



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAFAEL AKIRA AKISUE

**Implementação de sistema nebuloso (“fuzzy”) para controle de oxigênio dissolvido no cultivo de *Escherichia coli* para expressão de proteínas recombinantes**

SÃO CARLOS

2022

Rafael Akira Akisue

**Implementação de sistema nebuloso (“fuzzy”) para controle de oxigênio dissolvido no cultivo de *Escherichia coli* para expressão de proteínas recombinantes**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rafael Akira Akisue, realizada em 27/04/2022.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ruy de Sousa Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez (UFG)

Prof. Dr. Edson Romano Nucci (UFSJ)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Lauro e Maura. Foi uma longa jornada, mas sempre tive a certeza que não a estava trilhando sozinho.*

## AGRADECIMENTOS

A meus amados pais, Lauro e Maura, cujo agradecimento é difícil expor em simples palavras. Foi uma caminhada longa e difícil. Passamos por altos e baixos, vimos nosso mundo ser virado de cabeça para baixo para chegar ao “novo normal”. Estar hoje aqui só foi possível graças a vocês, que nunca desistiram, nunca esmoreceram e me apoiaram nos momentos mais difíceis para que eu realizasse esse sonho. Vocês são meu modelo de integridade, moralidade e conduta. Sua coragem, força, foco e fé foram meus alicerces nessa jornada.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior, que me abriu as portas para esse caminho. Olho com muito carinho os 7 anos que trabalhamos juntos e agradeço imensamente o quanto aprendi sob sua orientação. Um professor cuidadoso, um pesquisado dedicado, um orientador parceiro. Este é o modelo que tive, e espero que tenha correspondido às suas expectativas.

Ao professor Dr. Antonio Carlos Luperni Horta, que esteve comigo desde o início da jornada na Pós-Graduação. Agradeço todos os conselhos, os ensinamentos e por ter me acolhido no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos 2 (LaDABio2).

Ao meu companheiro Wagner Carvalho Santiago, que nunca desistiu de mim ou de me apoiar nessa jornada da Pós-Graduação. Sempre tive seu carinho nos momentos difíceis e com você aprendi que sou o único que pode correr atrás dos meus sonhos. Agradeço por ter te encontrado e por todos os momentos que vivemos juntos. Agradeço também à sua família que me acolheu como um filho.

Ao meu amigo e colega de laboratório Matheus Lopes Harth, que me acompanhou durante todo aprendizado no laboratório e esteve comigo em diversos cultivos me apoiando. Uma pessoa de coração enorme, gentil e um grande amigo.

Aos amigos do LaDABio 2: Lais Portugal Rios da Costa Pereira, Vanessa Guedes, Caroline Perez, Juliana Sandri, Thiago Mesquita, Valdemir Cardoso e Guilherme Palma pelas rizadas, pelos ensinamentos e por todo companheirismo. Nos divertimos juntos, passamos noites em claro, nos apoiamos nas derrotas e celebramos vitórias.

Aos amigos do Laboratório de Fábricas Celulares (Lafac): Davi Oliveira, Josivan Cunha, Gabriel Luz, Daniel Altmann e Raquel Batista pelos ensinamentos e amizade durante esses anos.

Aos professores Adilson José da Silva e Teresa Cristina Zangirolami pelos ensinamentos ao longo do doutorado.

Aos amigos da Pós-Graduação: Juliana Alves, Cássia Sidney Santana, Camila Lacerda, Rauber Daniel Pereira, Marina Del Bianco, Lucas Ramos, Alisson Marques, Thiago Melo, Ana Carolina Vieira, Rafael de Araújo, Leticia Passos, Eric Katayama, Alex Ribeiro, Maria Carlota, Mayara Viera, Bruna Pratto e Alice Torres.

Aos meus amigos da graduação: Fabiana Massini, Paula Hashimoto, Ana Elisa Lista, Nathália Mello, Ana Elisa Achilles, Ariane Sbrice e Bruna Roque.

Aos técnicos que me ajudaram.

À minha família.

Aos demais amigos que não puderam ser citados nominalmente, mas que merecem todos os agradecimentos.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar, todo seu corpo técnico e docente pelos 12 anos em que me abrigou.

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“É possível resistir à invasão de qualquer exército, mas não é possível resistir à  
invasão das ideias”  
(Victor Hugo)

## RESUMO

Devido a baixa solubilidade do oxigênio em água e limitações mecânicas dos biorreatores, assegurar um suprimento de oxigênio dissolvido adequado no cultivo de *Escherichia coli* é um desafio em termos de controle. Sob a luz destes fatos um controle *fuzzy* de oxigênio dissolvido foi desenvolvido baseado numa estratégia de árvore de decisão, presente na literatura, e implementado no sistema de supervisão e monitoramento de cultivos celulares (SUPERSYS\_HCDC). O algoritmo foi codificado em MATLAB e os parâmetros das funções de pertinência foram otimizados pela ferramenta *Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System*. O controlador *fuzzy* foi composto de três sistemas de inferência nebulosos independentes: Princ1, Princ2 - que determinavam se haveria um incremento ou uma redução nas vazões de ar e oxigênio (respectivamente) – e Delta, que estimava o tamanho destas variações. Para realizar o treinamento dos sistemas de inferência *fuzzy* foram utilizados dados de cultivos de *E. coli* previamente controlados via árvore de decisão. Após o treinamento, os primeiros testes com o controlador nebuloso consistiram de simulações utilizando modelos neurais (mimetizando os cultivos de *E. coli*). Os resultados apontaram que a *fuzzyficação* da árvore de decisão foi bem sucedida, resultando em mudanças mais suaves nas vazões de ar e oxigênio em relação às obtidas utilizando o controle anterior (via árvore de decisão). Em todos os casos a concentração média de oxigênio dissolvido foi próxima ao *setpoint* de 30%, com atenuação dos picos da variável controlada. Para provar a viabilidade do controlador nebuloso foram realizados testes iniciais que consistiram de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial) e *E. coli* (cepa PspA4Pro), parcialmente controlados pelo controlador *fuzzy*. Ambos foram realizados em um biorreator de 5 L de montagem própria do LaDABio 2 e supervisionados pelo programa SUPERSYS\_HCDC. Para os cultivos com a *E. coli*, concentração média de oxigênio dissolvido foi muito próxima de 30% e seu desvio padrão ficou abaixo de 6%, apontando um abrandamento dos picos de oxigênio dissolvido. Como teste de robustez foram realizados cultivos de *E. coli* inteiramente sob a supervisão do controlador *fuzzy* otimizado. Foram realizados cultivos sem indução e com períodos diferentes de indução (via IPTG). Para o cultivo sem indução foi obtida uma concentração celular final de 27,50 g<sub>massa seca</sub>/L em cerca de 13 horas de cultivo. De modo geral o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo de 30,5% e o desvio padrão ficou em 6,30%. A atenuação dos degraus das vazões de ar e oxigênio refletiu num perfil mais suave de concentração de oxigênio dissolvido. Para o cultivo de alta densidade celular seguido de um período de 4,5 horas de indução foi possível obter uma concentração celular máxima de 35,00 g<sub>massa seca</sub>/L em cerca de 16 horas de cultivo. A concentração média de oxigênio dissolvido foi mantida a 29,80% e o desvio padrão foi de 5,52%. Os resultados apresentados nesta tese atestam não só um aumento da vida útil dos fluxômetros de massa (dada a sua sensibilidade a oscilações abruptas nas variáveis manipuladas), mas também apontam para uma possível redução do estresse metabólico sofrido pela *E. coli* (dada sua sensibilidade a flutuações na concentração de oxigênio dissolvido). A lógica *fuzzy* se mostrou exitosa para o controle do oxigênio dissolvido em biorreatores, uma área que carece de soluções novas para problemas complexos.

**Palavras-chave:** *Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System*, oxigênio dissolvido, controle *fuzzy*, *Escherichia coli* recombinante, SUPERSYS\_HCDC

## ABSTRACT

Due to low oxygen solubility in water and mechanical limitations of a bioreactor, ensuring an adequate dissolved oxygen supply during a recombinant *Escherichia coli* cultivation is a major challenge in process control. In light of these facts, a fuzzy dissolved oxygen controller was developed based on a decision tree strategy (presented in the literature) and implemented in the cell culture supervision and monitoring system (SUPERSYS\_HCDC). The algorithm was coded in MATLAB and the membership function parameters were optimized by the Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System tool. The fuzzy controller was composed of three independent fuzzy inference systems: Princ1, Princ2 – that determined if there would be and increase or a reduction in air and oxygen flow rates (respectively) – and Delta system, that estimated the size of those variations. *E. coli* cultivation data previously controlled by the decision tree were employed in the training process of the three fuzzy inference systems. After the training process, the first tests with the fuzzy controller consisted of simulations using neural network models of the process (mimicking *E. coli* cultivation conditions). Results showed that the fuzzification process of the decision tree was successful, resulting in smoother changes in air and oxygen flow rates comparing with those provided by the previous controller (decision tree). In all simulations the dissolved oxygen concentration mean was kept close to its setpoint value of 30% with an attenuation of dissolved oxygen peaks. In order to prove the viability of the fuzzy controller, the initial tests consisted of *Saccharomyces cerevisiae* (commercial yeast) and *E. coli* (PspA4PRO strain) cultures, partially supervised by the fuzzy controller. Both cultivations were carried out in a 5 L, in-house, bioreactor and supervised by the SUPERSYS\_HCDC software. On average, for the *E. coli* cultures, the dissolved oxygen concentration was kept close to 30% and its standard deviation was lower than 6%, pointing towards a softening of the peaks observed in the controlled variable. For the robustness tests the optimized fuzzy controller was put in charge of dissolved oxygen control for the entire *E. coli* cultivation period. The cultivations were carried out without the induction phase and with different induction periods (using IPTG as the inductor). For the non-induced culture, the final cell mass concentration obtained was 27,50 g<sub>dry cell weight</sub>/L in 13 hours of cultivation. On average, the fuzzy controller kept the dissolved oxygen concentration at about 30,5% with a standard deviation of 6,30%. The attenuation of air and oxygen flow rates steps resulted in a smoother dissolved oxygen profile. For the high cell density cultivation followed by 4.5 hours of induction phase, the maximum cell mass concentration obtained was 35,00 g<sub>dry cell weight</sub>/L in 16 hours of cultivation. On average, the dissolved oxygen concentration was kept at about 29,80% with a standard deviation of 5,52%. The results presented in this thesis attest not only an increase in flowmeters lifespan (due to their sensibility of abrupt oscillation in the manipulated variables), but also point towards a possible reduction in the metabolic stress suffered by the *E. coli* (due to its sensitivity to fluctuation in dissolved oxygen concentration). Fuzzy logic has proven successful for controlling dissolved oxygen concentration in bioreactors, an area that lacks new solutions to complex problems.

**Keywords:** Adaptive Neuro Fuzzy Inference System, dissolved oxygen, fuzzy control, recombinant *Escherichia coli*, SUPERSYS\_HCDC

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema respiratório da <i>E. coli</i> .....	20
Figura 2 - Distribuição dos biofármacos por área terapêutica. ....	24
Figura 3 – Modelo para transferência de oxigênio .....	33
Figura 4 - Representação gráfica da teoria das duas películas estagnadas .....	34
Figura 5 - Funções de pertinência da variável linguística temperatura.....	47
Figura 6 - Estrutura do controlador nebuloso .....	49
Figura 7 - Representação do <i>fuzzy graph</i> .....	51
Figura 8 - Avaliação de um sistema nebuloso .....	52
Figura 9 - Exemplo de um sistema de inferência nebuloso .....	52
Figura 10 - Artigos baseados na lógica <i>fuzzy</i> agrupados por áreas do conhecimento publicados entre os anos de 2001 a 2020. ....	60
Figura 11 – Interface do <i>Fuzzy Inference System</i> . Em destaque as ferramentas de edição: <i>Fuzzy Logic Designer</i> (11A), <i>Membership Function Editor</i> (11B) e <i>Rule Editor</i> (11C). ....	69
Figura 12 – Interface do <i>Fuzzy Inference System</i> : destaque para as ferramentas de visualização são apresentadas as interfaces do <i>Rule Viewer</i> (12A) e <i>Surface Viewer</i> (12B)...	70
Figura 13 - Exemplo de sistema de inferência nebuloso otimizado via <i>ANFIS</i> .....	71
Figura 14 - Interface inicial do <i>Neuro-fuzzy Designer</i> .....	73
Figura 15 - Sistema de controle <i>fuzzy</i> dividido em 3 sistemas de inferência nebulosos. Da Esquerda para direita, sistema Delta (A) e sistemas Princ1 e Princ2 (B). Detalhamento do cálculo da variável auxiliar QarSe (C) .....	81
Figura 16 - Evolução do sistema Delta .....	83
Figura 17 - Evolução dos sistemas Princ1 e Princ2, em destaque a melhoria da granulação da variável auxiliar QarSe. Acima, à direita, a versão de AKISUE <i>et al.</i> , 2018. Abaixo, à direita, a versão final desenvolvida nesta tese. ....	84
Figura 18 - Superfície de resposta do sistema de inferência Delta .....	86
Figura 19 - Resumo dos sistemas de inferência nebulosos Delta, Princ1 e Princ2 (com suas respectivas variáveis linguísticas e valores linguísticos) .....	89
Figura 20 – Composição do simulador: controlador <i>fuzzy</i> , modelo neural do processo (composto pelas redes OD_net e Cx_net), controlador PID e a equação para o cálculo da velocidade específica de crescimento. ....	90

Figura 21 - Montagem do biorreator: à esquerda vista superior da tampa do biorreator completa com sensores e mangueiras (21A), à direita o reator selado pronto para esterilização (21B).....	96
Figura 22 – <i>Set up</i> do biorreator e montagem do aparato para controle das condições de cultivo .....	97
Figura 23 - Resultados das simulações para o controle <i>fuzzy</i> de oxigênio dissolvido utilizando o simulador. A linha tracejada preta representa os dados controlados via árvore de decisão, enquanto que a linha sólida vermelha representa os resultados do simulador utilizando o controlador <i>fuzzy</i> . Comparação entre os comportamentos das vazões de ar <b>(a)</b> e oxigênio <b>(b)</b> para ambos os controladores. Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido para ambos os controladores <b>(c)</b> e faixas para comparação dos valores de QarEscolha e QO2Escolha <b>(d)</b> para analisar a manutenção, aumento ou diminuição das vazões de ar e oxigênio.....	102
Figura 24 - Resultados das simulações baseadas no conjunto A12. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar <b>(a)</b> e oxigênio <b>(b)</b> simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A12 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles <b>(c)</b> . Faixas de QarEscolha e QO2Escolha otimizadas heurísticamente <b>(d)</b> .....	104
Figura 25 – Processo de melhoria contínua: resultados das simulações baseadas no conjunto A16. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar <b>(a)</b> e oxigênio <b>(b)</b> simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A16 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles <b>(c)</b> . Faixas de QarEscolha e QO2Escolha otimizados heurísticamente <b>(d)</b> . .....	106
Figura 26 - Processo de melhoria contínua: resultados das simulações baseadas no conjunto A12. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar <b>(a)</b> e oxigênio <b>(b)</b> simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A12 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles <b>(c)</b> . Faixas de QarEscolha e QO2Escolha otimizados heurísticamente <b>(d)</b> . .....	108
Figura 27 – Resultados do cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : comportamento da vazão de ar <b>(a)</b> em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso <b>(b)</b> . Ajustes experimentais do limite de QarEscolha <b>(c)</b> otimizada heurísticamente durante o cultivo. ....	111

Figura 28 - Resultados do cultivo de inicial de *E. coli* parcialmente controlado pelo controlador *fuzzy*. Durante as primeiras oito horas o controle da concentração de oxigênio foi realizada via árvore de decisão (dados omitidos). No período remanescente (entre 8 e 10 horas) o controle foi realizado via controlador *fuzzy*. Da esquerda para direita tem-se: comportamento das vazões de ar **(a)** e oxigênio **(b)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(c)**. Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha **(d)** otimizadas heurísticamente durante o cultivo. .... 113

Figura 29 - Resultados do cultivo de inicial de *E. coli* parcialmente controlado pela versão otimizada do controlador *fuzzy*. Durante as primeiras dez horas o controle da concentração de oxigênio foi realizado via árvore de decisão (dados omitidos). No período remanescente (entre 10 e 15 horas) o controle foi realizado via controlador *fuzzy*. Da esquerda para direita tem-se: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol **(a)**, comportamento das vazões de ar **(b)** e oxigênio **(c)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(d)**. Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha **(e)** otimizadas heurísticamente durante o cultivo. .... 115

Figura 30 - Resultados do cultivo *E. coli* controlado pela versão otimizada do controlador *fuzzy*: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol **(a)**, comportamento das vazões de ar **(b)** e oxigênio **(c)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(d)**. Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha **(e)** otimizadas heurísticamente durante o cultivo. .... 118

Figura 31 - Resultados do cultivo *E. coli* com período curto de indução: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol **(a)**, comportamento das vazões de ar **(b)** e oxigênio **(c)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(d)**. Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha **(e)** otimizadas heurísticamente durante o cultivo. .... 121

Figura 32 - Resultados do cultivo *E. coli* com período longo de indução: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol **(a)**, comportamento das vazões de ar **(b)** e oxigênio **(c)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(d)**. Faixas de ajustes experimentais

dos limites de QarEscolha e QO2Escolha (e) otimizadas heurísticamente durante o cultivo.  
..... 123

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Pseudocódigo de controle das vazões de ar e oxigênio .....	43
Quadro 2 - <i>Modus ponens</i> generalizado.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regras <i>fuzzy</i> ajustadas para o sistema nebuloso Delta.....	85
Tabela 2 – Parâmetros <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> das equações lineares de saída do sistema Delta. ....	86
Tabela 3 – Fases de construção das redes neurais (treinamento, validação e teste). O conjunto A16 foi utilizado para aferir o desempenho inicial do controlador nebuloso, já o conjunto A12 foi utilizado para realização de testes de robustez do sistema otimizado. ....	92
Tabela 4: Compilação dos resultados das simulações com o controlador nebuloso inicial e otimizado. ....	109
Tabela 5 - Regras nebulosas para os sistemas de inferência Princ1 e Princ2 ajustadas pelo <i>ANFIS</i> .....	135
Tabela 6 – Parâmetros <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> e <i>f</i> das funções lineares de saída do sistema Princ1 .....	139
Tabela 7 – Parâmetros <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> e <i>f</i> das funções lineares de saída do sistema Princ2 .....	143

## LISTA DE SIGLAS

*FIS: Fuzzy Inference System*

*ANFIS: Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System*

*HCDC: High Cell Density Cultivation*

CADC: Cultivo de Alta Densidade Celular

LaDABio: Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos

PID: Proporcional, Integral e Derivativo

PI: Proporcional e Integral

*FDA: U. S. Food and Drug Administration*

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Reduzida)

MBC: Metodologias Baseadas no Conhecimento

*KBM: Knowledge Based Methodologies*

*CDC: Centers for Disease Control and Prevention*

ATP: Adenosina Trifosfato

ADP: Adenosina Difosfato

*FNR: Fumarate, Nitrate Redutase*

*ArcAB: Anoxic Redox Control AB*

*CSTR: Continuous Stirred Tank Reactor*

IPTG: Isopropil-beta-d-tiogalactopiranosídeo

*SISO: Single Input, Single Output*

*SIMO: Single Input, Multiple Outputs*

*MISO: Multiple Inputs, Single Output*

*MIMO: Multiple Inputs, Multiple Outputs*

*NAR: Nonlinear Autoregressive*

*NARX: Nonlinear Autoregressive with Exogenous Input*

*LDDN: Layered Digital Dynamic Networks*

*FTDNN: Focused Time-Delayed Neural Network*

*DTDNN: Distributed Time Delay Neural Networks*

*NNTS: Neural Network Time Series*

PGA: Penicilina G-Acilase

BP: Baixo e Positivo

MP: Médio e Positivo

AP: Alto e Positivo

MAP: Muito Alto e Positivo

*E. coli*: *Escherichia coli*

*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

*HDF*: *High Density Fermentation*

PPG: Polipropileno glicol

DO<sub>600nm</sub>: Densidade Óptica a 600 nm

*RID*: *Refraction Index Detector*

UV: ultravioleta

VI: *Virtual Instrument*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta$ : delta	(L/min)
$\eta$ : Taxa de aprendizagem	
$\mu$ : velocidade específica de crescimento	(1/h)
Agit: velocidade de agitação	(rpm)
OD: Concentração de oxigênio dissolvido	(%)
SetP: <i>Setpoint</i> da concentração de oxigênio dissolvido	(%)
Kc: Ganho proporcional do controlador PID	(rpm/%)
Ti: Ganho integral do controlador PID	(s.%/rpm)
Td: Ganho derivativo do controlador PID	(s.rpm/%)
$n_{O_2}$ : Fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial	$\left(\frac{g_{O_2}}{m^2 h}\right)$
H: Constante de Henry	(mol/atm.L)
$K_{LA}$ : coeficiente volumétrico de transferência de $O_2$	$(h^{-1})$
Cx: concentração celular	(g/L)
$m_o$ : coeficiente de manutenção	$\left(\frac{g_{O_2}}{g_{célula h}}\right)$
F: vazão de alimentação	(L/min)
$C_{S0}$ : concentração inicial de substrato	(g/L)
Agit <sub>LS</sub> : limite superior de agitação	(rpm)
Qar: Vazão de ar	(l/min)
QO <sub>2</sub> : Vazão de oxigênio	(l/min)
Qmáx: Vazão máxima de gás permitida no sistema	(l/min)
Qar <sub>(-1)</sub> : Vazão de ar anterior	(l/min)
QO <sub>2(-1)</sub> : Vazão de oxigênio anterior	(l/min)
QarEscolha: Variável auxiliar de saída da subrotina Princ1	
QO <sub>2</sub> Escolha: Variável auxiliar de saída da subrotina Princ2	
QarSe: Variável auxiliar de entrada das subrotinas Princ1 e Princ2	
OD <sub>LI</sub> : Limite inferior da concentração de oxigênio dissolvido	(%)
R: coeficiente de correlação	
$\mu_{máx}$ : Velocidade específica de crescimento máxima	$(h^{-1})$
$\mu_{crit}$ : Velocidade específica de crescimento crítica	$(h^{-1})$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
1.3	ESTRUTURA DA TESE .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1	OXIGÊNIO E O METABOLISMO DA <i>E. coli</i> .....	19
2.2	Proteínas recombinantes.....	24
2.3	Cultivo de alta densidade celular.....	25
<b>2.3.1</b>	<b>Estratégias para cultivos de alta densidade celular .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Fatores que afetam o crescimento em cultivos de alta densidade celular .....</b>	<b>27</b>
2.3.2.1	. <i>Produção de acetato</i> .....	27
2.3.2.2	. <i>Meio de cultura</i> .....	28
2.3.2.3	. <i>Indutor</i> .....	28
2.3.2.4	. <i>Temperatura</i> .....	29
2.3.2.5	. <i>Oxigênio</i> .....	29
2.4	Controle de processos.....	30
<b>2.4.1</b>	<b>Aspectos gerais de um sistema de controle .....</b>	<b>30</b>
2.4.1.1	. <i>Modelagem Fenomenológica (mecanística)</i> .....	31
2.4.1.2	. <i>Modelagem Empírica (Experimental)</i> .....	32
2.4.1.3	. <i>Modelagem Semi-Empírica (Híbrida)</i> .....	32
<b>2.4.2</b>	<b>Controle do oxigênio dissolvido.....</b>	<b>32</b>
2.4.2.1	<i>Abordagem “caixa-branca”</i> .....	33
2.4.2.2	<i>Abordagem “caixa preta”</i> .....	40
2.4.2.3	<i>Abordagem “caixa cinza”</i> .....	41
2.5	Sistemas <i>fuzzy</i> .....	45

<b>2.5.1</b>	<b>Lógica <i>fuzzy</i>: fundamentos .....</b>	<b>45</b>
2.5.1.1	<i>Lógica Nebulosa.....</i>	45
2.5.1.2	<i>Conjuntos nebulosos.....</i>	45
2.5.1.3	<i>Funções de pertinência .....</i>	46
2.5.1.4	<i>Variáveis linguísticas .....</i>	46
2.5.1.5	<i>Operadores lógicos .....</i>	47
<b>2.5.2</b>	<b>Controle nebuloso.....</b>	<b>48</b>
2.5.2.1	<i>Controlador nebuloso.....</i>	49
2.5.2.2	<i>Regras nebulosas.....</i>	50
2.5.2.3	<i>Avaliação de um sistema nebuloso.....</i>	51
2.5.2.4	<i>Tipos de sistemas nebulosos.....</i>	53
<b>2.5.3</b>	<b>Aplicações do controle nebuloso .....</b>	<b>54</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Ferramentas computacionais .....</b>	<b>62</b>
2.5.4.1	<i>LabVIEW.....</i>	63
2.5.4.2	<i>SUPERSYS_HCDC .....</i>	64
2.5.4.3	<i>Fuzzy Logic toolbox.....</i>	67
2.5.4.4	<i>Redes Neurais Artificiais.....</i>	74
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
3.1	Desenvolvimento do controlador nebuloso.....	79
<b>3.1.1</b>	<b>Aquisição dos dados de cultivo de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Controlador <i>fuzzy</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Simulador .....</b>	<b>90</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Implementação do controlador nebuloso na ferramenta SUPERSYS_HCDC</b>	<b>93</b>
3.2	Cultivos celulares .....	93
<b>3.2.1</b>	<b>Cepas.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Meios de cultivo .....</b>	<b>94</b>

<b>3.2.3</b>	<b>Biorreator e aparato experimental .....</b>	<b>95</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Condições de cultivo .....</b>	<b>97</b>
3.2.4.1	<i>Cultivo da S. cerevisiae</i> .....	97
3.2.4.2	<i>Cultivo de E. coli</i> .....	98
<b>3.2.5</b>	<b>Métodos analíticos .....</b>	<b>100</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>101</b>
4.1	Simulações computacionais .....	101
4.1.1	Resultados utilizando o controlador em seu formato inicial .....	101
4.1.2	Processo de melhoria contínua e novas simulações .....	105
4.2	Experimentos iniciais .....	110
4.2.1	Cultivo em biorreator da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	110
4.2.2	Cultivo em biorreator da bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	112
4.2.3	Estrutura final do controlador <i>fuzzy</i> e testes com a <i>E. coli</i> .....	114
4.3	Testes finais em biorreator .....	116
4.3.1	Cultivo <i>E. coli</i> sem indução .....	117
4.3.2	Cultivo de <i>E. coli</i> com indução .....	120
<b>5</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>125</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>128</b>
	<b>APÊNDICE A – Regras nebulosas ajustadas para os sistemas Princ1 e Princ2 .....</b>	<b>135</b>
	<b>APÊNDICE B – PARÂMETROS DE SAÍDA DAS FUNÇÕES LINEARES DO SISTEMA NEBULOSO PRINC1 .....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE C – PARÂMETROS DE SAÍDA DAS FUNÇÕES LINEARES DO SISTEMA NEBULOSO PRINC2 .....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de melhoria da técnica de cultivo de alta densidade celular vem sendo estudado no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio)/UFSCar desde os anos 2000 e culminou no desenvolvimento do SUPERSYS\_HCDC. Este software, codificado nas plataformas MATLAB e LabVIEW, foi o primeiro software nacional para monitoramento e controle de biorreatores. A versão atual conta com uma composição de módulos, tais como: alarmes, controle de fases, controle de vazão de alimentação (baseado em inteligência artificial), controle de concentração de oxigênio dissolvido (composto por uma árvore de decisão para manipulação das vazões de ar e oxigênio e um controlador PID para manipulação da agitação), controle de pH e temperatura. Sua plataforma modular é uma das características mais atraentes, convidando pesquisadores a contribuir de modo a sempre se manter em linha com as técnicas de controle mais modernas (HORTA, 2011).

Dada a importância da bactéria *Escherichia coli* como modelo procarioto e fábrica celular de cerca de 30% dos biofármacos aprovados pela FDA em 2017, esforços foram realizados para melhorar a produtividade do cultivo celular. Os avanços da técnica de cultivos de alta densidade celular se deram em diversas frentes: disponibilidade de oxigênio dissolvido, composição do meio, produção de acetato, estratégia de alimentação, tipo de biorreator e política operacional (LEE, 1996; RIESENBERG, 1991; RIESENBERG; GUTHKE, 1999; SHILOACH; FASS, 2005). Porém, um dos grandes desafios dessa técnica é garantir um suprimento adequado e contínuo de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. É ponto pacífico que a privação de oxigênio tem efeitos nocivos no crescimento da *E. coli* e na produtividade de biomassa devido ao acúmulo de subprodutos inibitórios (por exemplo o acetato) (LULI; STROHL, 1990; MAJEWSKI; DOMACH, 1990; NAKANO *et al.*, 1997; PHUE; SHILOACH, 2005). Dada a baixa solubilidade do oxigênio em água e limitações mecânicas do biorreator (agitação limitada para evitar cisalhamento da célula e oxigênio limitado pelo mecanismo de aspensão), o controle da concentração de oxigênio dissolvido é altamente não linear e representa um desafio em termos de controle (MARTIN; COUCH, 1996; SCHMIDELL *et al.*, 2001). Em relação às estratégias atuais, a maioria sofre com picos na concentração de oxigênio dissolvido e um comportamento oscilatório das vazões de ar e oxigênio. Neste contexto, esforços foram direcionados para melhorar o controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreatores.

Para superar as dificuldades relacionadas à dinâmica variável do processo, controles adaptativos foram desenvolvidos. Num primeiro momento foi proposto um controlador adaptativo, cujos parâmetros foram ajustados via método dos mínimos quadrados recursivo. As variáveis manipuladas foram a vazão de ar e a velocidade de agitação. Os resultados mostraram melhora tanto na estabilidade quanto na performance, quando comparado com um controlador PID clássico (LEE *et al.*, 1991). Por outro lado, objetivando criar uma estratégia de controle independente de um modelo com equações complexas, foi proposto um modelo auto regressivo de média móvel. O controlador foi baseado na técnica de posicionamento de polos. Foram utilizadas como variáveis manipuladas a vazão de ar e a velocidade de agitação. Resultados positivos foram obtidos para a cepa selvagem de *E. coli*. Contudo, o controlador apresentou dificuldades durante a fase de indução para a cepa recombinante (HSIAO *et al.*, 1992). Ainda dentro das técnicas adaptativas, uma estratégia interessante se baseia na técnica de ganho escalonado. Dentre os controladores de oxigênio dissolvido propostos na literatura destacam-se dois, cujos modelos foram baseados em equações de balanços materiais. No primeiro, 5 pontos de operação foram estabelecidos (baseados na velocidade de agitação). Já no segundo, 16 pontos de operação foram estabelecidos (baseado na velocidade de agitação e na vazão de ar). Os controladores foram testados em simulações e validados em cultivos de *E. coli*. Embora ambos os controladores tenham conseguido manter, em média, a porcentagem de oxigênio dissolvido próxima a 30%, o primeiro controlador apresentou problemas no ajuste dos parâmetros e o segundo apresentou oscilações moderadas durante distúrbios induzidos (AREVALO *et al.*, 2018; MATS; HAGANDER, 1998).

Como alternativa à perspectiva tradicional de controle, as metodologias baseadas no conhecimento – MBC - (ou em inglês, Knowledge-Based Methodologies) foram introduzidas para lidar com as incertezas e não linearidades intrínsecas aos processos biológicos (KONSTANTINOV; YOSHIDA, 1992). Essas foram empregadas para desenvolvimento de um sistema híbrido-hierárquico para controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreatores. O controlador era um dos módulos que integravam o SUPERSYS\_HCDC (sistema de monitoramento e controle de biorreatores). Este módulo híbrido foi desenvolvido por meio da combinação de um controlador PID digital (manipulando a velocidade de agitação) e de um pseudocódigo de controle baseado numa árvore de decisão (manipulando as vazões de ar e oxigênio). Resultados mostraram que, em geral, foi possível manter os níveis de oxigênio dissolvido próximos ao valor de referência (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2011, 2014).

Contudo, análises detalhadas mostraram que a árvore de decisão forneceu respostas abruptas para as variáveis manipuladas, revelando a necessidade de melhoria desse sistema. O controle *fuzzy* é umas das MBC mais conhecidas e é formado pela combinação da teoria dos conjuntos *fuzzy* e da lógica *fuzzy* (aplicado a problemas de controle) (ZADEH, 1965, 1994). Um dos primeiros trabalhos na área de biorreatores empregando o controle *fuzzy* focou no controle da concentração de oxigênio dissolvido. Este foi desenvolvido utilizando como variáveis manipuladas a vazão de ar e a velocidade de agitação. No geral foi possível manter a concentração de oxigênio dissolvido próxima ao seu *setpoint* de 30% (MARTIN; COUCH, 1996). Em um trabalho mais recente a lógica *fuzzy* foi aplicada para simular a *fuzzyficação* da árvore de decisão criada por Horta (2011). Para isso, dados de cultivo de *E. coli* (previamente controlados via árvore de decisão) foram inseridos nas ferramentas *Fuzzy Inference System* (FIS) e *Adaptive Neuro Fuzzy Inference System* (ANFIS), a fim de construir a estrutura do controlador *fuzzy* e otimizar seus parâmetros. Os resultados das simulações mostraram que o controlador *fuzzy* forneceu respostas mais suaves de vazões de ar e oxigênio, mantendo a concentração de oxigênio dissolvido próxima ao seu *setpoint* de 30%. O citado trabalho de simulação é uma das poucas aplicações recentes empregando a lógica *fuzzy* para controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreatores (AKISUE; HORTA; DE SOUSA, 2018).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Sob a luz destes fatos, esta Tese teve como objetivo o desenvolvimento, implementação e validação de um controlador *fuzzy* de concentração de oxigênio dissolvido, baseado no trabalho inicial de simulação de Akisue e colaboradores (2018). É importante enfatizar que o citado trabalho focou apenas na avaliação (por meio de simulações computacionais) do potencial do controlador *fuzzy*. O presente trabalho, por outro lado, é mais robusto, trazendo novos resultados de simulação e validação experimental. Todavia, o trabalho inicial de simulação de Akisue e colaboradores (2018) pavimentou o caminho para a versão final otimizada do controlador *fuzzy* apresentado na presente Tese.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Realizar ajustes no algoritmo do controlador *fuzzy*: o trabalho inicial de simulação de Akisue e colaboradores (2018) pavimentou o caminho para a versão final do controlador *fuzzy* apresentado na presente Tese, mas foram necessárias diversas simulações durante o processo de desenvolvimento, visando à melhoria (em termos de robustez) dos sistemas de inferência nebulosos. Estas modificações foram necessárias para trazer o controlador *fuzzy* para um nível de implementação.

2) Implementar o controlador *fuzzy* na ferramenta SUPERSYS\_HCDC em substituição à árvore de decisão.

