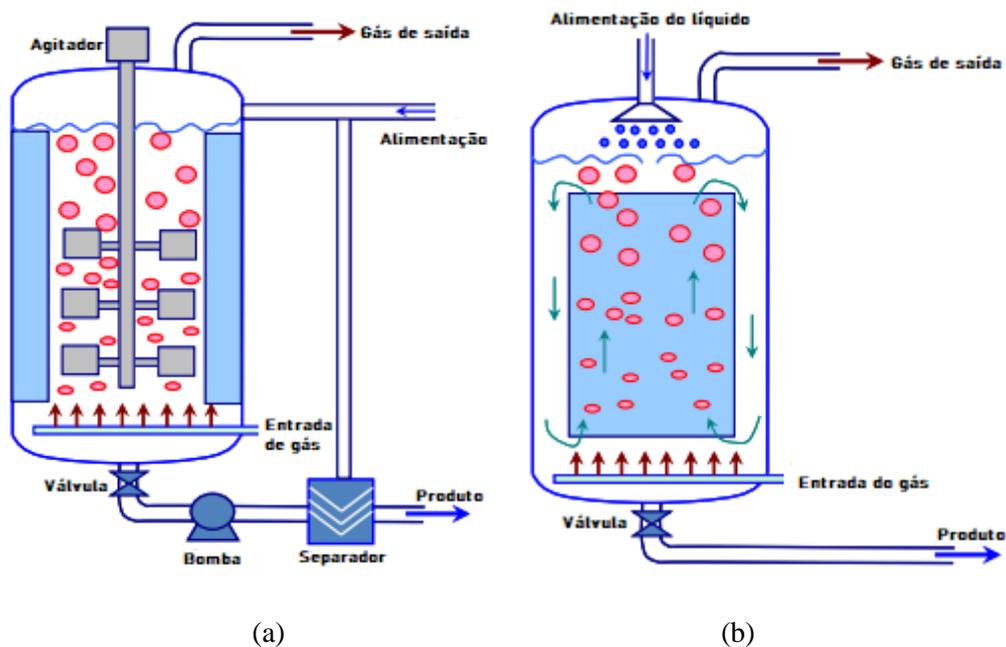
A dependência de oxigênio para o crescimento e manutenção celular divide os microrganismos em dois tipos: aeróbios e anaeróbios. Segundo Brown (2018), a primeira classificação coloca os organismos que necessitam de oxigênio para seu crescimento, como a maioria dos fungos, algas e bactérias. Já os anaeróbios podem ser divididos em facultativos e obrigatórios. O organismo anaeróbio facultativo pode utilizar oxigênio, porém em sua ausência podem crescer por outros mecanismos bioquímicos. Quando o oxigênio não pode estar presente no meio de cultivo do organismo, sendo-lhe tóxico, chama-se de anaeróbio obrigatório. Isso deve ser levado em consideração no projeto de um bioprocessos, uma vez que baixas concentrações de O₂ dissolvido no meio para microrganismos aeróbios afeta o rendimento do processo, inviabilizando-o (SCHMIDELL, 2021).

Em relação ao biorreator, grande parte dos meios de cultivo em aerobiose usam reatores de tanques agitados e aerados ou pneumáticos (DORAN, 2010). Para a produção de proteínas

recombinantes, Campani (2018) relata que a maioria dos reatores é de tanque agitado e aerado (FIGURA 1a), com os pneumáticos pouco utilizados em estudo.

Reatores pneumáticos, como o de bolhas e o *airlift* (FIGURA 1b), trazem a vantagem de uma maior eficiência energética, uma vez que não há presença de impelidores, tendo a mistura realizada pela própria aspersão de gás no vaso do reator, o que diminui o cisalhamento das células e fornece uma razão de oxigênio transferido por unidade de energia utilizada maior (DORAN, 2010; SHULER; KARGI, 2002). Assim sua estrutura é bem mais simples do que a dos reatores convencionais (DORAN, 2010), além de retirar um caminho de entrada de contaminantes em potencial para o meio, pois o impelidor em contato direto com o meio de cultivo exige uma vedação eficiente no eixo, sendo um risco de acesso a outros organismos (SHULER; KARGI, 2002).

Figura 1 - Biorreatores (a) tanque agitado e aerado e (b) *airlift*.



Fonte: Adaptado de Liu (2013).

2.1.1 Bioprocessos aeróbios

Bioprocessos com cultura de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos têm uma faixa ampla de utilidade nas indústrias. Produção de antibióticos, enzimas, fermentos, proteínas recombinantes, entre outros, são alguns dos exemplos do processo em aerobiose. Estes bioprocessos

têm a característica de necessitarem de uma transferência de oxigênio para o meio de cultura (SCHMIDELL, 2021).

As células necessitam de energia para sobrevivência, crescimento e geração de produtos desejados. Esta energia advém de reações metabólicas, como pela oxidação da glicose para geração de adenosina trifosfato (ATP) (BROWN, 2018; SCHMIDELL, 2021). Esta é feita em duas etapas: a primeira é a glicólise, em que a glicose é quebrada em piruvatos; a segunda, após a conversão dos piruvatos em acetilcoenzima A, tem o ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido tricarboxílico (ATC), e a cadeia de transporte de elétrons, que geram moléculas de ATP, molécula carreadora ativada de energia livre mais importante biologicamente (BROWN, 2018). Na segunda etapa tem participação efetiva do oxigênio, sendo o último a receber elétrons no fim, reduzindo-se à água. O ATP gerado, quando hidrolisado em ADP, libera energia para a célula (BROWN, 2018; SCHMIDELL, 2021).

Assim, pode-se observar a necessidade da disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo. Esta questão, porém, é um desafio tecnológico devido à dificuldade em dissolver o oxigênio em fase gasosa. À pressão de 1 atm e temperatura de 25 a 35 °C, a água satura-se com oxigênio dissolvido (OD) em aproximadamente 7 mg/L, sendo muito pouco solúvel em água (SCHMIDELL, 2021; SHULER; KARGI, 2002).

Em situações em que há no meio altas concentrações de células, como no cultivo de *Escherichia coli* para formação de proteínas recombinantes (CAMPANI, 2018), exige-se um suprimento grande de OD no meio. Esta característica torna a concentração de OD como fator limitante do processo, fazendo com que a taxa específica de crescimento varie com o OD (SHULER; KARGI, 2002).

2.1.1.1 Controle do oxigênio dissolvido

Como visto, a necessidade de manter a concentração de OD em um nível adequado tende a maximizar o crescimento e a concentração do produto desejado. Assim há a necessidade de um monitoramento e controle de OD.

Em tanque agitado este controle, em sua maioria com malha SISO com controlador PID, é feito pela manipulação da agitação feita pelos impelidores e da vazão de ar. Alguns incluem também o enriquecimento de ar com O₂ puro (ALFORD, 2006; DIAZ *et al.*, 1996). Modelos mais avançados e robustos de controle, como o preditivo, podem apresentar melhor controle em bioprocessos, em que a dinâmica das culturas de microrganismos tem perfil não-linear em vários

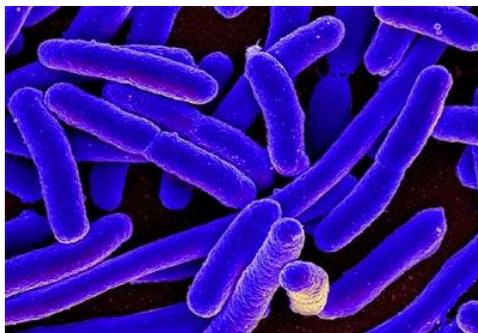
aspectos (ALFORD, 2006). Com isso Campani (2018) propôs a aplicação do controlador preditivo por matriz dinâmica (DMC) manipulando as vazões de ar e O₂ puro e a pressão no interior do biorreator.

2.2 *Escherichia coli* geneticamente modificada para produção de proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes produzidas a partir de culturas microbianas modificadas geneticamente tornaram-se uma boa opção para substituir a enorme quantidade de tecidos animais e vegetais ou fluidos biológicos para produção de baixa quantidade de proteínas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A escolha do microrganismo é feita de acordo com a viabilidade do cultivo e modificação genética do mesmo, em relação à produção da proteína de interesse.

Escherichia coli (FIGURA 2) é um bacilo Gram-negativo, sendo uma das bactérias mais difundidas na produção de proteínas recombinantes (GOPAL; KUMAR, 2013). Suas vantagens são o crescimento celular rápido, fácil cultivo, ampla caracterização metabólica e fácil manipulação genética (GOPAL; KUMAR, 2013; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Figura 2 – *Escherichia coli*.



Fonte: Jornal da USP¹.

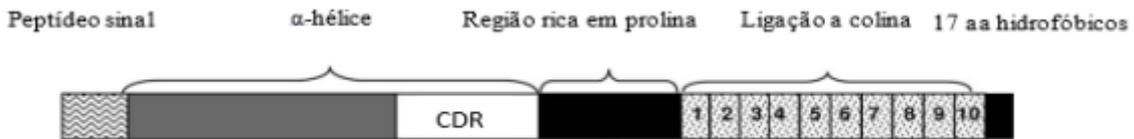
2.3 Proteína de superfície pneumocócica A (PspA)

PspA é uma proteína antigênica com grande variabilidade estrutural comumente encontrada nas cepas de isolados de pneumococo (MORENO, 2010; TOSTES, 2016). Cultivos de *E. coli* modificada geneticamente elevam a produtividade do bioprocessamento, sendo muito utilizado na

¹ Disponível em: <<https://jornal.usp.br/?p=21533>>. Acesso em: 09 set. 2022.

produção de proteínas recombinantes, como a PspA (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Sua estrutura é composta por quatro domínios (FIGURA 3): um domínio na região N-terminal em α -hélice, exposta à parede bacteriana; uma região rica em prolina, um domínio de ligação à colina na região C-terminal e uma pequena cauda hidrofóbica (MORENO, 2010; TOSTES, 2016).

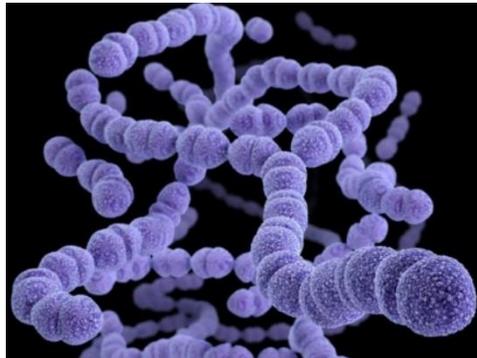
Figura 3 – Domínios na estrutura da PspA.



Fonte: Tostes (2016).

Estudos demonstraram que o PspA é capaz de induzir respostas de anticorpos, gerando imunidade de forma independente de sorotipo. Com relação a esta propriedade antigênica, tem estudos promissores na produção de vacinas, como a contra o *Streptococcus pneumoniae* (FIGURA 4), patógeno humano que matou 2,5 milhões em 2019 (BVSMS, 2021; MORENO, 2010).

Figura 4 – *Streptococcus pneumoniae*.



Fonte: Animo².

2.4 Controle de processos

² Disponível em: < <http://aminoapps.com/p/lkaag7> >. Acesso em: 09 set. 2022.

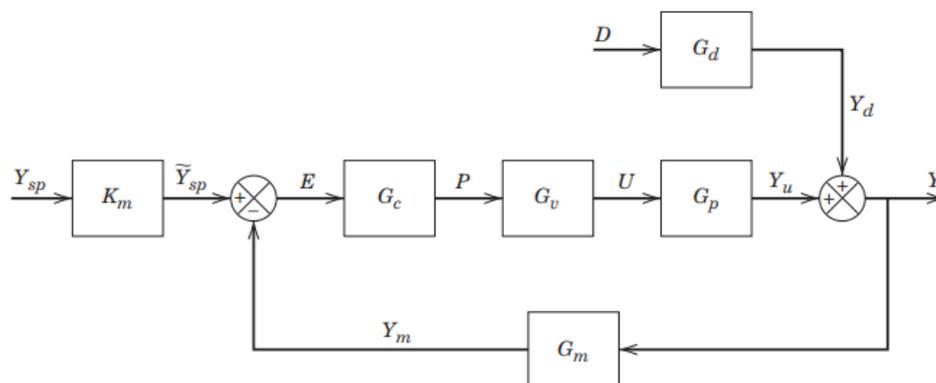
As evoluções tecnológicas ampliaram e melhoraram processos e produtos ao longo dos anos. Porém, fatores físicos, químicos e/ou biológicos podem afetar o rendimento, além do prejuízo econômico e, por vezes, ambiental. Desta forma há uma necessidade real de controlar os processos, feita por um profissional competente, seguindo as instruções de cada equipamento e exigência socioambiental. Stephanopoulos (1984) lista cinco exigências que devem ser monitoradas e controladas: segurança, especificações para qualidade do produto, respeito às leis e regulamentos ambientais, restrições operacionais e economia.

Uma característica fundamental em bioprocessos é a necessidade de manter alguns fatores controlados para que os microrganismos tenham condição de crescerem e gerarem o produto desejado. Um biorreator de tanque agitado e aerado, por exemplo, exige, no mínimo, os controles e/ou monitoramento de temperatura, pH, concentração de OD, vazão de ar, pressão interna, velocidade de agitação, nível, concentrações de O_2 e CO_2 no gás retirado e detecção de espuma (SCHMIDELL, 2021).

2.4.1 Malhas de controle

O processo com seu controlador, medidor e atuador compõem a chamada malha de controle. A malha é dita fechada (*closed-loop*) quando o processo é controlado. Já a malha aberta (*open-loop*) não contém o controle do processo (SEBORG *et al.*, 2016). As Figura 5 mostra um tipo de representação da malha, chamado de diagrama de blocos.

Figura 5 – Diagrama de blocos de malha fechada de um controlador *feedback* genérico.



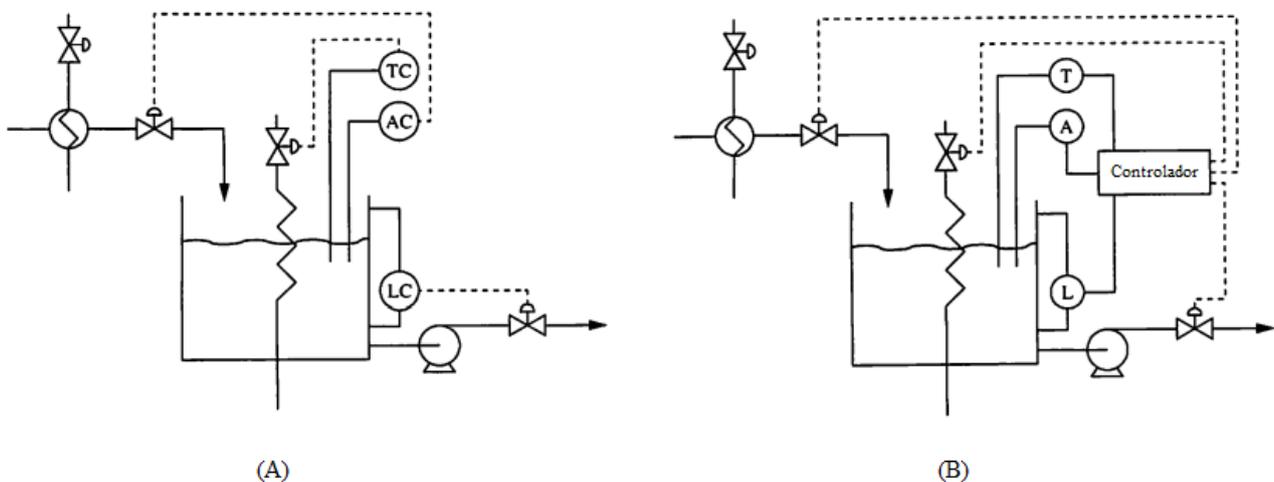
Legenda: A variável do processo (função de transferência G_p) Y_u é somada à perturbação Y_d , vinda de uma carga D com função G_d , para resultar na variável controlada Y . Esta é medida por um medidor (G_m) com

saída Y_m , e subtraída do valor de *set point* Y_{sp} para encontrar o erro E . O controlador (G_c) recebe o erro e emite um sinal P para o atuador (G_v). Este altera o valor final da variável manipulada U para o processo.

Fonte: Seborg *et al.* (2016)

A malha varia de acordo com a quantidade de variáveis manipuladas (variáveis de entrada) e de variáveis controladas (variáveis de saída). Sistemas com malha SISO (*single input single output*) têm o controlador relacionando uma manipulada e uma controlada (FIGURA 5). Sistemas multivariáveis (MIMO – *multiple input multiple output*) apresentam múltiplas variáveis de entrada e saída. Estes sistemas podem ser encontrados na forma de controle multimalha (*multiloop*) (FIGURA 6A), apresentando múltiplas malhas SISO, ou na forma de controle multivariável ou centralizado, em que um controlador apenas manipula e controla múltiplas variáveis (FIGURA 6B). Sistemas multivariáveis não necessitam ter a mesma quantidade de entradas e saídas, como o utilizado no presente trabalho, em que mais de uma variável de entrada controla apenas uma variável de saída, chamada de malha MISO (*multiple input single output*) (MARLIN, 2000).

Figura 6 – Exemplos de sistemas multivariáveis.



Legenda: (A) Malhas de controle de nível do tanque (LC), de composição (AC) e de temperatura (TC). (B) Controle multivariável de nível (L), composição (A) e temperatura (T).

Fonte: Adaptado de Marlin (2000).

2.4.2 Tipos de controladores

Os controladores mais comuns e simples, amplamente utilizados em processos industriais, são o PID (Proporcional - Integral - Derivativo), com suas variações de acordo com a ação de controle (P, PI, PD), e *on-off* (SEBORG *et al.*, 2016; STEPHANOPOULOS, 1984). Mais da metade

dos controladores em bioprocessos são PI (Proporcional – Integral) (ALFORD, 2006). Esses controladores são destinados a processos lineares ou aproximadamente lineares, o que não ocorre em alguns aspectos dos bioprocessos. Para isso, controladores devem ser formulados de formas mais avançadas e robustas.

Controladores adaptativos, inferenciais e preditivos são alguns tipos de controladores mais robustos, capazes de controlar processos não-lineares com maior qualidade e desempenho do que os clássicos. Os controladores preditivos são a técnica avançada mais utilizada nos processos industriais, por serem capazes de lidar com restrições nas variáveis (BEQUETTE, 2003).