3) Realizar testes iniciais em biorreator que incluem: teste com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (para uma avaliação inicial da viabilidade prática do controlador *fuzzy*, corrigir possíveis falhas de implementação e treinar os protocolos operacionais do biorreator e do *software* SUPERSYS\_HCDC), e testes com a bactéria *Escherichia coli* (cultivos parcialmente controlados pelo controlador nebuloso).

4) Realizar cultivos de *E. coli* para verificação/validação da robustez do controlador *fuzzy*, que incluem: cultivos celulares sem indução e com indução (a fim de avaliar o desempenho do controlador *fuzzy* sob condições de estresse).

## 1.3 ESTRUTURA DA TESE

Em virtude dos tópicos analisados, optou-se por estruturar a presente tese em 5 Capítulos, divididos em 1-Introdução, 2-Revisão Bibliográfica, 3-Material e Métodos, 4-Resultados e Discussões e 5-Considerações finais.

O desenvolvimento experimental descrito no Capítulo 3 foi realizado no período de Junho/2019 a Dezembro de 2021 no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos 2 do DEQ/UFSCar. No Capítulo 4 serão apresentados os principais resultados que suportam as conclusões desta tese, alguns deles publicados em periódicos e congressos internacionais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados os principais conceitos relacionados ao papel do oxigênio no metabolismo da *E. coli*, ao cultivo de alta densidade celular, ao controle do oxigênio dissolvido em biorreatores e à lógica *fuzzy*.

### 2.1 OXIGÊNIO E O METABOLISMO DA *E. coli*

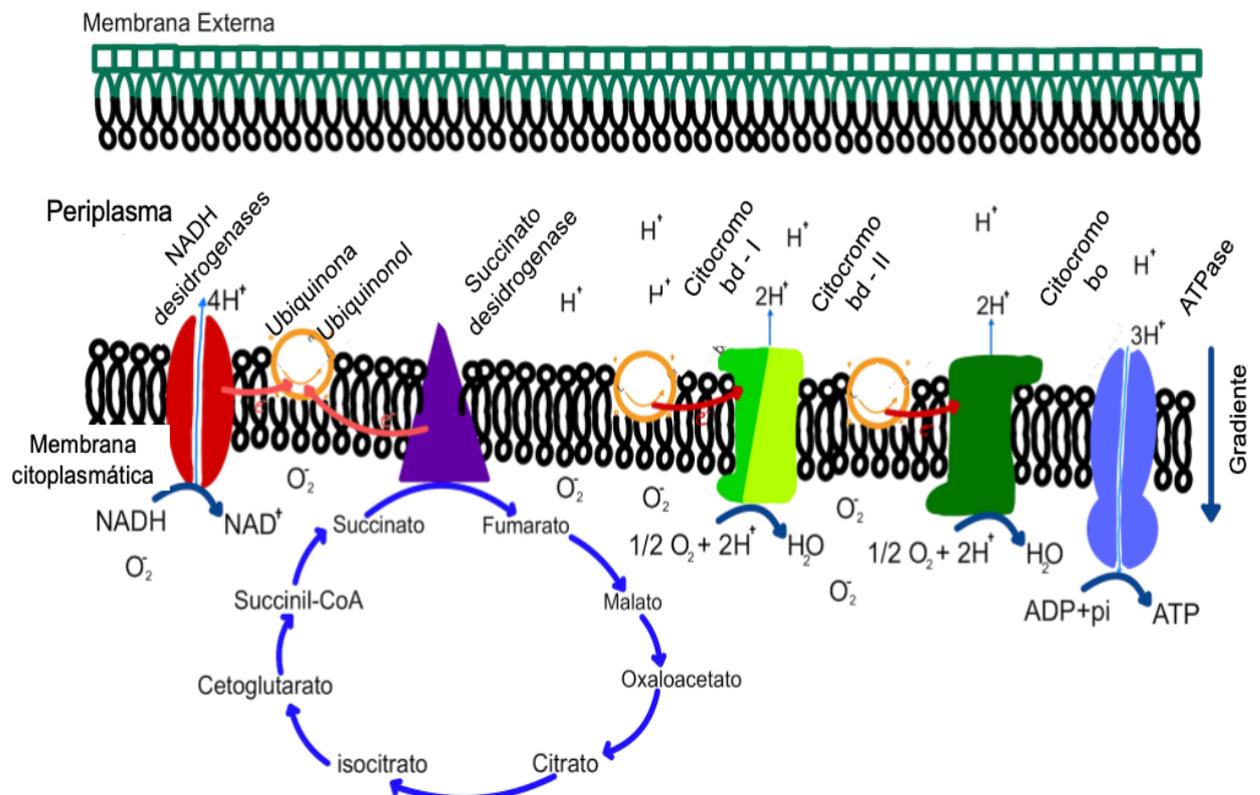
De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos a *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa que se encontra no trato intestinal de seres endotérmicos (seres humanos e animais). Em geral ela é inofensiva e tem um papel fundamental na manutenção do bom funcionamento do sistema digestivo. Porém, quando a *E. coli* migra para outros sistemas podem ser patogênicas, ou seja, podem causar doenças tais como diarreia, e infecções no trato urinário (CDC, 2021). Desde 1950 a *E. coli* vem sendo extensamente estudada e, graças aos avanços na área de biologia molecular, é o organismo modelo procaríoto mais bem documentado (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

São poucos os microrganismos tão versáteis como a *E. coli*. Um exemplo é a sua capacidade de sobreviver a vários níveis de oxigenação (organismo anaeróbico facultativo). Estes níveis são definidos com base em uma escala de aerobiose, em que a completa ausência de oxigênio é definida como 0% de aerobiose (anaerobiose) e a completa aerobiose é definida como a concentração de oxigênio limiar em que nenhum produto fermentativo é secretado. Qualquer valor intermediário é caracterizado como micro aeróbico. Por meio de um complexo sistema de sensores, a bactéria é capaz de identificar mudanças ambientais e readaptar o seu metabolismo (por meio de mecanismos reguladores) de forma a assegurar que ele seja favorável energeticamente (HENKEL *et al.*, 2014). Na respiração aeróbica, a fonte de carbono é convertida em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (moléculas pobres energeticamente) com consequente liberação de energia (sob a forma de ATP) por meio de reações controladas de oxirredução. Ela pode ser dividida em três estágios: a glicólise (em que ocorre a oxidação da glicose a ácido pirúvico), o ciclo do ácido cítrico (que produz os carregadores de elétrons NADH e FADH<sub>2</sub>) e a cadeia transportadora de elétrons (em que é produzido grande parte do ATP via fosforilação oxidativa). Neste caso o aceptor final de elétrons é o oxigênio. Na respiração anaeróbica, o ciclo de Krebs é desfeito e o piruvato é convertido em acetato ou etanol via acetil-coenzima A. Neste caso o aceptor final é uma outra molécula orgânica tal como nitrato, nitrito, fumarato etc. Na ausência

de um agente oxidante, a regeneração do  $\text{NAD}^+$  é feita através da fermentação, utilizando  $\text{NADH}$ , para reduzir metabólitos intermediários. Ou seja, após a glicólise o piruvato pode ser convertido a etanol (no caso da fermentação alcoólica), ácido láctico (fermentação láctica), succinato e ácido fórmico (SPIRO; GUEST, 1991; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

A troca entre as diferentes rotas metabólicas envolve a ativação e a repressão de diversos genes, que por sua vez alteram a composição do sistema respiratório. Este é formado por 3 componentes: desidrogenases (realizam a oxidação dos substratos orgânicos e com isso alimentam o reservatório de elétrons), quinonas (são reservatórios móveis que transferem elétrons para as oxirredutases terminais) e oxirredutases terminais (reduzem o aceptor final de elétrons). A Figura 1 ilustra a configuração do sistema respiratório da *E. coli* (SHALEL-LEVANON; SAN; BENNETT, 2005).

Figura 1 - Sistema respiratório da *E. coli*.



Fonte: BLOOIS, 2019 (Adaptado)

A primeira etapa é a oxidação do NADH à NAD<sup>+</sup> por meio das desidrogenases primárias (e, como consequência, a redução da Ubiquinona a Ubiquinol). A depender do tipo de respiração, estão presentes desidrogenases secundárias (succinato desidrogenase na respiração aeróbica e fumarato desidrogenase na respiração anaeróbica). Embora as desidrogenases secundárias não contribuam com o aumento da força motriz protônica elas ligam o sistema respiratório ao ciclo do ácido cítrico. O carregador Ubiquinol, por sua vez, assume sua forma oxidada (Ubiquinona) e transfere os elétrons para as oxidases terminais. A *E. coli* possui dois tipos de oxidases: citocromo bo e citocromo bd (I e II). Embora ambas tenham a mesma função (redução do oxigênio a água contribuindo para o aumento da força motriz protônica) observa-se que bo-oxidase tem maior eficiência energética que as bd-oxidases. Logo, bo-oxidases são sintetizadas (prioritariamente) em condições aeróbicas, ao passo que bd-oxidases são sintetizadas, em maior quantidade, sob condições micro aeróbicas. Por fim, a força motriz protônica gerada é utilizada pelo complexo ATPase para síntese de ATP a partir do ADP (BETTENBROCK *et al.*, 2014; BLOOIS, 2019; HENKEL *et al.*, 2014).

As respostas às mudanças nas condições de oxigenação (ativação e repressão de genes que alteram a composição do sistema respiratório) são feitas por meio de dois reguladores globais: FNR e ArcAB. O fator de transcrição FNR (do inglês: *fumarate, nitrate reductase*) em sua forma reduzida (sob condições aeróbicas e micro aeróbicas) permanece inativo. Por outro lado, na ausência de oxigênio, ele ativa sua forma DNA ligante e promove genes relacionados a respiração anaeróbica (produção de fumarato, nitrato e nitrato reductases) ao mesmo tempo que reprime genes relacionados a respiração aeróbica (repressão de NADH desidrogenase e citocromos bo e bd). Dessa forma, FNR é tido como um sensor direto de oxigênio. O sistema Arc (do inglês: *anoxic redox control*) é formado por 2 componentes: ArcA (regulador) e ArcB (sensor). Este sistema regula a expressão de genes tanto em condições micro aeróbicas quanto anaeróbicas. Quando a concentração de oxigênio passa a ser limitada, ArcB (sensor ligado a membrana) fosforila e, conseqüentemente, fosforila ArcA. A forma fosforilada de ArcA reprime genes que codificam a produção do citocromo bo e, ao mesmo tempo, promove genes codificadores do citocromo bd. Nota-se que a presença de Ubiquinol inibe a autofosforilação de ArcB, o que reprime a atividade de ArcA (BETTENBROCK *et al.*, 2014; HENKEL *et al.*, 2014; MATSUOKA; KURATA, 2017; SHALEL-LEVANON; SAN; BENNETT, 2005; SPIRO; GUEST, 1991).

Visando estudar o efeito da variação da concentração de oxigênio dissolvido no metabolismo celular, experimentos foram conduzidos utilizando a bactéria *E. coli*. Numa

primeira etapa, estudou-se o efeito de diferentes taxas de oxigenação em cultivo em batelada. Foram realizados 3 cultivos com vazões fixas de ar (1,5, 0,2 e 0,005 L/min). Resultados apontaram que uma diminuição na taxa de aeração causou um aumento na produção de acetato e uma diminuição na produção de biomassa. A fim de se obter mais detalhes, outros 3 experimentos foram realizados fixando as porcentagens de oxigênio na vazão de gás (1,85, 20,95 e 100% V O<sub>2</sub>). Observou-se uma queda mais acentuada na velocidade específica de crescimento para taxas mais baixas de oxigenação. Já a produção de acetato não é afetada consideravelmente para porcentagens de oxigênio entre 7 e 33%. Porém há um aumento considerável na produção do mesmo em situações extremas (1,85% e 100% V O<sub>2</sub>). Os resultados obtidos na primeira etapa representam momentos pontuais que foram utilizados para compor uma resposta dinâmica básica do efeito da concentração de oxigênio dissolvido no metabolismo da *E. coli* durante a segunda etapa. Os autores também traçam um paralelo e ressaltam que os experimentos podem representar diferentes pontos em um fermentador em escala industrial, visto que a concentração de oxigênio dissolvido em seu interior, além de não ser uniforme, é afetada diretamente pela capacidade de homogeneização (O'BEIRNE; HAMER, 2000a, 2000b)

Na segunda etapa estudou-se a resposta dinâmica do metabolismo da *E. coli* frente às flutuações na concentração de oxigênio dissolvido em um quimiostato. Para isso, dois conjuntos de experimentos foram realizados. O primeiro visava a resposta dinâmica de uma perturbação tipo degrau negativo no oxigênio disponível – a partir de uma situação de aerobiose para uma anaerobiose (choque anaeróbico) – e conseqüente retomada para aerobiose após 3 horas. Observou-se que para baixas taxas de diluição, toda a glicose foi consumida no período de anaerobiose, ao passo que para altas taxas de diluição, houve acúmulo de glicose no meio. A retomada do crescimento celular também foi influenciada pela taxa de diluição, uma vez que uma fase *lag* maior foi observada para altas taxas de diluição. Já a concentração de acetato permaneceu alta por mais tempo no quimiostato operado em baixa taxa de diluição. O segundo conjunto de experimentos visava investigar a resposta dinâmica da cultura partindo de aerobiose para um cultivo micro aerado (oxigênio limitado a 2,17% V O<sub>2</sub>) e posteriormente retomando a aeração (aerobiose). Observou-se que o efeito de uma perturbação tipo degrau negativo no oxigênio dissolvido é sentido mais rapidamente em altas taxas de diluição. Similarmente, a recuperação do cultivo, ao retomar a aeração, foi praticamente instantânea para altas taxas de diluição (e mais lenta para baixas taxas de diluição). Ao se comparar os dois conjuntos de experimentos observa-se a dificuldade de adaptação da *E. coli* após o choque anaeróbico (com

queda acentuada na formação de biomassa e aumento da produção de acetato), o que pode indicar que a mudança para o metabolismo aeróbico envolve a produção e repressão de enzimas. Na re-aeração as mudanças no metabolismo podem ser sentidas em um curto período de tempo (quando se parte de uma situação micro aeróbica para aeróbica), o que indicaria que o metabolismo aeróbico permanece parcialmente ativo. O que contrasta com a retomada lenta do metabolismo partindo de uma situação de anaerobiose (que pode ser causada pelo desligamento da via aeróbica), sendo requerido um período *lag* para produção de enzimas reguladoras (O'BEIRNE; HAMER, 2000a, 2000b).

Embora o oxigênio seja um substrato fundamental para obtenção de uma elevada taxa de crescimento da *E. coli*, não há consenso sobre o efeito da concentração de oxigênio dissolvido na produção de proteínas recombinantes. O efeito repressor ou promotor na síntese de proteínas recombinantes está intrinsicamente ligado ao microrganismo hospedeiro, ao tipo de plasmídeo, à resistência da proteína, tipo de meio, produção de subprodutos repressores, fase e escala do cultivo (LASKA, 2001; LI; ROBBINS; TAYLOR, 1992). Registrou-se um crescimento celular, sob condições de aerobiose, cerca de 24 vezes maior do que o observado sob condições de anaerobiose para as espécies de *E. coli* TB-1 e JM101. Neste mesmo estudo, a retenção plasmidial foi cerca de 7 vezes maior sob condições de aerobiose (LI; ROBBINS; TAYLOR, 1992). Contudo, níveis altos de oxigênio dissolvido no meio podem ter um efeito contrário (nocivo à célula). Para a *E. coli* BL21, foi observada uma queda na estabilidade plasmidial proporcionalmente ao aumento da concentração de oxigênio dissolvido (em termos de eficiência na expressão proteica) (KRISHNA RAO *et al.*, 2008). Já para a *E. coli* B1-EP, a maior concentração celular máxima foi obtida para valores de porcentagem de oxigênio dissolvido acima de 60%, enquanto que a maior expressão da proteína recombinante foi obtida para valores de abaixo de 30% (LIN *et al.*, 2016). Nos dois estudos citados anteriormente, foi proposta uma estratégia com dois *setpoints* de oxigênio dissolvido. Durante a fase exponencial de crescimento, o *setpoint* seria acima de 40%, já na fase de indução essa porcentagem cairia para abaixo de 25% (KRISHNA RAO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2016). Recentemente foi demonstrado que seria possível promover a indução da proteína de interesse sob condições elevadas de oxigênio dissolvido no meio (300% da saturação) utilizando a *E. coli* AB1157. Este novo método de indução foi possível a partir da clonagem do regulador *soxRS* num plasmídeo comercial que foi inserido na *E. coli*. Este regulador ativa uma superexpressão (cerca de 16 vezes maior em relação as condições normais de saturação) dos genes de resposta regulatória de superóxidos – *soxS* e *sodA* – que por sua vez codificam a superóxido dismutase. Esta reduz

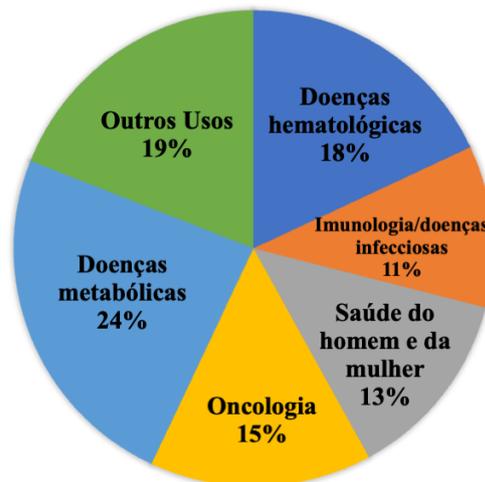
o estresse oxidativo causado pelo excesso de oxigênio dissolvido no meio, permitindo que a bactéria cresça ininterruptamente numa concentração de oxigênio dissolvido acima de 300% (BAEZ; MAJDALANI; SHILOACH, 2014).

## 2.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Graças ao avanço das técnicas de DNA recombinante foi possível sintetizar, em larga escala e alta pureza, mais de 170 tipos de proteínas recombinantes com fins terapêuticos (PHAM, 2018). Proteínas recombinantes são codificadas a partir de um DNA recombinante (vetor que contém o gene de interesse) que foi inserido em uma célula capaz de expressar e amplificar o gene de interesse. Com isso, a célula hospedeira pode atingir altos níveis de expressão da proteína recombinante.

Em 2015, cerca de 400 medicamentos (baseados em proteínas) aprovados para uso foram biofármacos (produtos terapêuticos gerados a partir de tecnologias que envolvem organismos vivos). Outros 1300 estavam na fase de testes clínicos. A Figura 2 mostra a distribuição de biofármacos por área terapêutica (SANCHEZ-GARCIA et al., 2016).

Figura 2 - Distribuição dos biofármacos por área terapêutica.



Fonte: SANCHEZ-GARCIA *et al.*, 2016 – adaptado

Destacam-se as áreas de distúrbios metabólicos e hematológicos (42%), que incluem doenças como diabetes (tipo I e II) e hemofilia. Oncologia (15%) que engloba melanomas, câncer de mama, entre outros. Saúde do homem e da mulher (13%), Imunologia e doenças

infecciosas (11%) e outros usos (19%), que incluem áreas como oftalmologia, cardiologia, dermatologia, entre outras. Logo, é esperado um aumento considerável na demanda por proteínas recombinantes durante os próximos anos (SANCHEZ-GARCIA *et al.*, 2016).

A escolha de um sistema de expressão de proteínas adequado é um dos fatores fundamentais no sucesso da síntese de proteínas recombinantes. Diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como: propriedades da proteína de interesse (tamanho e complexidade), aplicações, produtividade da proteína, custo, regulamentação etc. Os sistemas de expressão estão agrupados em quatro classes: leveduras, insetos, bactérias e mamíferos (sendo os dois últimos os sistemas dominantes). Os sistemas por bactérias possuem baixo custo de implementação da cadeia produtiva, rápido ciclo de produção, produtividade relativamente alta e regulamentação governamental mais flexível. Já o sistema por células mamíferas é o que possui o mais eficiente e complexo de modificações enzimáticas (modificações pós-traducionais de proteínas) e com capacidade de síntese de moléculas complexas (CLARK; PAZDERNIK, 2016).

Devido à caracterização detalhada da genética e fisiologia da *E. coli*, e a consolidação da tecnologia de recombinação genética ao longo dos anos, essa foi escolhida como pioneira na área de produção de proteínas heterólogas (RIESENBERG; GUTHKE, 1999; SHILOACH; FASS, 2005). Alguns tipos de proteínas, ao serem produzidas, acumulam-se no meio intracelular da *E. coli*. Logo, a produtividade é proporcional à concentração celular final. Ou seja, é necessária uma alta densidade celular a fim de se obter uma alta produtividade. Conseqüentemente, o cultivo de alta densidade celular (HCDC – do inglês, *High Cell Density Cultivation*) emergiu como uma das técnicas mais bem sucedidas para produção de proteínas recombinantes (LEE, 1996).

### 2.3 CULTIVO DE ALTA DENSIDADE CELULAR

Os produtos comerciais produzidos pela *E. coli* se dividem em duas categorias: produtos de baixo-volume-alto-valor (proteínas recombinantes) e produtos de alto-volume-baixo-valor (ácido succínico, por exemplo). Seja para condições de viabilidade econômica (primeiro caso) ou para redução de custos e enxugamento do processo produtivo (segundo caso), para ambas as categorias é necessária uma alta densidade celular final. Assim, a técnica de cultivo de alta densidade celular vem sendo estudada desde 1970 (SHILOACH; FASS, 2005).

Ao analisar a relação entre a densidade celular final e a viscosidade do caldo de cultura foi observado que, para valores acima de 200 g/L, a viscosidade do caldo aumenta exponencialmente com o aumento da concentração celular. Este praticamente perde sua fluidez em concentrações acima de 220 g/L, inviabilizando o cultivo em reatores (MORI et al., 1979). Baseado nestes estudos exploratórios, a concentração celular máxima experimental atingida empregando cultivos de alta densidade celular foi de 174 g<sub>massa seca</sub>/L utilizando um reator de diálise bicameral com membrana (MÄRKL et al., 1993).

Todavia não há um consenso sobre qual seria a concentração celular final mínima para se caracterizar um cultivo de alta densidade celular. Estudos avaliam que um cultivo que atinja entre 20 a 50 g<sub>massa seca</sub>/L já poderia ser considerado um cultivo de alta densidade celular (SHOJAOSADATI et al., 2008). Contudo, foi reportado na literatura recente uma concentração celular máxima final de 154 g<sub>massa seca</sub>/L num cultivo de *E. coli* (sendo este um dos valores de concentração celular mais altos, para biorreatores de bancada – até 5 litros) (HORTA et al., 2014).

### 2.3.1 Estratégias para cultivos de alta densidade celular

Para fins de produção industrial em larga escala o reator de tanque agitado (STR – *Stirred Tank Reactor*) operado em batelada alimentada é a melhor opção para cultivos de alta densidade celular. Este sistema apresenta vantagens como: simplicidade, potencial para alta produtividade e flexibilidade para fermentações robustas (RIESENBERG; GUTHKE, 1999).

O controle da velocidade específica de crescimento é crítico em cultivos descontínuos alimentados, uma vez que está diretamente associada com a formação de subprodutos repressores e a produtividade celular. Há três fases que caracterizam a estratégia de produção de proteínas recombinantes utilizando cultivos descontínuos alimentados (RIESENBERG, 1991; RIESENBERG; GUTHKE, 1999).

- Cultivo em batelada até que a fonte de carbono seja consumida, com  $\mu$  podendo atingir  $\mu_{\text{máx}}$ .
- Alimentação suplementar da fonte de carbono (de forma controlada) a fim de evitar o acúmulo de acetato  $\mu < \mu_{\text{crítico}}$ .
- Indução da síntese de proteína recombinante com  $\mu < \mu_{\text{máx}}$  (estresse metabólico)

Na primeira fase há o consumo de toda a fonte de carbono do meio, de forma que o microrganismo pode atingir a velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Esta fase de crescimento ilimitado é necessária para permitir a ambientação das células no biorreator e, posteriormente, permitir sua estabilização antes de iniciar a fase caracterizada pela escassez de substrato. A formação de acetato é uma das principais preocupações ao se utilizar cultivos descontínuos alimentados. Logo, a segunda fase é caracterizada pela alimentação controlada da fonte de carbono, de modo a evitar a saturação do ciclo de Krebs (e conseqüentemente a ativação do metabolismo *overflow*). Nesta fase, a velocidade específica de crescimento é mantida abaixo de um valor crítico ( $\mu_{\text{crítico}}$ ), ou seja, a vazão de alimentação deve ser mantida acima de um valor necessário para manter a manutenção do crescimento celular, porém abaixo de um limiar em que se verifica acúmulo de acetato. Para cultivos de alta densidade celular de *E. coli*, a formação de acetato é inibida para valores de  $\mu < 0,21 \text{ h}^{-1}$  (meio complexo). Após a obtenção de altas concentrações celulares, inicia-se a terceira fase, em que ocorre a indução da síntese da proteína recombinante. Nesta fase as células estão sujeitas a um estresse metabólico devido à falta de nutrientes (direcionados para a síntese de proteínas). Logo a velocidade específica de crescimento fica abaixo de seu valor máximo (BABAEIPOUR et al., 2007; CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013; FAULKNER et al., 2006; RIESENBERG, 1991; SHILOACH; FASS, 2005).

## **2.3.2 Fatores que afetam o crescimento em cultivos de alta densidade celular**

### *2.3.2.1. Produção de acetato*

Em cultivos aeróbicos, o excesso de glicose pode aumentar a produção de intermediários ácidos, como por exemplo o acetato. Essa acidogênese é conhecida como metabolismo *overflow*. A formação de acetato é causada por um desbalanceamento entre o metabolismo da glicose e a respiração (o fluxo de carbono para célula excede a capacidade de síntese da mesma), causando a saturação do ciclo de Krebs (KOPOT, 2015; LULI; STROHL, 1990). Dois caminhos contribuem para a produção de acetato: o primeiro é via conversão da acetilcoenzima A (Acetil-coA) utilizando da enzima fosfato acetiltransferase (pta) e a aceto kinase (ackA). A outra via é através da conversão direta do piruvato a acetato pela ação da piruvato oxidase B (poxB) (PHUE; SHILOACH, 2005).

Reportou-se efeitos nocivos do acúmulo de acetato no cultivo. Em concentrações acima de 2 g/L observou-se uma redução no crescimento da *E. coli*, queda na produção de biomassa e na densidade máxima celular atingida (SHILOACH; FASS, 2005). O acetato tem efeitos mais expressivos em células recombinantes do que em não recombinantes. Isso se deve ao efeito repressor do acetato na síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídios (FAUST et al., 2014; LEE, 1996).

Uma solução encontrada para inibir a formação do acetato é a alteração da composição do meio. Utilizando glicerol, ao invés de glicose, reduz-se o fluxo de carbono pela via glicolítica, evitando a saturação do ciclo de Krebs. A *E. coli* possui transportadores de glicerol na membrana, garantindo uma alta velocidade de absorção do mesmo. Além disso, o glicerol não tem efeito repressor na expressão de proteínas (HORTA, 2011).

#### 2.3.2.2. Meio de cultura

Estudos mostram que a densidade celular final não é diretamente proporcional à quantidade de substrato no meio. Logo, uma estratégia é começar o cultivo apenas com as quantidades mínimas de cada nutriente e adicioná-los conforme a demanda para o crescimento celular. É desejável manter a solução de alimentação a mais simples possível (LEE, 1996).

#### 2.3.2.3. Indutor

Ao serem expostas a indutores sintéticos (ex: IPTG), as células redirecionam seu metabolismo exclusivamente visando à superexpressão da proteína recombinante. Este redirecionamento de recursos celulares (ATP, aminoácidos e nucleotídeos) para atender a demanda de síntese é chamado de estresse metabólico. Além disso, uma parte dos recursos celulares é redirecionada para manutenção e replicação do plasmídeo. São consequências diretas do estresse metabólico, a diminuição do rendimento de biomassa e a debilidade do hospedeiro. No caso da *E. coli*, uma solução para diminuir o estresse metabólico é a utilização de indutores naturais, como por exemplo, a lactose (DVORAK et al., 2015; JESUINO, 2020).

#### 2.3.2.4. Temperatura

A temperatura é um fator de controle do metabolismo celular. Reduzindo-se a temperatura de 37°C para uma faixa entre 26 e 30°C reduz-se o consumo de nutrientes e a taxa de crescimento. Isso afeta diretamente a produção de intermediários tóxicos e diminui o calor gerado pelo metabolismo celular. Nesta faixa de temperatura, a demanda por oxigênio é menor, o que pode evitar a utilização do oxigênio puro (LEE, 1996).

#### 2.3.2.5. Oxigênio

Tal como descrito no item 2.1, a *E. coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa, ou seja, por meio de adaptações em seu metabolismo ela é capaz de produzir energia via: respiração aeróbica, respiração anaeróbica ou via fermentação (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016; UNDEN *et al.*, 1994). Para cultivos de alta densidade celular é vantajoso manter a respiração aeróbica, haja vista que é a via de maior liberação de energia (dado que o objetivo é atingir altas concentrações celulares e produtividade máxima).

Contudo, diferentemente dos substratos sólidos, gases são pouco solúveis em água. A concentração de oxigênio dissolvido, na saturação, é de cerca de 8 mgO<sub>2</sub>/L ao borbulhar ar a 1 atm e 25°C. Este valor aumenta com a diminuição da temperatura e com o aumento da pressão parcial do oxigênio na mistura gasosa. Ao se injetar oxigênio puro a concentração de oxigênio dissolvido aumenta cerca de 5 vezes (40 mgO<sub>2</sub>/L). Observa-se que a concentração de sais no meio também influencia a concentração de oxigênio dissolvido na saturação. Quanto maior a concentração de sais no meio, menor é a concentração de oxigênio dissolvido (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para cultivos de alta densidade celular, em especial, o consumo de oxigênio é consideravelmente maior. Além disso, o problema é agravado pelo acúmulo de subprodutos, distúrbios externos como adição de antiespumantes, soluções de ácido e base (alterando continuamente a composição do meio), amostragem e a própria fase do cultivo (fase de acúmulo de biomassa, indução etc) que alteram a dinâmica de crescimento e, portanto, alteram o consumo de oxigênio (HSIAO *et al.*, 1992; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

## 2.4 CONTROLE DE PROCESSOS

Nesta seção serão abordados os principais aspectos da teoria de controle e, em seguida, focar-se-á no problema do controle do oxigênio dissolvido em cultivos celulares.

### 2.4.1 Aspectos gerais de um sistema de controle

As variáveis associadas a um processo químico (vazão, temperatura, pressão, concentração, entre outras) podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é chamado “variáveis de entrada” e denota o efeito das vizinhanças no processo químico. São consideradas variáveis de entrada: variáveis manipuladas (cujo valor é ajustado por um controlador) e distúrbios (cujo valor não é derivado de um ajuste por um controlador). Já o segundo grupo é chamado “variáveis de saída” e denota o efeito do processo na vizinhança. São consideradas variáveis de saída: variáveis medidas (cujo valor é conhecido por meio da aferição direta) e variáveis não medidas (cujo valor não pode ser aferido diretamente) (STEPHANOPOULOS, 1984).

São apresentadas algumas etapas para construção de um sistema de controle:

- Definir um objeto de controle;

Na primeira etapa é definido um objeto de controle.

- Selecionar medidas

É de extrema importância a correta seleção das variáveis a serem medidas, a fim de aferir o desempenho do processo químico. Quando as variáveis monitoradas coincidem com as que representam os objetivos de controle, tem-se as medidas primárias. Porém, muitas vezes não é possível medir diretamente as variáveis que representam os objetivos de controle. Logo, é necessário medi-las de forma indireta, por meio de outras variáveis (saída é uma função das medidas secundárias). O terceiro tipo de medida advém das medidas diretas de distúrbios externos. Uma vantagem de se medir distúrbios é que se sabe, a priori, o comportamento do processo químico. Com isso é possível acionar medidas de remediação (STEPHANOPOULOS, 1984).

- Selecionar as variáveis manipuladas

A escolha das variáveis manipuladas afeta diretamente a qualidade das ações de controle.

- Selecionar a configuração de controle

É a estrutura da informação utilizada para conectar as medidas disponíveis com as variáveis manipuladas. Dependendo da quantidade de saídas controladas e entradas manipuladas as configurações podem ser: SISO (*Single Input Single Output*), SIMO (*Single Input, Multiple Output*), MISO (*Multiple Input, Single Output*) ou MIMO (*Multiple Input Multiple Output*).

Definem-se três configurações gerais de controle. O primeiro é o controle tipo *feedback*, que utiliza medidas diretas da variável controlada para ajustar os valores das variáveis manipuladas. O segundo é o controlador tipo “inferencial” que utiliza medidas secundárias para ajustar os valores das variáveis manipuladas. Com base em valores de saída mensuráveis e em equações de conservação de massa, energia e momento, o estimador calcula matematicamente os valores da variável não medida controlada. Estes valores são utilizados pelo controlador para ajustar o valor da variável manipulada. Por fim, tem-se o controle tipo *feedforward* que se utiliza de medidas de distúrbios para ajustar o valor da variável manipulada (STEPHANOPOULOS, 1984).

Todo sistema de controle está atrelado a um processo (o qual almeja-se controlar). Porém, nem sempre é possível implementar o controle diretamente no processo real, sendo necessários estudos prévios para desenvolvimento da estratégia de controle e otimização dos parâmetros do controlador. Para isso utilizam-se modelos. Para se determinar uma representação matematicamente tratável do processo, são utilizadas técnicas de modelagem matemática. Um modelo é uma idealização da realidade, representando suas características essenciais. Este conhecimento é traduzido em uma formulação matemática, que por sua vez representa a dinâmica do sistema (BOJORGE, 2009, 2017). Há três abordagens para determinação de modelos matemáticos:

#### 2.4.1.1. Modelagem Fenomenológica (mecanística)

Utiliza-se de equações matemáticas de conservação de massa, energia e momento, e princípios físico-químicos e biológicos para derivar as equações diferenciais que regem o processo. Estes modelos também são chamados de “caixa branca”, uma vez que são baseados em conhecimento prévio sobre o processo e na existência de equações universais (BOJORGE, 2009, 2017; ESTRADA-FLORES *et al.*, 2006).

A modelagem fenomenológica tem como principal vantagem a aplicabilidade em diversas condições de processo (baseado nas hipóteses adotadas). Como desvantagens tem-se o requerimento de hipóteses simplificadoras e métodos de solução matemática complexos

#### 2.4.1.2. Modelagem Empírica (Experimental)

Também chamados de modelos tipo “caixa preta”, estes não são baseados em equações matemáticas de conservação de massa, energia e momento, e princípios fundamentais. Aplica-se a observação direta de dados operacionais do processo a fim de se obter as equações diferenciais que o descreve. Este tipo de modelagem é interessante quando o mecanismo por trás do comportamento não é bem entendido ou é desconhecido. Em geral, aplica-se um sinal de entrada conhecido e mede-se a saída correspondente (ESTRADA-FLORES *et al.*, 2006).