2.4.2.1 PID (Proporcional – Integral – Derivativo)

O controlador clássico, dominante por muitas décadas, utiliza ações de controle proporcional, integral e derivativa (SEBORG *et al.*, 2016). A junção destas ações molda o controlador de acordo com a necessidade, desde o mais simples, o controlador P (proporcional) até o mais robusto, o PID (proporcional-integral-derivativo).

Controladores *feedback* partem do objetivo de diminuir a diferença entre o valor do *set point* e o valor medido da variável controlada. Ao longo do tempo o controlador busca manipular variáveis para que o valor da controlada não tenha diferença em relação ao *set point*, ou seja, que seu erro seja zero. Visto isso, a lei de controle PID representada pela Equação 2.1, com as ações de controle tomadas em paralelo (SEBORG *et al.*, 2016), traz a relação entre o erro e o valor de saída do controlador.

$$c(t) = \bar{c} + K_c \left[e(t) + \frac{1}{\tau_I} \int_0^t e(t) dt + \tau_D \frac{d(e(t))}{dt} \right] \quad (2.1)$$

Em que $c(t)$ é o valor do sinal da saída do controlador, \bar{c} o *bias* do controlador (quando o erro é zero), $e(t)$ é o erro entre a variável medida e o *set point*, K_c o ganho proporcional do controlador, τ_I a constante de tempo integral e τ_D a constante de tempo derivativa.

A lei de controle proporcional (controlador P), em que $\tau_I \rightarrow \infty$ e $\tau_D = 0$, ajusta a resposta de controle às variações do erro no tempo. É a mais simples, porém a variável controlada desvia do valor do *set point*, chamado de *offset* (ÅSTROM; HÄGGLUND, 2006; SEBORG *et al.*, 2016). Sistemas de controles de nível são exemplos de aplicação desta lei (CAMPOS; TEIXEIRA, 2006).

Adicionando-se a ação integral (controlador PI), isto é, $\tau_D = 0$ somente, elimina-se este *offset*, muito importante em alguns processos com controle de vazão e pressão (CAMPOS & TEIXEIRA, 2006).

A lei completa, PID, utiliza a ação derivativa para estabilizar as oscilações em processos lentos, porém ela é sensível a variáveis ruidosas, aumentando este ruído (ÅSTROM; HÄGGLUND, 2006; CAMPOS; TEIXEIRA, 2006; SEBORG *et al.*, 2016). Isto pode ser um problema para sistemas reais com presença de ruídos nas medidas e perturbações no processo, como representado neste trabalho com simulações estocásticas. Nestes casos em que a ação derivativa é um empecilho, a utilização de um controlador PI é uma opção.

Atualmente os controles são, em sua maioria, digitais, por conta do menor custo de aplicação computacional e flexibilidade (CAMPOS; TEIXEIRA, 2006; SEBORG *et al.*, 2016). Nelas os cálculos da derivada e integral da lei de controle (EQUAÇÃO 2.1) são substituídas por aproximações finitas. Duas alternativas de representar controladores digitais, a forma de posição e de velocidade, são exemplos desta aproximação. As leis de controle do PI e PID digital na forma de velocidade são apresentadas nas Equações 2.2 e 2.3, respectivamente (STEPHANOPOULOS, 1984).

$$\Delta u = K_c \left(1 + \frac{\Delta t}{\tau_I} \right) e_k - K_c e_{k-1} \quad (2.2)$$

$$\Delta u = K_c \left(1 + \frac{\Delta t}{\tau_I} + \frac{\tau_D}{\Delta t} \right) e_k - K_c \left(1 + \frac{2\tau_D}{\Delta t} \right) e_{k-1} + K_c \frac{\tau_D}{\Delta t} e_{k-2} \quad (2.3)$$

Em que a variação da variável manipulada (Δu) é relacionada com os parâmetros do controlador (K_c , τ_I e τ_D), sendo Δt o tempo amostral, e_k , e_{k-1} e e_{k-2} o erro nos instantes t_k , t_{k-1} e t_{k-2} , respectivamente.

A forma de velocidade apresenta algumas vantagens em relação à de posição como: não ocorre *reset windup* - saturação do controlador causado pela parte integral da Equação 2.1 ficar muito grande, devido à sustentação de um aumento do erro, enquanto na prática o atuador já alcançou seu máximo ou mínimo; facilidade de transferir o controlador do manual para o automático e passagem direta do valor da variação da variável de saída para o atuador (CAMPOS; TEIXEIRA, 2006; SEBORG *et al.*, 2016).

Os parâmetros do controlador (K_c , τ_I e τ_D) são sintonizados de acordo com o processo e método aplicado, seguindo seus passos de acordo com o encontrado na literatura. Um dos métodos encontrados, o método da curva de reação do processo, desenvolvido por Cohen e Coon, desliga o

controlador do atuador. Com esta malha aberta, envia-se uma variação do tipo degrau no atuador e observa-se o comportamento do sistema. Com os resultados obtidos e com as equações desenvolvidas por Cohen e Coon encontram-se os parâmetros do controlador (STEPHANOPOULOS, 1984).

Outro método conhecido é o desenvolvido por Ziegler e Nichols, em que com a malha do sistema é mantido fechado (sintonia online). Então, como forma de um processo de empírico, utiliza-se um controlador proporcional, aumentando seu ganho até encontrar o limite de estabilidade, em que o processo começa a oscilar. Com este valor de ganho e o período de oscilação encontram-se os parâmetros do controlador.

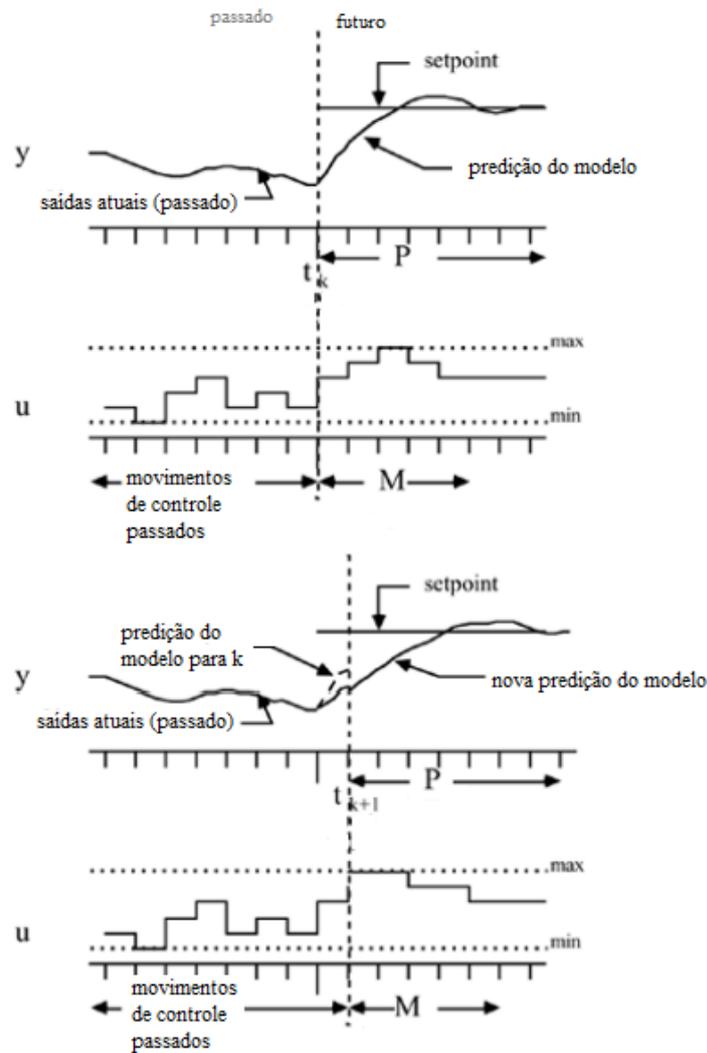
Para o bioprocessamento simulado deste trabalho, selecionou-se um controlador PI, indicado para sistemas com dinâmica rápida e medidas ruidosas, características presentes no controle de oxigênio dissolvido no sistema em estudo.

2.4.2.2 DMC (*controlador preditivo por matriz dinâmica*)

Avanços nos estudos de controle trouxeram controladores mais robustos. Os controladores preditivos são os mais utilizados nos processos industriais em relação às técnicas de controle mais avançadas (SEBORG *et al.*, 2016). A técnica preditiva consegue antever o(s) valor(es) da(s) variável(eis) de saída, desde que se tenha o modelo da dinâmica do processo e as variáveis medidas atuais. Desta forma pode-se orientar as mudanças nas variáveis manipuladas de acordo com os valores preditos, os medidos e as restrições impostas a cada variável de entrada (ou manipulada) e de saída (ou controlada), otimizando a chegada da variável controlada ao set point (SEBORG *et al.*, 2016).

Para os cálculos do controlador preditivo a partir de um instante $t_k \neq 0$, uma função objetivo dependente dos valores preditos até o horizonte de predição P é minimizada para encontrar os valores das variáveis manipuladas até seu horizonte de controle M de forma otimizadas. Após M, os valores das variáveis de entrada ficam constantes. No próximo instante (t_{k+1}), com os valores de entrada no instante t_k , refaz-se os valores preditos e os manipulados. Este procedimento é repetido a cada tempo de amostragem definido até o fim do processo (BEQUETTE, 2003; SEBORG *et al.*, 2016). A Figura 7 exemplifica graficamente uma variável manipulada u em resposta à variável controlada y nos instantes t_k e t_{k+1} .

Figura 7 – Representação dos conceitos básicos do controle preditivo.



Fonte: Adaptado de Bequette (2003).

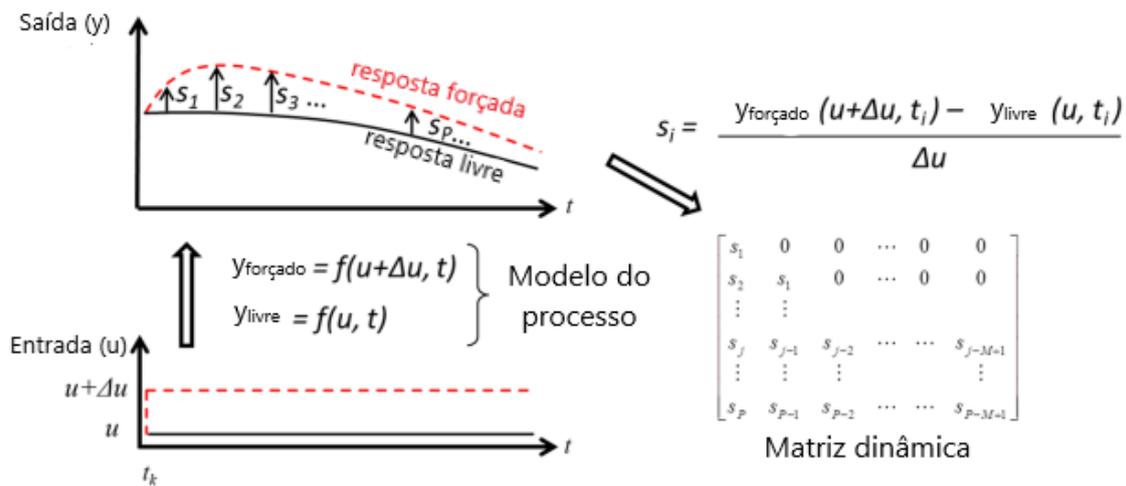
O controlador preditivo por matriz dinâmica (DMC) utiliza um modelo baseado em respostas ao degrau no sistema ao longo do tempo para prever a saída do processo. A Equação 2.3 representa a previsão um passo à frente (BEQUETTE, 2003).

$$\hat{y}_{k+1} = \sum_{i=1}^{N-1} s_i \Delta u_{k-i+1} + s_N u_{k-N+1} \quad (2.3)$$

Em que \hat{y}_{k+1} é o valor predito no instante t_{k+1} , Δu_{k-i+1} e u_{k-N+1} é a variável manipulada $i-1$ e $N-1$ passos anteriores, respectivamente, e s_i e s_N os coeficientes da resposta ao degrau nos instantes t_i e t_N , respectivamente.

O parâmetro s_i é definido como a variação da resposta da variável y ao degrau aplicado na variável manipulada (Δu) no instante t_i (BEQUETTE, 2003; SEBORG *et al.*, 2016). Para melhor explicação, a Figura 8 representa esta definição.

Figura 8 – Processo de cálculo do coeficiente da resposta ao degrau s_i .



Legenda: A partir do modelo do processo, os valores da resposta livre de ações de controle (y_{livre}) e da controlada por um degrau em u ($y_{forçada}$) são calculados. O coeficiente s_i representa o valor da resposta de y (diferença entre a saída com e sem ação de controle) em relação ao Δu .

Fonte: Adaptado de Campani *et al.* (2019).

Reajustando a Equação 2.3, como mostrado por Seborg *et al.* (2016), consegue-se separá-la em efeitos de ação no instante presente (t_k) e nos instantes passados ($t_i < t_k$). Ao aumentar o instante da predição, o modelo passa a apresentar os efeitos das ações futuras juntamente com as da Equação 2.3. Como exemplo, a predição j passos à frente é apresentada pelas Equações 2.4 e 2.5 (SEBORG *et al.*, 2016).

$$\hat{y}_{k+j} = \underbrace{\sum_{i=1}^{j-1} s_i \Delta u_{k-i+j}}_{\text{Efeito das ações futuras}} + \underbrace{s_j \Delta u_k}_{\text{Efeito da ação presente}} + \underbrace{\sum_{i=j+1}^{N-1} s_i \Delta u_{k-i+j} + s_N u_{k-N+1}}_{\text{Efeito das ações passadas}} \quad (2.4)$$

$$\hat{y}_{k+j} = \hat{y}_{k+j}^f + \sum_{i=1}^j s_i \Delta u_{k-i+j} \quad (2.5)$$

As ações passadas são livres das ações do controle atual, conhecida como resposta livre (\hat{y}_{k+j}^f), enquanto as ações presente e futuras são a resposta forçada (BEQUETTE, 2003). Com

múltiplas previsões, até o horizonte de previsão P , com M ações de controle, pode-se representar com notação matricial conforme a Equação 2.6.

$$(2.6) \quad \begin{bmatrix} \hat{y}_{k+1} \\ \hat{y}_{k+2} \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+j} \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+P} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{y}_{k+1}^f \\ \hat{y}_{k+2}^f \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+j}^f \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+P}^f \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ S_2 & S_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \vdots & \vdots \\ S_j & S_{j-1} & S_{j-2} & \dots & \dots & S_{j-M+1} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \dots & \vdots \\ S_P & S_{P-1} & S_{P-2} & \dots & \dots & S_{P-M+1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta u_k \\ \Delta u_{k+1} \\ \vdots \\ \Delta u_{k+M-2} \\ \Delta u_{k+M-1} \end{bmatrix} = \hat{Y}_f + S\Delta u$$

Em que \hat{Y}_f é o vetor de resposta livre, S a matriz dinâmica e Δu o vetor da variável manipulada.

Considerando as diferenças entre o *set point* Y_{sp} e as saídas \hat{Y} e \hat{Y}_f , insere-se o erro predito (E) e o erro não forçado (E_f) (EQUAÇÃO 2.7).

$$Y_{sp} - \hat{Y} = Y_{sp} - \hat{Y}_f - S\Delta u \therefore E = E_f - S\Delta u \quad (2.7)$$

A função objetivo utilizada é na forma quadrática, sendo a soma dos erros preditos (E) e a soma das mudanças no controle (Δu) com um peso atrelado a cada. Esta função Φ na forma matricial é apresentada pela Equação 2.8.

$$\Phi = E^T E + \Delta u^T W \Delta u \quad (2.8)$$

Em que W é a matriz peso, de dimensões $M \times M$.

O erro predito E é substituído pela Equação 2.7. Minimizando esta equação, ou seja, derivando-a em relação a Δu e igualando a zero, encontra-se a solução para a minimização da função objetivo (EQUAÇÃO 2.9).

$$\Delta u = (S^T S + W)^{-1} S^T E_f \quad (2.9)$$

Deste vetor Δu calculado, somente o primeiro valor calculado é utilizado, reiniciando os cálculos. Estas definições são para uma malha SISO. Através deles pode-se encontrar as definições

para malha MISO pelo Princípio da Superposição (SEBORG *et al.*, 2016). Desta forma a equação de solução é semelhante, mudando apenas as dimensões de Δu , S e W , de acordo com a quantidade m de variáveis manipuladas (Equações 2.10, 2.11 e 2.12, respectivamente).

$$\begin{bmatrix} \Delta u_k \\ \Delta u_{k+1} \\ \vdots \\ \Delta u_{k+M-2} \\ \Delta u_{k+M-1} \end{bmatrix}, \Delta u_{k+j} = \begin{bmatrix} \Delta u_{1,k+j} \\ \Delta u_{2,k+j} \\ \vdots \\ \Delta u_{m,k+j} \end{bmatrix} \quad (2.10)$$

$$\begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ S_2 & S_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & & & & \\ S_j & S_{j-1} & S_{j-2} & \dots & \dots & S_{j-M+1} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & & \vdots \\ S_P & S_{P-1} & S_{P-2} & \dots & \dots & S_{P-M+1} \end{bmatrix}, S_i = [S_{1,i} \quad S_{2,i} \quad \dots \quad S_{m,i}], i = 1, 2, \dots, P - M + 1 \quad (2.11)$$

$$\begin{bmatrix} W & 0 & 0 & 0 \\ 0 & W & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & W \end{bmatrix}, W = \begin{bmatrix} w_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & w_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & w_m \end{bmatrix} \quad (2.12)$$

3 METODOLOGIA

A realização do estudo do problema de controle regulatório (*set point* constante, com presença de perturbações no processo) do OD *in silico* pelo software MATLAB passou pela implementação do modelo matemático do processo obtido da literatura e pelo desenvolvimento e aplicação do controlador DMC/MISO. Os dados obtidos de desempenho dos diferentes controladores (PI, DMC/SISO e DMC/MISO) foram comparados estatisticamente para definição do melhor controlador.

3.1 Dados experimentais e modelagem matemática do processo

Campani (2018) desenvolveu o modelo matemático para representar a dinâmica do bioprocesso. Este é dividido em duas fases: a fase de crescimento, período de multiplicação celular e aumento da concentração de *E. coli* geneticamente modificada, e a fase de indução, em que há indução da bactéria para produção de PspA.