A modelagem empírica apresenta como principais vantagens: não requer o conhecimento completo dos mecanismos que envolvem o processo e os modelos matemáticos são mais simples e podem incluir efeitos de incerteza. As principais desvantagens são: aplicabilidade restrita às condições apresentadas pelos dados experimentais, ajuste do modelo pode ser complexo (neste caso, o ajuste tem grande impacto na estimativa dos parâmetros) e não se utiliza conhecimento prévio sobre o processo (ESTRADA-FLORES *et al.*, 2006).

#### 2.4.1.3. Modelagem Semi-Empírica (Híbrida)

Também chamados de modelos “caixa cinza”, combinam as características de modelos tipo “caixa branca” e “caixa preta”. Eles incorporam as equações de conservação e as equações constitutivas para modelar processos conhecidos. Ao mesmo tempo, utilizam-se de técnicas estatísticas e de dados experimentais para modelar outros mecanismos desconhecidos, a fim de melhorar a eficiência do modelo (ESTRADA-FLORES *et al.*, 2006).

### 2.4.2 Controle do oxigênio dissolvido

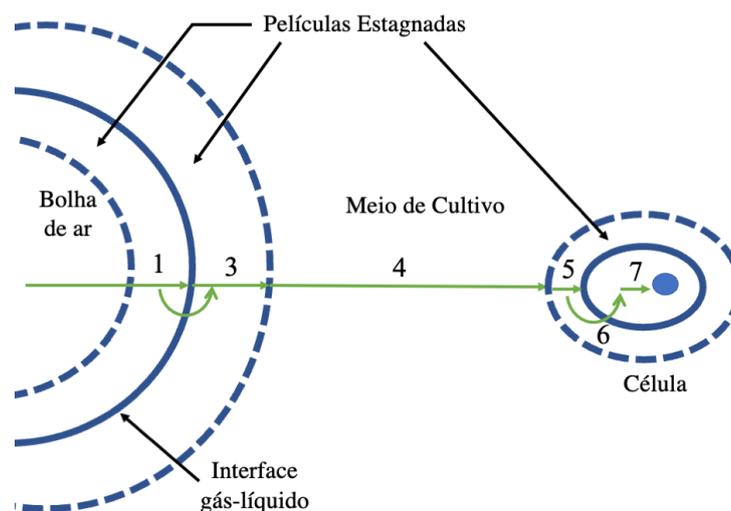
O controle do oxigênio dissolvido é altamente não linear e representa um desafio em termos de controle de processo. Tipicamente tais desafios estão associados a limitações do biorreator (limitações na velocidade de agitação para evitar cisalhamento e limitações mecânicas dos fluxômetros de gás), baixa solubilidade do oxigênio e desempenho insatisfatório da estratégia de controle.

Nas próximas seções serão apresentadas algumas estratégias de controle do oxigênio dissolvido em cultivos de *E. coli*. Os estudos foram subdivididos em três abordagens distintas.

#### 2.4.2.1 Abordagem “caixa-branca”

Inicialmente, devido à falta de sensores confiáveis para medição do oxigênio dissolvido, as estratégias de controle eram baseadas nas leis da conservação (balanços de massa, energia e momento) (GOMES; MENAWAT, 1998). O modelo consolidado para a transferência de oxigênio e seu consumo é baseado em resistências em série (relacionadas à sua dissolução no meio e ao consumo pela célula), tal como mostra a Figura 3 (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

Figura 3 – Modelo para transferência de oxigênio



Fonte: SCHMIDELL *et al.*, 2001 - modificado

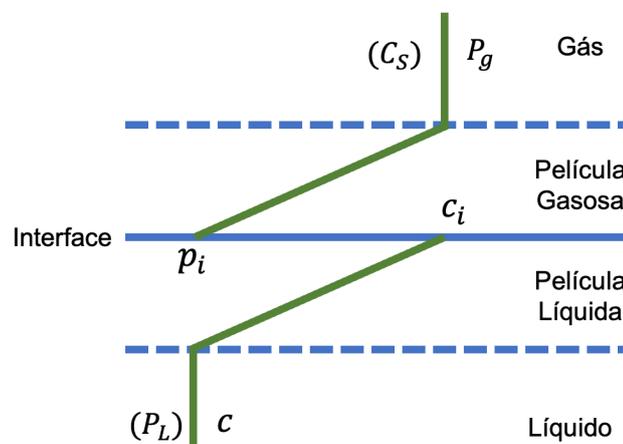
Neste modelo são identificados três grupos de resistência. O primeiro engloba as resistências relacionadas à transferência de oxigênio do gás para o líquido (resistências 1 a 3). O segundo contempla as resistências à difusão do oxigênio do meio até a célula (resistência 4). Já o último abarca as resistências relacionadas ao consumo do oxigênio dentro da célula (resistências 5 a 7). A título de simplificação do modelo, considerando o líquido suficientemente agitado, a pequena área superficial da célula (em relação ao volume de líquido

à sua volta), tamanho reduzido da célula e da própria molécula de água, as resistências 4 a 7 podem ser consideradas nulas (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

- Transferência de oxigênio

Uma das teorias mais consolidadas para a transferência de oxigênio é a teoria das duas películas estagnadas. A Figura 4 mostra a interface gás-líquido com as duas películas estagnadas.

Figura 4 - Representação gráfica da teoria das duas películas estagnadas



Fonte: SCHMIDELL *et al.*, 2001 - modificado

Uma das películas separa o seio do líquido (cuja concentração de oxigênio é dada por “ $c$ ”) da interface (cuja concentração de oxigênio é dada por “ $c_i$ ”). A outra separa o seio do gás (cuja pressão parcial de oxigênio é dada por “ $P_g$ ”) da interface (cuja pressão parcial de oxigênio é dada por “ $p_i$ ”). Nota-se que “ $C_s$ ” e “ $P_L$ ” são a concentração do oxigênio dissolvido no gás em equilíbrio com “ $P_g$ ” e a pressão parcial de oxigênio em um líquido que estaria em equilíbrio com a concentração “ $c$ ”, respectivamente (segundo a lei de Henry) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Nestas duas películas estariam localizadas as resistências ao transporte de oxigênio. Para ambas as películas, esta resistência é caracterizada pelo inverso do coeficiente de transferência de massa da película. A transferência de massa ocorre apenas por efeito difusional, ou seja, depende da existência de um gradiente entre a pressão parcial de oxigênio na bolha “ $P_g$ ” e a na interface “ $p_i$ ” (fase gasosa), e entre a concentração de  $O_2$  no líquido “ $c$ ” e na interface “ $c_i$ ” (fase líquida) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para um sistema em estado estacionário (em que há formação de um perfil linear no interior das películas) tem-se a Equação 1:

$$n_{O_2} = \frac{\text{gradiente}}{\text{resistência}} = k_g H(P_g - p_i) = k_L(C_i - c) \quad (1)$$

Em que  $n_{O_2}$  é o fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial ( $\frac{g_{O_2}}{m^2 h}$ ),  $H$  é a constante de Henry e “ $k_L$ ” e “ $k_g$ ” são os coeficientes de transferência de massa das películas líquida e gasosa (respectivamente).

Uma vez que não é possível conhecer os valores relativos à interface gás-líquido, é conveniente desprezar a resistência devido ao filme gasoso (tendo em vista a resistência do filme líquido), utilizando a consideração que  $P_g = P_i$  (como consequência  $C_s = C_i$ ).

Definindo “ $a$ ” como sendo a razão entre a área interfacial de transferência de massa ( $m^2$ ) e o volume total de líquido ( $m^3$ ) e multiplicando ambos os lados da Equação 1, tem-se a Equação 2 (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

$$n_{O_2} a = k_L a (C_s - c) \quad (2)$$

Em que  $n_{O_2} a$  é a velocidade de transferência de oxigênio ( $\frac{g_{O_2}}{m^3 h}$ ) e  $k_L a$  é o coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $h^{-1}$ ). Este pode ser descrito como a capacidade de aeração do sistema.

Caso não esteja em estado estacionário, a variação da concentração de oxigênio dissolvido ( $c$ ), em função do tempo, é descrita pela Equação 3:

$$n_{O_2} a = k_L a (C_s - c) = \frac{dc}{dt} \quad (3)$$

A partir das Equações 2 e 3, é possível compreender as diferentes estratégias de controle do oxigênio dissolvido. Ao enriquecer o meio com oxigênio puro aumenta-se o gradiente ( $C_s - c$ ), pois estaria aumentando o valor de  $C_s$ . O aumento da velocidade de agitação aumenta a área interfacial de transferência de massa (aumentando o coeficiente “ $a$ ”) e reduz a resistência à transferência de oxigênio no filme líquido (aumentando  $k_L$ ). Já o aumento da vazão de ar promove mais bolhas no seio do líquido, aumentando a área interfacial, além de promover

o arraste de outros gases (aumentando a pressão parcial do oxigênio no seio do gás) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

- Respiração celular

A velocidade específica de respiração celular  $Q_{O_2}$   $\left(\frac{g_{O_2}}{g_{célula} h}\right)$  é definida pela Equação 4:

$$Q_{O_2} = \frac{1}{Cx} \frac{dO_2}{dt} \quad (4)$$

Em que Cx é a concentração celular  $\left(\frac{g_{célula}}{m^3}\right)$  e  $\frac{dO_2}{dt}$  é a velocidade de consumo de oxigênio  $\left(\frac{g_{O_2}}{m^3 h}\right)$ .

A velocidade específica de respiração é uma característica biológica associada ao tipo de microrganismo empregado, meio e às condições de fermentação. Ela segue uma equação do tipo Monod tal como mostra a Equação 5 (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

$$Q_{O_2} = Q_{O_2,máx} \frac{c_{O_2}}{k_o + c_{O_2}} \quad (5)$$

Em que  $Q_{O_2,máx}$  é a velocidade máxima de respiração celular  $\left(\frac{g_{O_2}}{g_{célula} h}\right)$ ,  $k_o$  é a constante de saturação para o oxigênio  $\left(\frac{g_{O_2}}{m^3}\right)$  e  $c_{O_2}$  é a concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido  $\left(\frac{g_{O_2}}{m^3}\right)$ .

Nota-se que, para valores de oxigênio dissolvido abaixo de um valor crítico, este se torna um limitante do crescimento. Para a *E. coli* este valor é de 0,26 mg/L a uma temperatura de 37,8°C (ou cerca de 4% da saturação utilizando ar a 1 atm e 25°C) (BAILEY; OLLIS, 1986; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Em geral, observa-se uma relação linear entre a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e a velocidade específica de respiração ( $q_{O_2}$ ), tal como mostra a Equação 6:

$$q_{O_2} = m_o + \frac{1}{Y_o} \mu \quad (6)$$

Em que  $m_o$  é o coeficiente de manutenção para o oxigênio  $\left(\frac{g_{O_2}}{g_{célula\ h}}\right)$  e representa a velocidade específica de respiração celular para  $\mu=0$ .  $Y_o$  é o fator de conversão de  $O_2$  para células  $\left(\frac{g_{célula}}{g_{O_2}}\right)$  (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Ao realizar um balanço para o oxigênio dissolvido tem-se a Equação 7 em termos de transferência de oxigênio e respiração celular:

$$\frac{d(cV)}{dt} = k_L a (C_s - c) V - q_{O_2} C_x V \quad (7)$$

Em que o primeiro termo (lado direito) da Equação 7 (transferência de oxigênio) está intrinsecamente relacionado com o “sistema de produção”, definido pelas características físicas do equipamento – tipo de tanque, impelidor, aspensor, velocidade de agitação, entre outros – e do caldo. Já o segundo termo (consumo de oxigênio) está relacionado com a “fase biológica”, definida pelas características do microrganismo e seu crescimento (BADINO JR, 2015).

Assumindo que  $\frac{dV}{dt} \approx 0$  e que no controle do oxigênio dissolvido almeja-se  $\frac{dc}{dt} = 0$ , tem-se que a Equação 7 pode ser rearranjada na Equação 8 abaixo.

$$c = C_s - \frac{q_{O_2} C_x}{k_L a} \quad (8)$$

Logo, há três variáveis que podem ser utilizados para o controle do oxigênio dissolvido: vazão de ar, velocidade de agitação (que influenciam diretamente o  $k_L a$ ) e a vazão de oxigênio puro (que influencia a concentração de oxigênio na saturação –  $C_s$ ) (SUZUKI; YAMANE; SHIMIZU, 1986).

Baseado na Equação 8 criou-se um controlador adaptativo da concentração de oxigênio dissolvido, através da relação entre a taxa de evolução de  $CO_2$  ( $r_{CO_2}$ ) e a taxa de consumo de oxigênio ( $r_{O_2}$ ). Desse modo estariam contemplados os efeitos da dinâmica do metabolismo celular. Foram escolhidas como variáveis manipuladas: vazões de ar e oxigênio e a velocidade de agitação. Em especial, foi ajustado um controlador PD para manipulação da velocidade de agitação (dividido em dois níveis de atuação: baixo e alto). Os parâmetros do controlador adaptativo foram atualizados baseados em relações empíricas entre os parâmetros e a taxa de evolução de  $CO_2$ . Embora o controlador tenha mantido a concentração de oxigênio

dissolvido próxima ao seu *setpoint*, a variável controlada apresentou oscilações ao longo dos cultivos (SUZUKI; YAMANE; SHIMIZU, 1986).

Observou-se que o atraso na resposta do eletrodo poderia criar um descompasso entre a dinâmica do sistema e a medida da concentração de oxigênio dissolvido aferida, comprometendo a ação de controle. Neste caso o ganho do controlador seria minimizado, tornando a resposta do controlador lenta e não satisfatória. Uma solução encontrada foi a incorporação da dinâmica do eletrodo de oxigênio dissolvido ao controle. Foram selecionadas como variáveis manipuladas a vazão de ar e a velocidade de agitação. De acordo com a escolha destas variáveis, o estudo foi dividido em três casos (para cada caso foi construído um modelo): caso I (vazão de ar foi a variável primária e a velocidade de agitação a variável secundária, porém apenas a vazão de ar foi incluída no modelo), caso II (mesma estrutura do caso I, com ambas as variáveis incluídas no modelo) e caso III (velocidade de agitação foi a única variável controlada). Utilizando a aproximação de Euler de primeira ordem, foi possível discretizar o modelo dado pela Equação 7. Os parâmetros do modelo foram estimados *on-line* utilizando o método dos mínimos quadrados recursivo. Um filtro de Kalman foi aplicado para remover possíveis ruídos na variável controlada. Para testar o controlador adaptativo foi realizado um cultivo de *E. coli* em biorreator de 2 L. Para efeito de comparação, ajustou-se os parâmetros de um controlador PID para controle da velocidade de agitação e vazão de ar. Embora bem ajustado, o controlador PID apresentou oscilações em relação à variável controlada. Já o controle adaptativo apresentou uma resposta mais suave nos 3 casos estudados. Observou-se que foi possível obter um grau de estabilidade maior no caso III (em que apenas o efeito da agitação seria considerado, mantendo a vazão de ar constante). Todavia, esta estabilidade não indica uma escolha preferencial. A manutenção da vazão de ar constante não é indicada em um aumento de escala (dada a viscosidade do caldo, limitações no sistema de agitação e o alto consumo de potência do sistema) (LEE *et al.*, 1991).

Ainda no controle adaptativo destacaram-se estudos para criação de um controle adaptativo da concentração de oxigênio dissolvido baseado na técnica do “ganho programado” (do inglês, *gain scheduling*). A partir do modelo descrito pela Equação 7, o termo de consumo de oxigênio pela célula foi resumido em um termo “d” (caracterizado como um distúrbio). Logo, foi possível obter uma linearização do modelo utilizando como base a variável  $k_{La}$ . Ou seja, seria possível realizar o controle do oxigênio dissolvido utilizando como variável manipulada a velocidade de agitação. Uma das desvantagens presentes nesta técnica é que ela

não leva em consideração fatores como formação de espuma e agentes que modificam a tensão no líquido. A velocidade de agitação foi dividida em 3 faixas de trabalho: 350-600 rpm, 600 - 900 rpm e 900 - 1200 rpm (com uma histerese de  $\pm 20$  rpm para evitar oscilações nas regiões de transição). Para cada região de operação foi ajustada uma função *auto-tuner* no controlador (a fim de se obter os parâmetros otimizados do PID). Durante os experimentos, na região medida de operação, a variável controlada teve um comportamento oscilatório (necessitando de correções manuais). Em geral, os distúrbios nas regiões de operação foram corrigidos com sucesso pelo controlador com ganho programado. Os problemas de oscilações da variável manipulada poderiam ser corrigidos (ou amenizados) por meio da divisão das faixas de trabalho em mais regiões de operação (MATS; HAGANDER, 1998). Utilizando a mesma estratégia porém a partir de variáveis manipuladas diferentes, foi possível variar a velocidade de agitação - empregando uma ação proporcional-integral (PI) - e variar a vazão de ar de acordo com uma lei que detectava a saturação do  $k_{LA}$ . O controlador selecionava uma vazão de ar fixa adequada para evitar a saturação do  $k_{LA}$  e, ao mesmo tempo, ajustava os parâmetros do controlador PI da velocidade de agitação para se adequar ao ponto de operação. Para linearização do modelo considerou-se 4 valores de vazões de ar fixas - 0,2, 0,5, 1 e 1,5 vvm - e dessa forma foi possível obter uma relação linear entre  $k_{LA}$  e a velocidade de agitação. Definida a função de transferência, avaliou-se a resposta para diferentes pontos de operação (observando-se o ganho e a constante de tempo). A condição de operação foi determinada por uma “máquina de estado”. Esta determinava o fluxo de ar necessário para manter o sistema em operação linear. Ao se modificar a vazão de ar, modifica-se o  $k_{LA}$  (e, conseqüentemente, os parâmetros de linearização). Foram determinadas 16 condições de operação (ou seja, foram obtidos 16 conjuntos de parâmetros ajustados do controlador PI). Os resultados das simulações mostraram que o controlador manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao valor de referência quando exposto a uma perturbação tipo degrau crescente. Em resumo, o controlador mudou corretamente seu ponto de operação quando detectada a saturação da agitação. Os resultados dos testes em cultivos celulares mostraram momentos de instabilidade e oscilações que poderiam ser corrigidas aumentando o número de pontos de operação (AREVALO *et al.*, 2018).

Outra estratégia para controle de oxigênio dissolvido é baseada na técnica de controle dividido (*split range*). A partir das variáveis manipuladas velocidade de agitação e vazões de ar e oxigênio o controlador manipulava dois ou mais elementos de controle com base na segmentação da faixa de operação em que se encontra. Foram criadas 3 faixas de operação

(onde se operavam, sequencialmente, a velocidade de agitação, a vazão de ar e a vazão de oxigênio). As duas primeiras faixas tinham como objetivo aumentar o  $k_La$  - primeiramente com o aumento da velocidade de agitação e, em seguida, através do aumento da vazão de ar (mantendo a concentração de saturação do oxigênio constante). Já a terceira faixa visava aumentar a saturação do oxigênio (mantendo  $k_La$  constante). Para a determinação das faixas de atuação foram plotadas as curvas de agitação, aeração e oxigenação, de modo a obter uma resposta do produto  $k_La \times C_S$  (taxa máxima de transferência) linear em relação à ação de controle. Os parâmetros do controlador foram ajustados com base em simulações e o controlador foi testado num cultivo de *E. coli* em um biorreator de bancada. Os resultados mostraram que, apesar do período oscilatório da variável controlada (após o início da alimentação suplementar), foi possível mantê-la dentro do intervalo esperado (CARCAMO et al., 2014).

#### 2.4.2.2 Abordagem “caixa preta”

Diferentemente da abordagem “caixa branca”, a abordagem “caixa preta” não requer um modelo detalhado do processo (baseado em equações de estado). Ao invés disso, os modelos são baseados apenas nas relações entre entradas e saída e definidos por uma função de transferência. Uma desvantagem é que os parâmetros do modelo, em geral, não agregam informações sobre o estado do processo.

Dentro das abordagens tipo “caixa preta” se enquadra a estratégia de controle adaptativa por posicionamento de polos. Neste caso o processo foi modelado baseado em uma função de transferência linear (cujos parâmetros foram reajustados periodicamente de modo a compensar as não linearidades). Para testar a estratégia foram cultivadas 5 espécies de microrganismos (entre selvagens e recombinantes) em biorreatores com escalas que variavam de 50 a 300 L. O controlador operava “forçando” os polos do processo (em malha fechada) para posições desejadas, de modo a estabilizá-lo. Foram utilizadas como variáveis manipuladas a vazão de ar e a velocidade de agitação. Porém, diferentemente dos estudos apresentados previamente, elas foram manipuladas de forma simultânea (o que reduziria os efeitos de mudanças abruptas no comportamento do sistema). Tanto para as cepas selvagens quanto para as recombinantes, o controlador manteve a porcentagem de oxigênio dissolvido próxima a 30% durante quase todo o cultivo (mesmo durante a fase de indução). Embora o controle adaptativo

tenha se mostrado uma alternativa interessante para o controle do oxigênio dissolvido, este se mostrou altamente sensível a erros oriundos da estimativa do modelo (principalmente durante as fases de alimentação suplementar e indução) (HSIAO et al., 1992). Outra estratégia clássica de controle do oxigênio dissolvido, dentro da abordagem tipo “caixa preta”, é o controle preditivo. Em um dos estudos a velocidade de agitação foi selecionada como única variável manipulada. Já a dinâmica do sistema foi modelada com base num modelo de primeira ordem com tempo morto. Os parâmetros do controlador foram estimados pelo método de mínimos quadrados recursivo. A estratégia de controle foi estruturada em 3 níveis: estimador da dinâmica do oxigênio dissolvido em relação às mudanças na velocidade de agitação, um previsor da concentração de oxigênio dissolvido e um otimizador (responsável por regular desvios do oxigênio dissolvido em relação aos valores estimados pelo previsor). De modo geral, o controlador preditivo teve sucesso ao manter a concentração de oxigênio dissolvido próxima ao valor de *setpoint* (30%) sem muitas oscilações (DIAZ *et al.*, 1995).

Estas e outras aplicações mostram que a abordagem caixa preta atinge os objetivos de controle, sem a necessidade de um especialista do processo. Porém este tipo de abordagem exige vasto conhecimento na área matemática e na área de controle. Uma terceira via combina as abordagens branca e preta para criar uma estratégia tipo “caixa cinza”, agregando as qualidades de ambas as abordagens.

#### 2.4.2.3 Abordagem “caixa cinza”

O aumento da complexidade dos bioprocessos gerou um aumento na complexidade dos métodos matemáticos empregados no controle e na modelagem de biosistemas. O controle tradicional começava a apresentar certas lacunas em relação às incertezas intrínsecas aos bioprocessos. Em escala industrial a otimização era feita utilizando o conhecimento de um especialista (adquirido após longos períodos de observação). Todavia, este conhecimento empírico não é facilmente adaptável à linguagem matemática (utilizada pelos computadores). Além disso, cada bioprocessos possui características únicas, oriundas da utilização de células vivas, tais como (HORIUCHI, KISHIMOTO, 2000):

- Complexidade do mecanismo de reação intracelular: numerosas e complexas reações metabólicas dificultam a elaboração de um modelo matemático determinístico único

(dificultado a aplicação da teoria clássica de controle). Além disso, faltam informações precisas sobre a regulação das reações metabólicas para diversos microrganismos.

- Mudanças na dinâmica do crescimento celular ao longo do cultivo (fases de acúmulo de biomassa e indução para produção de proteínas recombinantes), inviabilizando parâmetros de controle fixos.

- Indisponibilidade de sensores robustos para variáveis sensíveis.

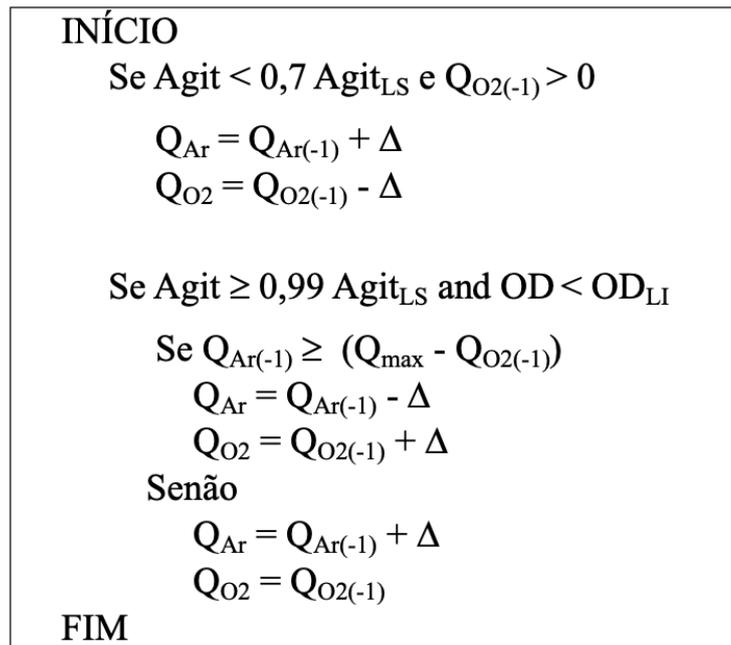
- Complexidade operacional: diversidade operacional (estratégia de cultivo em batelada, batelada alimentada, contínuo, etc.) torna difícil a adoção de uma estratégia de controle única.

Destaca-se, entre as abordagens tipo “caixa cinza”, o desenvolvimento de um controlador PID auto regulável, baseado numa heurística, para controle do oxigênio dissolvido. Dentre as constantes do controlador PID, a constante proporcional “K” foi escolhida como o foco do controlador auto regulável, uma vez que seus efeitos na estabilidade do controlador são mais pronunciados que as demais (otimizadas via método de Ziegler-Nichols modificado). A constante proporcional foi ajustada de forma *on-line* utilizando duas regras heurísticas (regras do tipo condição-ação). A primeira regra determinava que se o controlador apresentasse uma resposta instável, então o parâmetro “K” seria diminuído proporcionalmente à variação de saída. Já a segunda regra determinava que se o sistema apresentasse um *offset* significativo, então “K” seria aumentado proporcionalmente ao *offset*. O intervalo de tempo para ativação da heurística (e recálculo dos parâmetros) foi fixado em 60 segundos. O desempenho do controlador foi satisfatório durante todo o cultivo em batelada. O ganho proporcional se adaptou bem às mudanças na dinâmica do processo com poucas variações na variável controlada (LEE *et al.*, 1994).

Recentemente, tal como elucidado na introdução da presente tese, como parte de um esforço para criação de uma ferramenta nacional acessível de controle e supervisão de cultivos celulares, pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar criaram o SUPERSYS\_HCDC (cujo funcionamento será detalhado em seções posteriores). Até hoje é um dos únicos programas nacionais para controle e supervisão de biorreatores capaz de conduzir cultivos em batelada (ou batelada alimentada) automaticamente até altas densidades celulares (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2011). Dentre seus módulos de controle, este possui um módulo híbrido-hierárquico de

controle da concentração de oxigênio dissolvido. É composto por um controlador PID digital (na forma de velocidade) atuando no controle da velocidade de agitação e um algoritmo heurístico que modula as vazões de ar e oxigênio. Tal código consistiu de uma árvore de decisão apresentada no Quadro 1 (HORTA, 2011).

Quadro 1 - Pseudocódigo de controle das vazões de ar e oxigênio



Fonte: HORTA, 2011 – modificado

Caso a concentração de oxigênio dissolvido (OD) esteja abaixo de seu valor de referência, a árvore de decisão inicia pela avaliação da velocidade de agitação (Agit). Se está baixa (inferior a 70% de seu limite superior –  $Agit_{LS}$  – 950 rpm) e já está sendo enriquecido oxigênio no sistema, a nova vazão de ar ( $Q_{Ar}$ ) será a vazão de ar anterior ( $Q_{Ar(-1)}$ ) acrescida de delta ( $\Delta$ ). Já a nova vazão de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) será a vazão de oxigênio anterior ( $Q_{O_2(-1)}$ ) decrescida de delta ( $\Delta$ ). Porém, se a velocidade de agitação é maior ou igual a 99% do seu limite superior e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) ainda é menor que seu limite inferior ( $OD_{LI}$ ), então duas opções são apresentadas na árvore de decisão. Deve ser observado se a soma das vazões de ar e oxigênio já ultrapassou a vazão máxima de gás permitida no sistema ( $Q_{max}$ ). Se sim, deve-se diminuir a vazão de ar e aumentar a vazão de oxigênio pelo mesmo valor delta ( $\Delta$ ). Caso contrário a vazão de ar deve ser acrescida em  $\Delta$ , sem que haja modificação na vazão de oxigênio (até atingir o limite da vazão máxima de gás) (HORTA, 2011).

A implementação em LabVIEW deste pseudocódigo, além de não ser trivial, pode levar a resultados não plenamente satisfatórios. Podem ocorrer atrasos na ação de controle e também na resposta dos fluxômetros de massa, responsáveis pela injeção de ar e oxigênio no biorreator (uma vez que a árvore de decisão fornece respostas abruptas – em degraus  $\Delta$  – condicionadas às mudanças comparativas da árvore de decisão). Ou seja, não se tem transições suaves, graduais, na ação de controle. O sistema apresentado opera introduzindo perturbações tipo degrau nas vazões de ar e oxigênio. Além disso o SUPERSYS\_HCDC possui um dispositivo de corte da vazão de alimentação do meio suplementar sempre que a concentração de oxigênio dissolvido cai a um valor limite. Isto ocorre para evitar a formação de metabólitos indesejáveis. Esta privação de nutrientes pode desencadear graves problemas no cultivo e na fase de indução da síntese de proteína recombinante, reforçando a necessidade de melhoria deste sistema de controle (HORTA, 2011).

Com o avanço das técnicas de inteligência artificial, foi possível o desenvolvimento de novas estratégias de controle. Destacam-se as Metodologias Baseadas no Conhecimento (MBC) (KONSTANTINOV; YOSHIDA, 1992). Elas têm a capacidade de trabalhar com informações fragmentadas, incertas e qualitativas, por isso tiveram sucesso nas áreas de modelagem, simulação, otimização e operação de processos (desenvolvimento de *soft sensors*, monitoramento e supervisão de processos) (SHIOYA; SHIMIZU; YOSHIDA, 1999).

Sistemas de controle baseados no conhecimento podem ser implementados de duas formas: controle direto e indireto (supervisório). No controle direto, o conhecimento do especialista é utilizado para criação de um controlador que irá atuar diretamente no processo (em substituição aos controles tradicionais). Já no controle indireto, o conhecimento do especialista é separado em um módulo (base de conhecimento) que compõe o nível mais alto do sistema de controle. Este módulo não atua diretamente no processo, mas supervisiona um controle de nível hierárquico mais baixo (que pode ser um controle clássico). Este atua no processo com base na análise e na ação de controle enviada pelo comando supervisório (KONSTANTINOV; YOSHIDA, 1992).

Dentre as MBCs mais utilizadas tem-se os sistemas nebulosos (*fuzzy*), redes neurais artificiais, algoritmos genéticos, entre outras. Nesta tese destaca-se a utilização dos sistemas *fuzzy*.

## 2.5 SISTEMAS FUZZY

Nesta seção serão abordados os pressupostos teóricos da lógica nebulosa, do controle nebuloso e algumas aplicações da lógica nebulosa no controle de bioprocessos.

### 2.5.1 Lógica *fuzzy*: fundamentos

Na primeira seção serão apresentados os principais conceitos relacionados à teoria *fuzzy*, lógica nebulosa e conjuntos nebulosos. Em seguida abordar-se-á os conceitos de funções de pertinência, variáveis linguísticas e operadores lógicos.

#### 2.5.1.1 Lógica Nebulosa

Em um sentido estrito, a lógica nebulosa é um sistema lógico que visa a formalização de um raciocínio aproximado. “Andar alguns metros” e “copo meio vazio” são expressões que mostram a comunicação de modo vago e a incerteza do pensamento humano. São situações que violam a suposição da lógica clássica, em que uma informação é verdadeira ou falsa, não podendo ser parcialmente verdadeira ou parcialmente falsa. A lógica nebulosa surge como uma alternativa para lidar com essas incertezas. É um formalismo matemático capaz de capturar informações vagas, descritas em uma linguagem natural e convertê-las para um formato numérico (permitindo sua manipulação pelos computadores) (SOUSA JÚNIOR, 1999; TAKEMURA, 2016; ZADEH, 1994).

#### 2.5.1.2 Conjuntos nebulosos

Em 1965 o professor da Universidade de Berkley, Lotfali Askar Zadeh, introduziu o conceito de conjuntos nebulosos (*Fuzzy Sets*) que, como o próprio nome sugere, é uma teoria de conjuntos (ou classes) cujas fronteiras não são definidas. Zadeh observou que tanto no plano físico (mundo real), quanto no plano matemático, existiam conjuntos que não possuíam um critério de pertinência claramente definidos. Conjuntos como “temperatura alta” ou “pressão baixa”, definidos até então pela lógica clássica – em que um elemento pode pertencer ou não a um determinado conjunto – eram extremamente imprecisos e ainda tinham um papel fundamental nas comunicações, abstrações e reconhecimento de padrões. Assim, ele estabeleceu que um conjunto nebuloso seria uma classe com diversos graus de pertinência. Ou

seja, a cada elemento seria permitido um determinado grau de pertinência em relação ao conjunto. O grau de pertinência é um valor numérico entre 0 e 1 (em que 0 significa completa exclusão e 1 completa pertinência) que traduz a possibilidade de um elemento pertencer ou não a um determinado conjunto (SOUSA JÚNIOR, 1999; ZADEH, 1965).

### *2.5.1.3 Funções de pertinência*

Quando se considera todos os elementos de um conjunto, tem-se as funções de pertinência, por meio das quais, tem-se o grau de pertinência de cada elemento (SOUSA JÚNIOR, 1999). Elas se assemelham às funções de probabilidade, que descrevem a probabilidade relativa de uma variável de tomar certo valor. Porém, há diferenças conceituais bastante expressivas, principalmente nas regras de combinação das funções de pertinência. Além disso, a noção de um conjunto nebuloso é completamente não estatística por natureza (ZADEH, 1965). As funções de pertinência podem assumir diversas formas: quadradas, retangulares e trapezoidais (estas podem levar a perda de informações em regiões onde sua inclinação é igual a 0), triangulares, da forma-Z ou da forma-S (que são formas mais suaves e reduzem a perda de informações), entre outras (NELLES, 2001).

### *2.5.1.4 Variáveis linguísticas*

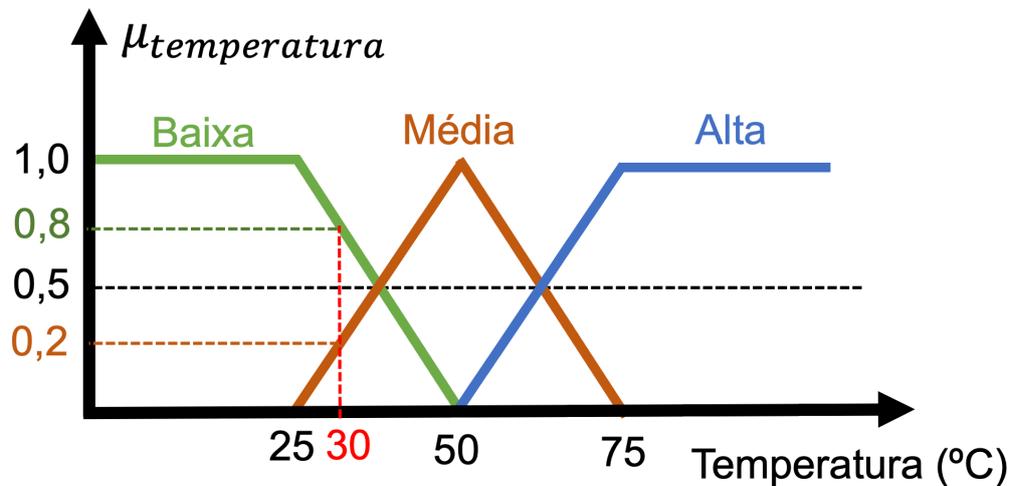
Outro conceito importante dentro da teoria da lógica nebulosa são as variáveis linguísticas. Enquanto que na matemática clássica são utilizadas variáveis numéricas, a lógica nebulosa utiliza-se de variáveis linguísticas (variáveis cujos valores não são números, mas palavras ou expressões), por exemplo: temperatura, pressão, vazão etc. Isto decorre da facilidade da utilização destes termos para expressão e processamento no formato de regras (NELLES, 2001; ZADEH, 1975).

Variáveis linguísticas compreendem variáveis descritas por expressões como “rápido”, “devagar”, “alto”, “baixo”, que correspondem aos valores linguísticos das variáveis linguísticas. Zadeh (1994) destaca que um dos aspectos mais importantes do conceito de valores linguísticos é o de considerá-los como uma forma de compressão de dados (granulação). Logo, conjuntos nebulosos podem ser entendidos como grânulos. Embora a granulação seja uma generalização da forma clássica de quantização, na primeira tem-se que os valores são uma

sobreposição de conjuntos nebulosos, ao passo que na segunda, os valores são intervalos. As vantagens da granulação frente à quantização são: maior generalização, maior semelhança com o pensamento humano e a transição de um valor linguístico para outro é mais suave e gradual, resultando em maior robustez (BĚLOHLÁVEK; DAUBEN; KLIR, 2017; ZADEH, 1994).

Toma-se como exemplo a variável linguística temperatura, que pode admitir 3 valores linguísticos: “baixa”, “média” e “alta”, tal como mostra a Figura 5:

Figura 5 - Funções de pertinência da variável linguística temperatura



Fonte: Gomide e Godwin (1994) – adaptado

Selecionam-se três valores arbitrários: 20, 30 e 80°C. Observando as funções de pertinência tem-se que 20°C é uma temperatura baixa com grau de pertinência 1,0, 30°C é uma temperatura baixa com grau de pertinência 0,8 e uma temperatura média com grau de pertinência 0,2 e, por fim, 80°C é uma temperatura alta com grau de pertinência 1,0. A noção de elementos linguísticos associados a um grau de pertinência em relação a valores linguísticos que caracterizam variáveis linguísticas é cerne da lógica nebulosa (SOUSA JÚNIOR, 1999).

#### 2.5.1.5 Operadores lógicos

Observa-se que mais de uma variável linguística pode ser empregada em uma mesma colocação linguística. Por exemplo: “Se a temperatura for baixa e o vento forte, então a sensação é de muito frio.”. “temperatura”, “vento” e “sensação” são as variáveis linguísticas em questão.

“baixa”, “forte” e “muito frio” são os valores linguísticos das variáveis linguísticas. “temperatura baixa e vento forte” é chamado de antecedente, já “sensação de muito frio” é o consequente. Observa-se que as duas variáveis linguísticas no antecedente são ligadas por um conector, “e”, chamado de operador lógico nebuloso de conjunção (NELLES, 2001).

A conjunção (conector “e”) de dois ou mais conjuntos nebulosos é feita por operadores lógicos, chamados de normas-t. Dentre elas estão:

- Mínimo: utiliza-se o valor mínimo entre os graus de pertinência.
- Produto: utiliza-se o produto dos graus de pertinência.
- Diferença limitada: utiliza-se o valor máximo entre 0 e a somatória dos graus de pertinência menos 1.

Para a disjunção (conector “ou”) de dois ou mais conjuntos nebulosos também são utilizados operadores lógicos, chamados conormas-t. Dentre elas estão:

- Máximo: utiliza-se o valor máximo entre os graus de pertinência.
- Soma algébrica: utiliza-se a soma dos graus de pertinência subtraindo-se o produto dos mesmos.
- Soma limitada: utiliza-se o mínimo entre 1 e a somatória dos graus de pertinência.

Por fim, tem-se o operador de negação “não”, que é o complementar do grau de pertinência (ou seja, 1 menos o grau de pertinência).

Para modelos nebulosos, a operação de conjunção pelo “mínimo” é a mais utilizada.

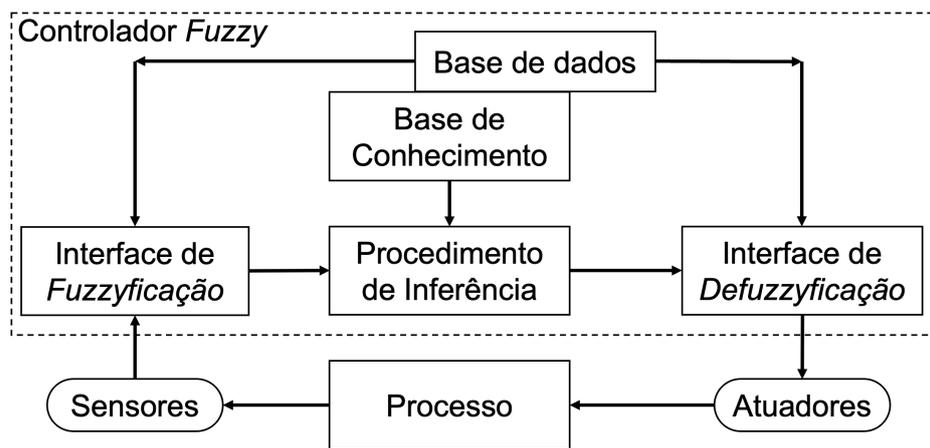
### **2.5.2 Controle nebuloso**

Nesta seção serão apresentados conceitos fundamentais relacionados ao funcionamento do controlador nebuloso, tais como: regras nebulosas, avaliação de sistemas nebulosos e os tipos de sistemas nebulosos. Por fim, serão abordadas algumas aplicações em bioprocessos.

### 2.5.2.1 Controlador nebuloso

A ideia do controle *fuzzy* é modelar ações de controle baseadas no conhecimento do especialista, ou seja, o algoritmo converte estratégias de controle de natureza qualitativa (baseadas em horas de observação do processo) em uma estratégia de controle automática. O que difere da abordagem clássica em que se busca desenvolver métodos de controle baseados na modelagem matemática do processo. A motivação dessa abordagem advém de casos em que o conhecimento do especialista é vasto e o sistema possui modelagem matemática complexa. A Figura 6 ilustra a estrutura básica de um controlador nebuloso (GOMIDE; GUDWIN, 1994; LEE, 1990; SOUSA JÚNIOR, 1999).

Figura 6 - Estrutura do controlador nebuloso



Fonte: Gomide e Godwin (1994) – adaptado

Os componentes básicos do controlador nebuloso são (GOMIDE; GUDWIN, 1994):

- Interface de *fuzzyficação*: mensura os valores das variáveis de entrada e conduz um mapeamento que transfere o conjunto das variáveis de entrada aos seus correspondentes no universo de discurso *fuzzyficado*. Ou seja, converte números reais a valores linguísticos (conjuntos nebulosos).

- Base de conhecimento: compreende a base de regras que caracteriza a estratégia de controle (regras linguísticas e funções de pertinência), metas de controle e informações sobre o processo.

- Procedimento de inferência: é o cerne do controle nebuloso. É onde ocorre o processamento dos dados de entrada *fuzzyficados*, junto com as regras de controle, a fim de inferir ações de controle utilizando a lógica nebulosa.

- Interface de *defuzzyficação*: transforma ações de controle *fuzzy* em ações não *fuzzy* através do mapeamento dos valores de saída *fuzzyficados* aos seus correspondentes no universo de discurso real.

Durante a implementação do controlador nebuloso é necessária a definição de alguns parâmetros e de um protocolo de controle (com as principais estratégias de controle). Ambos advêm do conhecimento do especialista do processo. Alguns desses parâmetros são fixos (estruturais), outros são alterados de tempos em tempos (sintonização). São exemplos de parâmetros estruturais: número de variáveis de saída e de entrada, variáveis linguísticas, funções de pertinência e regras de controle. São exemplos de parâmetros de sintonização: parâmetros das funções de pertinência (GOMIDE; GUDWIN, 1994).

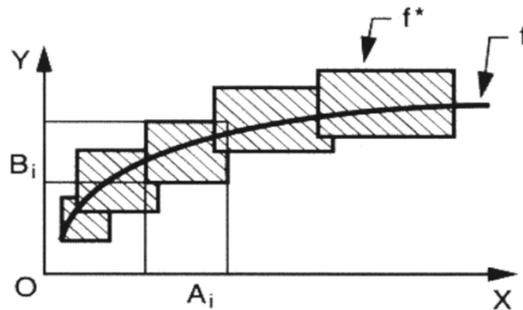
#### 2.5.2.2 Regras nebulosas

A forma mais usual de se expressar um conhecimento é utilizando regras do tipo “Se - então” ou regras do tipo “condição - ação”. Toma-se como exemplo um operador que monitora um reator químico. Uma das principais variáveis para o bom andamento de uma reação química é o controle preciso da temperatura. Logo, o operador tem em mente a seguinte regra: “Se a temperatura do reator aumentar, então abre-se a válvula de fluido refrigerante”. Observa-se que esta regra condicional tem uma premissa, “Se a temperatura do reator aumentar” e um conseqüente, “então abre-se a válvula de fluido refrigerante”. Esta regra equivale a implicação  $A_i \rightarrow B_i$ , que por sua vez corresponde ao produto cartesiano  $A_i \times B_i$  de dois conjuntos nebulosos. Dado que o comportamento do sistema é caracterizado por todas as regras nebulosas, o sistema de controle então é representado por uma única relação *fuzzy* (combinação linear das relações nebulosas provenientes das regras nebulosas). Ou seja,  $R = \sum_i A_i \times B_i$ . Conclui-se então que a descrição geral do sistema pode estar associada a um *fuzzy graph* (desde que a implicação se dê através de um produto cartesiano) (GOMIDE; GUDWIN, 1994; SOUSA JÚNIOR, 1999).

O *fuzzy graph* pode ser interpretado como uma representação granular de dependências funcionais e relações. Um *fuzzy graph*  $f^*$  de uma dependência funcional  $f: X \rightarrow Y$ , tal como mostra a Figura 7 (em que X e Y são variáveis linguísticas) fornece uma representação de f na forma da Equação 9:

$$f^* = A_1 \times B_1 + A_2 \times B_2 + \dots + A_n \times B_n = \sum_i A_i \times B_i \tag{9}$$

Figura 7 - Representação do *fuzzy graph*



Fonte: SOUSA JÚNIOR, 1999

Em que  $A_i$  e  $B_i$  são subconjuntos nebulosos contíguos de X e Y, respetivamente.

O procedimento de inferência anterior é decorrente do *modus ponens* apresentado no Quadro 2 (SOUSA JÚNIOR, 1999).

Quadro 2 - *Modus ponens* generalizado

X é A	Antecedente
$(X,Y) \in \sum A_i \times B_i$	Implicação
Y é B	Consequente

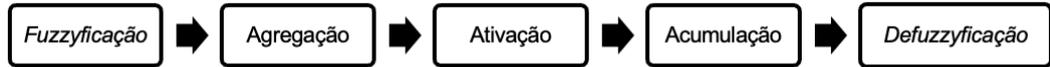
Fonte: SOUSA JÚNIOR, 1999 – adaptado

As regras “se-então” são chamadas de declarações condicionais *fuzzy* ou regras *fuzzy*.

### 2.5.2.3 Avaliação de um sistema nebuloso

A avaliação de um sistema nebuloso é feita em cinco fases, com base no diagrama da Figura 8:

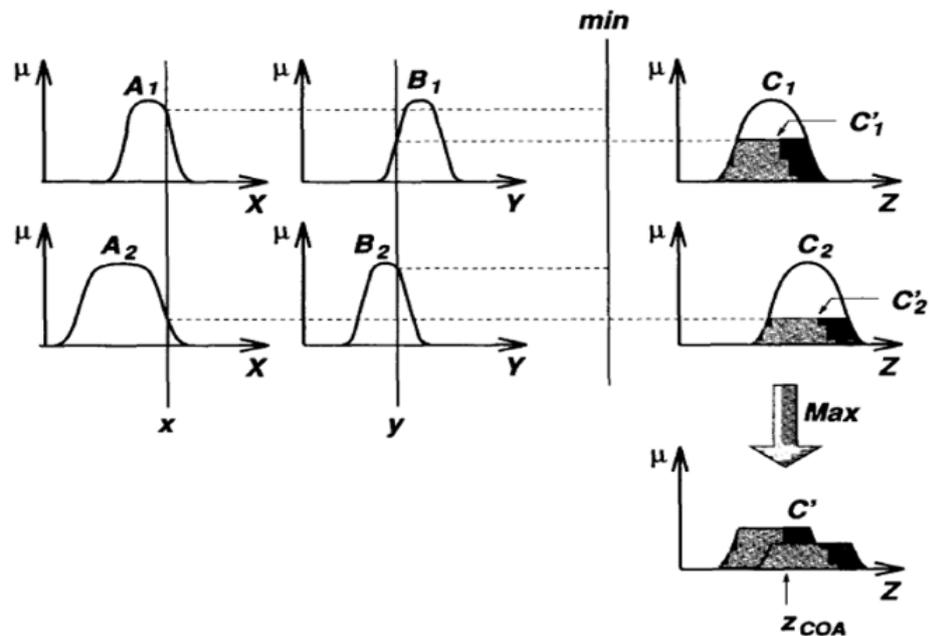
Figura 8 - Avaliação de um sistema nebuloso



Fonte: NELLES, 2001 – adaptado

Para ilustrar as cinco fases do processo de avaliação de sistemas de inferência nebulosos, tem-se a Figura 9. O sistema é composto de duas entradas *crisp* ( $x$  e  $y$ ), duas variáveis linguísticas de entrada ( $A$  e  $B$ ), 4 valores linguísticos ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  e  $B_2$ ) e uma variável de saída ( $C$ ) – e suas respectivas funções de pertinência – e duas regras nebulosas. A saída é um valor *crisp*  $z$ .

Figura 9 - Exemplo de um sistema de inferência nebuloso



Fonte: NELLES, 2001 - adaptado

A *Fuzzyficação* utiliza as funções de pertinência para mapear as entradas *crisp* aos graus de pertinência. Ou seja, toma-se os valores de entrada do controlador nebuloso e *fuzzyfica-os*, transformando números reais em conjuntos nebulosos, de modo que possam ser equiparados às categorias linguísticas (NELLES, 2001).

Ao conjunto das três fases seguintes (Agregação, Ativação e Acumulação) dá-se o nome de Inferência. Nesta fase que são processados os dados de entrada, junto com as regras de modo a inferir ações de controle. Na fase de Agregação os antecedentes de cada regra são combinados, utilizando operadores “ou” e “e”, ao grau de acionamento da regra. Na fase de Ativação os graus de acionamento são utilizados para calcular a ativação das saídas das regras. A combinação dos graus de pertinência de todas as colocações linguísticas é chamada de grau ou força de acionamento da regra. Quando há mais de um antecedente a ação de controle é ativada de acordo com o menor grau de pertinência entre os antecedentes. Esta operação é feita “cortando” as funções de pertinência de saída no grau de acionamento da regra. Na fase de acumulação as ativações das saídas de todas as regras são combinadas, computando-se o máximo de todas as ativações das saídas. A união destes conjuntos nebulosos produz a figura final, que por sua vez também é um conjunto nebuloso (NELLES, 2001).

Caso não seja necessário um valor *crisp* de saída, o processo de inferência termina. Isto acontece quando a resposta esperada não é um número, mas uma variável linguística. Caso seja necessário um valor *crisp* de saída, tem-se a *Defuzzyficação*. A técnica mais comumente empregada é a do Centro de Gravidade, cuja equação é dada pela Equação 10 (NELLES, 2001):

$$y_0 = \frac{\int y Y(y) dy}{\int Y(y) dy} \quad (10)$$

Em que  $y_0$  é o valor *defuzzyficado*,  $y$  é o valor da variável linguística e  $Y(y)$  é a função de pertinência. Observa-se que os três últimos passos da análise dos sistemas nebulosos dependem do sistema em estudo (NELLES, 2001).

#### 2.5.2.4 Tipos de sistemas nebulosos

Destacam-se três tipos de sistemas nebulosos: Mamdani (ou Linguístico), Takagi-Sugeno e Singleton (NELLES, 2001).

O sistema nebuloso do tipo Mamdani, também conhecido como sistema nebuloso Linguístico é baseado na seguinte regra apresentada pela Equação 11:

$$\text{Se } u_{i1} = A_{i1} \text{ e } u_2 = A_{i2} \dots u_{ip} = A_{ip} \text{ então } y = B_i \quad (11)$$

Sendo  $u_{i1} \dots u_{ip}$  as entradas,  $y$  a saída,  $A$  e  $B$  os conjuntos nebulosos.

São sistemas mais gerais e mais complexos, pois tanto as entradas quanto as saídas são descritas por variáveis linguísticas.

Sistemas nebulosos Takagi-Sugeno, por sua vez, seguem a seguinte regra apresentada pela Equação 12 (NELLES, 2001; TAKAGI; SUGENO, 1985).

$$\text{Se } u_{i1} = A_{i1} \text{ e } u_{i2} = A_{i2} \dots u_{ip} = A_{ip} \text{ então } y = f_i(u_1, u_2, \dots, u_p) \quad (12)$$

Em que  $f_i$  é uma função qualquer.

Enquanto que os sistemas nebulosos do tipo Mamdani possuem a saída na forma de conjunto nebuloso, os sistemas do tipo Takagi-Sugeno possuem como consequente uma função, em geral, de primeira ordem (em que o consequente da regra é uma função linear das entradas) (NELLES, 2001).

Uma vantagem dos sistemas Takagi-Sugeno é que eles trabalham bem com técnicas adaptativas e de otimização.

Os sistemas nebulosos Singleton são um caso específico tanto dos sistemas Linguísticos, quanto dos sistemas Takagi-Sugeno. Eles seguem a regra apresentada pela Equação 13 (NELLES, 2001):

$$\text{Se } u_{i1} = A_{i1} \text{ e } u_{i2} = A_{i2} \dots u_{ip} = A_{ip} \text{ então } y = BS_i \quad (13)$$

Em que  $S_i$  é um valor real chamado *singleton*.

Observa-se que, no caso de um sistema linguístico com valor *crisp* de saída, tem-se então um sistema *singleton*. Ao mesmo tempo, um sistema Takagi-Sugeno cujo consequente é uma função de ordem 0 (ou seja, uma constante), também se reduz a um sistema *Singleton* (NELLES, 2001).

### 2.5.3 Aplicações do controle nebuloso

A lógica *fuzzy* encontrou adeptos no Japão. Até hoje, o metrô de Sendai segue sendo uma das aplicações mais bem sucedidas do controle nebuloso. O sistema foi implementado em 1985 com o nome de Sendai 1000N e foi baseado em um estudo para desenvolvimento de um

controlador *fuzzy* visando à operação automatizada do sistema de frenagem e aceleração de trens. Anteriormente a operação era realizada por 2 operadores treinados e, em seguida, via sistema de controle automático. Porém ambas as estratégias apresentavam falhas, seja devido às não linearidades do sistema (controle automático PID era feito baseado num modelo linearizado) ou à falta de acuidade em relação as paradas e os solavancos de aceleração e frenagem (baixo conforto para os passageiros). Visando melhorar o sistema de controle foram determinados 4 índices de performance: segurança, conforto, controle de velocidade e *gap* de parada nas estações. Estas variáveis foram escolhidas com base no sistema operacional do trem, dividido em duas etapas: na fase de velocidade constante o operador aumentava a velocidade até o limite da via (caso o limite fosse ultrapassado os freios seriam acionados), já na fase de parada o operador analisava a distância em relação ao ponto de chegada na estação e iniciava o processo de frenagem do trem. Baseado no conhecimento do especialista foram criadas 3 regras *fuzzy* para a primeira etapa e 6 regras *fuzzy* para a segunda etapa. As simulações apontaram que não houve diferença considerável na controlabilidade do trem, ou seja, o *gap* entre o local de parada e seu alvo foi praticamente o mesmo. Porém o sistema *fuzzy* foi mais eficiente no controle de frenagem (o que foi comprovado após a implementação do sistema na malha ferroviária). Foi relatado um aumento no conforto dos passageiros e uma economia de energia de cerca de 10% (YASUNOBU; MIYAMOTO; IHARA, 1993).

Embora o sistema Sendai 1000N tenha sido a aplicação do controle *fuzzy* de maior escala, é vasto o número de aplicações da lógica nebulosa na indústria de bioprocessos do Japão. Na Sankyo o controle *fuzzy* foi empregado com sucesso na produção de ML-236B, precursor da prevastatina sódica (medicamento para combater o aumento do colesterol). A produção deste precursor é feita a partir do fungo *Penicillium citrinum* e requer um controle preciso do pH no meio (em torno de 4). A princípio o controle do pH era feito manualmente (por especialistas) a partir da manipulação da vazão de alimentação de substrato. Foram selecionadas como variáveis de entrada: total de gás carbônico produzido, valor do pH e inclinação (coeficiente angular) da curva do pH. O controlador nebuloso foi programado para identificar a fase em que o cultivo se encontrava (numeradas de 1 a 5). Com base nestas fases, o controlador modificava a vazão de alimentação entre 0 (fase 1), vazão constante (fase 2) e variável conforme a dinâmica do pH (fases 3 a 5). Utilizando o controle *fuzzy* foi possível manter o pH entre 3,8 e 4 (resultado superior ao obtido com o controle por um operador experiente). Além disso, os autores reportaram um aumento de produtividade de 10% em relação ao controle original,

comprovando a eficiência do controle nebuloso (HONDA; KOBAYASHI, 2000; HORIUCHI; KISHIMOTO, 2002).

Outra aplicação consistiu na implementação de um controlador *fuzzy* na fábrica da *Nippon Roche* (Roche Japão) para controle da produção de vitamina B2. No processo era utilizada uma cepa de *Bacillus* recombinante que convertia glicose diretamente em vitamina B2. Para criar o controlador nebuloso foram utilizadas como variáveis de entrada: tempo de cultivo, taxa de evolução de CO<sub>2</sub>, evolução total de CO<sub>2</sub> e concentração de oxigênio dissolvido. O controlador, por sua vez, indicava a fase em que se encontrava o cultivo (*lag*, crescimento, produção 1 ou 2). Após a identificação das fases, outro controlador foi utilizado para ajuste da vazão de alimentação e do pH do processo produtivo. Observou-se que os resultados obtidos com o controlador nebuloso foram praticamente idênticos aos obtidos por um operador experiente. Foi possível aumentar tanto a produção volumétrica quanto a produtividade (cerca de 8%). Além disso, foi observado um aumento na estabilidade operacional (HONDA; KOBAYASHI, 2000; HORIUCHI; KISHIMOTO, 2002).

Os exemplos anteriores descrevem a utilização de um controle indireto, em que a inferência nebulosa foi utilizada para estimar a fase ou estado fisiológico do cultivo. Em seguida, um controlador de nível hierárquico mais baixo realizava a ação de controle baseada na inferência. Por outro lado, no controle direto, a inferência *fuzzy* determina diretamente o valor da variável manipulada a partir da base de conhecimento e de dados *on-line*. Entre as aplicações do controle fuzzy direto estão a Ajinomoto e uma destilaria tradicional de *sakê*.

Na primeira aplicação, a Ajinomoto utilizava o melão como substrato de seu processo de fermentação do ácido glutâmico. Antes, o controle da alimentação era realizado com base numa relação linear entre a concentração de melão e a taxa de consumo de amônia. O controlador nebuloso foi proposto para automatizar a vazão de alimentação de melão. Foram utilizadas como variáveis de entrada: tempo após a adição de surfactantes no meio, concentração de oxigênio dissolvido e variação na concentração de oxigênio dissolvido. A variável de saída foi a variação de um parâmetro de regressão para ajuste da vazão de alimentação. Foram criadas 18 regras nebulosas: as duas primeiras aferiam a necessidade (ou não) da modificação da vazão de alimentação, já as 16 regras restantes aferiam a variação na vazão de alimentação. Os resultados mostraram que o controlador *fuzzy* aferiu corretamente tanto o momento do ajuste, quanto a variação da vazão de alimentação, a fim de manter a concentração de açúcar dentro dos valores limites. Esta foi uma das primeiras aplicações bem

sucedidas do controle *fuzzy* em bioprocessos de escala industrial (HORIUCHI; KISHIMOTO, 2002; NAKAMURA; KURATANI; MORITA, 1985).

A segunda aplicação foi numa fábrica tradicional de saquê (bebida alcoólica). O controle nebuloso foi empregado para obter um controle preciso da temperatura. Durante o processo notava-se um aumento inicial da temperatura devido à fermentação. Aos poucos, de acordo com a fase da fermentação, a temperatura deveria ser diminuída a fim de aumentar a quantidade de ésteres. Este controle era feito por especialistas com anos de prática. As variáveis de entrada do controlador nebuloso foram: o erro da densidade relativa do caldo (grau Baumé), o erro da taxa de decaimento da densidade relativa e o teor alcoólico. A variável de saída foi a variação da temperatura. Utilizando o controlador nebuloso foi possível obter um saquê de qualidade similar a de um especialista no processo (HONDA; KOBAYASHI, 2000; HORIUCHI; KISHIMOTO, 2002).

Fora do Japão, iniciavam-se os estudos da aplicação do controlador nebuloso visando controle do oxigênio dissolvido em um biorreator de bancada. Foram realizados experimentos preliminares para obter um modelo matemático do processo de fermentação, de forma a representar as três fases de crescimento: *lag*, exponencial e fim da exponencial. Para modelar a dinâmica entre as variáveis de entrada e saída, foi realizado um cultivo de *E. coli*. Ao se atingir uma concentração celular mínima, agitação e aeração foram mantidas constantes até que a concentração de oxigênio dissolvido também se mantivesse constante. Foi dado uma perturbação tipo degrau positivo na velocidade de agitação e aferiu-se a resposta do oxigênio dissolvido. Após a estabilização da medida, uma nova perturbação (degrau negativo) foi realizada na velocidade de agitação e a resposta foi aferida. Um procedimento similar foi realizado para aferir a resposta do oxigênio dissolvido em relação à vazão de ar. Este procedimento foi repetido para as três fases do cultivo. Utilizando a ferramenta MATLAB e os dados coletados, foi possível criar o modelo matemático. Para o desenvolvimento do controlador nebuloso as variáveis de entrada foram: erro do oxigênio dissolvido e a variação do erro. Sendo o erro definido pela diferença entre o valor medido e o *setpoint* do oxigênio dissolvido. Já a variação do erro foi definida pela diferença entre o erro atual e seu valor no passo anterior. As variáveis de saída selecionadas foram: variação na velocidade de agitação e a variação na vazão de gás. Para testar o controlador nebuloso foram conduzidas simulações para diversas situações de processo. Os resultados mostraram que a porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida próxima ao valor de *setpoint*, sem a ocorrência de *overshooting* (MARTIN; COUCH, 1996).

No Brasil, uma das aplicações mais bem-sucedidas do controle *fuzzy* foi na produção de Cafalosporina C. Este antibiótico pode ser produzido utilizando o fungo *Cephalosporium acremonium* e só ocorre sob altas concentrações de glicose (quando a metionina é reprimida). O cultivo do *C. acremonium* é realizado em duas fases distintas: a primeira é caracterizada pelo crescimento do microrganismo (com abundância da fonte de carbono) e a segunda é caracterizada pela alimentação suplementar (promovendo a síntese de enzimas específicas que catalisam a produção do antibiótico). A estratégia de controle foi baseada na observação de que o fim da trofofase há uma transição entre a liberação crescente de gás carbônico e a liberação decrescente (caracterizando um ponto de máximo). O sistema de controle foi implementado em 3 níveis: “Atenção”, “Ação” e “Proteção”. Para o primeiro nível de controle (nível de Atenção) foram definidas duas variáveis linguísticas: “tempo” e “nível de saturação de gás carbônico”. Os valores linguísticos adotados para cada uma das variáveis linguísticas foram: “cedo”, “tarde” e “baixo”, “alto”, respectivamente. Foram criadas 4 regras nebulosas e a resposta foi a ativação ou não do nível de ação. Para o segundo nível de controle (Nível de Ação) foi utilizada apenas uma variável linguística, “variação de CO<sub>2</sub>”, com dois valores linguísticos: “negativa” e “zero ou positiva”. Foram criadas duas regras nebulosas e a resposta do sistema foi a alimentação ou não do meio suplementar. Para o terceiro nível de controle (Nível de Proteção) foram definidas duas variáveis linguísticas: “tempo” e “nível de variação de CO<sub>2</sub>”. Os valores linguísticos adotados para cada uma das variáveis linguísticas foram: “cedo”, “tarde” e “Positiva”, “Negativa”, respectivamente. Foram criadas 4 regras nebulosas e a resposta foi a confirmação ou o cancelamento da alimentação. Foram realizados três cultivos de *C. acremonium* em biorreator. Os dois primeiros permitiram estabelecer as funções de pertinência e a base de regras do controlador. O terceiro foi utilizado para testar a viabilidade e a robustez do algoritmo. Os resultados foram bastante satisfatórios, obtendo-se um controlador eficaz na detecção do momento ótimo em que se deve iniciar a alimentação do meio suplementar (SOUSA JÚNIOR, 1999; SOUSA; ALMEIDA, 2001).

Com base no estudo citado anteriormente desenvolveu-se um algoritmo, baseado na lógica nebulosa, para determinação do momento de máxima concentração de enzimas durante um cultivo de *Bacillus megaterium* em um biorreator tipo tanque agitado. A Penicilina G-Acilase (PGA) é uma enzima industrial utilizada principalmente como biocatalizador na produção de antibióticos. O microrganismo *B. megaterium* produz a PGA e secreta-a no meio, o que simplifica os processos de separação e purificação. Durante o processo produtivo da

enzima, a fração molar do dióxido de carbono atinge um nível máximo. Concomitantemente, observou-se que a concentração enzimática também atinge seu ponto de máximo no mesmo momento. Assim, foi desenvolvido um sistema de lógica nebulosa, baseado no trabalho de Sousa (1999), para identificar o momento em que ocorre esse pico (reduzindo os custos do processo e evitando a degradação do produto). O algoritmo *fuzzy* foi escrito em linguagem FORTRAN, compilado e implementado na plataforma Visual Basic (Microsoft). Assim como em Sousa (1999), o controle foi implementado em 3 níveis: “Atenção”, “Identificação do Pico” e “Proteção”. Para o primeiro nível de controle (Nível de Atenção) foram definidas duas variáveis linguísticas: “tempo” e “fração molar de CO<sub>2</sub>”. Os valores linguísticos adotados para cada uma das variáveis linguísticas foram: “cedo”, “tarde” e “baixo”, “alto” (respectivamente). Foram criadas 4 regras nebulosas e a resposta foi a ativação ou não do nível de identificação do pico. Para o segundo nível de controle (Nível de Identificação do pico) foi utilizada apenas uma variável linguística, “variação de CO<sub>2</sub>”, com dois valores linguísticos: “negativa” e “zero ou positiva”. Foram criadas duas regras nebulosas e a resposta do sistema foi a notificação ou não do pico. Para o terceiro nível de controle (Nível de Proteção) foram definidas duas variáveis linguísticas: “tempo” e “variação de CO<sub>2</sub>”. Os valores linguísticos adotados para cada uma das variáveis linguísticas foram: “cedo”, “tarde” e “Positiva”, “Negativa” (respectivamente). Foram criadas 4 regras nebulosas e a resposta foi a confirmação ou o cancelamento do pico. Três experimentos foram realizados para obtenção dos dados e ajuste dos parâmetros do controlador nebuloso. Em seguida, outros três cultivos foram realizados para validação e testes de robustez do controlador. Os resultados mostraram que o controlador *fuzzy* identificou, com precisão, a região de máxima concentração de enzimas. Nos testes de robustez os resultados também foram positivos. O algoritmo forneceu estimativas de tempo para a máxima atividade enzimática dentro de uma faixa experimental correta (NUCCI *et al.*, 2005).

Durante as duas primeiras décadas do século XXI, somente na plataforma *Web of Science* foram registrados mais de 247 000 artigos científicos cujo tema estava relacionado com a lógica *fuzzy* (83 000 durante a primeira década – incluindo os aqui citados trabalhos de Sousa e Almeida (2001) e Nucci *et al* (2005) - e 164 000 entre os anos de 2011 e 2020), o que demonstra um aumento de interesse por essa teoria. Uma pesquisa na base de dados *web of Science*, utilizando os termos *fuzzy logic* e *fuzzy control* gerou como resultado a Figura 10 que ilustra a vasta gama de áreas nas quais a lógica *fuzzy* se mostrou promissora na última década. Dentre elas destacam-se: ciência computacional (inteligência artificial, métodos teóricos, sistemas de informação e aplicações multidisciplinares), engenharias (elétrica, eletrônica, industrial, civil,

de manufaturas, industrial, química, de materiais e mecânica), controle e automação, telecomunicações, combustíveis, sustentabilidade e instrumentação. Contudo, aplicações do controle fuzzy em biorreatores ainda é tímida.

Figura 10 - Artigos baseados na lógica *fuzzy* agrupados por áreas do conhecimento publicados entre os anos de 2001 a 2020.