O autor obteve os dados através de cultivos de *E. coli* sem e com indução da produção de PspA em tanque agitado (5 L), variando a temperatura em 27, 32 e 37°C. A caracterização da transferência de oxigênio (OTR – *Oxygen Transfer Rate*, em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (EQUAÇÃO 3.1), e validação de seu modelo, juntamente com a do modelo de taxa de consumo específica (q_{O_2} , em h^{-1}) foram realizadas pelo cultivo em biorreator *airlift* (5 L). A taxa de consumo (OUR – *Oxygen Uptake Rate*, em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (EQUAÇÃO 3.2) é calculada pela multiplicação da taxa de consumo específica q_{O_2} pela concentração celular C_X (g.L^{-1}). A subtração das taxas de transferência e consumo de O_2 equivale à taxa de variação da concentração de OD (g.L^{-1}) (EQUAÇÃO 3.3).

Utilizando em conjunto relações empíricas e balanços materiais, Campani (2018) representou a dinâmica das cinéticas de crescimento celular (EQUAÇÃO 3.4), de consumo de glicerol (substrato) (EQUAÇÃO 3.5) e de formação de produto (PspA) (EQUAÇÃO 3.6). Suas concentrações são representadas por C_X , C_S e C_P (g.L^{-1}), respectivamente. A validação dos modelos foi feita por dados obtidos do cultivo no biorreator *airlift*.

As velocidades específicas de crescimento celular (μ) (EQUAÇÃO 3.7) e de produção de PspA (μ_p) (EQUAÇÃO 3.8), em h^{-1} , tiveram suas equações obtidas por relações empíricas adaptadas da literatura. Adicionada na fase de indução, a perda de viabilidade celular (μ_m , em h^{-1}) (EQUAÇÃO 3.9), proporcional à temperatura, foi introduzida para expressar os efeitos de estresse

no metabolismo celular como consequência da síntese da proteína recombinante. Nesta fase, o crescimento celular também é afetado pela produção intracelular de PspA, também representada na Equação 3.7 quando é iniciada a indução.

$$OTR = \frac{k_L a}{1 + \exp\left[-b_k \left(\frac{Q_{ar} + Q_{O_2}}{V} - c_k\right)\right]} \theta^{(T-27)} (\varepsilon OD^* - OD) \quad (3.1)$$

$$OUR = \left[\frac{\mu}{Y_{X/O_2}} + \frac{m_{O_2}(T)}{(a_q \cdot T^3 + b_q)} \right] C_X \quad (3.2)$$

$$\frac{dOD}{dt} = OTR - OUR \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu - \mu_m) C_X \quad (3.4)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} C_X \quad (3.5)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \mu_P C_X \quad (3.6)$$

$$\mu = \begin{cases} (a_\mu \cdot T + b_\mu) \frac{C_S}{K_S + C_S}, & t < t_{ind} \\ (a_\mu \cdot T + b_\mu) \frac{C_S}{K_S + C_S} \exp\left[-\beta \frac{C_P}{C_X} (T - T_{ref})\right], & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (3.7)$$

$$\mu_P = \begin{cases} 0, & t < t_{ind} \\ \mu \frac{C_P}{C_X} + \frac{1}{T_{PX}} \left(k_m \mu - \frac{C_P}{C_X}\right), & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (3.8)$$

$$\mu_m = \begin{cases} 0, & t < t_{ind} \\ (a_{\mu m} \cdot T + b_{\mu m}), & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (3.9)$$

Em que T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$); a_k (h^{-1}), b_k (min), c_k (min^{-1}), a_q ($^{\circ}\text{C}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), b_q (h^{-1}), a_μ ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$), b_μ (h^{-1}), $a_{\mu m}$ ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$), $b_{\mu m}$ (h^{-1}), θ (adimensional), β ($^{\circ}\text{C}^{-1}$), k_m ($\text{g}_P \cdot \text{g}_{\text{ms}}^{-1} \cdot \text{h}$), T_{PX} (h), T_{ref} ($^{\circ}\text{C}$), ε (fator de correção, adimensional), Y_{X/O_2} (coeficiente de conversão de O_2 a células, $\text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{g}_{\text{O}_2}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), $Y_{X/S}$ (coeficiente de conversão de substrato a células, $\text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{g}_S^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) são parâmetros empíricos; K_S a constante de Monod ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); $k_L a$ o coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1}); m_{O_2} o coeficiente de consumo de O_2 para manutenção celular (h^{-1}); OD^* a solubilidade média de oxigênio no meio ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); V o volume do reator (L) e t o tempo de processo (h), sendo t_{ind} (h) o tempo de início da indução celular para produção de PspA.

3.2 Controle de OD

O controlador multivariável manipula em conjunto as três variáveis supracitadas, a fim de controlar o oxigênio dissolvido no sistema próximo a 30% da saturação do meio, como proposto por Campani (2018).

3.2.1 Variáveis de entrada e saída

Campani (2018) propôs o controle de OD do biorreator através da manipulação da vazão de ar, pressão e composição de O₂, sendo este feito pelo enriquecimento do ar, diminuindo a vazão de ar e aumentando a de O₂ puro na mesma proporção. Esta é calculada através da derivação parcial da equação do cálculo de composição, resultada na Equação 3.10.

$$\Delta Q = \frac{(Q_{ar} + Q_{O_2}) \cdot \Delta y_{O_2}}{0,79} \quad (3.10)$$

Em que ΔQ é a variação da vazão (L/min), Q_{ar} e Q_{O_2} as vazões de ar e O₂ puro, respectivamente (L/min), e Δy_{O_2} o degrau aplicado à fração molar de O₂ no gás de alimentação.

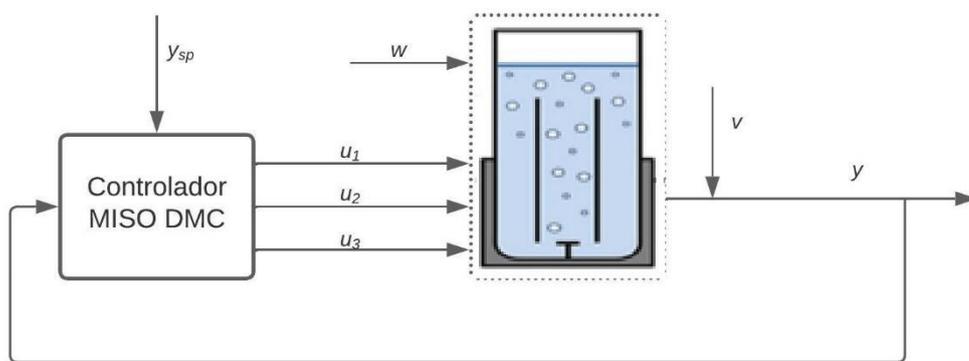
Para fazer a comparação entre os controladores PI, DMC/SISO e DMC/MISO manteve-se as mesmas variáveis de entrada (Q_{ar} , P e Q_{O_2}) para controlar a concentração de oxigênio dissolvido (variável de saída).

As restrições às variáveis manipuladas foram baseadas nos estudos de Campani (2018) e Campani et al. (2019) no biorreator *airlift*, que constaram que em pressões até 4 bar aumenta a transferência de O₂ e que com vazão de gás (ar e O₂ puro em conjunto) acima de 20 L/min aumenta a formação de espuma, reduzindo capacidade de transferência de O₂. Assim a pressão foi limitada de 1 a 4 bar e a vazão de gás ($Q_{ar} + Q_{O_2}$) até 20 L/min, sendo estes os limites para cada vazão de gás (ar e O₂ puro) de 0 a 20 L/min.

3.2.2 Esquema do controlador DMC/MISO

Como citado, o controlador DMC/MISO manipula simultaneamente a vazão de ar, pressão e a composição de O_2 pelo enriquecimento do ar com O_2 puro (manipulação de vazão do ar e do O_2 puro). A Figura 9 é o diagrama deste controlador empregado no biorreator *in silico*.

Figura 9 – Diagrama de blocos do controlador DMC/MISO.



Legenda: y é a variável medida (concentração de OD), y_{sp} o valor do *set point*, w é a perturbação no processo, v o ruído na medição, u_1 , u_2 e u_3 as variáveis manipuladas Q_{ar} , P e Q_{O_2} , respectivamente.

Fonte: Do autor (2022).

3.2.3 Matriz peso (W)

Uma das avaliações neste trabalho foi o desempenho do controlador multivariável frente a diferentes valores de w na matriz peso W (Equação 2.8). Adotou-se o mesmo w para todas as variáveis de entrada, optando pela escolha dos valores através de uma Progressão Geométrica (PG) com razão de 10 a fim de explorar uma ampla faixa de valores.

Observando graficamente o comportamento do controle de OD através de variações na matriz W , escolheu-se os seguintes valores iniciais e finais da PG: 10^{-2} e 10^8 para a fase de crescimento; 10^{-2} e 10^9 para a fase de indução.

3.3 Avaliação de desempenho: *RMSE* e *RMCM*

As simulações estocásticas para o controlador DMC/MISO com os pesos indicados anteriormente foram realizadas em quintuplicata, considerando ruído nas medidas (baseado em conhecimento prévio) e perturbações no processo, estimadas a partir da incerteza na determinação paramétrica dos modelos matemáticos, especificamente na constante de Monod, conforme descrito por Campani *et al.* (2019). Em cada simulação buscou-se quantificar o erro entre a variável medida e o set point, bem como a amplitude de atuação, a fim de quantificar indiretamente o desgaste em cada atuador (atuações com elevadas amplitudes podem levar a um desgaste prematuro do atuador). Para isso, utilizou-se o *RMSE* (*Root Mean Squared Error*) para o desempenho do controlador (EQUAÇÃO 3.11). Uma adaptação desta fórmula foi usada como uma forma de quantificar a amplitude média de atuação e, indiretamente, o desgaste nas válvulas de manipulação de Q_{ar} , P e Q_{O_2} , parâmetro esse chamado de *RMCM* (*Root Mean Squared Control Move*) (EQUAÇÃO 3.12).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - y_{sp})^2} \quad (3.11)$$

$$RMCM = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (u_i - u_{i-1})^2} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\Delta u)^2} \quad (3.12)$$

Em que n é o número de amostras, y_i a concentração de OD medida, y_{sp} o valor do *set point* para a concentração de OD, u_i e u_{i-1} a variável manipulada nos instantes i e $i-1$, respectivamente, com Δu sendo sua variação.

O *RMSE* mostra o erro (diferença entre o valor medido e o valor desejado) médio ao longo do processo. Assim um menor valor corresponde a um melhor desempenho do controlador. De forma semelhante é a análise do *RMCM*, que representa a quantidade média de variação das variáveis manipuladas. Como o controlador utiliza um modelo de resposta em degrau ao sistema (Δu), este próprio quantifica as variações no atuador ao longo do processo. Assim um menor valor de *RMCM* mostra uma atuação menos brusca, gerando um menor desgaste no atuador.

A simulação do bioprocesso para o DMC/MISO com as diferentes matrizes W , o DMC/SISO e o PI foram feitas em quintuplicata. Os valores médios e seus desvios foram calculados e comparados estatisticamente.

A análise de variância permite comparar as médias de duas ou mais populações, levando em consideração as variações entre as diferentes populações (tratamentos) e as variações ao acaso

dentro da mesma população. Porém, para mais de dois tratamentos ela não é capaz de dizer quais se diferem estatisticamente, garantindo somente se há ou não diferença entre elas (VIEIRA, 1980). O teste de Tukey é capaz de relatar quais médias são diferentes ao nível de significância (α) escolhido. Para isso deve-se calcular a diferença mínima significativa (*d.m.s.*), estabelecendo o menor valor da diferença absoluta entre médias de dois tratamentos que se considera estatisticamente significativa, de acordo com o α escolhido. A Equação 3.13 mostra como o *d.m.s.* é calculado para tratamentos com o mesmo número de repetições.

$$d. m. s. = q \sqrt{\frac{QMR}{r}} \quad (3.13)$$

Em que *QMR* é o quadrado médio residual, *r* o número de repetições nos tratamentos e *q* é um valor tabelado de acordo com o número de tratamentos e os graus de liberdade no resíduo. Os valores de *QMR* e os graus de liberdade no resíduo foram obtidos pela análise de variância feita com a ferramenta de Análise de Dados do Excel. A tabela de valores de *q* foi apresentada por Vieira (1980). Caso o valor da diferença absoluta entre duas médias fosse maior ou igual ao *d.m.s.* pode-se concluir que as médias comparadas são estatisticamente diferentes ao nível de significância determinado.

O teste de Tukey foi aplicado para encontrar a matriz peso *W* que ofereceu o melhor desempenho estatisticamente para o controlador DMC/MISO e o comparar com os controladores PI e DMC/SISO. O critério principal para a avaliação do desempenho foi o \overline{RMSE} (*RMSE* médio). Caso o teste não encontrasse diferença estatística nas médias comparadas, o próximo critério foi o desgaste nos atuadores, pela comparação dos \overline{RMCM} (*RMCM* médios). Em ambos os critérios, caso apresentada diferença estatística, o menor valor médio foi o escolhido.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação de desempenho dos controladores foi utilizada o \overline{RMSE} . Para a avaliação dos atuadores foi utilizada uma adaptação do \overline{RMSE} , chamada de \overline{RMCM} . As simulações foram realizadas em quintuplicatas. A comparação dos desempenhos foi feita estatisticamente pelo teste de Tukey.

A comparação principal foi feita em relação ao desempenho do controlador. Caso os valores fossem estatisticamente iguais foram utilizadas as comparações em relação ao atuador.

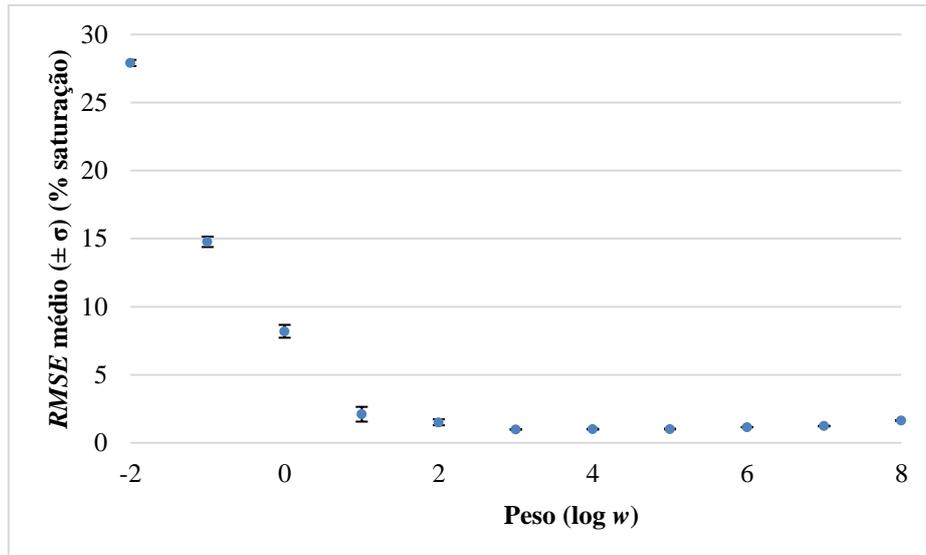
4.1 Comparação da matriz peso

A matriz peso W do DMC/MISO foi formada com o mesmo peso para todas as variáveis manipuladas (matriz diagonal com pesos w iguais, Equação 4.1). Os valores foram escolhidos por uma PG de razão 10 para encontrar os limites de peso que controlassem o processo. As análises estatísticas foram feitas com nível de significância de 5%.

$$W = \begin{bmatrix} w & 0 & 0 & 0 \\ 0 & w & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & w \end{bmatrix} \quad (4.1)$$

4.1.1 Fase de crescimento

Na fase de crescimento testou-se os pesos w de 10^{-2} a 10^8 . A Figura 4.1 mostra os resultados médios do desempenho do DMC/MISO, com seus erros representados por barras. A partir destes pesos buscou-se encontrar os limites inferior e superior dos valores da matriz peso W .

Figura 10 – \overline{RMSE} do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.

Fonte: Do autor (2022).

Com os valores dos \overline{RMSE} , montou-se diferentes pares de médias e comparou suas diferenças absolutas com o *d.m.s.* de 0,568, calculado pelo teste de Tukey. Os valores acima deste estão representados com asterisco na Tabela 1.

Tabela 1 – Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de crescimento (Continua).

Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^{-2} e 10^{-1}	13,143*	10^0 e 10^1	6,092*	10^2 e 10^7	0,277
10^{-2} e 10^0	19,716*	10^0 e 10^2	6,684*	10^2 e 10^8	0,130
10^{-2} e 10^1	25,807*	10^0 e 10^3	7,214*	10^3 e 10^4	0,022
10^{-2} e 10^2	26,400*	10^0 e 10^4	7,191*	10^3 e 10^5	0,036
10^{-2} e 10^3	26,929*	10^0 e 10^5	7,178*	10^3 e 10^6	0,172
10^{-2} e 10^4	26,907*	10^0 e 10^6	7,042*	10^3 e 10^7	0,252
10^{-2} e 10^5	26,893*	10^0 e 10^7	6,962*	10^3 e 10^8	0,659*
10^{-2} e 10^6	26,757*	10^0 e 10^8	6,555*	10^4 e 10^5	0,014
10^{-2} e 10^7	26,677*	10^1 e 10^2	0,593*	10^4 e 10^6	0,150
10^{-2} e 10^8	26,270*	10^1 e 10^3	1,122*	10^4 e 10^7	0,230
10^{-1} e 10^0	6,573*	10^1 e 10^4	1,100*	10^4 e 10^8	0,637*
10^{-1} e 10^1	12,665*	10^1 e 10^5	1,086*	10^5 e 10^6	0,136
10^{-1} e 10^2	13,257*	10^1 e 10^6	0,950*	10^5 e 10^7	0,216
10^{-1} e 10^3	13,787*	10^1 e 10^7	0,870*	10^5 e 10^8	0,623*

Tabela 1 – Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de crescimento (Conclusão).

Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de Médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^{-1} e 10^4	13,764*	10^1 e 10^8	0,463	10^6 e 10^7	0,080
10^{-1} e 10^5	13,751*	10^2 e 10^3	0,529	10^6 e 10^8	0,487
10^{-1} e 10^6	13,614*	10^2 e 10^4	0,507	10^7 e 10^8	0,407
10^{-1} e 10^7	13,534*	10^2 e 10^5	0,493		
10^{-1} e 10^8	13,128*	10^2 e 10^6	0,357		

Fonte: Do autor (2022).

O teste mostrou que os pesos inferiores a 10^2 e superiores a 10^7 são diferentes estatisticamente. Por serem maiores que o restante dos valores e, conseqüentemente, não controlarem adequadamente o OD, eles foram eliminados da comparação.

Os pesos restantes (de 10^2 a 10^7) tiveram seus desempenhos comparados estatisticamente (TABELA 2). O valor do *d.m.s.* foi de 0,181.

Tabela 2 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMSE} na fase de crescimento.

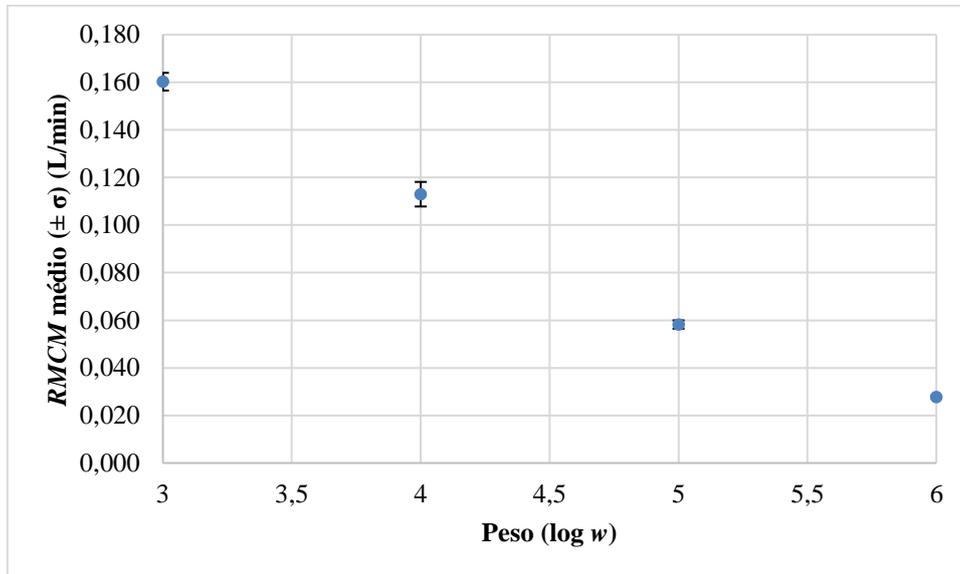
Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^2 e 10^3	0,529*	10^2 e 10^7	0,277*
10^3 e 10^4	0,022	10^3 e 10^5	0,036
10^4 e 10^5	0,014	10^3 e 10^6	0,172
10^5 e 10^6	0,136	10^3 e 10^7	0,252*
10^6 e 10^7	0,080	10^4 e 10^6	0,150
10^2 e 10^4	0,507*	10^4 e 10^7	0,230*
10^2 e 10^5	0,493*	10^5 e 10^7	0,216*
10^2 e 10^6	0,357*		

Fonte: Do autor (2022).

Pela Tabela 2 foi possível averiguar que inicialmente o módulo da diferença entre 10^2 e 10^3 foi acima do *d.m.s.*, mas conforme o peso foi aumentando esta diferença foi diminuindo, exceto entre 10^5 e 10^6 , ponto em que o \overline{RMSE} começou a aumentar. Comparados com os outros controladores DMC/MISO, os com peso de 10^2 e 10^7 tiveram os valores de \overline{RMSE} maiores estatisticamente. Estes controladores foram inferiores em desempenho e, portanto, retirados da

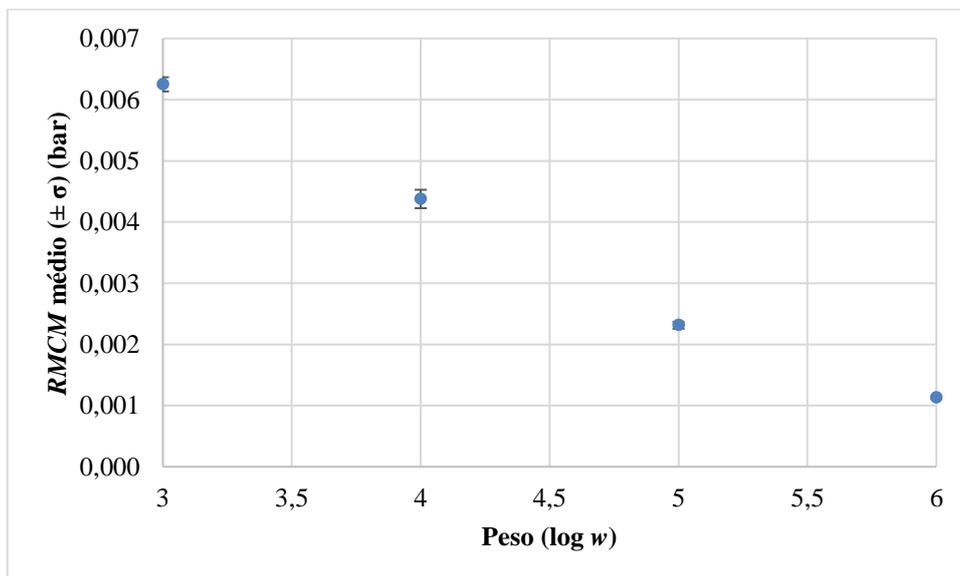
seleção. O restante dos controladores teve seus \overline{RMCM} de cada atuador comparados. As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os \overline{RMCM} de cada controlador em cada atuador.

Figura 11 – \overline{RMCM} (Q_{ar}) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.



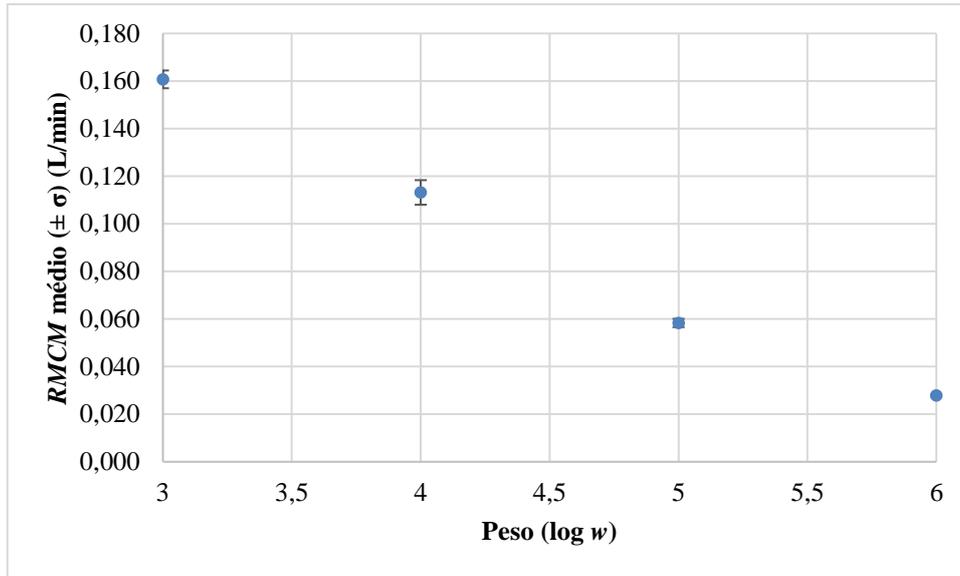
Fonte: Do autor (2022).

Figura 12 – \overline{RMCM} (P) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 13 – \overline{RMCM} (Q_{O_2}) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de crescimento.



Fonte: Do autor (2022).

Aplicou-se o teste de Tukey em cada atuação (*d.m.s.* de 0,0060, 0,0002 e 0,0060 para Q_{ar} , P e Q_{O_2} , respectivamente). As comparações entre os \overline{RMCM} mostraram que todos são estatisticamente diferentes entre si nos três atuadores, conforme apresentado na Tabela 3, com os valores maiores do que os *d.m.s.* destacadas com asterisco.

Tabela 3 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMCM} na fase de crescimento.

Par de médias	Valor absoluto da diferença		
	Q_{ar} (L/min)	P (bar)	Q_{O_2} (L/min)
10^3 e 10^4	0,047*	0,002*	0,048*
10^4 e 10^5	0,055*	0,002*	0,055*
10^5 e 10^6	0,030*	0,001*	0,031*
10^3 e 10^5	0,102*	0,004*	0,102*
10^3 e 10^6	0,133*	0,005*	0,133*
10^4 e 10^6	0,085*	0,003*	0,085*

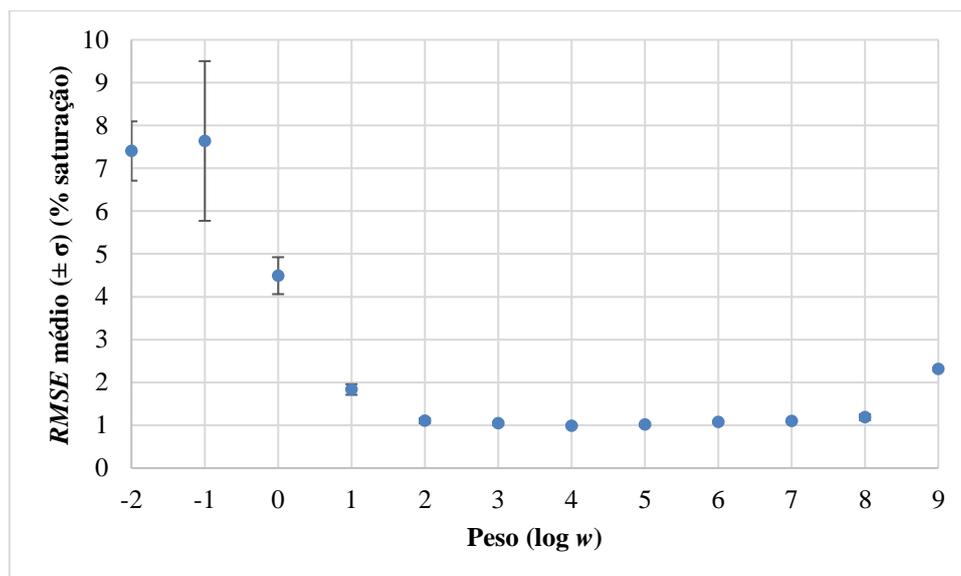
Fonte: Do autor (2022).

Um valor menor de $RMCM$ representa um desgaste menor no atuador, tornando o controlador economicamente mais viável. Como no teste estatístico todas as médias foram diferentes, optou-se pelo controlador com menor valor. O DMC/MISO com peso de 10^6 obteve os menores valores de \overline{RMCM} para todos os atuadores. Desta forma pôde-se afirmar com 95% de confiança que o DMC/MISO com peso de 10^6 obteve o melhor desempenho na faixa escolhida.

4.1.2 Fase de indução

Os valores do \overline{RMSE} da fase de indução dos pesos de 10^{-2} a 10^9 estão representados na Figura 14.

Figura 14 – \overline{RMSE} do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.



Fonte: Do autor (2022).

Como feito na fase de crescimento, as diferenças de pares de médias foram comparadas em relação ao *d.m.s.* de 1,260 (TABELA 4).

Tabela 4 – Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de indução (Continua).

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^{-2} e 10^{-1}	0,235	10^{-1} e 10^2	6,532*	10^0 e 10^8	3,306*
10^{-1} e 10^0	3,145*	10^{-1} e 10^3	6,595*	10^1 e 10^3	0,793
10^0 e 10^1	2,658*	10^{-1} e 10^4	6,649*	10^1 e 10^4	0,846
10^1 e 10^2	0,729	10^{-1} e 10^5	6,624*	10^1 e 10^5	0,821
10^2 e 10^3	0,063	10^{-1} e 10^6	6,562*	10^1 e 10^6	0,759
10^3 e 10^4	0,054	10^{-1} e 10^7	6,541*	10^1 e 10^7	0,738
10^4 e 10^5	0,025	10^{-1} e 10^8	6,450*	10^1 e 10^8	0,648
10^5 e 10^6	0,062	10^{-1} e 10^9	5,326*	10^2 e 10^4	0,117

Tabela 4 - Teste de Tukey: \overline{RMSE} limites na fase de indução (Conclusão).

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^6 e 10^7	0,021	10^0 e 10^9	2,181*	10^2 e 10^5	0,092
10^7 e 10^8	0,091	10^1 e 10^9	0,477	10^2 e 10^6	0,030
10^8 e 10^9	1,125	10^2 e 10^9	1,206	10^2 e 10^7	0,009
10^{-2} e 10^0	2,910*	10^3 e 10^9	1,270*	10^2 e 10^8	0,082
10^{-2} e 10^1	5,568*	10^4 e 10^9	1,323*	10^3 e 10^5	0,029
10^{-2} e 10^2	6,297*	10^5 e 10^9	1,299*	10^3 e 10^6	0,034
10^{-2} e 10^3	6,361*	10^6 e 10^9	1,236	10^3 e 10^7	0,054
10^{-2} e 10^4	6,414*	10^7 e 10^9	1,215	10^3 e 10^8	0,145
10^{-2} e 10^5	6,390*	10^0 e 10^2	3,387*	10^4 e 10^6	0,087
10^{-2} e 10^6	6,327*	10^0 e 10^3	3,451*	10^4 e 10^7	0,108
10^{-2} e 10^7	6,306*	10^0 e 10^4	3,504*	10^4 e 10^8	0,199
10^{-2} e 10^8	6,216*	10^0 e 10^5	3,480*	10^5 e 10^7	0,083
10^{-2} e 10^9	5,091*	10^0 e 10^6	3,417*	10^5 e 10^8	0,174
10^{-1} e 10^1	5,803*	10^0 e 10^7	3,396*	10^6 e 10^8	0,112

Fonte: Do autor (2022).

Dadas as diferenças destacadas com asterisco, concluiu-se que controladores com peso abaixo de 10^1 e acima de 10^8 o valor do \overline{RMSE} difere-se estatisticamente dos demais ($\alpha = 0,05$), com um desempenho inferior (média maior do que dos demais). Desta forma eles foram descartados e o restante foi novamente comparado. O *d.m.s.* para o restante foi de aproximadamente 0,119. A Tabela 5 apresenta o módulo das diferenças dos \overline{RMSE} , em que os valores acima do valor do *d.m.s.* encontram-se com asterisco.

Tabela 5 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMSE} na fase de indução (Continua).

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^1 e 10^2	0,729*	10^2 e 10^5	0,092
10^2 e 10^3	0,063	10^2 e 10^6	0,030
10^3 e 10^4	0,054	10^2 e 10^7	0,009
10^4 e 10^5	0,025	10^2 e 10^8	0,082
10^5 e 10^6	0,062	10^3 e 10^5	0,029
10^6 e 10^7	0,021	10^3 e 10^6	0,034

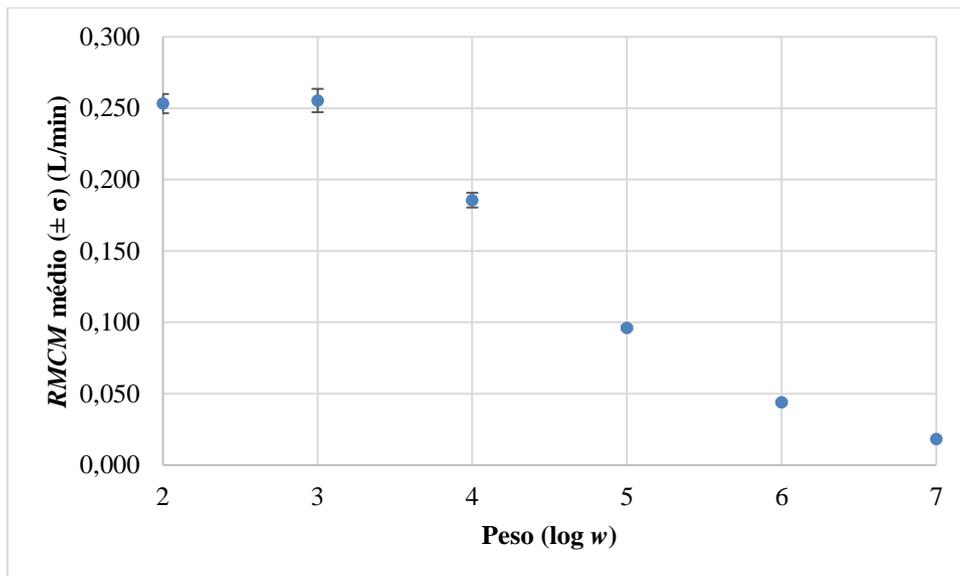
Tabela 5 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMSE} na fase de indução (Conclusão).

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)	Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
10^7 e 10^8	0,091	10^3 e 10^7	0,054
10^1 e 10^3	0,793*	10^3 e 10^8	0,145*
10^1 e 10^4	0,846*	10^4 e 10^6	0,087
10^1 e 10^5	0,821*	10^4 e 10^7	0,108
10^1 e 10^6	0,759*	10^4 e 10^8	0,199*
10^1 e 10^7	0,738*	10^5 e 10^7	0,083
10^1 e 10^8	0,648*	10^5 e 10^8	0,174*
10^2 e 10^4	0,117	10^6 e 10^8	0,112

Fonte: Do autor (2022).

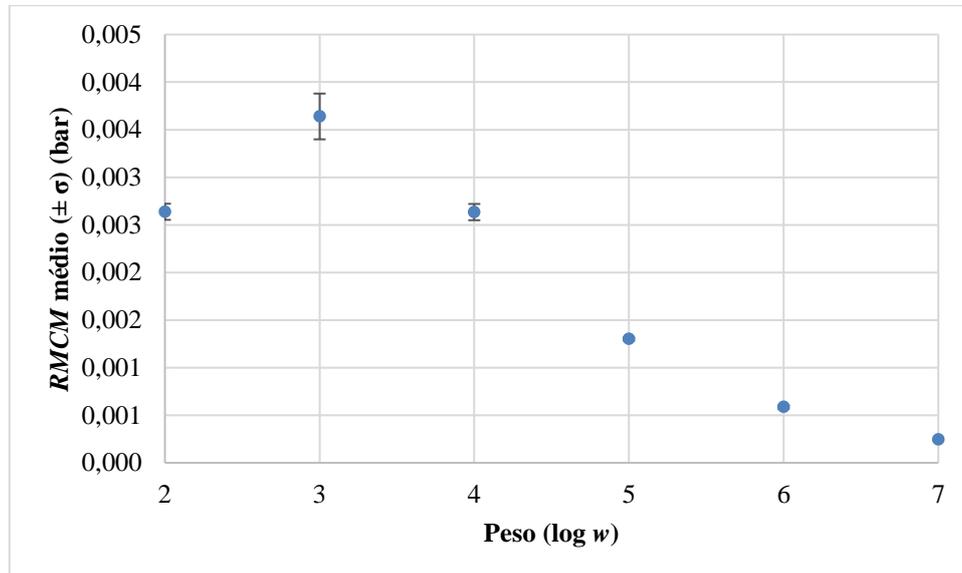
Analisando os resultados, pôde-se observar que a diferença dos \overline{RMSE} vai diminuindo com o aumento do peso, até chegar a 10^5 . Comparados ao *d.m.s.* foi possível observar que os controladores com pesos de 10^1 e 10^8 foram diferentes estatisticamente. Por terem \overline{RMSE} maiores do que os demais, foram eliminados da seleção. Os controladores restantes seguiram para a comparação dos atuadores. As Figuras 15, 16 e 17 apresentam os \overline{RMCM} dos controladores em cada atuador.