Fonte: *Web of Science*, 2021

Dentre as aplicações da presente década destaca-se o estudo comparativo do desempenho de estimadores de biomassa baseados em sistemas *fuzzy*, redes neurais e via ANFIS. Foram utilizadas como variáveis de entrada, a concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de substrato. Já a variável de saída utilizada foi a variação da concentração de biomassa. Os resultados das simulações mostraram que, embora os três modelos tenham obtido boa convergência em relação aos dados experimentais, todos apresentaram grande sensibilidade devido a ruídos (o que poderia acarretar em uma degeneração da estimativa). Ao incorporar mais dados experimentais ruidosos ao treinamento, as redes neurais se mostram mais resilientes. Neste caso, a versão híbrida (*fuzzy* e redes neurais), apresentada pelo ANFIS, foi o modelo mais adequado para estimativa da concentração celular (MUNOZ; QUINTERO, 2011).

No controle *fuzzy* direto destaca-se a aplicação da lógica *fuzzy* para controle de temperatura. Foram utilizadas como variáveis de entrada a potência do aquecedor e a vazão de água fria da camisa. Já a variável de saída foi a variação do erro da temperatura. Os parâmetros

do controlador nebuloso foram otimizados utilizando a técnica de algoritmo genético. Os resultados experimentais mostraram que durante os cultivos de *S. cerevisiae* a temperatura foi mantida muito próxima ao valor do *setpoint* estabelecido. No entanto, notou-se que a variável de aquecimento teve um comportamento mais instável do que a variável de resfriamento (AHIOĞLU *et al.*, 2013).

Em um estudo recente avaliou-se a viabilidade da lógica nebulosa (por meio de simulações computacionais) para o controle do oxigênio dissolvido em um bioprocessamento (cultivo de *E. coli*). Este trabalho exploratório foi realizado em 3 etapas: *fuzzyficação* da árvore de decisão (presente no SUPERSYS\_HCDC), ajuste dos parâmetros do controlador nebuloso e, por fim, modelagem do processo utilizando redes neurais artificiais para testes de robustez do controlador.

Na primeira etapa foi desenvolvido o sistema de controle *fuzzy* utilizando o *toolbox* de lógica nebulosa do MATLAB e suas ferramentas: *Fuzzy Inference System* (FIS) e o *Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System* (ANFIS). O controlador *fuzzy* foi dividido em 3 sistemas de inferência nebulosos do tipo Takagi-Sugeno, mimetizando a estratégia da árvore de decisão. O primeiro, “Delta”, determinava o tamanho das variações das vazões de ar e oxigênio. Já os outros dois sistemas (Princ1 e Princ2) eram responsáveis por definir se haveria ou não variações nas vazões de ar e oxigênio (respectivamente). A variável linguística de entrada do sistema “Delta” foi a vazão anterior de oxigênio (com 3 valores linguísticos: Baixo e Positivo (BP), Médio e Positivo (MP) e Alto e Positivo (AP)). Já a variável de saída foi delta (L/min), a variação das vazões. Para os sistemas Princ1 e Princ2 as variáveis linguísticas de entrada foram: velocidade de agitação (com 3 valores linguísticos: Baixo e Positivo (BP), Alto e Positivo (AP) e Muito Alto e Positivo (MAP)), concentração de oxigênio dissolvido (com 3 valores linguísticos: BP, MP e AP), QarSe (variável auxiliar que auxiliava pela escolha da opção “se” ou pela opção “se não” da árvore de decisão após avaliação do valor da soma das vazões de ar e oxigênio, com 2 valores linguísticos: “Sim” e “Não”). Todas as variáveis até aqui citadas foram diretamente adaptadas a partir da árvore de decisão (Quadro 1). Além disso, foram adicionadas duas variáveis relacionadas ao crescimento celular, concentração celular (com 2 valores linguísticos: “BP” e “AP”) e velocidade específica de crescimento (com 2 valores linguísticos: “BP” e “MP”). Já as variáveis de saída de Princ1 e Princ2 foram QarEscolha e QO2Escolha (respectivamente). Ressalta-se que estas variáveis não indicavam, diretamente, um aumento, redução ou manutenção (no caso de QO2Escolha) nas vazões de ar e oxigênio. Os valores de saída deviam, na verdade, ser comparados a certos limites (faixas)

que mimetizavam as opções da árvore de decisão. Esta abordagem foi adotada visto que QarEscolha e QO2Escolha eram sensíveis a pequenas variações nas variáveis de entrada (AKISUE; HORTA; DE SOUSA, 2018).

Na segunda etapa foi realizado o ajuste, tanto dos parâmetros das funções de pertinência de entrada quanto dos parâmetros das funções lineares de saída, utilizando a ferramenta ANFIS. Utilizando técnicas de otimização paramétricas e técnicas adaptativas, o ANFIS regula os parâmetros com base em dados experimentais de entrada e saída. Foram criadas 3 regras nebulosas para o sistema “Delta” e 72 regras nebulosas para os sistemas Princ1 e Princ2.

Por fim, na terceira etapa foram ajustados os valores de QarEscolha e QO2Escolha com base em simulações. Para isso foram utilizados modelos neurais do processo, construídos com base em conjuntos de dados experimentais cedidos por Horta (2011). Foram utilizados dois conjuntos de dados de cultivo de *E. coli*: A16 (utilizado tanto para o desenvolvimento do controlador nebuloso quanto para os testes no simulador neural) e o conjunto A12 (utilizado somente para testes de robustez do controlador nebuloso) (AKISUE; HORTA; DE SOUSA, 2018).

Os resultados mostraram que foi possível manter a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30%. Além disso, as necessidades de vazões de ar e oxigênio - que seriam requeridas por um cultivo - foram satisfeitas, bem como uma atenuação dos picos de oxigênio dissolvido.

O citado trabalho inicial de desenvolvimento de controlador *fuzzy* (AKISUE *et al.*, 2018) já foi apontado como uma das poucas aplicações recentes da lógica nebulosa para controle do oxigênio dissolvido em biorreatores. Assim, este teve papel fundamental para pavimentar o caminho até a apresentação da versão final do controlador *fuzzy* para oxigênio dissolvido (objeto do trabalho da presente Tese).

#### **2.5.4 Ferramentas computacionais**

Nesta seção serão abordadas as principais ferramentas computacionais utilizadas nesta tese: o SUPERSY\_HCDC (implementado em LabVIEW), e os *toolboxes* do MATLAB (FIS, ANFIS e Redes Neurais).

### 2.5.4.1 LabVIEW

O LabVIEW (do inglês, *Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*) é uma linguagem de programação gráfica criada pela empresa *National Instruments*. Sua primeira versão foi lançada em 1986 e, desde então, mais de 40 versões e atualizações foram comercializadas. Os principais campos de aplicação do LabVIEW são a realização de medições e automação. A programação é feita de acordo com o modelo de fluxo de dados. Os programas em LabVIEW são chamados de instrumentos virtuais (em inglês, *Virtual Instruments* ou VI's) e são compostos por um painel frontal, pelo diagrama de blocos e por um painel de conexões. Cada programa pode ser executado isoladamente ou como subprograma (ou sub-VI) de outro (NATIONAL INSTRUMENTS, 2019).

O painel frontal é constituído de indicadores (saídas) e controles (entradas). Já o diagrama de blocos contém o código gráfico. Além de indicadores e controladores, o diagrama de blocos também contém estruturas e funções para realizar operações de dados. Estas estruturas são chamadas de nós, e são interligadas por fios (*wires*) que definem o sentido do fluxo de dados. As principais vantagens do LabVIEW são:

- Interface para diversos dispositivos: o programa inclui suporte nativo a diversos dispositivos, instrumentos de medição e controle e *softwares* de terceiros.
- Programação em paralelo: é possível realizar múltiplas tarefas, ideal para testar sistemas de automação (em que a aquisição, salvamento de dados e o controle do processo devem ser feitos de forma simultânea).
- Vasta biblioteca de programação: A *National Instruments* disponibiliza uma vasta biblioteca de funções e sub VI's prontas para uso. O LabVIEW também oferece suporte nativo a programação em código, o que permite que o usuário crie suas próprias funções.
- Linguagem de programação acessível: a linguagem de programação gráfica é intuitiva e acessível para usuários inexperientes, principalmente aqueles que não são familiarizados com a linguagem por código (escrita através de linhas de comando) (NATIONAL INSTRUMENTS, 2019).

Contudo, podem ser apontadas algumas “falhas” no programa, tais como:

- Lentidão: conforme aumenta-se a complexidade do instrumento virtual (aumento do código e inserção de múltiplas sub-rotinas) aumenta-se tanto a lentidão da comunicação de sinais, quanto a probabilidade de erros.

- Estrutura do programa: com o aumento da complexidade dos instrumentos virtuais, pequenas mudanças podem acarretar em uma profunda reestruturação no programa (NATIONAL INSTRUMENTS, 2019).

#### 2.5.4.2 SUPERSYS\_HCDC

A vazão de alimentação, a produção de metabólitos indesejados, alterações na temperatura, variações na concentração de oxigênio dissolvido, formação de espuma, entre outros fatores, podem influenciar o sucesso e o bom andamento dos cultivos de alta densidade celular. Assim, é necessário um operador experiente e treinado para supervisionar o cultivo durante todo o tempo. Contudo, cultivos celulares podem levar mais de 30 horas ininterruptas. Logo, uma ferramenta baseada em inteligência artificial poderia auxiliar e até substituir a supervisão humana. Na época da concepção do SUPERSYS\_HCDC, programas de monitoramento e controle de biorreatores já eram vendidos por fabricantes como Fermentec e Marconi. Todavia, ressalta-se que nenhum deles tinha capacidade de conduzir um cultivo em batelada alimentada automaticamente até altas densidades celulares. Os programas de monitoramento e supervisão apresentam as mesmas funcionalidades básicas: controle de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, agitação e vazão de líquidos e gases. Com o avanço das telecomunicações, também foram incluídas funções de acesso remoto pela internet, alarmes sonoros e por mensagem (SMS) (HORTA, 2011).

O SUPERSYS\_HCDC foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Já foi empregado com sucesso em diversos tipos de cultivos, tais como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*. O programa foi parcialmente codificado em MATLAB (6.5) e implementado na plataforma LabVIEW (8.0), onde foi segmentado em diversos módulos de controle que atuam desde as funções básicas até a inferência de importantes variáveis em tempo real, entre eles: controle de pH, temperatura, módulo de alarmes, módulo automático da alimentação suplementar e, em especial, o módulo de controle da concentração de oxigênio dissolvido (HORTA, 2011).

Utilizando o sistema com todas as suas funcionalidades chegou-se a uma concentração celular máxima de 155 g<sub>massa seca</sub>/L em apenas 17 horas de cultivo. Ou seja, obteve-se uma

produtividade de biomassa superior a 9 g<sub>massa seca</sub>/L.h. Além disso, houve significativa diminuição dos problemas operacionais e erros de operação. Destacam-se alguns módulos que compõe o SUPERSYS:

- Módulo de controle automático da vazão de alimentação do meio suplementar por meio da velocidade específica de crescimento dinâmica

Este módulo de controle foi implementado a partir da velocidade específica de crescimento calculada online ( $\mu_{din}$ ) utilizando o sinal de permissividade fornecido pelo sensor de biomassa (Fogale nanotech). Para possibilitar o uso do sinal de permissividade para o cálculo da velocidade específica de crescimento dinâmica ( $\mu_{din}$ ), foram necessários dois filtros de média móvel. O valor de  $\mu_{din}$  foi atualizado a cada 10 minutos para que fosse utilizado na Equação 14 que descreve a vazão de alimentação do meio suplementar:

$$F = \frac{\left(\frac{\mu_{din} + m_0}{Y_{XC}}\right) C_{X0} V_0}{(C_{S0} - C_{SR})} e^{(\mu_{din} t_{alim})} \quad (14)$$

Em que  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento (1/h), F é a vazão de alimentação do meio suplementar (g/h),  $Y_{XC}$  é o coeficiente de rendimento ( $g_x/g_{substrato}$ ),  $m_0$  é a manutenção ( $\frac{g_x}{g_{substrato} h}$ ),  $C_{X0}$  é a concentração celular no início da alimentação (g/L),  $V_0$  é o volume no início da alimentação (L),  $t_{alim}$  representa o tempo de alimentação (h),  $C_{S0}$  é a concentração de substrato no início da alimentação (g/L) e  $C_{SR}$  é a concentração de substrato residual (g/L) (HORTA, 2011).

- Módulo de alarmes

Um recurso importante implementado no SUPERSYS\_HCDC foi um conjunto de alarmes para detecção de problemas durante o cultivo. Foram monitorados: pH, (mal funcionamento das bombas de ácido e base), temperatura (aumento ou diminuição acentuada da temperatura do banho), concentração de oxigênio dissolvido (aumento da velocidade de agitação ou da vazão de gás). Vazões de ar e oxigênio (pressão incorreta das linhas de ar e

oxigênio), pressão interna (aumento da pressão no reator) e viabilidade do microrganismo ( $\mu$  negativo ou positivo) (HORTA, 2011).

- Módulo de controle da concentração de oxigênio dissolvido

Um dos principais módulos de controle é o controle da concentração de oxigênio dissolvido. A fim de compatibilizar a alta velocidade de consumo de oxigênio em cultivos de alta densidade celular de *E. coli*, o controle da concentração de oxigênio dissolvido envolveu um sistema híbrido-hierárquico. Este combinava um PID digital (na forma de velocidade) – atuando diretamente na velocidade de agitação – e um algoritmo heurístico que modulava as vazões de ar e oxigênio, que já foi apresentada no Quadro 1 (HORTA, 2011).

A estratégia de controle PID para velocidade de agitação é descrita pela Equação 15:

$$Agit_t = Agit_{t-1} + K_c \{[(SetP - OD_t) - (SetP - OD_{t-1})] + \frac{\Delta t}{T_i} (SetP - OD_t) + \frac{T_d}{\Delta t} [(SetP - OD_t) - 2(SetP - OD_{t-1}) + (SetP - OD_{t-2})]\} \quad (15)$$

Em que  $Agit$  é a velocidade de agitação (rpm),  $K_c$ ,  $T_i$ ,  $T_d$  são as constantes proporcional, integral e derivativa (respectivamente),  $SetP$  o valor do *setpoint* da concentração de oxigênio dissolvido (%),  $OD$  a concentração de oxigênio dissolvido (%) e  $t$  é o tempo (h).

A estratégia de controle PID digital advém da equação do PID clássico mostrada na Equação 16 (SEBORG; EDGAR; MELLICHAMP, 2004):

$$p_k = \bar{p} + K_c \left[ \varepsilon_t + \frac{1}{T_i} \int_0^t \varepsilon_t dt + T_d \frac{d\varepsilon_t}{dt} \right] \quad (16)$$

Em que  $p_k$  é o valor da variável de saída do controlador e  $\varepsilon_t$  o valor do erro e  $\bar{p}$  é o valor do desvio (estado estacionário)

Para obtenção da equação do PID digital, substitui-se os termos integral e derivativo da Equação 16 por suas respectivas aproximações por diferenças finitas, dadas pelas Equações 17 e 18 (SEBORG; EDGAR; MELLICHAMP, 2004).

$$\int_0^t \varepsilon_t dt \cong \sum_{j=1}^k \varepsilon_j \Delta t \quad (17)$$

$$\frac{d\varepsilon_t}{dt} \cong \frac{\varepsilon_k - \varepsilon_{k-1}}{\Delta t} \quad (18)$$

Obtendo-se a Equação 19 do controlador PID digital (de posição).

$$p_k = \bar{p} + K_c \left[ \varepsilon_t + \frac{\Delta t}{T_i} \sum_{j=1}^k \varepsilon_j + T_d \frac{(\varepsilon_k - \varepsilon_{k-1})}{\Delta t} \right] \quad (19)$$

Para se obter a Equação 19 na forma de velocidade, calcula-se a variação da variável de saída do controlador PID, tal como mostra a Equação 20, a partir dos termos  $p_k$  e  $p_{k-1}$  (SEBORG; EDGAR; MELLICHAMP, 2004).

$$\Delta p_k = p_k - p_{k-1} = K_c \left[ \varepsilon_k - \varepsilon_{k-1} + \frac{\Delta t}{T_i} \varepsilon_k + \frac{T_d}{\Delta t} (\varepsilon_k - 2\varepsilon_{k-1} + \varepsilon_{k-2}) \right] \quad (20)$$

#### 2.5.4.3 Fuzzy Logic toolbox

O desenvolvimento do sistema de controle nebuloso (que envolve o estabelecimento das variáveis linguísticas, das funções de pertinência e das regras de controle) foi feito por meio de duas ferramentas computacionais: *Fuzzy Inference System* (FIS) e o *Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System* (ANFIS). Ambas pertencem ao *Fuzzy Logic toolbox* do MATLAB. O *toolbox* prevê um conjunto de funções e aplicações em MATLAB para análise, *design* e simulação de sistemas baseados na lógica nebulosa. Ele permite a modelagem de sistemas de comportamento complexo que se utilizam de regras lógicas simples, para assim implementá-las em um sistema de inferência nebuloso (MATHWORKS, 2018).

##### -Fuzzy Inference System (FIS)

O *Fuzzy Inference System* (FIS) possui ferramentas gráficas para construir, editar e visualizar sistemas de inferência nebulosos. Estas ferramentas estão divididas em dois grupos, um de edição (tal como mostra a Figura 11) e outro de visualização *Viewer* (tal como mostra a Figura 12). O primeiro grupo é composto pelas ferramentas: *Fuzzy Logic Designer*, *Membership Function Editor* e *Rule Editor*. O segundo conjunto é composto pelo *Rule Viewer*

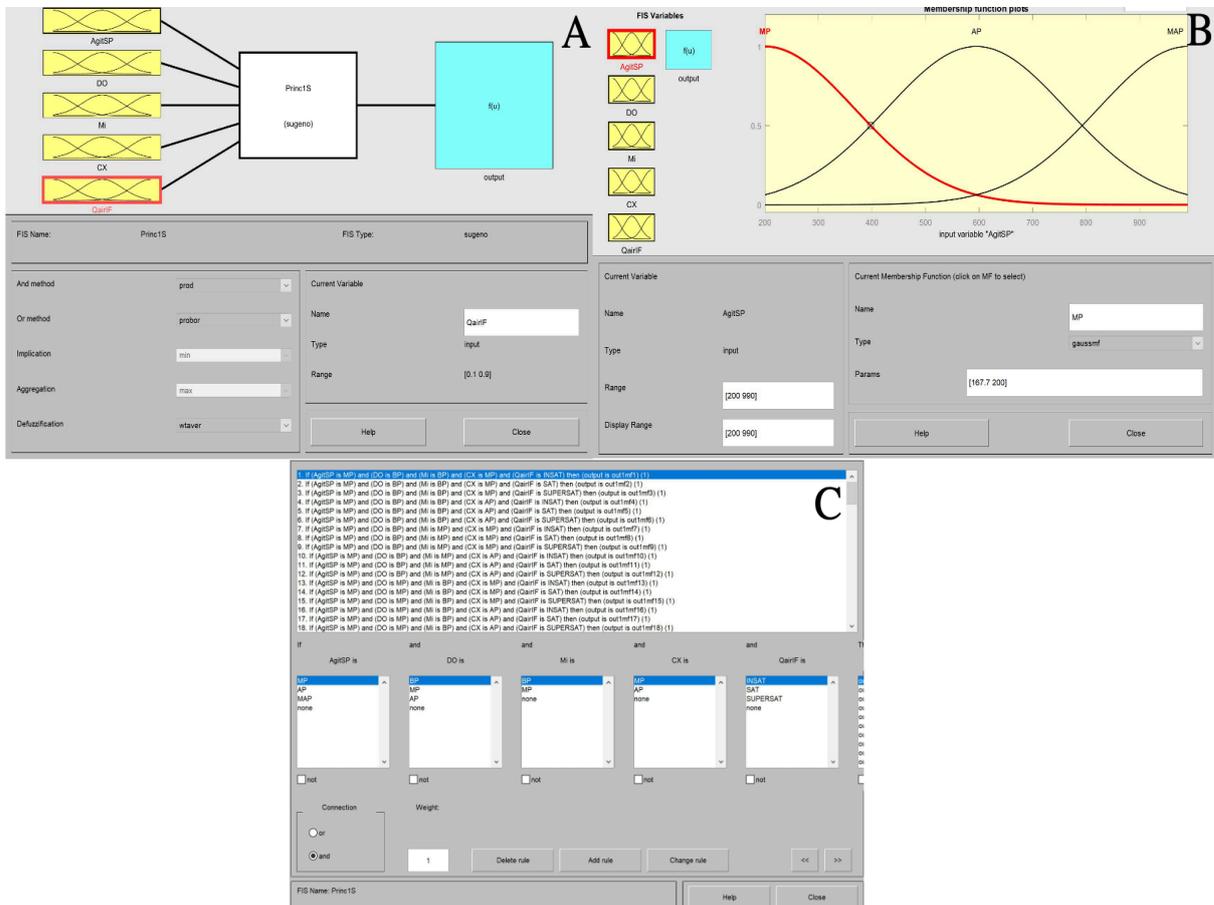
e pelo *Surface*. Elas estão dinamicamente interligadas, ou seja, quaisquer alterações pelas ferramentas de edição serão refletidas nas ferramentas de visualização (MATHWORKS, 2018).

*Fuzzy Logic Designer*: lida com questões importantes para o sistema tais como: número de variáveis de entrada e saída, nomenclaturas, escolha do método de agregação e *defuzzyficação* e o tipo de sistema nebuloso (Mandani ou Takagi-Sugeno). É importante ressaltar que o *Fuzzy Logic Designer* não limita o número de entradas (condicionado apenas à memória disponível no *hardware*).

*Membership Function Editor*: é uma ferramenta de edição das funções de pertinência. Ela permite ao usuário incluir, excluir, editar e visualizar todas as funções de pertinência relacionadas tanto às entradas quanto às saídas. É possível determinar os limites superior e inferior (*ranges*) das funções de pertinência, nomeá-las, escolher o tipo de função – dentre elas destacam-se as triangulares (*trimf*), trapezoidais (*trapmf*), gaussianas (*gaussmf1* e *gaussmf2*), em forma de sino (*gbellmf*), sigmodais (*sigmf*, *dsigmf*, *psigmf*) e polinomiais (*zmf*, *smf*, *pimf*) – e seus parâmetros. O programa também permite ao usuário que ele crie suas próprias funções de pertinência (*custmf*).

*Rule Editor*: é uma ferramenta que lida com a edição, inclusão ou exclusão de regras que determinam o comportamento do sistema. Sua interface é intuitiva e permite ao usuário criar regras (e modificá-las) escolhendo as variáveis linguísticas a partir de uma lista. O editor também possui duas opções extras: *None* e *Not*. A primeira é para excluir determinada variável da regra. Já a segunda é para negar determinada qualidade (ou seja, o conjunto complementar). Também é possível atribuir pesos (valores entre 0 e 1) a determinadas regras. Se nada for especificado, assume-se que o peso é igual a 1 (MATHWORKS, 2018).

Figura 11 – Interface do *Fuzzy Inference System*. Em destaque as ferramentas de edição: *Fuzzy Logic Designer* (11A), *Membership Function Editor* (11B) e *Rule Editor* (11C).

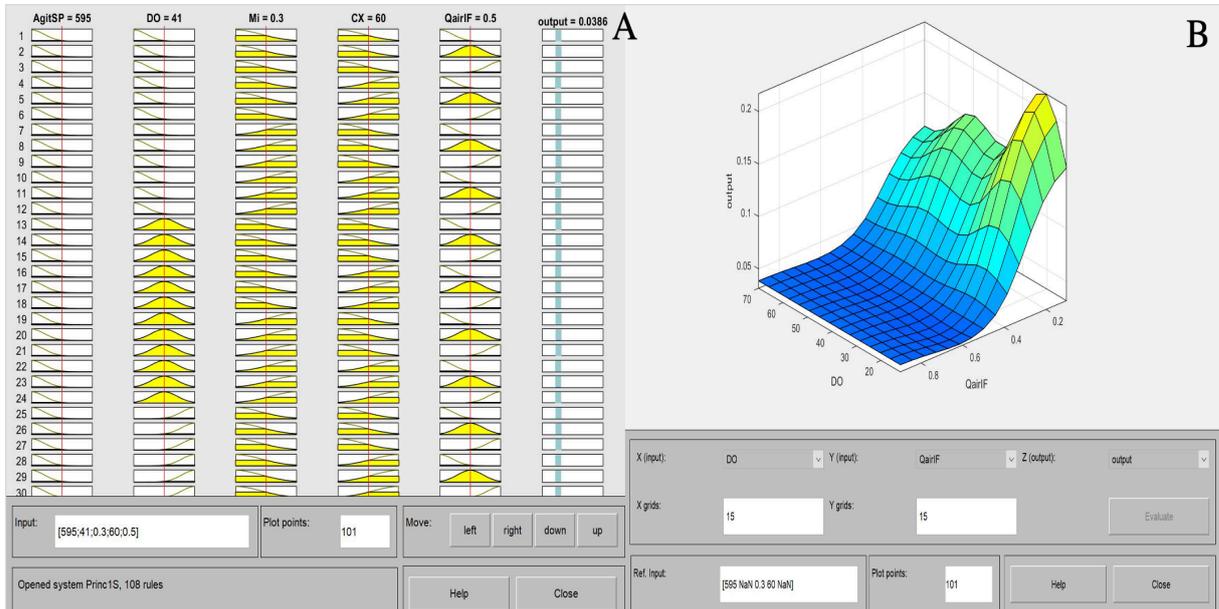


Fonte: Acervo pessoal

*Rule Viewer:* Nesta ferramenta cada linha representa uma regra, sendo a última o resultado da fase de acumulação. Nas colunas os gráficos amarelos representam as funções de pertinência referentes aos antecedentes. Já os gráficos azuis representam as funções de pertinência referentes aos consequentes. O valor *defuzzyficado* é representado por uma linha vermelha. O *Rule Viewer* é considerado uma ferramenta para diagnóstico. Avalia-se, por exemplo, quais as regras que estão ativas e como a forma de uma função de pertinência específica pode afetar o resultado final.

*Surface Viewer:* é uma ferramenta utilizada para avaliar a dependência de uma saída em relação a duas variáveis de entrada, através de gráficos de superfície. Os eixos  $x$  e  $y$  referem-se às entradas. Já o eixo  $z$  refere-se à saída. A ferramenta permite o ajuste do número de pontos a serem plotados (no formato padrão são utilizados 101 pontos) (MATHWORKS, 2018).

Figura 12 – Interface do *Fuzzy Inference System*: destaque para as ferramentas de visualização são apresentadas as interfaces do *Rule Viewer* (12A) e *Surface Viewer* (12B).



Fonte: Acervo pessoal

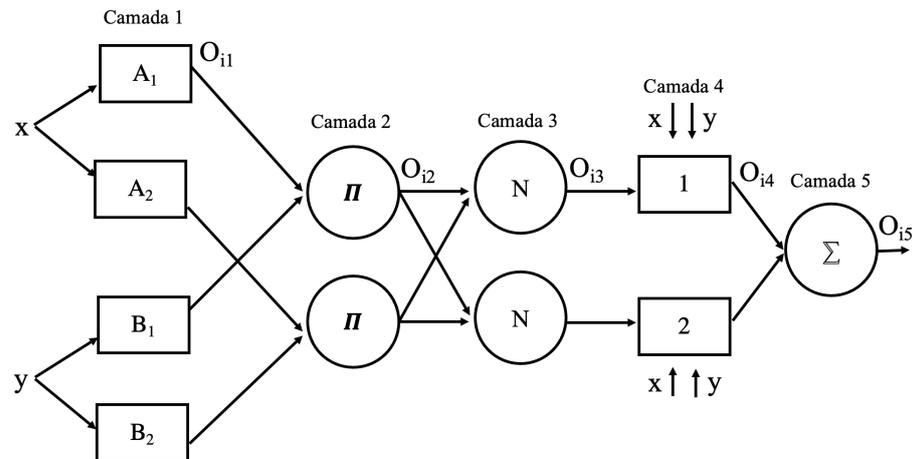
### - Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System

No caso do *FIS* a forma e os parâmetros das funções de pertinência são definidos pelo próprio usuário. Porém, quando não é possível discernir a forma e os parâmetros das funções de pertinência simplesmente observando dados de entrada e saída, utiliza-se a ferramenta *ANFIS* (*Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System*), pertencente ao *toolbox* de lógica nebulosa no MATLAB. Ela realiza a escolha automaticamente, utilizando um conjunto de funções, a fim de construir um sistema de inferência nebuloso a partir de um conjunto de dados.

O *ANFIS* é uma técnica de aprendizagem por meio de dados. Sua estrutura é muito similar à de uma rede neural. O *software* computa os parâmetros das funções de pertinência que permitem o mapeamento das entradas com as saídas por meio de um sistema de inferência nebuloso. Os ajustes nos valores dos parâmetros permitem ao sistema de inferência aprender com os dados conforme são apresentados durante o treinamento. Esta é a principal característica do *ANFIS* (AL-HMOUZ *et al.*, 2012; JANG, 1993).

Para ilustrar a arquitetura do *ANFIS*, um sistema de inferência nebuloso de duas entradas ( $x$  e  $y$ ) e uma saída ( $z$ ) é proposto na Figura 13.

Figura 13 - Exemplo de sistema de inferência nebuloso otimizado via ANFIS



Fonte: AL-HMOUZ *et al.*, 2012 – adaptado

Este sistema possui duas regras nebulosas baseadas num modelo de sistema nebuloso tipo Takagi-Sugeno de primeira ordem, tal como mostram as Equações 21 e 22:

$$R_1: \text{Se } x \text{ é } A_1 \text{ e } y \text{ é } B_1, \text{ então } f_1 = p_1x + q_1y + r_1 \quad (21)$$

$$R_2: \text{Se } x \text{ é } A_2 \text{ e } y \text{ é } B_2, \text{ então } f_2 = p_2x + q_2y + r_2 \quad (22)$$

Em que  $A_i$  e  $B_i$  são conjuntos nebulosos,  $f_i$  as funções lineares de saída e  $p_i$ ,  $q_i$  e  $r_i$  os parâmetros a serem determinados durante o processo de treinamento.

Na camada 1: as saídas ( $O_{1i}$ ) são as funções de pertinência que especificam em que medida as entradas satisfazem os valores linguísticos ( $A_i$ ), tal como mostra a Equação 23.

$$O_{1i} = \mu_{A_i}(x) \quad (23)$$

Usualmente,  $\mu_{A_i}(x)$  é uma função de pertinência Gaussiana tipo 1.

Na camada 2: em oposição à camada 1, onde todos os nós são adaptativos, na camada 2 os nós ( $\pi$ ) são fixos. Eles realizam a multiplicação dos sinais de entrada e enviam o produto  $w_i$  (ou seja, eles utilizam o operador “e”) tal como mostra a Equação 24.

$$w_i = \mu_{A_i}(x) * \mu_{B_i}(y) \quad (24)$$

Na camada 3: as saídas  $w_i$  advindas da camada anterior são normalizadas (utilizando a Equação 25). Elas são chamadas de grau de acionamento normalizado.

$$O_{3i} = \bar{w}_i = \frac{w_i}{w_1 + w_2} \quad (25)$$

Na camada 4: as saídas  $\bar{w}_i$  são multiplicadas pela função  $f_i$  (tal como mostra a Equação 26), obtendo-se a saída  $O_{4i}$ .

$$O_{4i} = \bar{w}_i f_i = \bar{w}_i (p_i x + q_i y + r_i) \quad (26)$$

Em que  $p_i$ ,  $q_i$  e  $r_i$  são os parâmetros do consequente.

Na camada 5: o único nó ( $\Sigma$ ) soma todos os sinais de entrada (Equação 27).

$$O_{5i} = \sum_i \bar{w}_i f_i = \frac{\sum_i w_i f_i}{\sum_i w_i} \quad (27)$$

Os ajustes nos parâmetros das funções de pertinência são feitos por meio de um algoritmo de propagação retrógrada do erro ou *backpropagation* (via gradiente descendente), ou um algoritmo híbrido de *backpropagation* (associado aos parâmetros da função de pertinência de entrada) com um método dos mínimos quadrados (associado aos parâmetros da função linear de saída) (MATHWORKS, 2018). Durante a primeira passagem (ida) os sinais das funções são calculados até a camada 4, onde os parâmetros do consequente são identificados pelo método dos mínimos quadrados. Na segunda passagem (volta), o erro propaga de forma retroativa e os parâmetros das premissas são atualizados pelo método do gradiente descendente, tal como mostra a Equação 28:

$$\Delta\alpha = -\eta \frac{\partial E}{\partial \alpha} \quad (28)$$

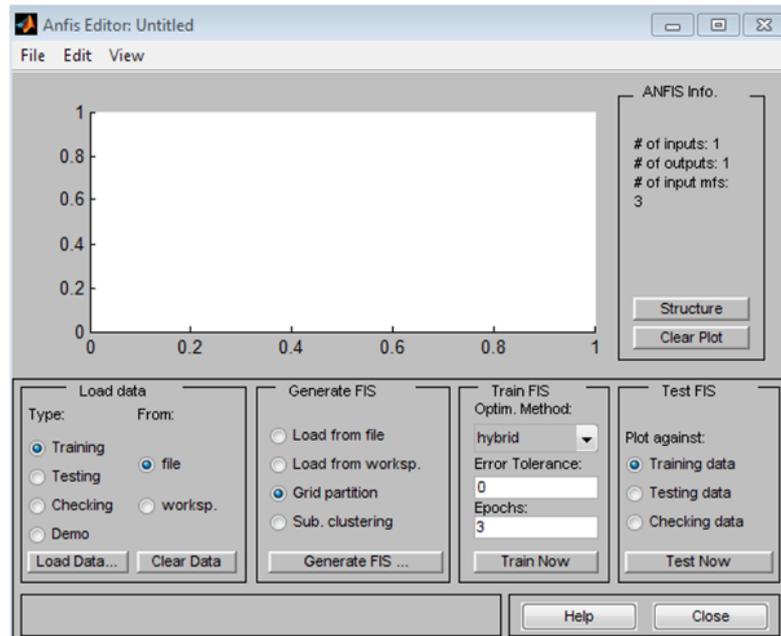
Em que  $\alpha$  é um parâmetro genérico,  $\eta$  é a taxa de aprendizagem e “E” é o erro medido.

A abordagem de modelagem do *ANFIS* é similar às técnicas de identificação de sistemas. Primeiro hipotetiza-se a estrutura de um modelo (relacionando entradas e saídas às

funções de pertinência e construindo as regras nebulosas). Em seguida, treina-se o *ANFIS* com dados de entrada e saída, para que possa gerar um sistema de inferência nebuloso que emule os dados utilizados no treinamento. Em geral essa técnica de modelagem funciona bem se o conjunto de treinamento é representativo das características dos dados que o *FIS* almeja modelar. Por fim, é necessário o teste do modelo, apresentando-se dados não utilizados previamente na fase de treinamento. Dessa forma verifica-se a qualidade do ajuste do modelo *FIS* (ou seja, se o sistema de inferência treinado prevê, com acuidade, as saídas). Já a utilização de conjuntos de validação prevê que, conforme aumenta-se o número de treinos, diminui-se o erro, até um ponto em que ocorre um sobre-ajuste (*overfitting*) do modelo aos dados (acarretando perda da capacidade de generalização) e o erro do modelo começa a aumentar (MATHWORKS, 2018).