Figura 15 – \overline{RMCM} (Q_{ar}) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.



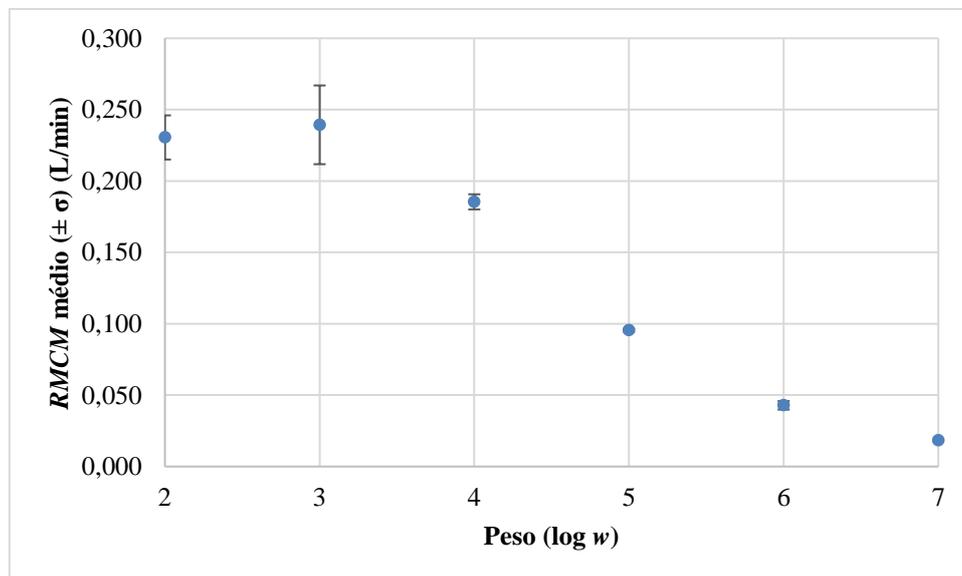
Fonte: Do autor (2022).

Figura 16 – \overline{RMCM} (P) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 17 – \overline{RMCM} (Q_{O_2}) do controlador DMC/MISO com diferentes pesos na fase de indução.



Fonte: Do autor (2022).

Estes valores foram comparados e apresentados na Tabela 6. Os valores de $d.m.s.$ para o atuador de Q_{ar} , P e Q_{O_2} foram de 0,009, $2,160 \cdot 10^{-4}$ e 0,025, respectivamente. As diferenças absolutas acima dos valores de $d.m.s.$ são apresentadas com asterisco.

Tabela 6 – Teste de Tukey: Módulo da diferença entre os \overline{RMCM} na fase de indução.

Par de médias	Valor absoluto da diferença		
	Q _{ar} (L/min)	P (bar)	Q _{O₂} (L/min)
10 ² e 10 ³	0,002	0,001*	0,009
10 ³ e 10 ⁴	0,070*	0,001*	0,054*
10 ⁴ e 10 ⁵	0,089*	0,001*	0,090*
10 ⁵ e 10 ⁶	0,052*	0,001*	0,053*
10 ⁶ e 10 ⁷	0,026*	0,000*	0,025
10 ² e 10 ⁴	0,068*	0,000	0,045*
10 ² e 10 ⁵	0,157*	0,001*	0,135*
10 ² e 10 ⁶	0,209*	0,002*	0,188*
10 ² e 10 ⁷	0,235*	0,002*	0,212*
10 ³ e 10 ⁵	0,159*	0,002*	0,144*
10 ³ e 10 ⁶	0,211*	0,003*	0,196*
10 ³ e 10 ⁷	0,237*	0,003*	0,221*
10 ⁴ e 10 ⁶	0,142*	0,002*	0,143*
10 ⁴ e 10 ⁷	0,167*	0,002*	0,167*
10 ⁵ e 10 ⁷	0,078*	0,001*	0,077*

Fonte: Do autor (2022).

Comparando as diferenças, os controladores com peso 10² e 10³ mostraram igualdade estatística para os atuadores de vazão de ar e O₂ puro. Contudo eles têm \overline{RMCM} maiores do que do restante. Dentre os que sobraram o DMC/MISO com peso 10⁷ é o que apresentou menores valores de \overline{RMCM} , resultando em um desgaste menor nos atuadores. Desta forma ele foi o controlador de melhor desempenho para a fase de indução, ao nível de 5% de significância.

4.2 Comparação dos controladores PI, DMC/SISO e DMC/MISO

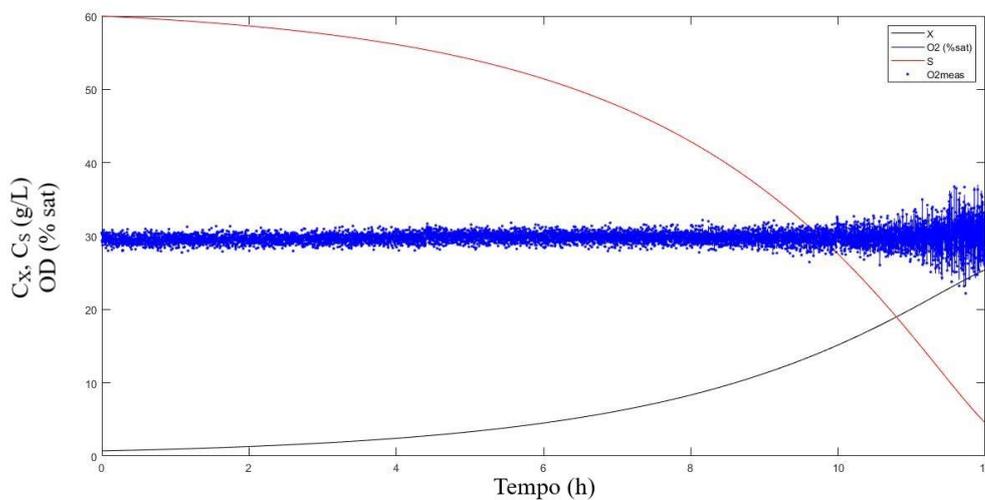
Feitas as comparações para encontrar o peso ótimo para o DMC/MISO, utilizaram-se os pesos com melhor desempenho para a fase de crescimento ($w = 10^6$) e de indução ($w = 10^7$) para comparar com os controladores PI, sintonizado pelo método transiente e utilizando as relações de projeto IMC (*Internal Model Control*), pelo método Skogestad IMC (SIMC), que melhora a resposta a perturbações na carga para processos com tempo de atraso muito alto (SEBORG *et al.*, 2016), e DMC/SISO, desenvolvido por Campani *et al.* (2019). As comparações dos diferentes tipos de controladores foram feitas da mesma forma que para encontrar a matriz peso ideal para o

DMC/MISO. Inicialmente as comparações foram feitas pelo \overline{RMSE} para analisar o erro em relação ao set point. Nos casos em que este critério não apresentou diferença estatística significativa, comparou-se o desgaste dos atuadores. Os testes estatísticos foram aplicados ao nível de 5% de significância.

4.2.1 Fase de crescimento

O controle do OD e os valores das variáveis manipuladas Q_{ar} , P e y_{O_2} (alterada a partir da manipulação em Q_{ar} e Q_{O_2} , conforme Equação 3.10) estão representados para cada controlador. As Figuras 18 e 19 são a variável controlada (OD) e as manipuladas para o PI, respectivamente. Esta sequência é repetida nas Figuras 20 e 21 para o DMC/SISO e Figuras 22 e 23 para o DMC/MISO.

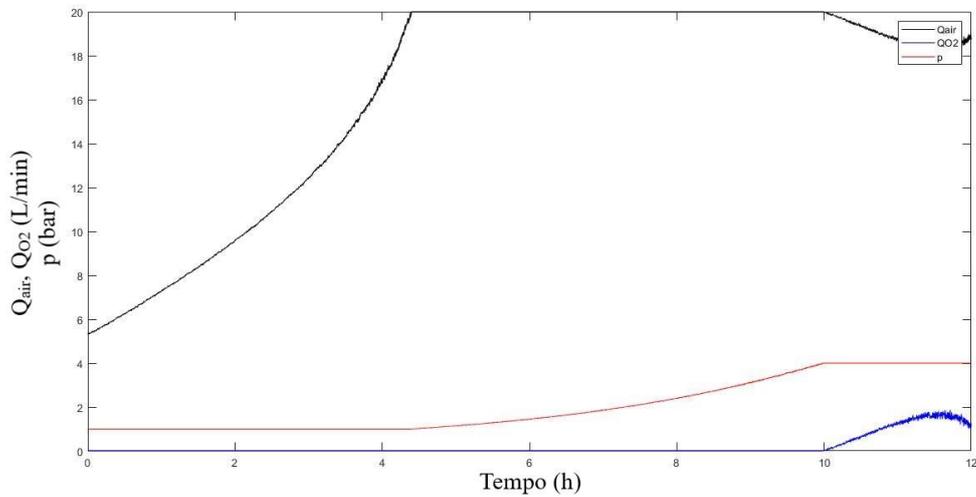
Figura 18 – PI: Variável controlada (OD) na fase de crescimento.



Legenda: As primeiras 12h de processo para crescimento celular, a concentração de células X (linha de cor preta) aumenta com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

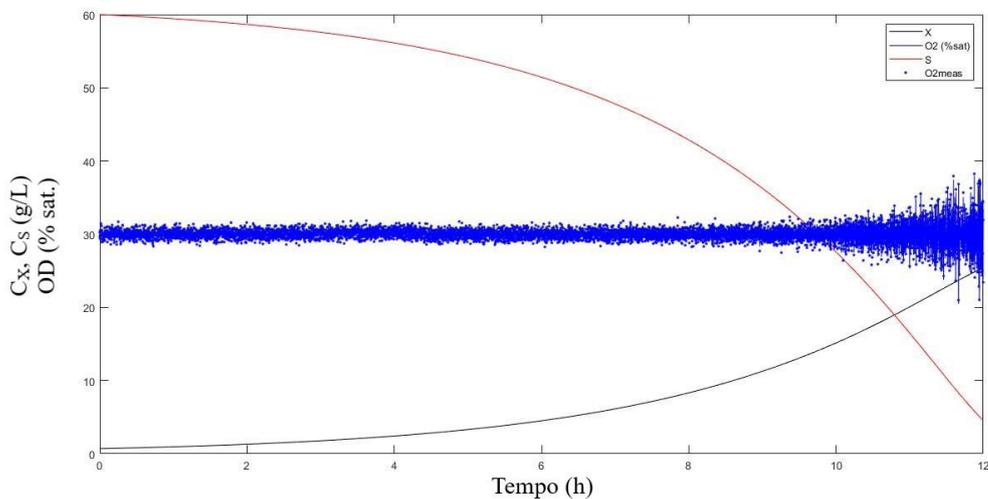
Figura 19 – PI: Variáveis manipuladas na fase de crescimento.



Legenda: Inicialmente manipulou-se a vazão de ar (linha preta). Após atingir o limite, manipulou-se a pressão (linha vermelha). Chegando ao limite de P , manipulou-se a composição de O_2 enriquecendo o ar, diminuindo a vazão de ar e aumentando a vazão de O_2 puro (linha azul).

Fonte: Do autor (2022).

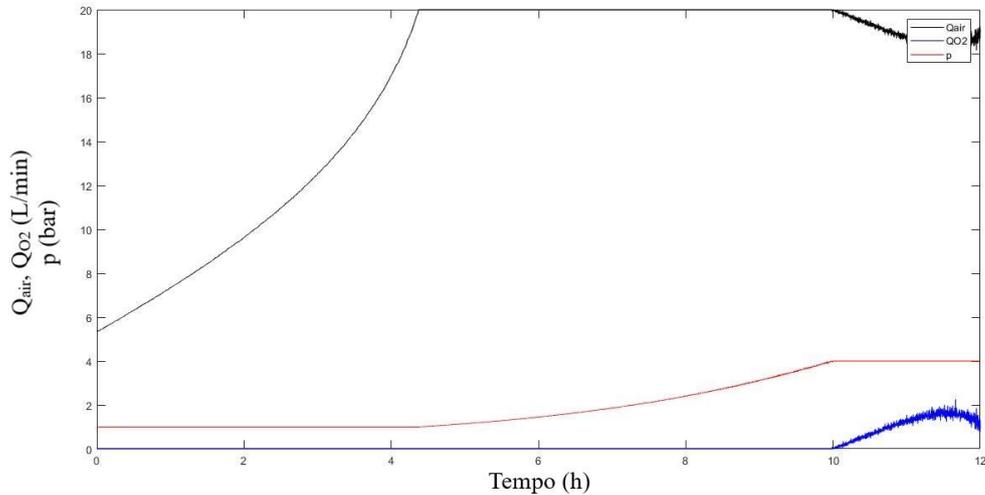
Figura 20 – DMC/SISO: Variável controlada (OD) na fase de crescimento.



Legenda: As primeiras 12h de processo para crescimento celular, a concentração de células X (linha de cor preta) aumenta com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

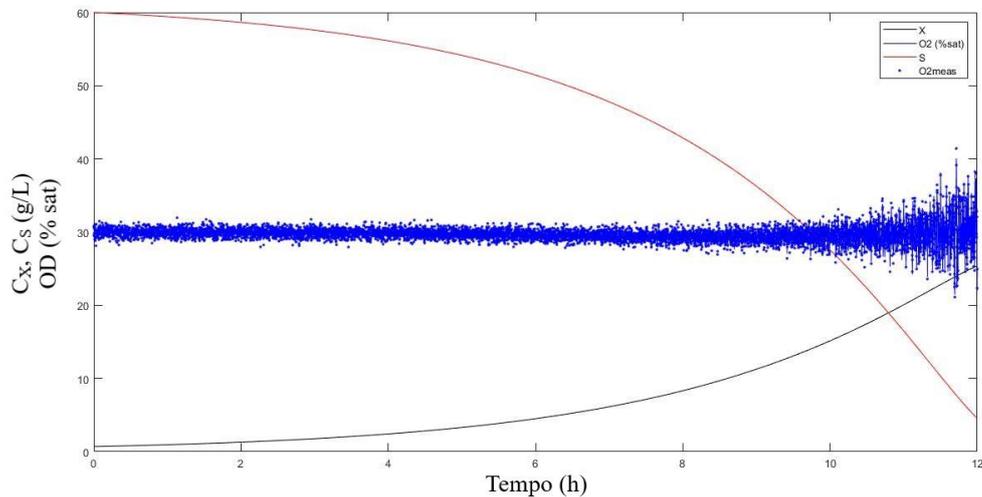
Figura 21 – DMC/SISO: Variáveis manipuladas na fase de crescimento.



Legenda: Inicialmente manipulou-se a vazão de ar (linha preta). Após atingir o limite, manipulou-se a pressão (linha vermelha). Chegando ao limite de P , manipulou-se a composição de O_2 enriquecendo o ar, diminuindo a vazão de ar e aumentando a vazão de O_2 puro (linha azul).

Fonte: Do autor (2022).

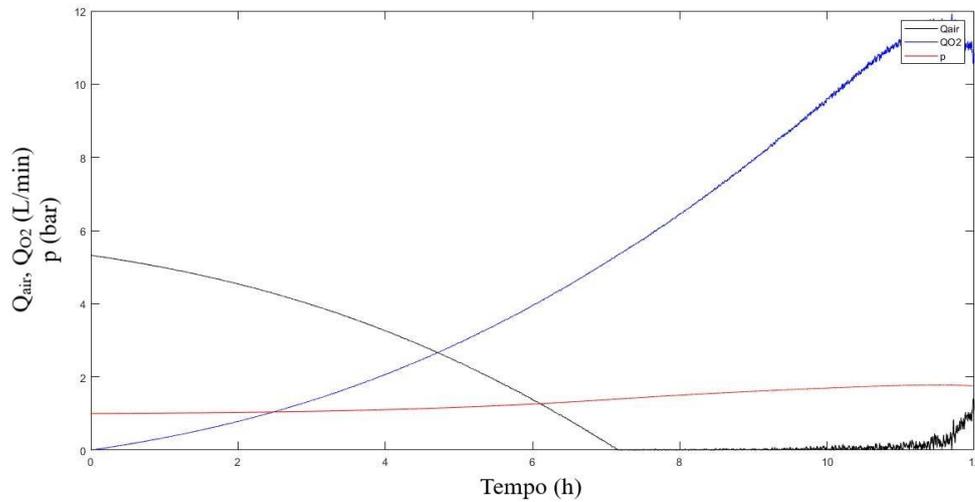
Figura 22 – DMC/MISO ($w = 10^6$): Variável controlada (OD) na fase de crescimento.



Legenda: As primeiras 12h de processo para crescimento celular, a concentração de células X (linha de cor preta) aumenta com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 23 – DMC/MISO ($w = 10^6$): Variáveis manipuladas na fase de crescimento.



Legenda: As três variáveis (Q_{ar} , P e Q_{O_2}) são manipuladas ao mesmo tempo. A linha preta é a vazão de ar, a vermelha é a pressão e a azul é vazão de O_2 puro.

Fonte: Do autor (2022).

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos de \overline{RMSE} para cada controlador.

Tabela 7 – \overline{RMSE} dos controladores na fase de crescimento.

Controlador	\overline{RMSE} (% saturação)	$\bar{\sigma}$ (% saturação)
PI	1,001	$2,085 \cdot 10^{-2}$
DMC/SISO	0,961	$2,266 \cdot 10^{-2}$
DMC/MISO	1,154	$1,496 \cdot 10^{-2}$

Fonte: Do autor (2022).

Para a comparação, como feito na subseção 4.1, foi utilizado o teste de Tukey. O valor do *d.m.s.* foi de 0,033. A Tabela 8 exhibe os valores das diferenças absolutas entre os \overline{RMSE} .

Tabela 8 – Teste de Tukey: Comparação dos controladores na fase de crescimento.

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
PI e DMC/SISO	0,040*
PI e DMC/MISO	0,153*
DMC/SISO e DMC/MISO	0,193*

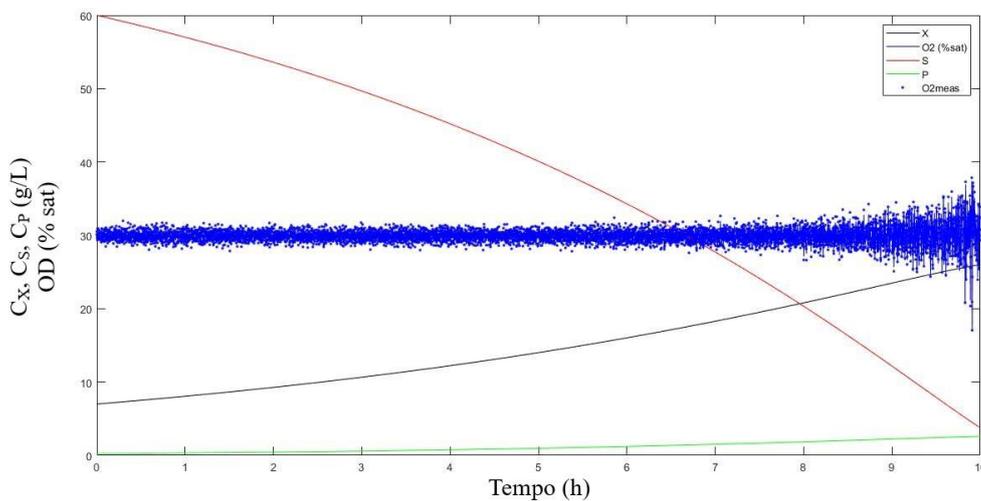
Fonte: Do autor (2022).

Comparando as médias, observou-se que o \overline{RMSE} do DMC/SISO é diferente estatisticamente em relação aos outros. Por ser o menor valor, conclui-se com 95% de confiança que ele apresentou o melhor desempenho na fase de crescimento.

4.2.2 Fase de indução

A seguir são representados os valores da variável controlada e das variáveis manipuladas para cada controlador, primeiro para o PI (FIGURAS 24 e 25), em seguida para o DMC/SISO (FIGURAS 26 e 27) e por fim para o DMC/MISO (FIGURAS 28 e 29).

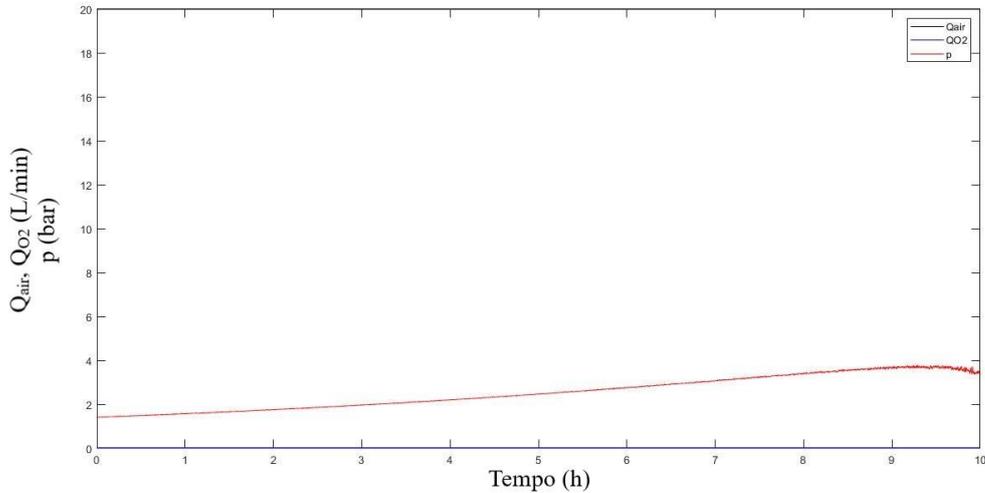
Figura 24 – PI: Variável controlada (OD) na fase de indução.



Legenda: Ao longo das 10h do processo de indução, a concentração de células X (linha de cor preta) e a de produto P (linha verde) aumentam com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

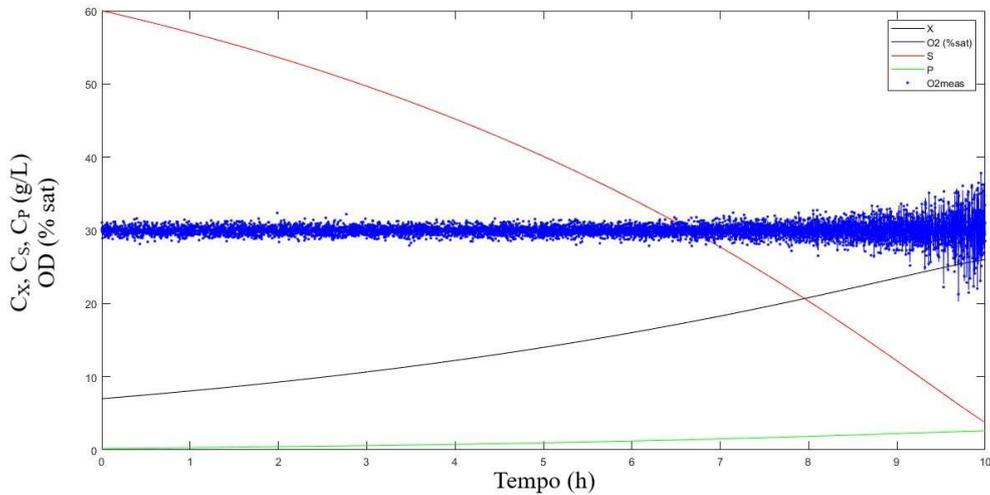
Figura 25 – PI: Variáveis manipuladas na fase de indução.



Legenda: Na fase de indução a vazão de ar (linha preta) já se encontra em seu valor máximo de 20 L/min. Para controlar o OD em 30% de saturação só foi necessária a manipulação da pressão (linha vermelha), mantendo a vazão de O₂ puro (linha azul) em 0 L/min.

Fonte: Do autor (2022).

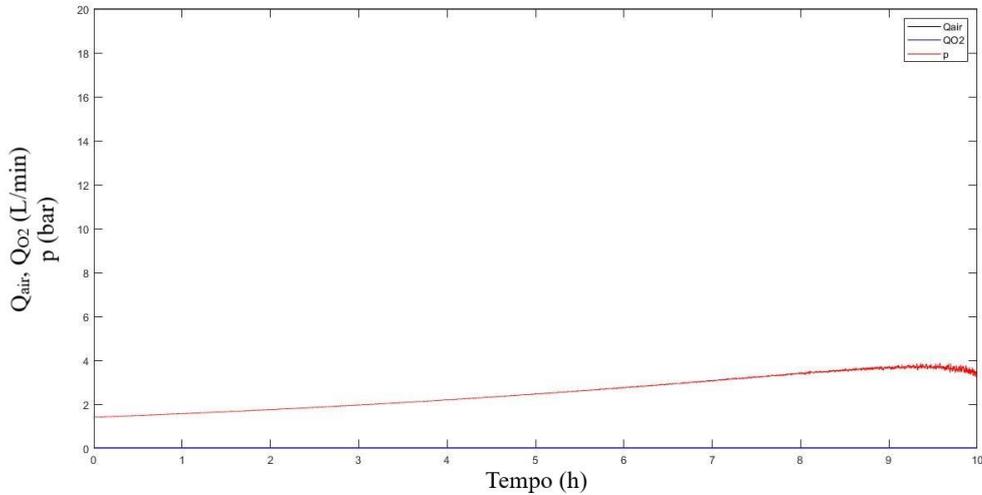
Figura 26 – DMC/SISO: Variável controlada (OD) na fase de indução.



Legenda: Ao longo das 10h do processo de indução, a concentração de células X (linha de cor preta) e a de produto P (linha verde) aumentam com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

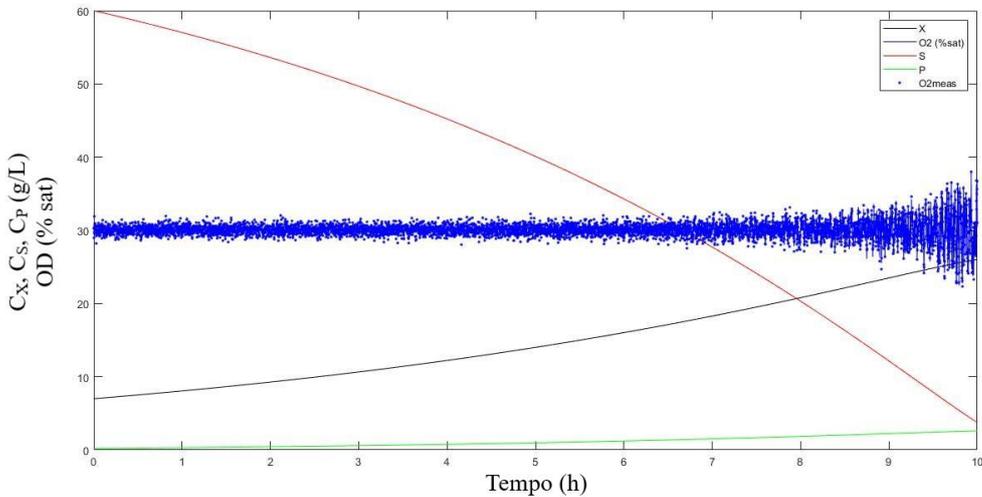
Figura 27 – DMC/SISO: Variáveis manipuladas na fase de indução.



Legenda: Na fase de indução a vazão de ar (linha preta) já se encontra em seu valor máximo de 20 L/min. Para controlar o OD em 30% de saturação só foi necessária a manipulação da pressão (linha vermelha), mantendo a vazão de O₂ puro (linha azul) em 0 L/min.

Fonte: Do autor (2022).

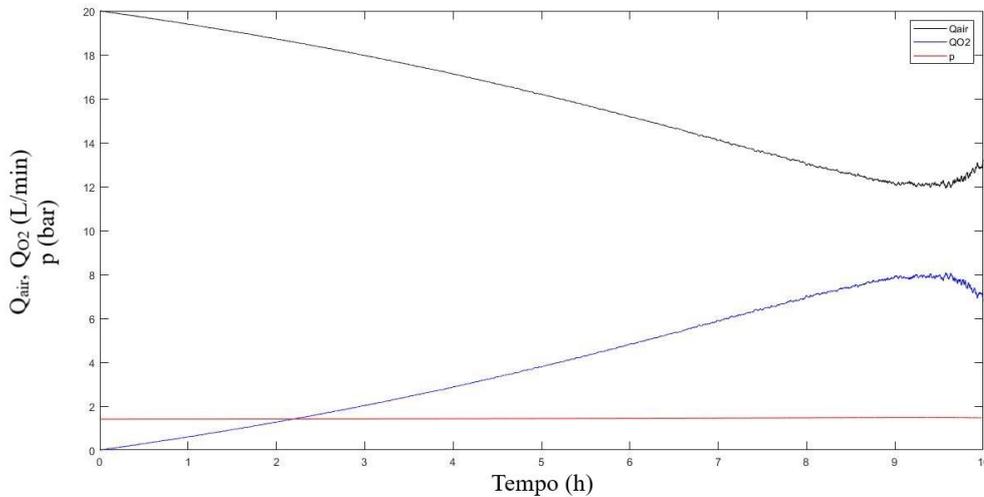
Figura 28 – DMC/MISO ($w = 10^7$): Variável controlada (OD) na fase de indução.



Legenda: Ao longo das 10h do processo de indução, a concentração de células X (linha de cor preta) e a de produto P (linha verde) aumentam com a diminuição da concentração de substrato S (linha vermelha), enquanto a concentração de OD (pontos azuis para o valor medido e a linha azul para o estado estimado de OD) é mantida próxima a 30% de saturação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 29 – DMC/MISO ($w = 10^7$): Variáveis manipuladas na fase de indução.



Legenda: As três variáveis (Q_{ar} , P e y_{O_2}) são manipuladas ao mesmo tempo. A linha preta é a vazão de ar, a vermelha é a pressão e a azul é vazão de O_2 puro.

Fonte: Do autor (2022).

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos do \overline{RMSE} para cada controlador.

Tabela 9 – \overline{RMSE} para os controladores na fase de indução.

Controlador	\overline{RMSE} (% saturação)	$\bar{\sigma}$ (% saturação)
PI	1,071	$3,262 \cdot 10^{-2}$
DMC/SISO	1,009	$1,050 \cdot 10^{-2}$
DMC/MISO	1,096	$2,025 \cdot 10^{-2}$

Fonte: Do autor (2022).

Estes valores foram comparados pelo teste de Tukey, com o *d.m.s.* calculado de 0,039. A Tabela 10 traz as diferenças entre as médias.

Tabela 10 – Teste de Tukey: Comparação dos controladores na fase de crescimento.

Par de médias	Valor absoluto da diferença (% saturação)
PI e DMC/SISO	0,062*
PI e DMC/MISO	0,025
DMC/SISO e DMC/MISO	0,088*

Fonte: Do autor (2022).

Pelo teste pôde-se observar estatisticamente que o controlador DMC/SISO apresentou melhor desempenho em relação aos demais ao nível de 95% de confiança, por ter diferença absoluta em relação aos outros maior do que o *d.m.s.* e apresentar menor \overline{RMSE} . Porém também vale ressaltar que nesta fase os controladores PI e DMC/SISO somente atuaram na pressão para fazer o controle de OD, enquanto que o DMC/MISO atua em todas as variáveis manipuladas, um gasto a mais em relação aos outros tipos aqui analisados, especialmente quando considerado o uso de oxigênio puro (CAMPANI, 2018).

4.3 Considerações gerais

Um problema que pôde ser observado no controlador DMC/MISO foi o critério econômico na manipulação das variáveis para controlar o OD. Campani (2018) trouxe em seu trabalho uma otimização do controle do OD, resultando no controlador de malha SISO do tipo *split-range*, que inicia o processo manipulando a vazão de ar (variável de menor custo). Alcançado o limite da variável ele inicia a manipulação da pressão. Por último ele manipula a composição de O₂, enriquecendo o ar com O₂ puro, insumo de maior custo dentre as variáveis manipuladas.

Observando os gráficos das variáveis manipuladas dos controladores (FIGURAS 19, 21, 23, 25, 27 e 29) nota-se que o controlador multivariável utiliza muito mais o O₂ puro do que os outros controladores, uma vez que o oxigênio dissolvido no meio de cultivo é mais sensível ao enriquecimento do ar com O₂. Uma forma de corrigir este problema seria a adaptação deste DMC/MISO para um controlador multivariável preditivo econômico, levando em consideração um termo econômico na função objetivo (SILVA; ALVAREZ, 2018).

5 CONCLUSÕES

O controlador DMC/MISO foi capaz de controlar o oxigênio dissolvido no bioprocesso simulado de cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada para a produção da proteína recombinante PspA. Feitos os testes para definir a matriz peso W ideal, concluiu-se com 95% de confiança que a matriz com $w = 10^6$ e a com $w = 10^7$ foram as que obtiveram os melhores desempenhos estatisticamente para as fases de crescimento e indução, respectivamente, pois igualaram com o \overline{RMSE} dos pesos com menor erro e tiveram menor amplitude média de atuação e, portanto, desgaste nos atuadores.

Quando comparado aos controladores PI e DMC/SISO, o controlador multivariável teve desempenho pior estatisticamente ao nível de 5% de significância. Em ambas as fases do processo o DMC/SISO foi o que obteve o melhor desempenho.

Para a manipulação de forma econômica uma sugestão seria a inserção do EMPC (*Economic Model Predictive Control*) multivariável. Com isso seria possível comparar, além do desempenho e desgaste dos atuadores, a economia feita com uma manipulação mais adequada das variáveis.

REFERÊNCIAS

- ALFORD, J. S. Bioprocess control: Advances and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, 30, p. 1464 – 1475, 2006.
- ÅSTROM, K. J; HÄGGLUND, T. **Advanced PID Control**. Research Triangle Park, NC: ISA – Instrumentation, System and Automation Society, 2006.
- BEQUETTE, B. W. **Process Control: Modeling, Design and Simulation**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2003.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **12/11 – Dia Mundial da Pneumonia**. 2021. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/12-11-dia-mundial-da-pneumonia-2/>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial, volume 1: fundamentos**. São Paulo, SP: Blucher, 2001.
- BROWN, T. A. **Bioquímica**. 1.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018.
- CAMPANI, G. *et al.* A hierarchical state estimation and control framework for monitoring and dissolved oxygen regulation in bioprocesses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 42, p. 1467 – 1481, 2019.
- CAMPANI, G. **Otimização do controle do oxigênio dissolvido em biorreator airlift pressurizado: aplicação em cultivos de Escherichia coli recombinante**. Tese de doutorado - São Carlos: UFSCar, 2018.
- CAMPANI, G. **Reator airlift operado em sobrepressão: construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de Escherichia coli recombinante**. Tese de mestrado - São Carlos: UFSCar, 2014.
- CAMPOS, M. C. M. M.; TEIXEIRA, H. C. G. **Controles típicos de equipamentos e processos industriais**. São Paulo, SP: Blucher, 2006.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, 27, p. 297 – 306, 2009.
- DIAZ, C. *et al.* Simultaneous adaptive predictive control of the partial pressures of dissolved oxygen (pO₂) and dissolved carbon dioxide (pCO₂) in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, 52, p. 135 – 150, 1996.
- DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. 2.ed. Waltham, MA: Elsevier, 2013.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein J**, 32, p. 419 – 425, 2013.

LIU, S. **Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design.** Oxford, UK: Elsevier, 2013.

MARLIN, T. E. **Process Control: Designing Processes and Control Systems for Dynamic Performance.** 2.ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2000.

MORENO, A. T. *et al.* Immunization of Mice with Single PspA Fragments Induces Antibodies Capable of Mediating Complement Deposition on Different Pneumococcal Strains and Cross-Protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, 17, p. 439 – 446, 2010.