A ferramenta *Neuro-fuzzy designer* do ANFIS inclui 4 áreas (conforme detalhado na Figura 14), que permite ao usuário carregar, plotar ou limpar os dados, gerar ou carregar uma estrutura *FIS* inicial, treinar um *FIS* e validar um *FIS* treinado (MATHWORKS, 2018).

Figura 14 - Interface inicial do *Neuro-fuzzy Designer*



Fonte: MATHWORKS, 2018 – adaptado

Carregar, plotar ou limpar dados: para treinar um *FIS* é necessário carregar um conjunto de treinamento que contém os dados de entrada e saída do sistema a ser modelado.

Neste arquivo (em formato de texto) cada linha é um par de dados de entrada e saída. Como o *ANFIS* trabalha apenas com uma única saída, o número de colunas no arquivo é igual ao número total de entradas acrescido de 1 (a saída). Assim, qualquer conjunto de dados a ser carregado deve estar no formato de “vetor coluna”, sendo a última coluna os dados de saída. Depois de carregar os dados eles são plotados num gráfico em que o eixo *y* representa o valor da saída e o eixo *x* a posição dos dados (linha em que se encontra determinado dado). Durante o treinamento os parâmetros das funções de pertinência de entrada e os parâmetros das funções lineares de saída são ajustados visando a melhor modelagem do conjunto de dados. Também é possível carregar conjuntos de dados de teste e de validação (MATHWORKS, 2018)

Gerar ou carregar uma estrutura *FIS* inicial: após o carregamento dos dados, o próximo passo consiste em determinar uma estrutura *FIS*. Esta pode ser gerada automaticamente pelo *Neuro fuzzy designer* pelos métodos: *Grid partition*, *clustering* ou pode ser carregado pelo usuário. O *grid partition* é o método padrão. Ele permite ao usuário escolher a quantidade de valores linguísticos e de funções de pertinência (assim como seu formato). Observa-se que as funções de pertinência de saída devem ser todas lineares ou constantes (linear de ordem zero) (MATHWORKS, 2018).

Treinar um *FIS*: como descrito anteriormente, há duas opções de métodos de otimização paramétrica disponíveis no *ANFIS*, propagação retrógrada (via gradiente descendente) e híbrido (propagação retrógrada e mínimos quadrados). É possível determinar o critério de parada através da tolerância do erro (baseado no tamanho do mesmo). Também é possível escolher o número de iterações (*epochs*) a serem realizadas durante o treinamento (MATHWORKS, 2018).

Testar um *FIS* treinado: para testar um *FIS* treinado há duas opções: via conjunto de checagem ou conjunto de teste (MATHWORKS, 2018).

#### 2.5.4.4 Redes Neurais Artificiais

Redes neurais artificiais são inspiradas em sistemas nervosos biológicos e são compostas por uma ou múltiplas camadas de neurônios. Uma camada inclui a combinação de pesos (na forma de uma matriz que multiplica a força das entradas), e o somatório ponderado das entradas com um vetor de ajuste (*bias*) – similar a um peso, porém possui um valor de entrada constante igual a 1 – forma o argumento para a função de transferência (em geral do

tipo sigmoidal ou linear). A ideia principal das redes neurais é que estes parâmetros (pesos e *bias*) podem ser ajustados (ou treinados) de forma que uma determinada entrada leve a uma saída específica. As redes neurais podem ser classificadas em redes estáticas e redes dinâmicas. A primeira (também chamada de *feedforward*) não possui elementos retroalimentados ou atrasos (*delays*). Já no segundo tipo de rede (também chamadas de recorrentes), a saída depende não só dos valores atuais das entradas, mas também de valores passados (tanto das entradas quanto das saídas). Redes neurais dinâmicas são, em geral, mais poderosas que as estáticas (devido à presença de memória). Além disso, as redes dinâmicas podem ser treinadas para aprender padrões sequenciais ou dinâmicos (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004).

O *toolbox* de redes neurais do MATLAB pode treinar redes tipo *Layered Digital Dynamic Networks* (LDDN), que podem ser classificadas em *Focused Time-Delayed Neural Network* (FTDNN), *Distributed Time Delay Neural Networks* (DTDNN) e *Nonlinear Autoregressive Network with Exogenous inputs* (NARX). FTDNN é a rede neural dinâmica mais simples e consiste de uma rede tipo *feedforward* com atrasos (*delays*) nas entradas. As redes DTDNN possuem *delays* distribuídos ao longo de todas as camadas. Já as redes NARX possuem conexões *feedback* fechando as camadas da rede (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004).

Antes de realizar o treinamento das redes é importante certificar-se que o conjunto de dados utilizado (entradas e saídas) cobre todo o intervalo a ser modelado. Embora elas tenham alto poder de generalização dentro do intervalo de treinamento observa-se grande dificuldade para extrapolação além do intervalo. Após o carregamento do conjunto de dados, o programa realiza sua normalização – por meio da remoção de pares de dados repetidos e via mapeamento dos valores máximo e mínimo – de forma que os pares de entrada/saída estejam dentro do intervalo  $[-1,1]$ . Em seguida, os dados normalizados são convertidos em uma sequência temporal. Por fim, o vetor contendo os valores anteriores (atrasos) e as entradas da rede (juntamente com os valores-objetivo) são convertidos para a forma matricial. Deve-se, então, escolher a arquitetura da rede. Este passo é importante uma vez que poucos neurônios podem levar ao fenômeno de *underfitting*. Muitos neurônios, por outro lado, podem aumentar o poder da rede, mas, ao mesmo tempo, podem levar ao *overfitting*. Durante o treinamento, a primeira etapa consiste na divisão do conjunto de dados em três subconjuntos. O primeiro é chamado de conjunto de treinamento, e é utilizado para atualizar os parâmetros da rede (pesos e *bias*). O segundo subconjunto é chamado de conjunto de validação, e é utilizado para mensurar a

capacidade de generalização da rede e para interromper o treinamento quando a taxa de generalização piora. O último subconjunto é chamado de conjunto teste. Ainda que este conjunto seja independente do treinamento em si, ele é utilizado para comparar modelos. Se o modelo ajustado durante a fase de treinamento também se ajustar ao conjunto teste, então não houve *overfitting* (ou a possibilidade de ter havido é baixa). Para a maior parte dos problemas, uma rede com duas camadas (uma escondida e uma de saída) pode relacionar a maioria dos conjuntos de entrada e saída (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004).

Durante a fase de treinamento os pesos e o *bias* são ajustados de forma iterativa de forma a minimizar a função objetivo. Para redes dinâmicas, a função objetivo padrão é dada pelo erro quadrático médio (*mean squared error* ou MSE) tal como mostra a Equação 29:

$$F = mse = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N e_i^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (t_i - a_i)^2 \quad (29)$$

Em que o erro quadrático médio é calculado a partir da diferença entre a saída da rede ( $a_i$ ) e os valor-objetivo ( $t_i$ ).

O treinamento da rede neural pode ser do tipo incremental (em que os pesos e o *bias* são atualizados a cada vez que um conjunto de dados é apresentado) ou em batelada (em que os parâmetros são atualizados após todo o conjunto de dados ser apresentado à rede) (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004).

Qualquer algoritmo de otimização pode ser utilizado para minimização da função objetivo, mas o mais simples é o algoritmo do Gradiente Descendente. Nesta técnica os parâmetros da rede são atualizados na direção na qual a função objetivo decresce mais rapidamente (ou seja, o negativo do gradiente). Uma iteração genérica é descrita pela Equação 30:

$$x_{i+1} = x_i - \eta_i g_i \quad (30)$$

Em que  $x_i$  é o vetor dos pesos e *bias* atuais,  $g_i$  é o gradiente atual e  $\eta_i$  é a taxa de aprendizagem.

Para redes com múltiplas camadas e função de transferência não-linear diferenciável é recomendado o uso do algoritmo *backpropagation*, que envolve o cálculo computacional retroativo através da rede. Esse algoritmo consiste de duas fases distintas. A primeira é chama

de propagação. Um conjunto de padrões é apresentado à camada de entrada da rede. A atividade resultante é propagada pela rede, camada por camada, até que a resposta seja produzida pela camada de saída (durante essa etapa os pesos sinápticos são fixos). A saída é então comparada à saída desejada. O erro é então calculado tal como mostra a Equação 31:

$$e_i = t_i - a_i \quad (31)$$

Em que o erro é calculado a partir da diferença entre a saída da rede ( $a_i$ ) e os valor-objetivo ( $t_i$ ).

Inicia-se a fase de retro-propagação. O erro é então propagado a partir da camada de saída até a camada de entrada, fazendo com que os pesos das conexões das unidades sejam alterados. Este processo é repetido para todos os vetores de entrada da rede até que o erro quadrático médio das saídas da rede esteja num valor aceitável.

Sabendo o valor do erro quadrático médio pode-se calcular a mudança no fator de pesos  $\Delta w_{ij}$  para a  $i$ -ésima conexão ao  $j$ -ésimo nó, tal como mostra Equação 32.

$$\Delta w_{ij} = -\eta_i \frac{\partial F}{\partial w_{ij}} \quad (32)$$

Nota-se que se  $\eta_i$  é grande, o aprendizado ocorre mais rapidamente. Contudo, se for um valor muito grande pode levar à instabilidade e ao aumento do erro. Por outro lado, se for muito pequeno o algoritmo pode levar muito tempo para convergir. O critério de parada do treinamento é baseado na magnitude do gradiente da função objetivo e no número de validações de checagem. Conforme o treinamento atinge um valor mínimo de desempenho, o gradiente vai diminuindo e, quando atinge um valor menor que  $1 \times 10^{-5}$  (por padrão), o treinamento é interrompido. O número de validações de checagem, por sua vez, indica o número de iterações sucessivas em que o valor da função objetivo não mais decresce. Se esse número atinge 6 (por padrão), então o treinamento é interrompido (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004)

Cada vez que uma rede neural é treinada uma solução diferente é obtida. Isto é decorrente da diferença entre os valores iniciais dos parâmetros e da alocação aleatória dos dados nos três subconjuntos (treinamento, validação e teste). Dessa forma, redes neurais treinadas para um mesmo problema podem gerar resultados diferentes. Para analisar os

resultados do treinamento das redes um gráfico de regressão pode ser plotado. Ele mostra a relação entre as saídas da rede e os valores de saída objetivos (*targets*). Valores de regressão próximos de 1 indicam total correspondência entre os valores de saída e os *targets*, ao passo que valores de regressão próximos de 0 indicam uma correlação aleatória entre as saídas.

Para o treinamento das redes é necessário um estudo preliminar das variáveis, a fim de se obter a arquitetura ideal da rede. Esse estudo é realizado com base nos valores de regressão. Caso não sejam satisfatórios (ou seja, não demonstrarem boa correlação entre os valores de saída da rede e seus *targets*) recomenda-se, primeiramente, realizar um retreinamento das redes. Em seguida, aumentar o número de neurônios e de camadas ocultas gradualmente (um maior número de parâmetros fornece maior flexibilidade para o ajuste da rede). Uma terceira opção é tentar um algoritmo de otimização diferente. No *toolbox* de redes neurais são disponibilizadas técnicas de otimização tais como: Gradiente descendente, Quasi-Newton e Levenberg-Marquadt. Por fim, fornecer mais dados para o treinamento da rede pode aumentar sua capacidade de generalização (BEALE; HAGAN; DEMUTH, 2017; DEMUTH; BEALE, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão detalhadas as metodologias para desenvolvimento do controlador nebuloso, bem como as simulações realizadas. Em seguida focar-se-á na validação experimental, dividida em 3 partes: implementação do controlador *fuzzy*, testes iniciais e cultivo de *E. coli* com e sem indução.

#### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO CONTROLADOR NEBULOSO

Nesta seção serão abordadas as metodologias para aquisição dos dados experimentais para desenvolvimento e otimização (via simulações computacionais) dos parâmetros do controlador *fuzzy*.

##### 3.1.1 Aquisição dos dados de cultivo de *E. coli*

Os dados de cultivo de *E. coli* utilizados para o desenvolvimento do controlador *fuzzy* foram gentilmente cedidos pelo professor Antonio Carlos Luperni Horta do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (HORTA, 2011). Os cultivos foram parte do Projeto Temático FAPESP 08/05207-4 “Vacina conjugada anti-pneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo capsular - proteína de superfície de pneumococo A”, coordenada pela Dra. Martha Tanizaki do Instituto Butantan (SP). Foram cultivados três clones geneticamente modificados da *E. coli* BL21(DE3): PspA3/pET37b+, PspA245/pET37b+ e PspA4PRO/pET37b+. Todos superexpressavam fragmentos da proteína de superfície A (PspA) de células de *Streptococcus pneumoniae*, clonadas no mesmo vetor pET. As três construções foram cedidas pela Dra. Eliane Miyagi do Instituto Butantan (SP) (CARVALHO *et al.*, 2012; HORTA, 2011; SARGO, 2011).

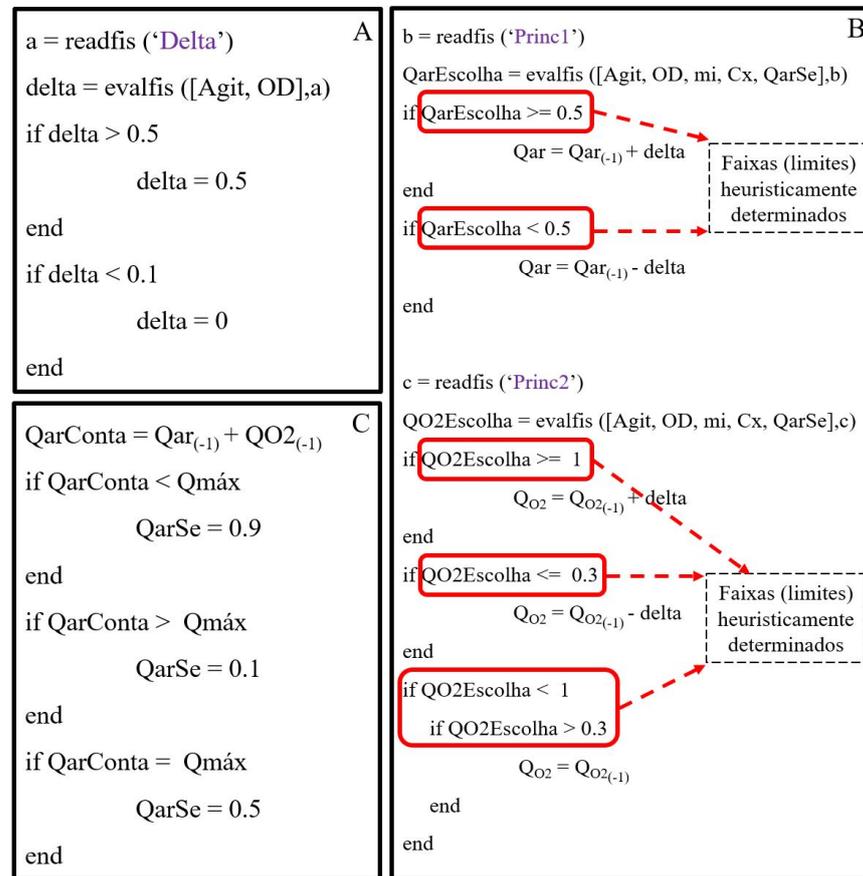
Foram realizados cultivos em batelada alimentada em biorreator de 5 L de montagem própria do LaDABio2 e supervisionados pela ferramenta SUPERSYS\_HCDC. Algumas condições do cultivo foram: pH mantido entre 6,7 na fase de batelada e 6,9 na fase de batelada alimentada, temperatura mantida a 35°C, concentração de oxigênio dissolvido mantida a 30% da saturação por um sistema híbrido (PID para manipulação da velocidade de agitação e árvore de decisão para manipulação das vazões de ar e oxigênio), condutividade e permissividade monitoradas por um sensor de biomassa. Mais detalhes estão disponíveis em (HORTA, 2011)

e (SARGO, 2011). No total foram realizados 16 cultivos de *E. coli* (nomeados A1 a A16). Contudo, devido à disponibilidade parcial dos dados em alguns dos conjuntos (alguns conjuntos não apresentavam valores de concentração celular ou de velocidade específica de crescimento) – variáveis indispensáveis para o funcionamento do controlador nebuloso – apenas alguns destes foram utilizados para o treinamento do controlador nebuloso. Com base neste critério e comparadas as concentrações celulares máximas apresentadas por cada conjunto, foram escolhidos os dois que atingiram as mais altas concentrações celulares máximas. O conjunto de dados A16 (concentração celular máxima de  $155 \text{ g}_{\text{massa seca}}/\text{L}$ ) foi empregado para *fuzzyficar* a árvore de decisão. Já o conjunto de dados A12 (concentração celular máxima de  $123 \text{ g}_{\text{massa seca}}/\text{L}$ ) foi utilizado para testes de robustez do controlador *fuzzy*.

### 3.1.2 Controlador *fuzzy*

O sistema de controle *fuzzy* foi desenvolvido utilizando o *toolbox* de lógica nebulosa do MATLAB e suas ferramentas: *FIS* e *ANFIS*. Baseado no algoritmo da árvore de decisão descrita no Quadro 1 (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2011) foi definida uma estratégia para o controle *fuzzy* de concentração de oxigênio dissolvido. Este foi dividido em três sistemas de inferência nebulosos independentes do tipo *Takagi-Sugeno* (TAKAGI; SUGENO, 1985), tal como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Sistema de controle *fuzzy* dividido em 3 sistemas de inferência nebulosos. Da Esquerda para direita, sistema Delta (A) e sistemas Princ1 e Princ2 (B). Detalhamento do cálculo da variável auxiliar QarSe (C)



Fonte: Acervo pessoal

Em que “*readfis*” e “*evalfis*” são os comandos para leitura dos parâmetros do sistema nebuloso e avaliação do sistema de inferência nebuloso (respectivamente).

O primeiro sistema, Delta, determinava o tamanho das variações das vazões de ar e oxigênio (delta em L/min) tal como mostra a Figura 15a. Ressalta-se que os limitadores do valor de delta entre 0,1 e 0,5 L/min decorreram dos limites físicos dos atuadores (fluxômetros de massa). O sistema Delta também foi responsável por guiar o controlador nebuloso entre três possíveis cenários. Estes eram avaliados com base na diferença entre a concentração de oxigênio dissolvido e seu *setpoint* (erro). Quanto menor fosse o erro, menor seria o valor de delta. Por outro lado, se a concentração de oxigênio medida fosse menor que o seu *setpoint*, então Delta inferiria um valor a ser utilizado pelos demais sistemas de inferência nebulosos

(Princ1 e Princ2) para determinar se haveria um incremento, decremento ou manutenção das vazões de ar (Princ1) ou oxigênio (Princ2). O último cenário correspondeu a um mecanismo de segurança. Para valores de concentração de oxigênio dissolvido acima do *setpoint*, uma das vazões (ou ambas) seriam decrescidas em delta (L/min).

Observando-se a Figura 15b, ambos os sistemas Princ1 e Princ2 foram descritos utilizando o mesmo conjunto de variáveis de entrada. Contudo, suas variáveis de saída (QarEscolha e QO2Escolha, respectivamente) não definiam as vazões de ar e oxigênio diretamente. Ao invés disso, estes valores foram comparados a certos limites (imitando a árvore de decisão). Dessa forma, se QarEscolha fosse maior ou igual a um limite definido pela busca heurística via simulações, o controlador enviaria uma ordem de aumento de delta na vazão de ar. Caso contrário, o controlador foi programado para diminuir a vazão de ar pelo mesmo valor. Um raciocínio similar aplica-se aos limites (superior e inferior) de QO2Escolha, porém com a possibilidade adicional de manter a vazão de oxigênio constante (além das possibilidades de diminuir ou aumentar o enriquecimento de oxigênio no sistema). Esta abordagem (via comparação) é altamente eficiente visto que os sistemas *fuzzy* são sensíveis a pequenos distúrbios (podendo acarretar em oscilações nos valores de QarEscolha e QO2Escolha). Ao estabelecer limites de atuação (e degraus limitados para Delta) esperou-se evitar oscilações severas. A Figura 15c detalha o mecanismo de cálculo de QarSe, uma variável auxiliar, que comparava se a soma das vazões de ar e oxigênio já teria atingido a vazão máxima de gás permitida, iniciando o enriquecimento de oxigênio puro no sistema.

A estrutura do controlador *fuzzy* evoluiu conforme a obtenção dos resultados das simulações computacionais e dos resultados experimentais advindos da implementação na ferramenta SUPERSYS\_HCDC. A Figura 16 ilustra as principais modificações ao longo do tempo do sistema de inferência nebuloso Delta até sua versão final.

Figura 16 - Evolução do sistema Delta

<pre> a = readfis ('Delta') delta = evalfis ([QO<sub>2(-1)</sub>],a) if delta &gt; 0.5     delta = 0.5 end if delta &lt; 0.1     delta = 0 end </pre>	A
<pre> a = readfis ('Delta') delta = evalfis ([Agit, OD],a) if delta &gt; 0.5     delta = 0.5 end if delta &lt; 0.1     delta = 0 end </pre>	B

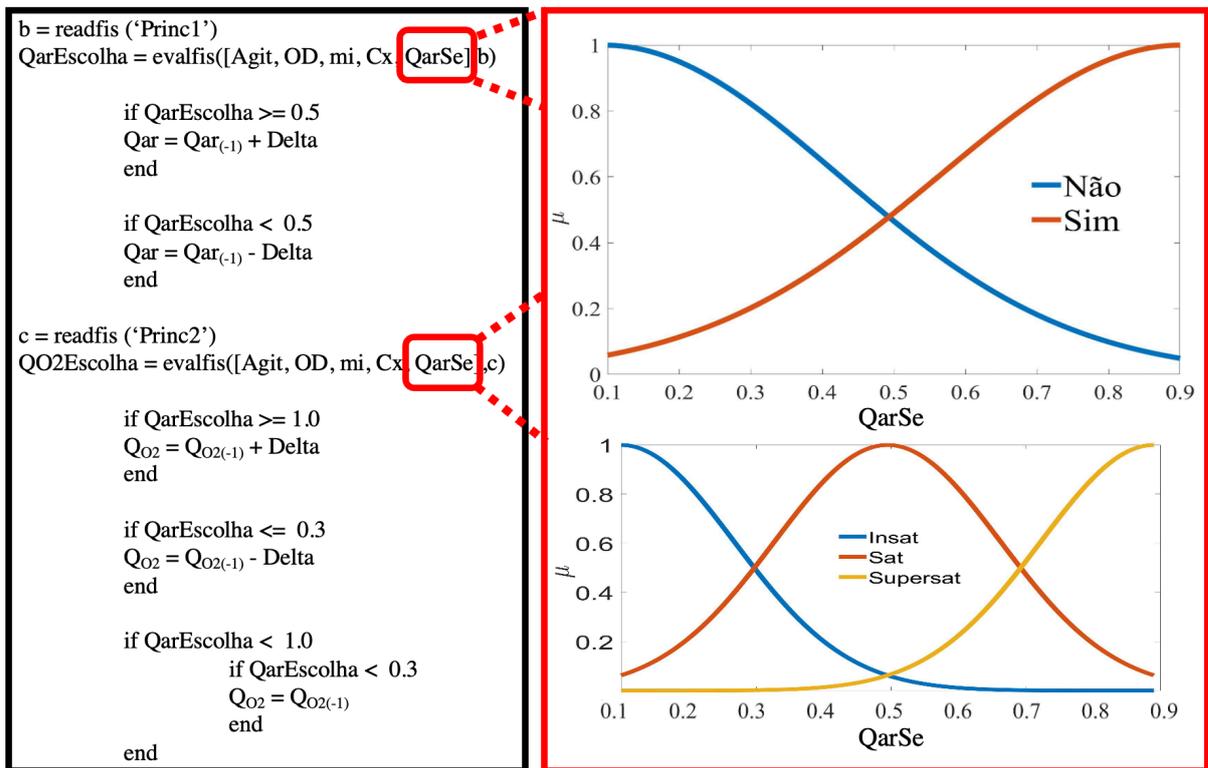
Fonte: Acervo pessoal

De início, a variável linguística de entrada escolhida foi a vazão anterior de oxigênio (com base na árvore de decisão) (Figura 16A). Contudo, os resultados da simulação indicaram a necessidade de variáveis de entrada mais robustas. Assim, a vazão anterior de oxigênio foi substituída pela velocidade de agitação e pela concentração de oxigênio dissolvido (Figura 16B). Os três valores linguísticos para cada variável linguística foram modelados com base na observação de dados de cultivo (previamente controlados pela árvore de decisão) e pelo conhecimento do especialista. A variável de saída do sistema *fuzzy* Delta foi delta, que definia o tamanho das variações das vazões de ar e oxigênio.

O mesmo processo de melhoria contínua foi aplicado para os sistemas *fuzzy* Princ1 e Princ2, tal como mostra a Figura 17. Neste caso, a evolução foi no sentido de melhoria da granulação das variáveis linguísticas (proporcionando melhor detalhamento do processo e, consequentemente, acuidade da ação de controle). Para ambos os sistemas *fuzzy* Princ1 e Princ2 as principais variáveis de entrada (definidas com base na árvore de decisão) foram: velocidade de agitação (Agit), concentração de oxigênio dissolvido (OD) e QarSe (variável auxiliar responsável por indicar o limite para troca da aeração pelo enriquecimento de oxigênio puro). Os valores linguísticos para cada variável linguística foram definidos com base na estratégia da árvore de decisão. Além disso, visando melhorar a estratégia *fuzzy*, foram incorporadas como variáveis de entrada a concentração de microrganismos (Cx) e a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) (baseada na análise do balaço de massa para células). Se por um lado a inserção

de mais variáveis de entrada aumentou a complexidade do controlador *fuzzy*, por outro elas forneceram uma nova dimensão ao controlador nebuloso em relação à fase do cultivo e suas especificidades. Para ambas as variáveis foram determinados dois valores linguísticos.

Figura 17 - Evolução dos sistemas Princ1 e Princ2, em destaque a melhoria da granulação da variável auxiliar QarSe. Acima, à direita, a versão de AKISUE *et al.*, 2018. Abaixo, à direita, a versão final desenvolvida nesta tese.



Fonte: Acervo pessoal

Para o treinamento do sistema de inferência nebuloso Delta, a matriz de dados experimentais foi carregada na ferramenta ANFIS. As entradas foram definidas baseadas em três valores linguísticos cada (com funções de pertinência tipo Gaussiana 1 – uma vez que elas tem um comportamento mais suave que as funções de pertinência triangulares - tal como mostra a Equação 33:

$$(x, \sigma, c) = e^{-\frac{(x-c)^2}{2\sigma^2}} \quad (33)$$

Em que  $\sigma$  é o desvio padrão (que controla a largura do sino) e  $c$  é a média (que define a posição do centro do pico).

Escolhido o sistema nebuloso tipo Takagi - Sugeno, as funções de saída foram definidas como funções lineares tal como mostra a Equação 34.

$$F_i = a \times Agit_i + b \times OD_i + c \quad (34)$$

Em que  $a$  e  $b$  são os coeficientes das variáveis  $Agit$  e  $OD$  (respectivamente) e  $c$  é o coeficiente linear.

O método de otimização escolhido foi o híbrido (*backpropagation* e mínimos quadrados) com pelo menos 25 treinamentos. O erro quadrático médio (ou *rmse*) do treinamento foi de 0,035, o que expressa uma combinação quase perfeita entre os valores observados e os preditos.

A aplicação dos princípios da consistência e da completude permitiu que o ANFIS criasse 9 regras nebulosas condicionais do tipo “Se-Então”, tal como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Regras *fuzzy* ajustadas para o sistema nebuloso Delta

Regra	Agit	OD	Saída
1	BP	BP	F1
2	BP	MP	F2
3	BP	AP	F3
4	AP	BP	F4
5	AP	MP	F5
6	AP	AP	F6
7	MAP	BP	F7
8	MAP	MP	F8
9	MAP	AP	F9

Fonte: Acervo pessoal

Em que BP, MP, AP e MAP são os valores linguísticos: Baixo e Positivo, Médio e Positivo, Alto e Positivo e Muito Alto e Positivo (respectivamente).

Já  $F_i$  é representado pela Equação 34 generalizada com seus parâmetros  $a$ ,  $b$  e  $c$  para as Equações F1 até F9 apresentados na Tabela 2.

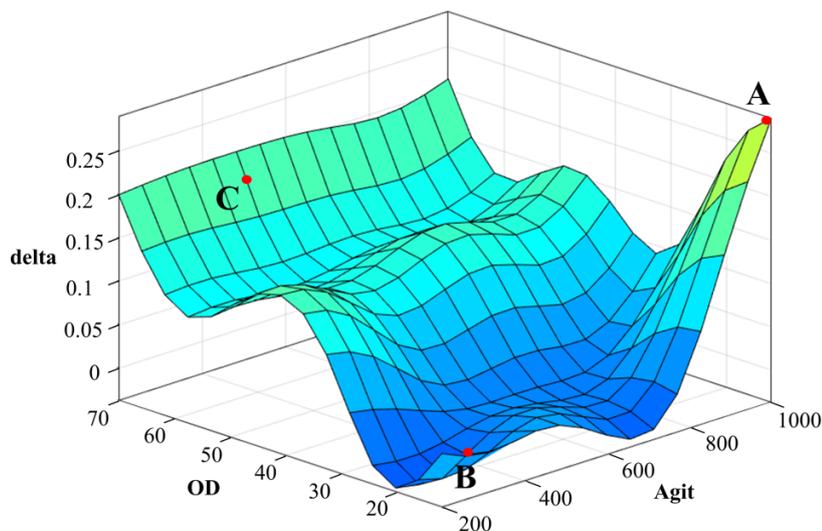
Tabela 2 – Parâmetros  $a$ ,  $b$  e  $c$  das equações lineares de saída do sistema Delta.

Função	$a$	$b$	$c$
F1	$-4,23 \times 10^{-4}$	$-1,40 \times 10^{-2}$	0,25
F2	$-2,73 \times 10^{-4}$	$3,92 \times 10^{-4}$	0,15
F3	$4,20 \times 10^{-5}$	$1,54 \times 10^{-2}$	-0,89
F4	$-5,76 \times 10^{-4}$	$8,00 \times 10^{-3}$	0,25
F5	$6,24 \times 10^{-4}$	$1,71 \times 10^{-2}$	0,93
F6	$3,54 \times 10^{-7}$	$2,32 \times 10^{-2}$	-1,45
F6	$0,87 \times 10^{-4}$	$5,17 \times 10^{-4}$	-0,34
F8	$8,06 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-2}$	-1,27
F9	$1,65 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^{-2}$	-1,43

Fonte: Acervo pessoal

A Figura 18 ilustra a superfície de resposta do sistema de inferência Delta em relação às duas variáveis de entrada (Agit e OD).

Figura 18 - Superfície de resposta do sistema de inferência Delta



Fonte: Acervo pessoal

Ao analisar o comportamento de Delta observa-se que seu pico (ponto A) é atingido quando a concentração de oxigênio dissolvido está em seu valor mínimo e a velocidade de agitação atinge o seu máximo. Neste caso a vazão de ar deve ser aumentada (de um valor de 0,28 L/min aproximadamente). A região próxima ao ponto B é caracterizada por uma baixa concentração de oxigênio dissolvido em um cenário de baixa velocidade de agitação. A estratégia determina que a correção seja realizada apenas pelo aumento da velocidade de agitação (via controlador PID) ao invés do aumento da vazão de gás (logo o valor de delta é zero). O ponto C está localizado na região do mecanismo de segurança. Uma vez que a supersaturação de oxigênio é detectada, Delta infere um valor de saída positivo (de tamanho delta) com o objetivo de diminuir a vazão de gás.

Para o treinamento dos sistemas Princ1 e Princ2, as matrizes foram construídas utilizando dados de velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido, concentração de microrganismos, velocidade específica de crescimento (adquiridos diretamente do conjunto A16) e valores de QarSe (estimados com base na comparação entre a vazão máxima de gás determinada e a soma das vazões de ar e oxigênio). Valores de QarSe próximos de 0,1 indicavam uma insaturação de gás (logo, a possibilidade de aumento da vazão de ar). Por outro lado, valores próximos de 0,9 indicavam uma supersaturação de gás (logo, a necessidade de diminuição de uma ou ambas as vazões de gás). Valores intermediários (próximos de 0,5) indicavam a saturação de gás (logo, a necessidade de diminuição da aeração com conseqüente enriquecimento de oxigênio puro). Os valores-objetivos (QarEscolha e QO2Escolha) foram estimados com base na análise das entradas e nas variações das vazões de ar e oxigênio.

Após o carregamento das matrizes na ferramenta ANFIS, definiu-se o número de valores linguísticos (baseado no conhecimento do especialista no processo), juntamente com as funções de pertinência tipo Gaussiana 1 (tal como mostra a Equação 33). Escolhido o sistema tipo Takagi-Sugeno, as saídas foram definidas por funções lineares tal como demonstra a Equação 35 generalizada:

$$F_i = a Agit_i + b OD_i + c QarSe_i + d Cx_i + e Mi_i + f_i \quad (35)$$

Em que  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$  são os coeficientes das variáveis Agit, OD, QarSe, Cx e Mi (respectivamente) e  $f$  é o coeficiente linear.

O método de otimização escolhido foi o híbrido (*backpropagation* e mínimos quadrados) com pelo menos 25 treinamentos. O erro quadrático médio do treinamento foi de

0,10 para Princ1 e 0,12 para Princ2, o que expressa uma combinação quase perfeita entre os valores observados e os preditos.

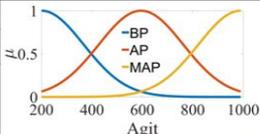
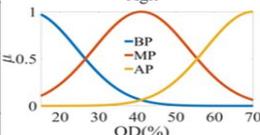
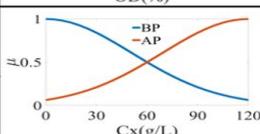
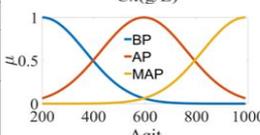
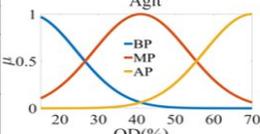
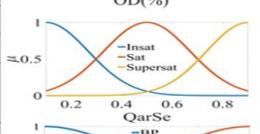
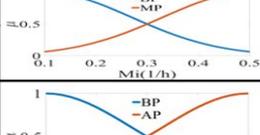
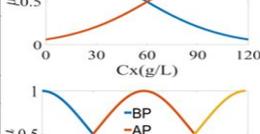
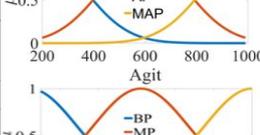
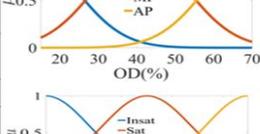
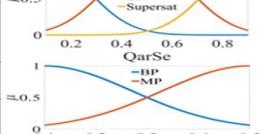
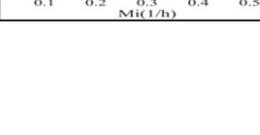
Aplicando os princípios da consistência e da completude, o *ANFIS* criou 108 regras nebulosas condicionais do tipo “Se-então” para cada sistema de inferência nebuloso, por exemplo:

“Se Agit é BP, OD é BP, QarSe é INSAT, CX é BP e Mi é BP, então QarEscolha é F1”

Todas as regras nebulosas para os sistemas Princ1 e Princ2 estão descritas no Apêndice A. Já os valores dos parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$  e  $f$  das Equações F1 até F108 dos sistemas Princ1 e Princ2 estão descritos nos Apêndices B e C (respectivamente).

A Figura 19 resume os sistemas nebulosos Delta, Princ1 e Princ2 (com suas respectivas variáveis linguísticas, valores linguísticos e funções de pertinência de entrada – cujos parâmetros foram otimizados pelo *ANFIS*).

Figura 19 - Resumo dos sistemas de inferência nebulosos Delta, Princ1 e Princ2 (com suas respectivas variáveis linguísticas e valores linguísticos)

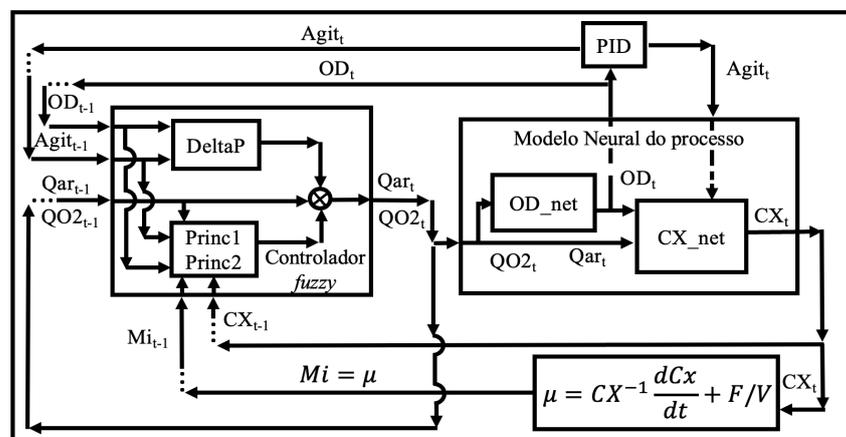
Sistema <i>fuzzy</i>	Variáveis de entrada	Valores Linguísticos	Funções de pertinência	Variáveis de saída		
"Delta"	Agit: Velocidade de agitação (rpm)	Baixo e Positivo (BP)		Delta		
		Alto e Positivo (AP)				
		Muito Alto e Positivo (MAP)				
	OD: Oxigênio dissolvido (%)	Baixo e Positivo (BP)				
		Médio e Positivo (MP)				
		Alto e Positivo (AP)				
"Princ1"	CX: Concentração de microrganismos (g/l)	Baixo e Positivo (BP)		QarEscolha		
		Alto e Positivo (AP)				
	Agit: Velocidade de agitação (rpm)	Baixo e Positivo (BP)				
		Muito Alto e Positivo (MAP)				
	OD: Oxigênio dissolvido (%)	Baixo e Positivo (BP)				
		Médio e Positivo (MP)				
	QarSe: Variável auxiliar	Insaturado (INSAT)				
		Saturado (SAT)				
	Mi: velocidade específica de crescimento (1/h)	Baixo e Positivo (BP)				
		Médio e Positivo (MP)				
	"Princ2"	CX: Concentração de microrganismos (g/l)	Baixo e Positivo (BP)			QO2Escolha
			Alto e Positivo (AP)			
Agit: Velocidade de agitação (rpm)		Baixo e Positivo (BP)				
		Muito Alto e Positivo (MAP)				
OD: Oxigênio dissolvido (%)		Baixo e Positivo (BP)				
		Médio e Positivo (MP)				
QarSe: Variável auxiliar		Insaturado (INSAT)				
		Saturado (SAT)				
Mi: velocidade específica de crescimento (1/h)		Baixo e Positivo (BP)				
		Médio e Positivo (MP)				

Fonte: Acervo pessoal

### 3.1.3 Simulador

Os parâmetros do controlador *fuzzy* foram ajustados utilizando a ferramenta *ANFIS*. Contudo, os limites (faixas) utilizados para efetuar a comparação com os valores de saída dos sistemas Princ1 e Princ2 (QarEscolha e QO2Escolha, respectivamente) ainda necessitavam de um ajuste fino. Assim, para testar e realizar o ajuste fino do controlador *fuzzy* foi criado um simulador, codificado em MATLAB. A Figura 20 ilustra o conceito do simulador. A partir de valores anteriores de concentração celular ( $Cx$ ), concentração de oxigênio dissolvido ( $OD$ ), velocidade de agitação ( $Agit$ ), vazões de ar e oxigênio ( $Qar$  e  $QO2$ , respectivamente) e velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), o controlador *fuzzy* forneceu valores atualizados das vazões de ar e oxigênio. Estes valores foram repassados à primeira rede neural ( $OD\_net$ ) que estimava a concentração de oxigênio dissolvido. Com este valor atualizado, o controlador PID determinava a velocidade de agitação. Os novos valores de vazões de ar e oxigênio, oxigênio dissolvido e velocidade de agitação foram repassados à segunda rede neural ( $Cx\_net$ ) para estimativa do valor atualizado da concentração de microrganismos. As duas redes formavam o modelo neural do processo. Por fim, a concentração celular atualizada foi utilizada para estimar a velocidade específica de crescimento. Todos os valores atualizados foram realimentados no controlador nebuloso para iniciar um novo passo.

Figura 20 – Composição do simulador: controlador *fuzzy*, modelo neural do processo (composto pelas redes  $OD\_net$  e  $Cx\_net$ ), controlador PID e a equação para o cálculo da velocidade específica de crescimento.



Fonte: Acervo pessoal

Ambas as redes neurais foram criadas utilizando a ferramenta *Neural Network Time Series* (MATLAB). Devido à capacidade de memória foram escolhidas as redes neurais dinâmicas (caracterizadas por um problema não linear com apenas um vetor de entradas e saídas). Para modelar a rede *Cx\_net* foram carregadas duas matrizes no *Time Series*: uma contendo as entradas (vazões de ar e oxigênio, velocidade de agitação e concentração de oxigênio dissolvido) e outra contendo os dados de saída (valores-objetivos de concentração de microrganismos). A partir do conjunto de dados de cultivo de *E. coli* controlados via árvore de decisão, o programa dividiu-o aleatoriamente baseado nas porcentagens de 70, 15 e 15% (treinamento, validação e teste, respectivamente) para cada fase de aprendizagem. Essa separação aleatória, não tendenciosa, permite capturar de forma eficiente as tendências apresentadas pelo conjunto de dados. As porcentagens de 70, 15 e 15% foram recomendadas como padrão pelo próprio programa, porém poderiam ser ajustadas de acordo com a necessidade do usuário. Com múltiplas entradas e valores-objetivo com padrão suave e comportado, o coeficiente de correlação ( $R$ ) foi 1 em todas as fases do treinamento. De modo contrário, o treinamento da rede *OD\_net* teve características opostas: poucas variáveis de entrada (vazões de ar e oxigênio) e comportamento altamente oscilatório dos valores-objetivos da variável de saída (concentração de oxigênio dissolvido). Assim, o conjunto de treinamento foi reduzido à aproximadamente 6% de seu tamanho original. Os dados foram cuidadosamente selecionados e inseridos nas matrizes de entrada e saída. Balanceando valores de  $R$  mais baixos (cerca de 0,65) e resultados de saída mais suaves, foi possível obter uma rede mais genérica (evitando o *overfitting*). Esta estratégia foi aplicada para ambos os conjuntos de dados A16 e A12. Os resultados do treinamento são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Fases de construção das redes neurais (treinamento, validação e teste). O conjunto A16 foi utilizado para aferir o desempenho inicial do controlador nebuloso, já o conjunto A12 foi utilizado para realização de testes de robustez do sistema otimizado.

Conjunto de dados	Fase	OD_net		CX_net	
		Amostras	$R^1$	Amostras	$R^1$
A16	Treinamento	216	0,68	3681	1,00
	Validação	47	0,59	789	1,00
	Teste	47	0,66	789	1,00
A12	Treinamento	290	0,77	5160	0,98
	Validação	62	0,72	1106	0,98
	Teste	62	0,63	1106	0,98

\*Em que  $R$  é o coeficiente de correlação entre as saídas da rede neural e os valores-objetivo. Valores de  $R$  próximos de 1 indicam total correspondência, ao passo que valores de  $R$  próximos de 0 indicam uma correlação aleatória.

Durante o treinamento, uma busca heurística foi conduzida a fim de determinar a melhor arquitetura para as redes. Foi realizada uma pré-escolha da arquitetura da rede para o treinamento de modo a aferir seu desempenho. Por meio de comparações entre os valores de porcentagem de oxigênio dissolvido simulados e os valores de vazões de ar e oxigênio com o conjunto de dados de cultivo de *E. coli* foi possível avaliar o desempenho das redes neurais artificiais. Se os resultados não apresentassem uma boa correlação, uma nova rodada de ajustes nas redes seria realizada, de forma a aumentar progressivamente o número de neurônios e o número de atrasos. Para a rede CX\_net, a arquitetura escolhida foi uma camada escondida com 4 neurônios (com função de transferência tipo Sigmoidal) e 4 atrasos (*delays*) seguida por uma camada de saída com um único neurônio (com função de transferência linear). Já a arquitetura escolhida para a rede OD\_net foi uma camada escondida com 15 neurônios (com função de transferência tipo Sigmoidal) e 4 atrasos (*delays*) seguida por uma camada de saída com um único neurônio (com função de transferência linear). O maior número de neurônios na rede OD\_net é reflexo da sua maior complexidade (em comparação com a rede CX\_net).

### 3.1.4 Implementação do controlador nebuloso na ferramenta SUPERSYS\_HCDC

Tal como descrito na seção anterior, o controlador *fuzzy* foi codificado em MATLAB. Porém, dado que o SUPERSYS\_HCDC foi desenvolvido na plataforma LabVIEW, o controlador *fuzzy* teve de ser traduzido para a linguagem de programação gráfica. Para facilitar a transição, o código do controlador foi reescrito em uma *SubVI* chamada *MATLAB Script Node*. Esta ferramenta abre um *script* de comando (onde pode ser escrito o código) e importa todas as funções diretamente do MATLAB. De início optou-se por inserir o código em uma nova *SubVI*. Contudo, devido à execução em paralelo das funções no LabVIEW, optou-se por escrever o código em uma *SubVI* existente (com as adaptações necessárias).

Outros instrumentos virtuais foram empregados com o objetivo de adaptar o controlador nebuloso às limitações impostas pelo cultivo de *E. coli* e pelos instrumentos mecânicos. Um dos instrumentos virtuais foi um contador de tempo regressivo, que foi programado para ativar o controlador *fuzzy* a cada 40 segundos. Este período de atraso foi necessário para que transcorresse a ação de controle (mudanças nas vazões de ar e oxigênio) e que a mesma gerasse uma resposta do processo (mudança na concentração de oxigênio dissolvido). Outra adaptação necessária foi a imposição de limites (máximo e mínimo) para as vazões de ar e oxigênio. Dado que ambas eram manipuladas por instrumentos mecânicos, estavam sujeitas aos limites relacionados à precisão ( $\pm 0,1$  L/min) e aos valores de vazões máximas e mínimas permitidas (0 a 8 L/min para a vazão de oxigênio e 0 a 5 L/min para vazão de ar). A última adaptação foi baseada em limites (faixas) ajustáveis para comparação com os valores de saída dos sistemas Princ1 e Princ2 (QarEscolha e QO2Escolha, respectivamente). As três faixas de atuação foram convertidas em controles no painel frontal do SUPERSYS\_HCDC, habilitando o operador a realizar ajustes nas faixas durante o cultivo (diferentemente das simulações, em que as faixas permaneciam fixas).

Embora o controlador *fuzzy* tenha sido implementado na plataforma LabVIEW com sucesso, a árvore de decisão foi mantida como um sistema de apoio.

## 3.2 CULTIVOS CELULARES

A estratégia para testar o desempenho real do controlador *fuzzy* envolveu testes iniciais utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial) e a bactéria *Escherichia coli*. Já os testes finais envolveram cultivo de *E. coli* sob supervisão do controlador

*fuzzy*. Nesta seção serão detalhadas as cepas utilizadas, os meios de cultivo, o aparato experimental (biorreator), as condições de cultivo e os métodos analíticos.

### 3.2.1 Cepas

Os primeiros testes foram conduzidos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial da marca “Fleishmann”). Já os demais cultivos foram conduzidos utilizando a bactéria *Escherichia coli*. Um fragmento recombinante do gene da proteína pneumocócica de superfície A do clado 4 (PspA4Pro) foi clonada no vetor pET37b+ e inserida na *E. coli* BL21(DE3) (CARVALHO *et al.*, 2012). Esta construção foi cedida pela Dra. Eliane Miyagi do Instituto Butantan de São Paulo.

### 3.2.2 Meios de cultivo

Para os cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado um meio mínimo adaptado de Mesquita e colaboradores (2019). Para a fase de batelada foi utilizada glicose (150 g/L) como fonte de carbono e os sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (8 g/L),  $KH_2PO_4$  (25 g/L) e uréia (7,5 g/L). Já para a fase em batelada alimentada, a concentração de glicose foi dobrada, mantendo-se as mesmas concentrações dos demais sais (MESQUITA *et al.*, 2019).

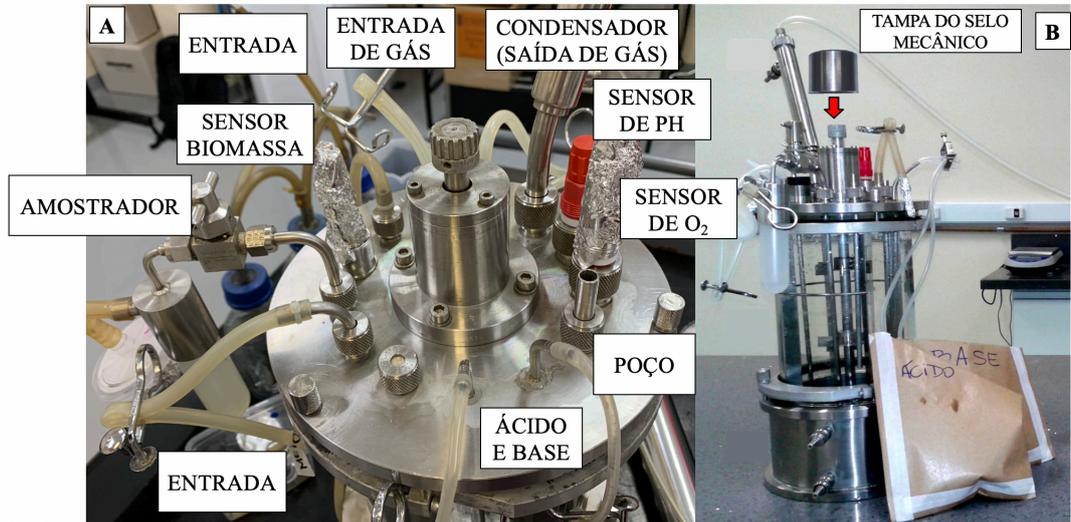
Os cultivos de *E. coli* foram conduzidos em um meio quimicamente definido (meio HDF ou *High Density Fermentation*) para cultivos de microrganismos adaptado de Sargo (2011), Horta e colaboradores (2012) e Silva (2015). Os sais  $(NH_4)_2HPO_4$  (5,30 g/L),  $KH_2PO_4$  (17,73 g/L), ácido cítrico (2,27 g/L), e concentrações-traço de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (3,33 mg/L),  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (2,00 mg/L),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (20 mg/L),  $H_3BO_3$  (4,00 mg/L),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (2,80 mg/L),  $Zn(CH_3COOH)_2 \cdot H_2O$  (33,80 mg/L), EDTA (18,80 mg/L) – a partir de soluções estoque – foram misturadas e solubilizadas em água destilada. O pH foi ajustado para 6,3 (para evitar precipitação dos sais), e a solução foi autoclavada a 120 °C por 15 min. Soluções de glicerol (60,00 g/L) e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,60 g/L) também foram ajustadas para o pH 6,3 e autoclavadas separadamente. Para a preparação do meio, as três soluções foram misturadas em uma cabine de fluxo laminar. Canamicina (50,00 mg/L) e Tiamina (45,00 mg/L) foram diluídas em água milli-Q, esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (diâmetro do poro) e adicionadas

ao meio (este em temperatura ambiente). Polipropileno glicol (PPG) (1,00 mL/L) foi adicionado como antiespumante (HORTA *et al.*, 2012; SARGO, 2011; SILVA, 2015).

### 3.2.3 Biorreator e aparato experimental

Para a montagem do biorreator, todas as saídas superiores foram fechadas, com exceção da linha de saída dos gases (conectada aos frascos de contenção) para recirculação de vapor. A Figura 21A ilustra a tampa do biorreator montada com: sensores (pH, oxigênio dissolvido e biomassa), condensador, amostrador e mangueiras para vazões de ácido, base, gases e entrada de inóculo. Para o amostrador e a entrada de gases foram acoplados filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de evitar contaminação do reator. Todas as extremidades (mangueiras, filtros e partes metálicas) foram cobertas com papel alumínio. O biorreator montado é mostrado na Figura 21B. Antes de realizar o processo de esterilização foram adicionados 100 mL de água destilada (para formação de vapor) e o eletrodo de pH foi calibrado. O reator foi selado e autoclavado a 120°C, 1,1 bar por 30 minutos (ressalta-se que o reator foi autoclavado com uma saída de ar para que este não ficasse pressurizado e garantisse sua completa esterilização). Ao retirar da autoclave esta saída foi selada de modo a manter a esterilidade. Para diminuir o risco de contaminação, após o carregamento com o meio de cultivo, uma vazão de 1 L/min de ar foi passada continuamente, garantindo uma pressão positiva no reator. Por fim, o segundo frasco de contenção foi preenchido com 200 mL de uma solução de  $\text{CuSO}_4$  (30 g/L) garantindo que, durante o cultivo, o gás de saída não arrastasse microrganismo vivos para fora do sistema de contenção durante o cultivo (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2012; SARGO, 2011; SILVA, 2015).

Figura 21 - Montagem do biorreator: à esquerda vista superior da tampa do biorreator completa com sensores e mangueiras (21A), à direita o reator selado pronto para esterilização (21B)

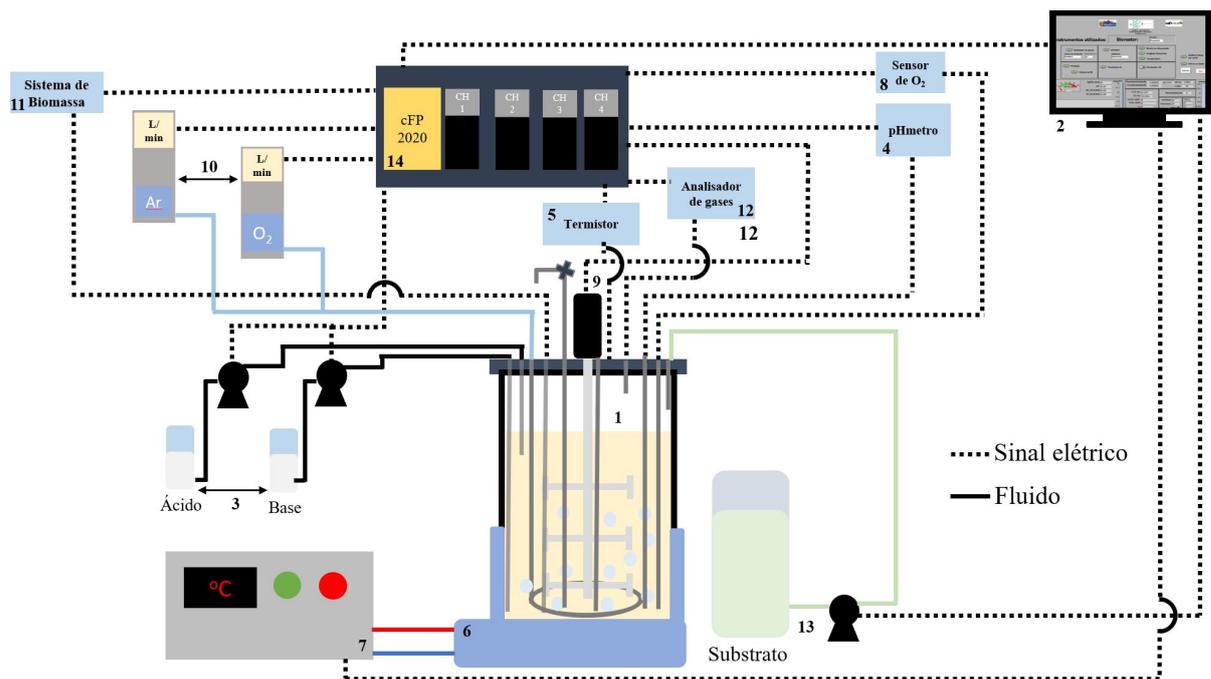


Fonte: Acervo pessoal

O aparato experimental para os cultivos em biorreator é mostrado na Figura 22. Os cultivos foram conduzidos em um reator tipo tanque agitado de 5 L (com volume de trabalho de 4 L) (1), desenvolvido no próprio LaDABio2 e supervisionado pelo programa SUPERSYS\_HCDC (2). O pH foi controlado pela adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30%) ou  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (30%) via bombas de ácido e base (3) com controle tipo *on-off*. A aferição foi realizada por um transmissor de pH com aquisição analógica e um pHmetro (GLI PRO - Milwaukee, WI, EUA) (4). A temperatura foi mensurada através de um termistor (PT100 Camtec mit Exacta – São Paulo, SP, Brasil) (5) e controlada via camisa de arrefecimento (6) com banho térmico acoplado (7). A concentração de oxigênio dissolvido foi aferida via conjunto de transmissor de concentração de oxigênio dissolvido (com aquisição analógica) e sensor amperométrico (Mettler Inpro 6800 - Columbus, OH, EUA) (8) e controlado via sistema híbrido composto por um PID e pelo controlador fuzzy. O controlador PID ajustava a velocidade de agitação entre 200 e 950 rpm via inversor de frequência (9). Já as vazões de ar e oxigênio eram controladas por dois fluxômetros de massa (GFC AALBORG - Orangeburg, NY, EUA) (10). Condutividade e Permissividade foram monitoradas via sensor de biomassa (HAMILTON - Reno, NV, USA) (11). A composição do gás de exaustão foi medida por um analisador de gases (902P Quantek instruments - Grafton, MA, EUA) (12). O meio foi introduzido no biorreator

utilizando uma bomba peristáltica (MASTERFLEX - Radnor, PA, USA) (13). A comunicação entre sensores, atuadores e o computador (abrigoando o SUPERSYS\_HCDC) foi feita via compact Field Point (14) (cFP-2020 National Instruments - Austin, TX, EUA) (Horta, 2011; Horta et al., 2011; Sargo, 2011; Horta et al., 2012).

Figura 22 – *Set up* do biorreator e montagem do aparato para controle das condições de cultivo



Fonte: Acervo pessoal

### 3.2.4 Condições de cultivo

Nesta seção serão detalhadas as condições de cultivo para a levedura *S. cerevisiae* e para a bactéria *E. coli*.

#### 3.2.4.1 Cultivo da *S. cerevisiae*

O primeiro teste consistiu de um cultivo de *S. cerevisiae*, a fim de testar as funcionalidades do SUPERSYS\_HCDC equipado com o novo controlador *fuzzy* de concentração de oxigênio dissolvido. Assim, foi possível adquirir familiaridade com o sistema

por meio de um cultivo com protocolos mais simples em relação ao cultivo de *E. coli* (que requer um alto grau de esterilidade).

Utilizando o biorreator e a aparelhagem experimental descritos na seção 3.2.3. os cultivos foram realizados com um volume de 3 L de meio (tal como descrito na seção 3.2.2) e uma concentração inicial de microrganismos de cerca de 30 g/L (considerando que cada tablete de fermento possui 70% de umidade, foram utilizados 20 tabletas ou 300 g de fermento fresco). Também foi adicionado 1 mL/L de antiespumante PPG (30%).

Após a calibração dos sensores o reator foi carregado com parte do meio e foram inseridas as condições de cultivo no SUPERSYS\_HCDC: pH controlado em 4,5, concentração de oxigênio dissolvido controlado em 30% da saturação e temperatura controlada em 35°C Ressalta-se que, para os testes iniciais, o controle de oxigênio dissolvido foi realizado parcialmente pela árvore de decisão e pelo controlador nebuloso (juntamente com o controlador PID). Após cerca de 2 horas de cultivo a vazão de alimentação suplementar foi ativada. Foi alimentado cerca de 1 L de meio suplementar, cuja composição foi definida na seção 3.3.2. A amostragem foi realizada a cada 2 horas para determinação do crescimento celular.

#### 3.2.4.2 Cultivo de *E. coli*

Para a realização dos testes do controlador nebuloso otimizado em cultivos de *E. coli* foi necessária a criação de um estoque de células. Uma placa de HDF-Ágar foi estriada com uma alça plástica (estéril e descartável) a partir de um criotubo contendo células de *E. coli* na fase exponencial. As placas foram colocadas em estufa por 48 horas até o surgimento de colônias isoladas e bem definidas (fase de semeadura). Duas colônias foram semeadas em dois *erlenmeyers* de 500 mL contendo 50 mL do meio definido HDF (tal como descrito na seção 3.2.2). Os frascos foram deixados em uma incubadora rotativa (*shaker*) a 300 rpm e 37°C até que se atingisse uma densidade óptica à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), entre 2 e 2,5 (garantindo que a cultura estava na fase exponencial). As alíquotas para análise da densidade óptica foram coletadas assepticamente em uma câmara de fluxo laminar. Atingido o valor de  $DO_{600nm}$  dentro da faixa proposta, interrompeu-se o cultivo e um volume de 20 mL de caldo foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 10 mL de meio fresco. Adicionou-se glicerol como crioprotetor até atingir uma concentração de 20% vv. Em seguida, armazenou-

se alíquotas de 1,5 mL em criotubos à -80°C (HORTA, 2011; PAREDES, 2018; SARGO, 2011).

O inóculo foi preparado em dois estágios. A partir de uma placa HDF-Ágar, duas colônias isoladas de *E.coli* BL21(DE3) foram inoculadas em dois *erlernmeyers* de 500 mL com 50 mL de meio HDF fresco. Os frascos foram incubados em *shaker* (SL-223 Solab, Piracicaba, SP, Brasil) à 37°C e 300 rpm por, pelo menos, 12 horas. Foi realizado o acompanhamento periódico da densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) até o valor de 2 (garantindo que o cultivo estava na fase exponencial). Neste momento, duas alíquotas de 5 mL foram transferidas a dois *erlernmeyers* de 500 mL contendo 100 mL de meio HDF fresco. Os dois frascos foram novamente incubados em *shaker* à 37°C e 300 rpm e a  $DO_{600nm}$  foi aferida periodicamente. Ao atingir um valor entre 2 e 2,5 eles foram misturados assepticamente numa cabine de fluxo laminar para inoculação no reator (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2012; SARGO, 2011; SILVA, 2015).

Utilizando o biorreator e a aparelhagem experimental descritos na seção 3.2.3, os cultivos foram realizados com um volume de 3,8 L de meio (tal como apresentado na seção 3.2.2). Após a montagem do reator, este foi selado e autoclavado a 120°C, 1,1 bar por 30 minutos. Após seu resfriamento a temperatura ambiente, o reator foi carregado com 3,8 L de meio HDF fresco e a temperatura foi ajustada para 35°C. Em seguida, os sensores de oxigênio dissolvido e biomassa foram calibrados. Após a inoculação do reator foram estabelecidas as seguintes condições de cultivo: pH mantido a 6,7, temperatura controlada em 35°C e concentração de oxigênio dissolvido mantida a 30% da saturação. A aquisição de dados, monitoramento e controle dos sensores e atuadores foram feitas via *software* SUPERSYS\_HCDC (HORTA, 2011; HORTA *et al.*, 2012; SARGO, 2011; SILVA, 2015).

A amostragem foi realizada periodicamente (a cada 2 horas durante a fase *lag* e a cada hora durante a fase exponencial) a fim de acompanhar o crescimento celular e a produção de ácido acético. Ao se notar uma desaceleração do crescimento (sinal do fim da fonte de carbono) foi dado um pulso de glicerol. A composição deste era idêntica ao meio no reator, porém com uma concentração de glicerol ajustada (de modo que, após o pulso, a concentração de glicerol no biorreator fosse de 20 g/L). Foi utilizado como indutor IPTG (1 mM), introduzido assepticamente utilizando uma seringa.

### 3.2.5 Métodos analíticos

Para cada amostra foram realizados testes de densidade óptica a uma faixa de 600 nm em um espectrômetro de massa (Genesys 10S UV-VIS-Thermo Electron Corp – Madison, WI, EUA) após diluições adequadas da mesma. Para estabelecer uma correlação entre a densidade óptica e a massa seca, três amostras de 1,5 mL (para cada ponto experimental aferido) foram centrifugadas (IEC micro CL 21R – Thermo Electron Corp - Madison, WI, EUA) a 5000 rpm, 4°C por 10 minutos em *ependorf* previamente secos e pesados. O sobrenadante foi reservado em outro *ependorf* para posterior análise no HPLC e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, 5°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em estufa a 70°C por 12 horas (ou até que o peso se mantivesse constante). As amostras foram transferidas a um dessecador até que a temperatura se estabilizasse, a fim de pesá-los novamente. Para obtenção da concentração final (em base seca), foi utilizada a Equação 36.

$$Cx = \frac{m_{final} - m_{inicial}}{V_{suspensão}} \quad (36)$$

Em que a massa inicial ( $m_{inicial}$ ) se refere ao *ependorf* vazio, a massa final ( $m_{final}$ ) o final o peso do *ependorf* com a massa de células e  $V_{suspensão}$  é a alíquota (volume) utilizada na primeira centrifugação.

As concentrações de glicerol e ácido acético foram analisadas via HPLC (Shimadzu – Kyoto, Japão). Para isso foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H (Biorad Life Science – Hercules, CA, EUA) com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM) como fase móvel. As leituras foram realizadas a 60°C por 30 minutos a 0,60 mL/min. O detector de índice de refração (ou *refraction index detector*, *RID*, em inglês) foi utilizado para determinação da concentração de glicerol e a detecção ultravioleta (UV) a 210 nm foi utilizada para análise da concentração de ácido acético (CARVALHO et al., 2012; PAREDES, 2018; SARGO, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão detalhados os principais resultados obtidos durante as simulações computacionais e os experimentos (cultivos de *S. cerevisiae* e *E. coli*). A partir desses resultados discorrer-se-á sobre o desempenho geral do controlador *fuzzy* de concentração de oxigênio dissolvido otimizado.

### 4.1 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

Tal como elucidado na seção 3.1.2 o processo de desenvolvimento e otimização do controlador *fuzzy* se deu em etapas e através de uma extensa busca. Para isso, inicialmente foi criado um simulador baseado em um modelo neural do processo, mimetizando as condições de um cultivo (conforme já mencionado na seção 3.1.3 de Material e Métodos).

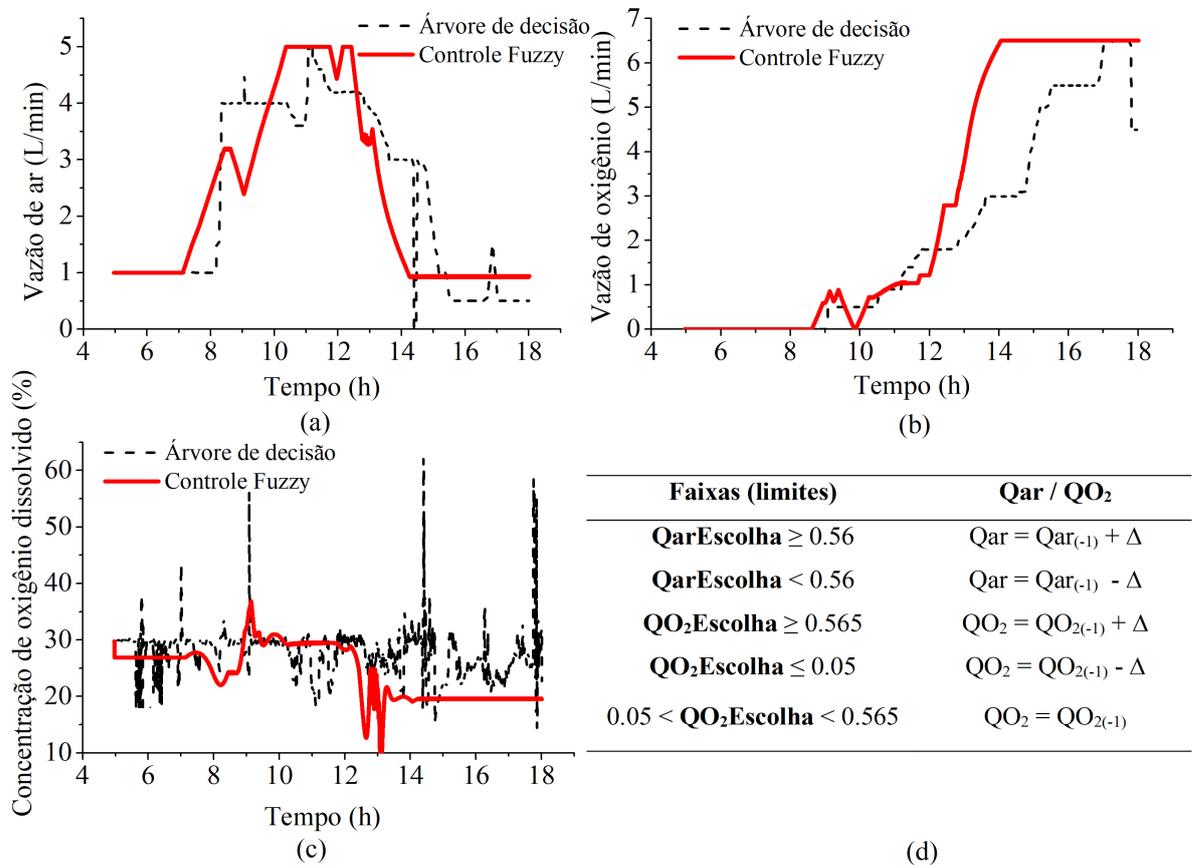
#### 4.1.1 Resultados utilizando o controlador em seu formato inicial

No primeiro conjunto de simulações foi utilizado o modelo neural para a dinâmica do processo treinado a partir de dados provenientes do conjunto A16 (mesmo conjunto utilizado para o treinamento dos sistemas de inferência nebulosos).