MUENZ, R. **A Brief Overview of Bioprocessing.** Lab Manager, 2021. Disponível em: <https://www.labmanager.com/big-picture/bioprocessing-overview-and-trends/a-brief-overview-of-bioprocessing-25962>. Acesso em: 14 jun. 2022.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 5, Article 172, 2014.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial, Volume 2: Engenharia bioquímica.** 2. Ed. São Paulo, SP: Blucher, 2021.

SEBORG, E. D. *et al.* **Process Dynamics and Control.** 4. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2016.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts.** 2. Ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR, 2002.

SILVA, D.M; ALVAREZ, L. A. Controle preditivo econômico aplicado a uma planta de tanques interligados. **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, 22., 2018, São Paulo, SP.

STEPHANOPOULOS, G. **Chemical Process Control: An Introduction to Theory and Practice.** Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1984.

TOSTES, R. O. **Avaliação da eficácia do antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*.** Tese de mestrado – São Paulo: USP/ IPT/ Instituto Butantan, 2016.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística.** 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1980.

APÊNDICE A – Código em MATLAB da simulação da fase de crescimento

```

% DO control for aerobic bioprocess - model from Campani et al. (2019)
% Growth phase
%
% Gilson Campani - (2020, adapted from 2017)

clc; clear all; close all

% Model parameters
%Kinetics
Ks = 3.8937; sKs = 0.339;
Yxs = 0.4453; sYxs = 0.0098;
au = 0.0256; sau = 0.0003;
bu = -0.3594; sbu = 0.0063;
%OUR
aq = 7.56486532478092e-06;
bq = -0.057467084664367;
Yxo2 = 1.427538;
%OTR
ak = 197.259397;
bk = -1.04955034;
ck = -2.2653477;
teta = 1.02205267;

% Initial manipulated variables
% u = [Qar Qo2 T p]
u0 = [5;0;27;1]; % for T = 32°C reduce tf from 12 to 7 h
u = u0;

% Parameters array list
Par{1} = Ks;
Par{2} = au;
Par{3} = Yxs;
Par{4} = bu;
Par{5} = Yxo2;
Par{6} = aq;
Par{7} = bq;
Par{8} = ak;
Par{9} = bk;
Par{10} = ck;
Par{11} = teta;
Par{12} = u;

% Initial state conditions
% xk = [Cx Co Cs]
% xk = real states
xk(:,1) = [0.7;0.3*solO2(u0(3));60]; % Real process with noise
u = DOcontrol(xk(:,1),u,u0,0,Par); %finding first inputs value
Par{12} = u;
stage = 1;

% Sample time DMC tuning parameters
Du = [1;0.05;0.003]; %Du used for Step Model identification // [Qar;p;yO2]
ts = 0.05; % settling time 0.05
N = 30; % model horizon 30

```

```

M = 10; % control horizon 10
PH = N + M; % prediction horizon
t0=0;
tf=12;
tAmos=ts/N;%0.1;
tspamAmos=[t0:tAmos:tf];
lmax = 1;% Number subdivisions of each time interval for u update (O2 control)
Dt = tAmos/lmax;% Subdivision of time interval

% Setpoint selection
imax = length(tspamAmos)-1;
sp = 30*ones(1,imax);
sp(1:round(imax/4)) = 30;
sp(round(imax/4):round(imax*2/4)) = 30;%50;
sp(round(imax*2/4):round(imax*3/4)) = 30;%20;
sp(round(imax*3/4):round(imax*4/4)) = 30;

% Paramaters for numerical derivatives
dx = 1e-5;
dPar = 1e-5;

% Allocating space for u matrix (plot)
uplot = zeros(4,imax);

% Observable matrix C <-> y = C*x
C=[0 1 0]; % Co2 measurement

% Covariance matrix of paramters
par = [1];% disturbant parameters
covarPar = [0.114947622739240    0.000084847194692   -0.000675593043754   -
0.001746343450589;
            0.000084847194692    0.000000076188301    0.000000091878064   -
0.000001629370318;
            -0.000675593043751    0.000000091878064    0.000095837714097
0.000011780628201;
            -0.001746343450589   -0.000001629370318    0.000011780628201
0.000039182832801];%Ks;au;Yxs;bu
covarPar = covarPar(par,:);
covarPar = covarPar(:,par);
covarPar = covarPar;
sqrt_covarPar = chol(covarPar);
covarMeas = C*[0.088 0 0; 0 (0.274/100^2)*solO2(u0(3))^2 0; 0 0 2.094]*C';
% covarMeas = covarMeas*0;
yk(:,1) = mvnrnd((C*xk(:,1))',covarMeas)';% First measurement

DMatrix(:,1)=[0;0;0;0];

% Process simulation with noise
for i=1:imax
    % State simulation (with time subdivision to avoid Co2 depletion)
    xk_aux = xk(:,i);
    for l=1:lmax
        tspam_aux = [tspamAmos(i)+Dt*(l-1):Dt/2:tspamAmos(i)+Dt*1];% Subdivision
of tspam
        tspam_aux(1)

        % Adding normal noise to Ks
        Par{1} = Ks + (randn(1,length(diag(covarPar)))*sqrt_covarPar);
    end
end

```

```

    % Real process simulation
    [T,X] = simulacaoX(tspam_aux,[xk_aux(1);xk_aux(2);xk_aux(3)],Par);%
Process simulation (nonlinear)
    xk(:,i+1) = X(end,:)' ;

    xk(2,i+1) = max(1e-6,xk(2,i+1));% Zero lower bound to Co2
    xk_aux = X(end,:)' ;

    % Measurement
    yk(:,i+1) = mvnrnd((C*xk(:,i+1))',covarMeas)';% Normal noise addition to
measurement

    [u,du] = MISODMC(u,Du,ts,N,M,PH,xk(:,i+1),xk(:,i+1),sp(i),Par); % MISO
DMC DO control

    dmatrix(:,i) = du;
    DMATRIX(:,i+1) = du;

    Tf = 2/3600;
    alpha = tAmos/(Tf + tAmos);
    if i==1
        uf = u;
    else
        uf = alpha*u + (1-alpha)*uplot(:,i-1);
    end
    uplot(:,i) = uf;%u;
    Par{12} = uf;%u;

    % unmeasured input disturbance
    % if 500*tAmos<tspamAmos(i) && tspamAmos(i)<=510*tAmos
    %     uplot(:,i) = u*1.05;
    %     Par{12} = u*1.05;
    % end

end
end

Erro = sp-(yk(1:imax)./solO2(u0(3)).*100);
RMSE = (1/imax * (Erro * Erro'))^0.5;

%MISO DMC
RMCM_Qar = (1/imax * (dmatrix(1,:) * dmatrix(1,:))')^0.5;
RMCM_QP = (1/imax * (dmatrix(4,:) * dmatrix(4,:))')^0.5;
RMCM_QO2 = (1/imax * (dmatrix(2,:) * dmatrix(2,:))')^0.5;

RESULTADO = [RMSE,RMCM_Qar,RMCM_QP,RMCM_QO2];

% Plot of results
figure(1)

plot(tspamAmos,xk(1,:),'-k',tspamAmos,xk(2,:)./solO2(u0(3)).*100,'-b',...
tspamAmos,xk(3,:),'-r',tspamAmos,yk(1,:)./solO2(u0(3)).*100,'.b');
legend('X','O2 (%sat)','S','O2meas');

figure(2)
plot(tspamAmos(2:end),uplot(1,:),'-k',tspamAmos(2:end),uplot(2,:),'-b',...

```

```

    tspanAmos(2:end),uplot(4,:)','-r');
legend('Qair','QO2','p');

figure(3)
plot(tspanAmos(2:end),dmatrix(1,:)','-k',tspanAmos(2:end),dmatrix(2,:)','-b',...
    tspanAmos(2:end),dmatrix(4,:)','-r');
legend('Qair','QO2','p');

function C = solO2(T)

% Calculo da solubilidade do O2 no meio de cultivo [g/L]
a = 14.69035283;
b = -0.400237164;
c = 0.008271568;
d = -9.69863*10^(-5);
e = 4.83882*10^(-7);
% C = 0.8600504124892*(a + b*T(:,1) + c*T(:,1).^2 + d*T(:,1).^3 ...
%     + e*T(:,1).^4)/1000; % [g/L]
C = 0.8600504124892*(a + b*T(:,1) + c*T(:,1).^2 + d*T(:,1).^3 ...
    + e*T(:,1).^4); % [mg/L]

end

function [uc] = DOcontrol(xk,u,u0,ind,Par)

% jun/2017
% DO control calculation
% x = [Cx Co Cs]
% u = [Qar Qo2 T]

options = optimset('Display','off','Algorithm','sqp');% better performance

if ind == 0 % fase de crescimento
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    Yxs = Par{3};
    bu = Par{4};
    Yxo2 = Par{5};
    aq = Par{6};
    bq = Par{7};
    ak = Par{8};
    bk = Par{9};
    ck = Par{10};
    teta = Par{11};
    mi = (au*u(3)+bu)*xk(3) ./ (Ks+xk(3));
else % fase de inducao
    % Parameters array list
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    beta = Par{3};
    Tpx = Par{4};
    km = Par{5};
    Tref = Par{6};
    bkd = Par{7};
    Yxs = Par{8};

```

```

    akd = Par{9};
    bu = Par{10};
    Yxo2 = Par{11};
    aq = Par{12};
    bq = Par{13};
    ak = Par{14};
    bk = Par{15};
    ck = Par{16};
    teta = Par{17};
%    u = Par{18};
    mi = (au*u(3)+bu) .*exp(-beta*xk(4)/xk(1) *(u(3)-26.831) ) *xk(3) / (Ks+xk(3)) -
    (akd*u(3)+bkd);
end

if u(1)<20 && u(2)==0
    lb = [0;0;u0(3);u0(4)]; % lb for u
    ub = [20;0;u0(3);u0(4)]; % ub for u
    u = fmincon(@(u) (1-pressao(xk,u,ind,Par))^2,u,[1 1 0 0;-1 -1 0 0],[20;-
5],[],[],lb,ub,[],options);
    u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
end
if u(1)==20 && u(2)==0 && u(4)<=4*0.99
    u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
end
if u(4)>4*0.99
    lb = [0;0;u0(3);-Inf]; % lb for u
    ub = [20;20;u0(3);Inf]; % ub for u
    u = fmincon(@(u) (4-pressao(xk,u,ind,Par))^2,u,[],[],[1 1 0
0],[20],lb,ub,[],options);
    u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
end

uc = u;% updated u vector

end

function [p] = pressao(x,u,ind,Par)

% out/2016
% Calculo da pressao necessaria para dC_o2/dt~0 <-> OUR = OTR
% x = [Cx Co Cs]
% u = [Qar Qo2 T]

if ind == 0 % fase de crescimento
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    Yxs = Par{3};
    bu = Par{4};
    Yxo2 = Par{5};
    aq = Par{6};
    bq = Par{7};
    ak = Par{8};
    bk = Par{9};
    ck = Par{10};
    teta = Par{11};
    mi = (au*u(3)+bu) *x(3) ./ (Ks+x(3));
else % fase de inducao

```

```

% Parameters array list
Ks = Par{1};
au = Par{2};
beta = Par{3};
Tpx = Par{4};
km = Par{5};
Tref = Par{6};
bkd = Par{7};
Yxs = Par{8};
akd = Par{9};
bu = Par{10};
Yxo2 = Par{11};
aq = Par{12};
bq = Par{13};
ak = Par{14};
bk = Par{15};
ck = Par{16};
teta = Par{17};
%   u = Par{18};
mi = (au*u(3)+bu) .*exp(-beta*x(4)/x(1)*(u(3)-26.831))*x(3)/(Ks+x(3)) -
(akd*u(3)+bkd);
end

% Solubilidade do O2 no meio de cultivo
C = solO2(u(3));%[g/L]

% Calculo da pressao
% p
=0.21*(u(:,1)+u(:,2))./(0.21*u(:,1)+u(:,2)).*((mi/Yxo2+aq*x(:,3)+bq).*x(:,1))./
(ak*((u(:,1)+u(:,2))/V).^bk).*teta.^(x(:,3)-27).*C)+0.3);
% p
=0.21*(u(1)+u(2))./(0.21*u(1)+u(2)).*((mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq).*x(1))./(ak./(1+exp
(bk*((u(1)+u(2))/5+ck))).*teta.^(u(3)-27).*C)+0.3);
p
=0.21*(u(1)+u(2))./(0.21*u(1)+u(2)).*(1000*(mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq).*x(1))./(ak./(
1+exp(bk*((u(1)+u(2))/5+ck))).*teta.^(u(3)-27).*C)+0.3);

end

function [T,X] = simulacaoX(tspam,x0,Par)

opcoes = odeset('AbsTol',1e-6,'RelTol',1e-3);
% opcoes = odeset('AbsTol',1e-10,'RelTol',1e-7);

[T,X] = ode45(@fun_odeX,tspam,x0,opcoes,Par);

end

function dx = fun_odeX(t,x,Par)

% System mathematical model (growth phase)
% x = [Cx Co Cs]
% u = [Qar Qo2 T]

% Parameters array list

```

```

Ks = Par{1};
au = Par{2};
Yxs = Par{3};
bu = Par{4};
Yxo2 = Par{5};
aq = Par{6};
bq = Par{7};
ak = Par{8};
bk = Par{9};
ck = Par{10};
teta = Par{11};
u = Par{12};
% Ks = 3.8937; % Monod constant (g/L)
% Yxs = 0.4453; % biomass yield

% Oxygen transfer calculation (OTR)
% ak = 197.259397;
% bk = -1.04955034;
% ck = -2.2653477;
% teta = 1.02205267;
kLa = ak/(1+exp(bk*(u(1)+u(2))/5+ck))*teta^(u(3)-27);
C = solO2(u(3)); % o2 solubility [g/L]
p = u(4);
% p = pressao(x',u,0,Par); %pressure estimation in order to OTR=OUR
OTR =kLa*C*(p*(0.21*u(1)+u(2))./(u(1)+u(2))*0.21-x(2)/solO2(u(3))); % -0.3

% Oxygen uptake calculation (OUR)
% aq = 7.56486532478092e-06;
% bq = -0.057467084664367;
% Yxo2 = 1.427538;
% au = 0.0256;
% bu = -0.3594;
mi = (au*u(3)+bu)*x(3)/(Ks+x(3));
% qO2 = mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq; %[g/g]
qO2 = (mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq)*1000; %[mg/g]
OUR = qO2*x(1);

% EDOS
dCx = mi*x(1);
dCo = OTR-OUR;
dCs = -mi/Yxs*x(1);

dx = [dCx; dCo; dCs]; %deve sair vetor coluna
end

function [uf,du] = MISODMC(usr,Dusr,ts,N,M,P,xminus,x,ysp,Par)

% Dynamic Matrix Control

% Implementation based on Bequette 2003 and Seborg et al. 2016

% Time spam
dt = ts/N;% Sampling time
tspam = [0:dt:P*dt]';

% Identification of step reponse model
%Du = [DQar;Dp;DyO2]

```

```

%du = [DQar;DQO2;DT;Dp]

Du = Dusr;
[T,ynl,yfree,S1,S2,S3] = MISOSStepModel(tspan,x,usr,Du,Par);

% Input calculation
% Future matrix (P×M)
Sf = zeros(P,3*M);
line=1;
for i=1:3:3*M
    Sf([line:P],i) = S1(1:P-line+1);
    Sf([line:P],i+1) = S2(1:P-line+1);
    Sf([line:P],i+2) = S3(1:P-line+1);
    line = line + 1;
end

% Wheighting: input (W)
w=[];
w_values = [1 1 1]*10^6;

for j = 1:3:3*M
    w = [w,w_values];
end

W=diag(w);

% Bias correction
d = x(2) - xminus(2);

% Unforced error calculation
r = ysp*ones(P,1);% Setpoint
E = r - yfree(1:P) - d;

% Moves calculation
deltau = inv(Sf'*Sf+W)*Sf'*E;

% u transformation to the final actuator
du = zeros(length(usr),1);

if usr(1)== 20
    deltau(1)=0;
end

% Qair
du(1) = deltau(1);
% Pressure
du(4) = deltau(2);
% yO2
% yO2 = (0.21*usr(1)+usr(2))/(usr(1)+usr(2));
DQ = (usr(1)+usr(2))*deltau(3)/0.79;
du(1) = du(1) -DQ;
du(2) = DQ;

% Update of u
uf = usr+du;
if uf(1)+uf(2)>20
    du(2)=0;
    uf = usr+du;

```

```

end
uf = min([20;20;37;4],uf);% Upper bound
uf = max([0;0;27;1],uf);% Lower bound

end

function [T,ynl,yfree,S1,S2,S3] = MISOSStepModel(tspam,x,u,Du,Par)

% This function calculates the paramaters of step response model - Growth Phase
%
% Implementaion according to Bequette 2003 and Seborg et al. (2016)

% options = optimset('Display','off','Algorithm','sqp');% better performance

% Step actuation
% u = [Qar Qo2 T p]
%Du = [DQar;Dp;DyO2] % used for sr model identification
%du = [DQar;DQO2;DT;Dp]
du = zeros(length(u),1);
stage = 1;

% Simulation (free response)
Par{12} = u;
[T,X] = simulacaoX(tspam,x,Par);
yfree = X(:,2)./solO2(u(3)).*100;

while stage <= 3
    switch stage
        case 1 % Qair
            du(1) = Du(1);
        case 2 % Pressure
            du(4) = Du(2);
        case 3 % yO2
            yO2 = (0.21*u(1)+u(2))/(u(1)+u(2));
            DQ = (u(1)+u(2))*Du(3)/0.79;
            du(1) = -DQ;
            du(2) = DQ;
    end

    uinc = u + du;

    Par{12} = uinc;

    % Simulation (response)
    [T,X] = simulacaoX(tspam,x,Par);
    ynl = X(:,2)./solO2(u(3)).*100;
    % Dy = zeros(length(y)-1,1);% Space allocation

    % % Diference state
    % for i=1:length(Dy)
    %     Dy(i)=y(i+1)-y(i);
    % end

    % Step response model parameters normalized (assuming du=1)
    % S = Dy*1/Du(stage);
    % S = (ynl-ynl(1))/Du(stage);

```

```
S = (yn1-yfree)/Du(stage);  
  
if stage == 1  
    S1 = S;  
elseif stage == 2  
    S2 = S;  
else  
    S3 = S;  
end  
  
stage = stage + 1;  
Par{12} = u;  
du = zeros(length(u),1);  
  
end  
  
end
```

APÊNDICE B – Código em MATLAB da simulação da fase de indução

```

% DO control for aerobic bioprocess - model from Campani et al. (2019)
% Induction phase
%
% Gilson Campani - (2020, adapted from 2017)

clc; clear all; close all

% global xk_id

% Model parameters
%Kinetics
Ks = 1.199268;
Yxs = 0.6853889;
au = 0.16868856;
bu = -4.2728689;
beta = 2.299329;
akd = 0.009286;
bkd = -0.1198;
Tref = 26.830966;
km = 0.2053777;
Tpx = 6.62183;
%OUR
aq = 7.56486532478092e-06;
bq = -0.057467084664367;
Yxo2 = 1.427538;
%OTR
ak = 197.259397;
bk = -1.04955034;
ck = -2.2653477;
teta = 1.02205267;

% Initial manipulated variables
% u = [Qar Qo2 T p]
u0 = [20;0;27;1];
% u0 = [19;1;32;4];
u = u0;

% Parameters array list
Par{1} = Ks;
Par{2} = au;
Par{3} = beta;
Par{4} = Tpx;
Par{5} = km;
Par{6} = Tref;
Par{7} = bkd;
Par{8} = Yxs;
Par{9} = akd;
Par{10} = bu;
Par{11} = Yxo2;
Par{12} = aq;
Par{13} = bq;
Par{14} = ak;
Par{15} = bk;
Par{16} = ck;
Par{17} = teta;

```

```

Par{18} = u;

% Initial state conditions
% x = [Cx Co Cs Cp]
% x = a posteriori // xminus = a priori // xk = real
xk(:,1) = [10*0.7; 0.3*solO2(u0(3)); 60; 0.327*0.7];
u(4) = pressao(xk(:,1),u,1,Par);
Par{18} = u;

% Sample time and DMC tuning parameters
Du = [1;0.05;0.003];%Du used for Step Model identification // [Qar;p;yO2]
ts = 0.05; % settling time 0.05
N = 30; % model horizon 30
M = 10; % control horizon 10
PH = N + M; % prediction horizon
t0=0;
tf=10;%4.3; 7
tAmos=ts/N;%0.1;
tspamAmos=[t0:tAmos:tf];
tAmos_id=ts/N;%0.1;
tspamAmos_id=[t0:tAmos_id:tf];
lmax = 1;% Number subdivisions of each time interval for u update (O2 control)
Dt = tAmos/lmax;% Subdivision of time interval
Dt_id = tAmos_id/lmax;% Subdivision of time interval

% Setpoint selection
imax = length(tspamAmos)-1;
sp = 30*ones(1,imax);
sp(1:round(imax/4)) = 30;%40;
sp(round(imax/4):round(imax*2/4)) = 30;
sp(round(imax*2/4):round(imax*3/4)) = 30;
sp(round(imax*3/4):round(imax*4/4)) = 30;

% Paramaters for numerical derivatives
dx = 1e-5;
dPar = 1e-5;

% Allocating space for u matrix (plot)
uplot = zeros(4,imax);
uplot(:,1) = u;
uplot_id = zeros(4,imax);
uplot_id(:,1) = u;

% Observable matrix C <-> y = C*x
K = 0; % Cx sample times
k = 1; % Cx sample times
KK = 1;
C=[0 1 0 0]; % Cx and Cs estimation
C2 = [1 0 0 0;0 1 0 0;0 0 1 0];
C2 = C;

% Covariance matrix of paramters and measurement
par = [1];% disturbant parameters
covarPar = load('covarParSXP.txt');%Ks;au;beta;Tpx;km;Tref;bkd;Yxs;akd;bu
covarPar = covarPar(par,:);% Subset row selection
covarPar = covarPar(:,par);% Subset collumn selection
sqrt_covarPar = chol(covarPar);

```

```

covarMeas = C*[(xk(1,1)*0.05)^0.5 0 0 0; 0 (0.274/100^2)*solO2(u0(3))^2 0 0; 0 0
0.838 0; 0 0 0 0.03876]*C';
yk(:,1) = mvnrnd((C*xk(:,1))',covarMeas)';% First measurement

% Process simulation with noise
u = u0;% Return u to initial value
u = DOcontrol(xk(:,1),u,u0,1,Par);
Par{18} = u;
for i=1:imax
    % State simulation (with time subdivision to avoid Co2 depletion)
    for l=1:lmax
        tspam_aux = [tspamAmos(i)+Dt*(l-1):Dt/2:tspamAmos(i)+Dt*l];% Subdivision
of tspam
        tspam_aux(1)

        % Real process simulation
        Par{1} = Ks + (randn(1,length(diag(covarPar)))*sqrt_covarPar);% +
0.0240;% real process noise (nonlinear)
        [T,Xk] = simulacaoX(tspam_aux,xk(:,i),Par);% Process simulation
        xk(:,i+1) = Xk(end,:)';
        xk(2,i+1) = max(1e-6,xk(2,i+1));% Zero lower bound to Co2
        xk(2,i+1) = min(solO2(u0(3)),xk(2,i+1));% 100% upper bound to Co2

        % Measurement and fault simulation
        covarMeas = C*[(xk(1,i+1)*0.05)^0.5 0 0 0; 0
(0.274/100^2)*solO2(u0(3))^2 0 0; 0 0 0.838 0; 0 0 0 0.03876]*C';
        yk(:,i+1) = mvnrnd((C*xk(:,i+1))',covarMeas)';% Normal noise addition to
measurement

        [u,du] = MISODMC(u,Du,ts,N,M,PH,xk(:,i+1),xk(:,i+1),sp(i),Par); % DMC DO
control

        dmatrix(:,i) = du;

        Tf = 2/3600;
        alpha = tAmos/(Tf + tAmos);
        if i==1
            uf = u;
        else
            uf = alpha*u + (1-alpha)*uplot(:,i-1);
        end
        Par{18} = uf;%u;
        uplot(:,i+1) = uf;%u;
        uplot(:,i+2) = uplot(:,i+1);

    end
end

Erro = sp-(yk(1:imax)./solO2(u0(3)).*100);
RMSE = (1/imax * (Erro * Erro'))^0.5;

%MISO DMC
RMCM_Qar = (1/imax * (dmatrix(1,:) * dmatrix(1,:)'))^0.5;
RMCM_P = (1/imax * (dmatrix(4,:) * dmatrix(4,:)'))^0.5;
RMCM_QO2 = (1/imax * (dmatrix(2,:) * dmatrix(2,:)'))^0.5;

RESULTADO = [RMSE,RMCM_Qar,RMCM_P,RMCM_QO2];

```

```

% Plot of results
figure(1)
plot(tspanAmos,xk(1,:)','-k',tspanAmos,xk(2,:)'./solO2(u0(3)).*100,'-b',...
      tspanAmos,xk(3,:)','-r',tspanAmos,xk(4,:)','-g',...
      tspanAmos,yk(1,:)'./solO2(u0(3)).*100,'.b');
legend('X','O2 (%sat)','S','P','O2meas');

figure(2)
plot(tspanAmos,xk(4,:)','-g');
legend('P');

figure(3)
plot(tspanAmos,(1000*xk(4,:)./xk(1,:))','-g');
legend('Y');

figure(4)
plot(tspanAmos(1:end),uplot(1,1:end-1)','-k',tspanAmos(1:end),uplot(2,1:end-1)','-b',...
      tspanAmos(1:end),uplot(4,1:end-1)','-r');
legend('Qair','QO2','p');

figure(5)
plot(tspanAmos(2:end),dmatrix(1,:)','-k',tspanAmos(2:end),dmatrix(2,:)','-b',...
      tspanAmos(2:end),dmatrix(4,:)','-r');
legend('Qair','QO2','p');

function C = solO2(T)

% Calculo da solubilidade do O2 no meio de cultivo [g/L]
a = 14.69035283;
b = -0.400237164;
c = 0.008271568;
d = -9.69863*10^(-5);
e = 4.83882*10^(-7);
% C = 0.8600504124892*(a + b*T(:,1) + c*T(:,1).^2 + d*T(:,1).^3 ...
%     + e*T(:,1).^4)/1000; % [g/L]
C = 0.8600504124892*(a + b*T(:,1) + c*T(:,1).^2 + d*T(:,1).^3 ...
    + e*T(:,1).^4); % [mg/L]

end

function [p] = pressao(x,u,ind,Par)

% out/2016
% Calculo da pressao necessaria para dC_o2/dt~0 <-> OUR = OTR
% x = [Cx Co Cs]
% u = [Qar Qo2 T]

if ind == 0 % fase de crescimento
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    Yxs = Par{3};
    bu = Par{4};
    Yxo2 = Par{5};

```

```

    aq = Par{6};
    bq = Par{7};
    ak = Par{8};
    bk = Par{9};
    ck = Par{10};
    teta = Par{11};
    mi = (au*u(3)+bu)*x(3)/(Ks+x(3));
else % fase de inducao
    % Parameters array list
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    beta = Par{3};
    Tpx = Par{4};
    km = Par{5};
    Tref = Par{6};
    bkd = Par{7};
    Yxs = Par{8};
    akd = Par{9};
    bu = Par{10};
    Yxo2 = Par{11};
    aq = Par{12};
    bq = Par{13};
    ak = Par{14};
    bk = Par{15};
    ck = Par{16};
    teta = Par{17};
%     u = Par{18};
    mi = (au*u(3)+bu).*exp(-beta*x(4)/x(1)*(u(3)-26.831))*x(3)/(Ks+x(3))-
    (akd*u(3)+bkd);
end

% Solubilidade do O2 no meio de cultivo
C = solO2(u(3));%[g/L]

% Calculo da pressao
% p
=0.21*(u(1)+u(2))./(0.21*u(1)+u(2)).*((mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq).*x(1)./(ak./(1+exp
(bk*((u(1)+u(2))/5+ck))).*teta.^(u(3)-27).*C)+0.3);
p
=0.21*(u(1)+u(2))./(0.21*u(1)+u(2)).*(1000*(mi/Yxo2+aq*u(3).^3+bq).*x(1)./(ak./(
1+exp(bk*((u(1)+u(2))/5+ck))).*teta.^(u(3)-27).*C)+0.3); %qO2[mg/g/L]
end

function [uc] = DOcontrol(xk,u,u0,ind,Par)

% jun/2017
% DO control calculation
% x = [Cx Co Cs]
% u = [Qar Qo2 T]

options = optimset('Display','off','Algorithm','sqp');% better performance

if ind == 0 % fase de crescimento
    Ks = Par{1};
    au = Par{2};
    Yxs = Par{3};

```

```

bu = Par{4};
Yxo2 = Par{5};
aq = Par{6};
bq = Par{7};
ak = Par{8};
bk = Par{9};
ck = Par{10};
teta = Par{11};
mi = (au*u(3)+bu)*xk(3) ./ (Ks+xk(3));
else % fase de inducao
% Parameters array list
Ks = Par{1};
au = Par{2};
beta = Par{3};
Tpx = Par{4};
km = Par{5};
Tref = Par{6};
bkd = Par{7};
Yxs = Par{8};
akd = Par{9};
bu = Par{10};
Yxo2 = Par{11};
aq = Par{12};
bq = Par{13};
ak = Par{14};
bk = Par{15};
ck = Par{16};
teta = Par{17};
% u = Par{18};
mi = (au*u(3)+bu) .*exp(-beta*xk(4)/xk(1) *(u(3)-26.831)) *xk(3) / (Ks+xk(3)) -
(akd*u(3)+bkd);
end

% Update of u according to cell growth
if u(1)<20 && u(2)==0
lb = [0;0;u0(3);u0(4)]; % lb for u
ub = [20;0;u0(3);u0(4)]; % ub for u
u = fmincon(@(u) (1-pressao(xk,u,ind,Par))^2,u,[1 1 0 0;-1 -1 0 0],[20;-
5],[],[],lb,ub,[],options);
u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
elseif u(1)==20 && u(2)==0 && u(4)<=4*0.99
u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
elseif u(4)>4*0.99
lb = [0;0;u0(3)]; % lb for u
ub = [20;20;u0(3)]; % ub for u
u = fmincon(@(u) (4-pressao(xk,u,ind,Par))^2,u,[],[],[1 1 0
0],[20],lb,ub,[],options);
u(4) = pressao(xk,u,ind,Par);
end

uc = u;% updated u vector

end

function [T,X] = simulacaoX(tspam,x0,Par)

```

```

opcoes = odeset('AbsTol',1e-6,'RelTol',1e-3);
% opcoes = odeset('AbsTol',1e-10,'RelTol',1e-7);

[T,X] = ode45(@fun_odeX,tspam,x0,opcoes,Par);

end

function dx = fun_odeX(t,x,Par)

% System mathematical model (growth phase)
% x = [Cx Co Cs Cp]
% u = [Qar Qo2 T]

% Parameters array list
Ks = Par{1};
au = Par{2};
beta = Par{3};
Tpx = Par{4};
km = Par{5};
Tref = Par{6};
bkd = Par{7};
Yxs = Par{8};
akd = Par{9};
bu = Par{10};
Yxo2 = Par{11};
aq = Par{12};
bq = Par{13};
ak = Par{14};
bk = Par{15};
ck = Par{16};
teta = Par{17};
u = Par{18};

% Oxygen transfer calculation (OTR)
kLa = ak/(1+exp(bk*((u(1)+u(2))/5+ck)))*teta^(u(3)-27);
C = solO2(u(3));% o2 solubility [g/L]
p = u(4);
% p = pressao(x',u,0,Par); %pressure estimation in order to OTR=OUR
OTR =kLa*C*(p*(0.21*u(1)+u(2))./((u(1)+u(2))*0.21)-x(2)/solO2(u(3)));%

% Specific growth rate
mi = (au*u(3)+bu)*exp(-beta*x(4)./x(1).*(u(3)-Tref))*x(3)/(Ks+x(3));
mid = akd*u(3)+bkd;

% Protein production rate
mip = mi*x(4)/x(1) + (km*mi-x(4)/x(1))/Tpx;

% Oxygen uptake calculation (OUR)
% qO2 = (mi-mid)/Yxo2+aq*u(3).^3+bq; %[g/g]
qO2 = ((mi-mid)/Yxo2+aq*u(3).^3+bq)*1000; %[mg/g]
OUR = qO2*x(1);

% EDOS
dCx = (mi-mid)*x(1);
dCo = OTR-OUR;

```

```

dCs = -mi/Yxs*x(1);
dCp = mip*x(1);

dx = [dCx; dCo; dCs; dCp]; %deve sair vetor coluna
end

function [uf,du] = MISODMC(usr,Dusr,ts,N,M,P,xminus,x,ysp,Par)

% Dynamic Matrix Control
%
% Implementaion based on Bequette 2003 and Seborg et al. (2016)
%

% Variable used to detect control stage

% Time spam
dt = ts/N;% Sampling time
tspam = [0:dt:P*dt]';

% Identification of step reponse model
%Du = [DQar;Dp;DyO2]
%du = [DQar;DQO2;DT;Dp]

Du = Dusr;
[T,ynl,yfree,S1,S2,S3] = MISOSTepModel(tspam,x,usr,Du,Par);

% Input calculation
% Future matrix (P×M)
Sf = zeros(P,3*M);
line=1;
for i=1:3:3*M

    Sf([line:P],i) = S1(1:P-line+1);
    Sf([line:P],i+1) = S2(1:P-line+1);
    Sf([line:P],i+2) = S3(1:P-line+1);
    line = line + 1;
end

% Wheighting: input (W)

w=[];
w_values = ones(1,3)*10^7;

for j = 1:3:3*M
    w = [w,w_values];
end
W=diag(w);

% Bias correction
d = x(2) - xminus(2);

% Unforced error calculation
r = ysp*ones(P,1);% Setpoint
E = r - yfree(1:P) - d;

```

```

% Moves calculation
deltau = inv(Sf'*Sf+W)*Sf'*E;

% u transformation to the final actuator
du = zeros(length(usr),1);

if usr(1)== 20
    deltau(1)=0;
end

% Qair
du(1) = deltau(1);
% Pressure
du(4) = deltau(2);
% yO2
yO2 = (0.21*usr(1)+usr(2))/(usr(1)+usr(2));
DQ = (usr(1)+usr(2))*deltau(3)/0.79;
du(1) = du(1)-DQ;
du(2) = DQ;

% Update of u
uf = usr+du;

if uf(1)+uf(2)>20
    du(2)=0;
    uf = usr+du;
end

uf = min([20;20;37;4],uf);% Upper bound
uf = max([0;0;27;1],uf);% Lower bound

end

function [T,ynl,yfree,S1,S2,S3] = MISOSStepModel(tspam,x,u,Du,Par)

% This function calculates the paramaters of step response model - Induction
Phase
%
% Implementaion according to Bequette 2003 and Seborg et al. (2016)
%

% Step actuation
% u = [Qar Qo2 T p]
%Du = [DQar;Dp;DyO2] % used for sr model identification
%du = [DQar;DQO2;DT;Dp]
du = zeros(length(u),1);
stage = 1;

% Simulation (free response)
Par{18} = u;
[T,X] = simulacaoX(tspam,x,Par);
yfree = X(:,2)./solO2(u(3)).*100;

while stage <=3

```

```

switch stage
    case 1 % Qair
        du(1) = Du(1);
    case 2 % Pressure
        du(4) = Du(2);
    case 3 % yO2
        yO2 = (0.21*u(1)+u(2))/(u(1)+u(2));
        DQ = (u(1)+u(2))*Du(3)/0.79;
        du(1) = -DQ;
        du(2) = DQ;
end

uinc = u + du;
Par{18} = uinc;

% Simulation (response)
[T,X] = simulacaoX(tspam,x,Par);
ynl = X(:,2)./solO2(u(3)).*100;
% Dy = zeros(length(y)-1,1);% Space allocation

% % Diference state
% for i=1:length(Dy)
%     Dy(i)=y(i+1)-y(i);
% end

% Step response model parameters normalized (assuming du=1)
% S = Dy*1/Du(stage);
% S = (ynl-ynl(1))/Du(stage);
S = (ynl-yfree)/Du(stage);

if stage == 1
    S1 = S;
elseif stage == 2
    S2 = S;
else
    S3 = S;
end

stage = stage + 1;
Par{18} = u;
du = zeros(length(u),1);

end

end

```