A partir da concepção inicial do controlador *fuzzy*, dado pelas Figuras 16a e 17a (que descrevem os sistemas Delta e Princ1/Princ2, respectivamente) foi realizada uma extensa busca heurística pelos valores ótimos das faixas (limites) de QarEscolha e QO2Escolha. Para isso ajustou-se os limites de modo que as tendências de vazões de ar e oxigênio fossem coerentes com os resultados obtidos por Horta (2011) no cultivo A16 (em que a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada via árvore de decisão) e, ao mesmo tempo, reduzindo as oscilações na concentração de oxigênio dissolvido. As Figuras 23a e 23b comparam o comportamento das vazões de ar e oxigênio a partir de cada controlador. A linha preta tracejada representa os dados de cultivo controlados via árvore de decisão, enquanto que a linha vermelha representa os resultados obtidos com o controlador nebuloso (utilizando o simulador neural da dinâmica do processo). Os resultados mostraram que as tendências das necessidades das vazões de ar e oxigênio, requeridas por um cultivo, seriam satisfeitas com sucesso pelo controlador nebuloso, tal como mostra a “sobreposição” das duas linhas. Na Figura 23c plotou-se o gráfico de concentração de oxigênio dissolvido experimental (conjuntos de dados A16) e os valores

simulados (via modelo neural do processo), ambos em função do tempo. Estes resultados foram obtidos por meio da busca heurística pelas faixas de QarEscolha e QO2Escolha. Estas faixas foram determinadas por meio do balanceamento entre pequenos desvios nas vazões de ar e oxigênio (em relação aos dados do conjunto A16) com valores mais suaves de concentração de oxigênio dissolvido. A Figura 23d representa os melhores resultados da busca heurística.

Figura 23 - Resultados das simulações para o controle *fuzzy* de oxigênio dissolvido utilizando o simulador. A linha tracejada preta representa os dados controlados via árvore de decisão, enquanto que a linha sólida vermelha representa os resultados do simulador utilizando o controlador *fuzzy*. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar (a) e oxigênio (b) para ambos os controladores. Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido para ambos os controladores (c) e faixas para comparação dos valores de QarEscolha e QO2Escolha (d) para analisar a manutenção, aumento ou diminuição das vazões de ar e oxigênio.



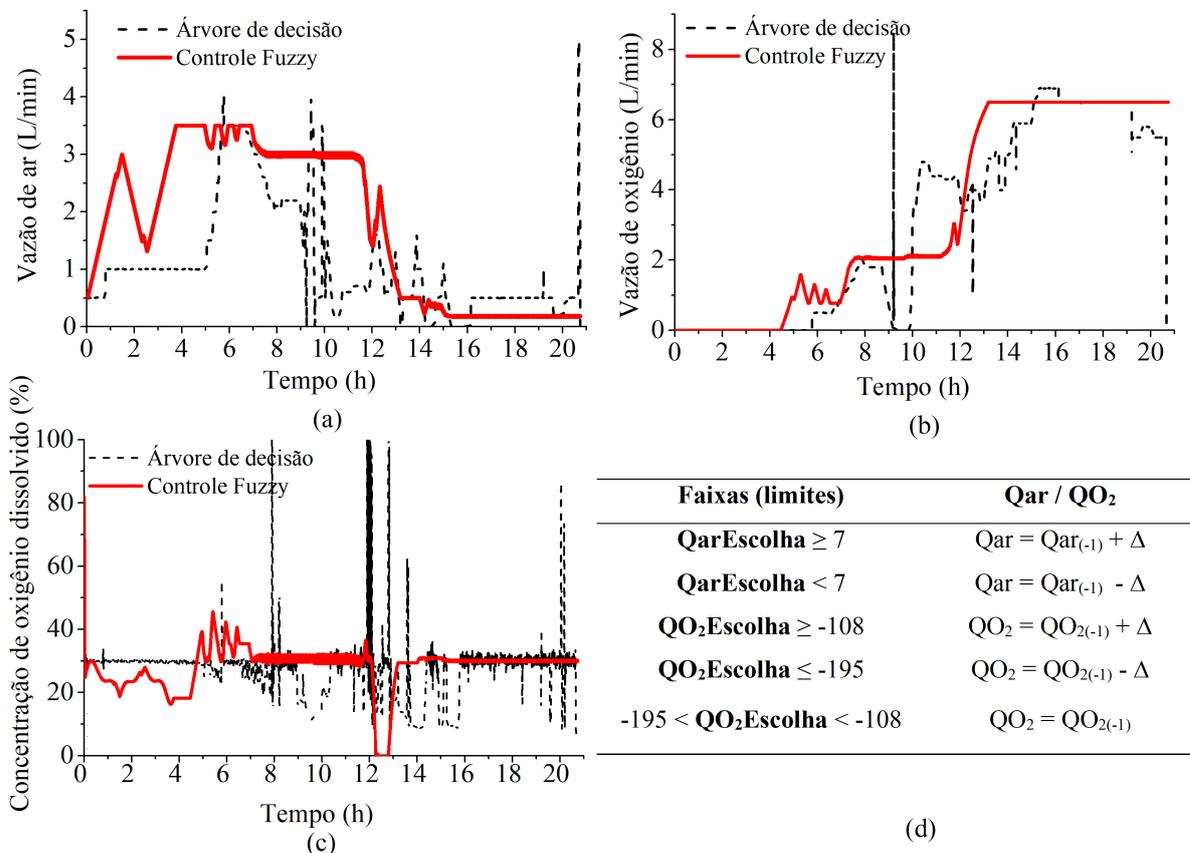
Fonte: Akisue *et al.*, 2018

Utilizando o controlador nebuloso foi possível manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em uma faixa entre 20 e 31% (que compreende o valor ótimo de 30%). Pode-se observar dois picos na concentração de oxigênio dissolvido - ambos por volta das 13 horas - todavia, de um modo geral, a resposta do controlador *fuzzy* foi mais suave em relação aos dados experimentais (controlados via árvore de decisão). É provável que os picos tenham sido ocasionados devido a um descompasso entre alta demanda de oxigênio dissolvido aferida pela rede OD\_net com base nas condições de cultivo (fase exponencial de crescimento) e a resposta do controlador nebuloso (saturado com ar e o substituindo pelo enriquecimento de oxigênio puro). Este resultado foi obtido por meio de uma busca heurística pelas faixas de QarEscolha e QO2Escolha. Estas se mantiveram próximas aos valores utilizados durante o treinamento dos sistemas de inferência nebulosos Princ1 e Princ2. Vale destacar que, o desvio padrão da concentração de oxigênio dissolvido (controlada via controlador *fuzzy*) foi ligeiramente menor do que a resposta obtida utilizando a árvore de decisão. Contudo, ao se comparar as duas curvas, nota-se que os picos de oxigênio dissolvido foram abrandados. É possível inferir que, baseado nos perfis de vazões de ar e oxigênio (simulados) o desgaste das partes mecânicas dos fluxômetros de massa seria diminuído. Ao mesmo tempo, esse comportamento mais suave também poderia implicar em um suprimento mais estável de oxigênio dissolvido, potencialmente reduzindo o estresse metabólico sofrido pela célula devido à privação de oxigênio.

Também foi realizado um teste de robustez do controlador *fuzzy*. Acoplou-se o modelo neural da dinâmica do processo (reconstruído a partir do conjunto de dados A12, não utilizado no ajuste do controlador *fuzzy*) com o controlador nebuloso (cujos parâmetros, otimizados previamente pela ferramenta ANFIS *via* conjunto A16, foram mantidos constantes). As Figuras 24a e 24b comparam o comportamento das vazões de ar e oxigênio a partir de cada controlador. Novamente, os resultados mostraram que as tendências das necessidades das vazões de ar e oxigênio, requeridas por um cultivo, seriam satisfeitas com sucesso pelo controlador nebuloso, tal como mostra a “sobreposição” das duas linhas. Na Figura 24c plotou-se o gráfico de concentração de oxigênio dissolvido experimental (conjunto de dados A12) e os valores simulados (via modelo neural do processo), ambos em função do tempo. Estes resultados foram obtidos pela busca heurística pelas faixas de QarEscolha e QO2Escolha. Novamente, estas faixas foram determinadas por meio do balanceamento entre pequenos desvios nas vazões de

ar e oxigênio (em relação aos dados do conjunto A12) com valores mais suaves de concentração de oxigênio dissolvido. A Figura 24d mostra os melhores resultados.

Figura 24 - Resultados das simulações baseadas no conjunto A12. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar **(a)** e oxigênio **(b)** simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A12 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles **(c)**. Faixas de QarEscolha e QO2Escolha otimizadas heurísticamente **(d)**.



Fonte: Akisue *et al.*, 2018

Utilizando o controlador nebuloso foi possível manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em uma faixa entre 20 e 40% (que compreende o valor ótimo de 30%). A concentração de oxigênio dissolvido média, utilizando a árvore de decisão foi cerca de 27% (este valor subiu para 28% quando utilizado o controlador *fuzzy*). É possível observar alguns picos na concentração de oxigênio dissolvido. Contudo, novamente, a resposta do controlador

*fuzzy* foi mais suave em relação aos resultados obtidos via árvore de decisão. Vale destacar que, o desvio padrão da concentração de oxigênio dissolvido (controlada via controlador *fuzzy*) foi 29% menor do que aquele apresentado utilizando a árvore de decisão. Este resultado prova que os picos de oxigênio dissolvido foram abrandados. Baseado nos perfis de vazões de ar e oxigênio (simulados) o desgaste das partes mecânicas dos fluxômetros de massa seria diminuído. Ao mesmo tempo, esse comportamento mais suave também pode implicar num suprimento mais estável de oxigênio dissolvido, potencialmente reduzindo o estresse metabólico sofrido pela célula devido à privação de oxigênio.

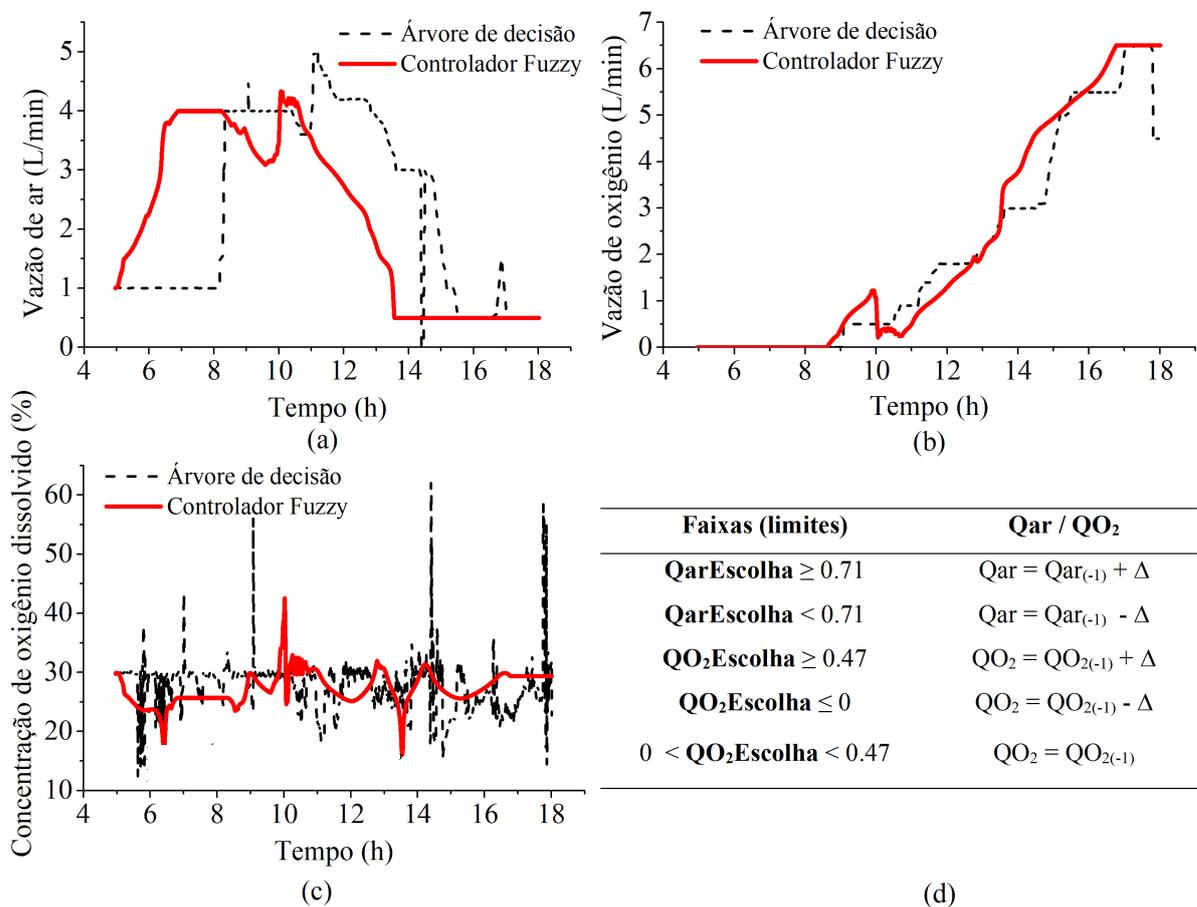
Comparando-se as Figuras 23d e 24d nota-se que houve uma mudança significativa das faixas, principalmente em relação ao limite de QO2Escolha. Essa diferença é decorrente da ampla faixa de valores para os coeficientes  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$  e  $f$  da Equação 35. Deve-se ressaltar que os parâmetros do controlador (otimizados via ANFIS) não foram modificados e, mesmo utilizando um novo modelo dinâmico neural do processo (treinado a partir dos dados do conjunto A12), o mesmo apresentou resultados bastante satisfatórios. Isto demonstra a robustez do controlador proposto, modificando apenas as faixas de comparação para QarEscolha e QO2Escolha.

#### **4.1.2 Processo de melhoria contínua e novas simulações**

Embora o conjunto de resultados obtidos nas simulações tenha atestado a viabilidade da lógica *fuzzy* para o controle do oxigênio dissolvido em um cultivo de *E. coli*, também foi necessário aferir seu desempenho em um cultivo real. Para isso foi realizado um processo de melhoria contínua, visando sua implementação na ferramenta SUPERSYS\_HCDC. Após as modificações na estrutura do controlador, descritas nas Figuras 16 e 17, foram realizadas novas simulações e, por conseguinte, uma nova busca heurística das faixas de QarEscolha e QO2escolha. As Figuras 25a e 25b comparam o comportamento das vazões de ar e oxigênio (respectivamente) via árvore de decisão (linha preta) e via controlador *fuzzy* (linha vermelha). As simulações mostram um comportamento mais estável de ambas as vazões, o que refletiu numa diminuição das oscilações na concentração de oxigênio dissolvido (ou seja, os picos de oxigênio dissolvido foram abrandados) tal como mostra a Figura 25c. Na Figura 25d tem-se as faixas ótimas obtidas a partir da simulação do desempenho do controlador fazendo uso do modelo dinâmico neural baseado no conjunto A16. Estas faixas foram obtidas heurísticamente

balanceando pequenos desvios das vazões de ar e oxigênio (em relação as vazões previamente obtidas pela árvore de decisão) e valores de concentração de oxigênio dissolvido mais suaves.

Figura 25 – Processo de melhoria contínua: resultados das simulações baseadas no conjunto A16. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar **(a)** e oxigênio **(b)** simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A16 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles **(c)**. Faixas de  $Q_{arEscolha}$  e  $QO_2Escolha$  otimizados heurísticamente **(d)**.



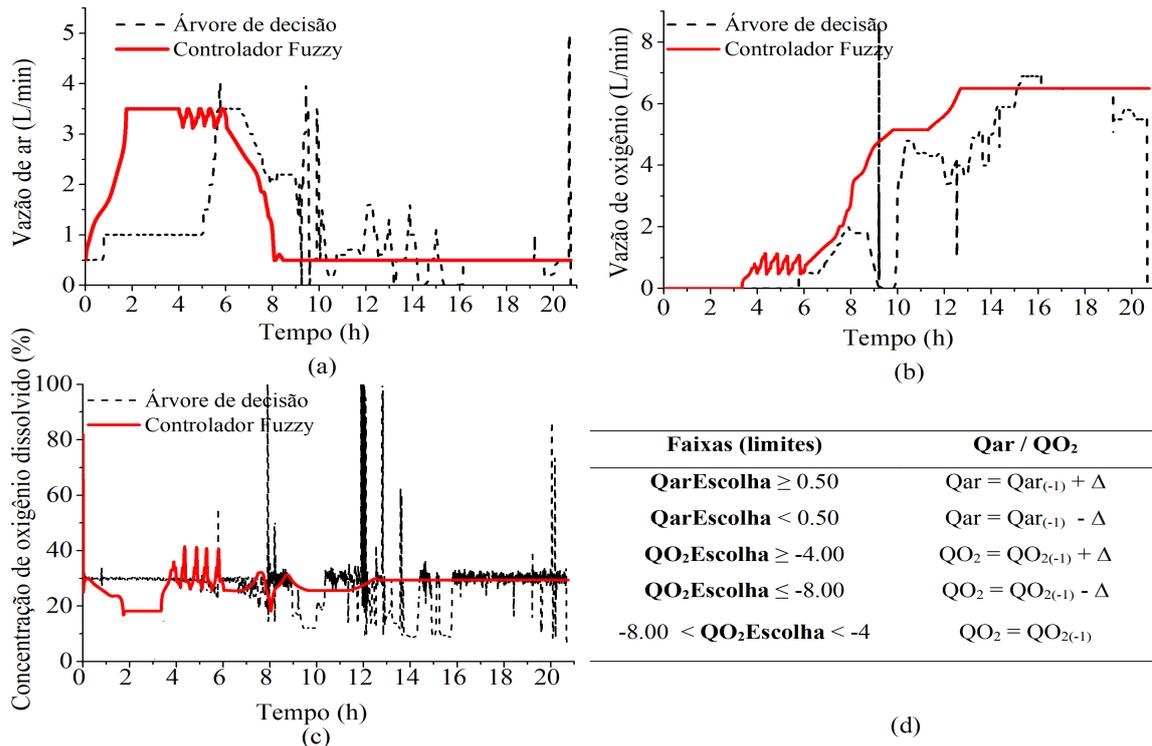
Fonte: Acervo pessoal

Utilizando o controlador nebuloso foi possível manter a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu valor ótimo de 30% (com baixo *offset*). A concentração de oxigênio dissolvido média, utilizando a árvore de decisão foi cerca de 27%. Este valor caiu ligeiramente para 26% quando utilizado o controlador *fuzzy*. Nota-se que as faixas comparativas para

QarEscolha e QO2Escolha ficaram próximas àquelas obtidas com a estrutura original (Figura 23d). Vale destacar que o desvio padrão da concentração de oxigênio dissolvido (controlada via controlador *fuzzy*) foi 44% menor do que aquele apresentado utilizando a árvore de decisão, provando que os picos de oxigênio dissolvido foram suavizados.

Novamente, foi realizado o teste de robustez do controlador *fuzzy* (utilizando o modelo neural do processo treinado a partir do conjunto A12). É importante ressaltar que, do mesmo modo que foi realizado o teste de robustez da versão original, não houve alteração dos parâmetros do controlador *fuzzy* ajustados pelo *ANFIS*. As Figuras 26a e 26b comparam a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente) a partir da árvore de decisão (conjunto A12) com os resultados obtidos com o controlador *fuzzy*. O resultado representa uma melhora quando considerada a aplicação da lógica *fuzzy*. O teste de robustez reforça o argumento de que as tendências das necessidades das vazões de ar e oxigênio seriam satisfeitas, com sucesso, pelo controlador nebuloso - tal como mostra a “sobreposição” das duas linhas. O comportamento das variáveis manipuladas afetou diretamente o perfil da concentração de oxigênio dissolvido, que apresentou um comportamento mais suave em relação às respostas obtidas via árvore de decisão (tal como observado na Figura 26c). Estes resultados foram obtidos através da busca heurística pelas faixas comparativas ótimas para QarEscolha e QO2Escolha - determinadas através do balanceamento entre pequenos desvios nas vazões de gás e valores mais suaves de concentração de oxigênio dissolvido. A Figura 26d mostra os valores ótimos das faixas de QarEscolha e QO2Escolha.

Figura 26 - Processo de melhoria contínua: resultados das simulações baseadas no conjunto A12. Comparação entre os comportamentos das vazões de ar (a) e oxigênio (b) simulados (linha vermelha) e os dados do conjunto A12 (linha preta). Comparação do comportamento da concentração de oxigênio dissolvido utilizando os dois controles (c). Faixas de  $Q_{ar}$ Escolha e  $Q_{O_2}$ Escolha otimizados heurísticamente (d).



Fonte: Acervo pessoal

As simulações mostram que o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao valor ótimo de 30% com pouco *offset*. Neste caso, para ambos os controladores, a concentração de oxigênio dissolvido média foi cerca de 27%. Tal como elucidado nos resultados anteriores, as tendências de vazões de ar e oxigênio seriam satisfeitas pelo controlador nebuloso. De modo geral os picos de concentração de oxigênio dissolvido foram abrandados, ou seja, as respostas fornecidas pelo controlador *fuzzy* foram mais suaves em relação àquelas obtidas via árvore de decisão. Vale destacar que o desvio padrão da concentração de oxigênio dissolvido (controlada via controlador *fuzzy*) foi 60% menor do que aquele apresentado utilizando a árvore de decisão, provando que os picos de oxigênio dissolvido foram suavizados.

É possível notar que as modificações estruturais no controlador nebuloso acarretaram em uma melhora significativa. Embora para todas as simulações apresentadas as tendências de vazões de ar e oxigênio tenham sido seguidas com sucesso (como pode ser observado pela “sobreposição” das linhas preta e vermelha), o cerne da questão está nos resultados de concentração de oxigênio dissolvido. Utilizando o controlador nebuloso otimizado nota-se que a concentração de oxigênio dissolvido média atingiu valores muito próximos do *setpoint* desejado. Ao mesmo tempo, houve uma queda sensível (acima de 40%) no desvio padrão da concentração de oxigênio dissolvido, tanto no teste padrão (utilizando o conjunto A16) quanto no teste de robustez (utilizando o conjunto A12). O ganho em desempenho também pode ser percebido ao comparar as Figuras 24d e 26d, em que há uma melhora no ajuste das faixas de QarEscolha e QO2Escolha.

Na Tabela 4 estão compilados os resultados dos testes heurísticos - via simulação - para busca dos limites ótimos das faixas de QarEscolha e QO2Escolha.

Tabela 4: Compilação dos resultados das simulações com o controlador nebuloso inicial e otimizado.

		Limite otimizado (heurísticamente) de QarEscolha	Limite superior otimizado (heurísticamente) de QO2Escolha	Limite inferior otimizado (heurísticamente) de QO2Escolha
Controle inicial	Conjunto A16	0,560	0,565	0,050
	Conjunto A12	7	-108	-195
Controle otimizado	Conjunto A16	0,71	0,47	0,00
	Conjunto A12	0,50	-4,0	-8,0

Fonte: Acervo pessoal

Todos os resultados obtidos nas simulações sugerem que a lógica *fuzzy* é uma opção viável para o controle da concentração de oxigênio dissolvido em um cultivo de *E. coli*, com parâmetros robustos ajustados pela ferramenta *ANFIS*.

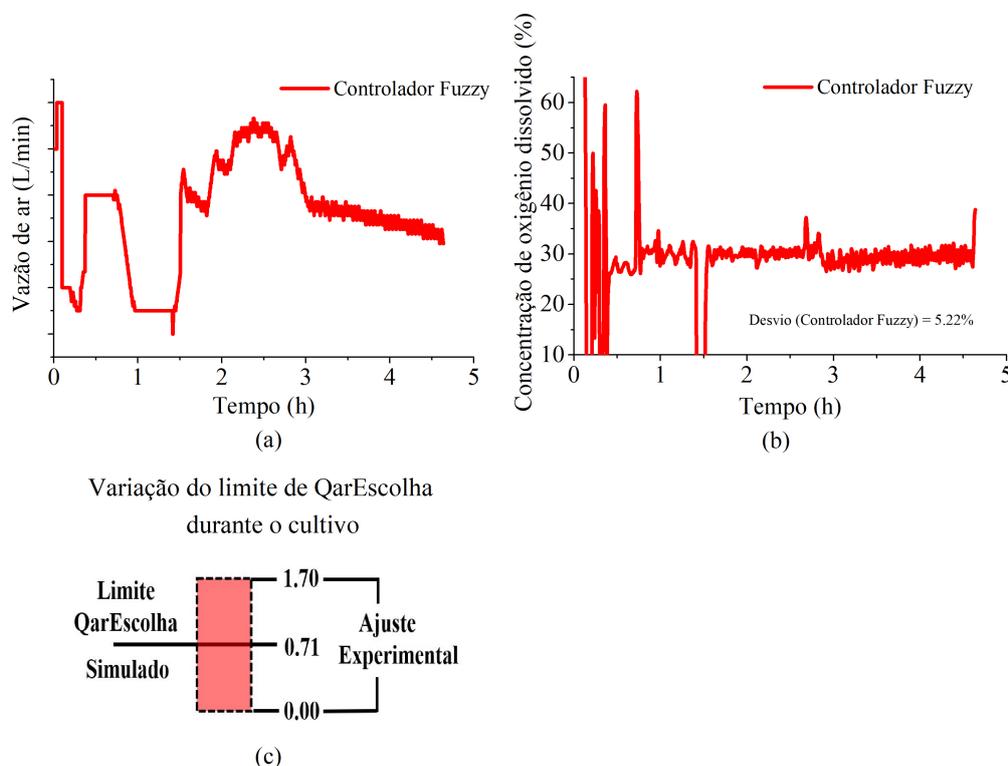
## 4.2 EXPERIMENTOS INICIAIS

Após os resultados obtidos com as simulações iniciou-se a fase de implementação do controlador nebuloso na ferramenta SUPERSYS\_HCDC, seguida de testes iniciais.

### 4.2.1 Cultivo em biorreator da levedura *S. cerevisiae*

Seguindo os procedimentos descritos no Capítulo de Material e Métodos, foram realizados cultivos testes em biorreator utilizando a levedura *S. cerevisiae*. As Figuras 27a e 27b mostram os resultados para a vazão de ar e a porcentagem de oxigênio dissolvido, ambas em função do tempo (respectivamente). A obtenção de um perfil da concentração de oxigênio dissolvido suave foi possível devido à flexibilidade da faixa de QarEscolha durante o cultivo. A Figura 27c compara os resultados da faixa de QarEscolha, otimizada via simulação para a *E. coli* (e utilizada como condições iniciais para o controlador *fuzzy* aplicado no cultivo de *S. cerevisiae*) e suas faixas máximas de variação (determinadas heurísticamente durante o experimento). Apesar da diferença dos microrganismos, os limites ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (com desvios máximos de -0,71 e +0,99 a partir dos valores iniciais).

Figura 27 – Resultados do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*: comportamento da vazão de ar (a) em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso (b). Ajustes experimentais do limite de QarEscolha (c) otimizada heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

Utilizando o controlador nebuloso foi possível manter a concentração de oxigênio dissolvido numa faixa entre 27 e 30% durante quase todo o cultivo (muito próximo àquele determinado pelo *setpoint*). Devido às diferenças metabólicas entre a levedura e a *E. coli*, o requerimento de oxigênio da primeira é sensivelmente menor do que a segunda. Conseqüentemente, esta diferença foi compensada com uma alta carga inicial de microrganismos.

Devido à alta concentração inicial de microrganismos nota-se um período inicial instável, com fortes oscilações de concentração de oxigênio dissolvido (frutos de tentativas de correção pelo controlador *fuzzy*). O segundo pico da concentração de oxigênio dissolvido (próximo à primeira hora) foi consequência da tentativa de enriquecimento de oxigênio puro no sistema. Devido à estabilização da demanda de oxigênio as faixas de QarEscolha e QO2Escolha foram ajustadas de modo a interromper o enriquecimento de oxigênio puro. Após o início da

alimentação suplementar o controle se estabilizou até o final do cultivo. De modo geral, o controle *fuzzy* de oxigênio dissolvido se deu apenas por variações na velocidade de agitação e na vazão de ar.

Mesmo apresentando diferenças consideráveis entre o metabolismo da *S. cerevisiae* e da *E. coli* (cujos dados foram utilizados para o desenvolvimento e otimização do controlador *fuzzy*) não houve interferência considerável no desempenho do controlador *fuzzy*. O controlador manipulou com sucesso a vazão de ar durante o cultivo, de modo a manter a concentração de oxigênio dissolvido próxima do valor de *setpoint* de 30%. Esta flexibilidade foi decorrente da transformação das faixas (limites) de QarEscolha e QO2Escolha em *inputs* (entradas) no LabVIEW, o que permitiu a manipulação de seus valores pelo usuário. A faixa de variação do limite de QarEscolha foi considerável em relação ao valor otimizado via simulação. Porém ficou dentro de uma variação já contemplada nos testes de robustez do controlador nebuloso (comprovando a robustez deste parâmetro). Ressalta-se que os parâmetros do controlador, otimizados via *ANFIS*, não foram modificados para este cultivo. Mesmo sendo empregado em um processo que difere daqueles utilizados durante o treinamento dos sistemas de inferência *fuzzy*, o controlador se mostrou uma ferramenta flexível e ao mesmo tempo robusta (bem como seus parâmetros). Os resultados mostram que o controlador *fuzzy* está apto a controlar as vazões de ar e oxigênio em um cultivo celular com poucos ajustes.

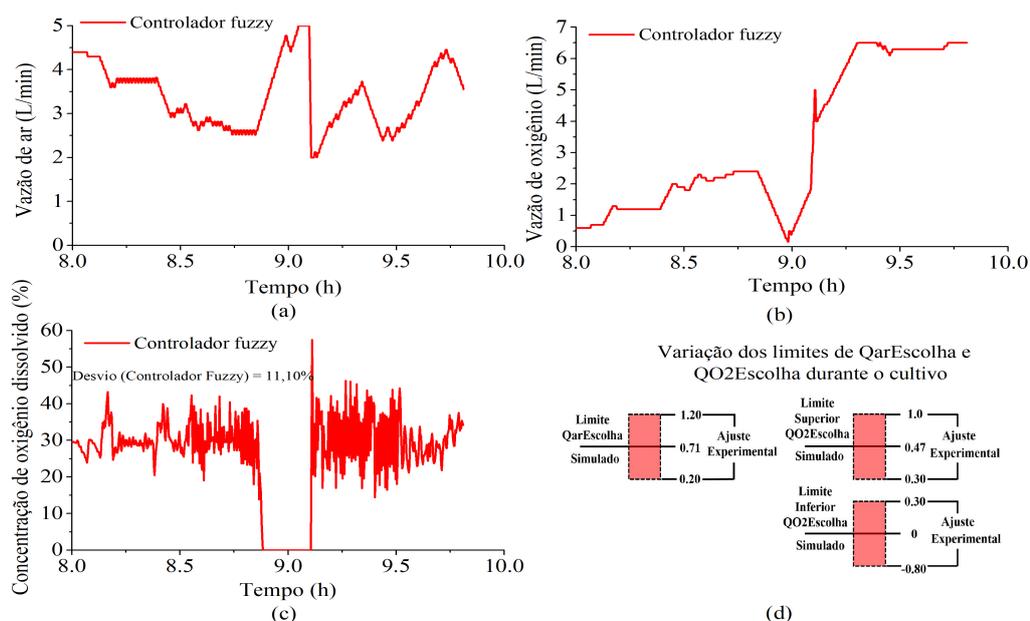
#### 4.2.2 Cultivo em biorreator da bactéria *Escherichia coli*

A segunda parte dos testes iniciais consistiu de cultivos de *E. coli* parcialmente controlados utilizando o controlador *Fuzzy* (ou seja, cultivos em que num primeiro momento a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada utilizando a árvore decisão e durante um segundo momento a árvore de decisão foi desativada e o controlador *fuzzy* assumiu o controle da concentração de oxigênio dissolvido). Em um deles, a árvore de decisão foi responsável pelo controle da concentração de oxigênio dissolvido até a oitava hora. O período remanescente foi controlado pelo sistema *fuzzy* (tal como descrito na Figura 28).

O primeiro período (cujos dados foram suprimidos) foi essencial para estabilizar o processo antes que o controlador nebuloso assumisse. As Figura 28a e 28b mostram a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente). A queda abrupta da vazão de oxigênio (e o conseqüente aumento da vazão de ar) decorreu da queda da pressão na linha de gás, causando

o esgotamento do oxigênio dissolvido. Após a regularização da pressão na linha de oxigênio, a elevada vazão de gás foi gradualmente substituída pelo enriquecimento de oxigênio puro (ocasionando oscilações na concentração de oxigênio dissolvido). Com exceção deste curto período, o perfil da concentração de oxigênio dissolvido apresentou um comportamento suave durante praticamente todo o cultivo (tal como mostra a Figura 28c). Esse comportamento oscilatório pontual contribuiu para um ajuste mais frequente dos valores limites de QarEscolha e QO2Escolha durante o período de reestabilização. Contudo estas variações foram pequenas (com desvios máximos de -0,80 e +0,53 a partir dos valores iniciais obtidos via simulação). Logo, é possível observar que os valores ajustados das faixas de QarEscolha e QO2Escolha ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (Figura 28d).

Figura 28 - Resultados do cultivo de inicial de *E. coli* parcialmente controlado pelo controlador *fuzzy*. Durante as primeiras oito horas o controle da concentração de oxigênio foi realizada via árvore de decisão (dados omitidos). No período remanescente (entre 8 e 10 horas) o controle foi realizado via controlador *fuzzy*. Da esquerda para direita tem-se: comportamento das vazões de ar **(a)** e oxigênio **(b)** em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso **(c)**. Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha **(d)** otimizadas heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

De modo geral, o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30% durante praticamente todo o cultivo, com uma rápida recuperação após um período de desoxigenação. É importante salientar que, embora a concentração de oxigênio dissolvido média tenha sido mantida a 26%, o desvio padrão aumentou para cerca de 11%. Isto foi decorrente do curto período de desoxigenação. Excluídos estes *outliers*, o desvio padrão cairia para 5,60%, tal como previsto nas simulações, com OD médio próximo de 30%. O período oscilatório subsequente foi curto em decorrência dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, o que prova a robustez dos parâmetros do controlador *fuzzy*. Contudo, foram observadas algumas flutuações na concentração de oxigênio dissolvido antes do distúrbio na pressão, o que levou a ajustes finos na estrutura do controlador *fuzzy*.

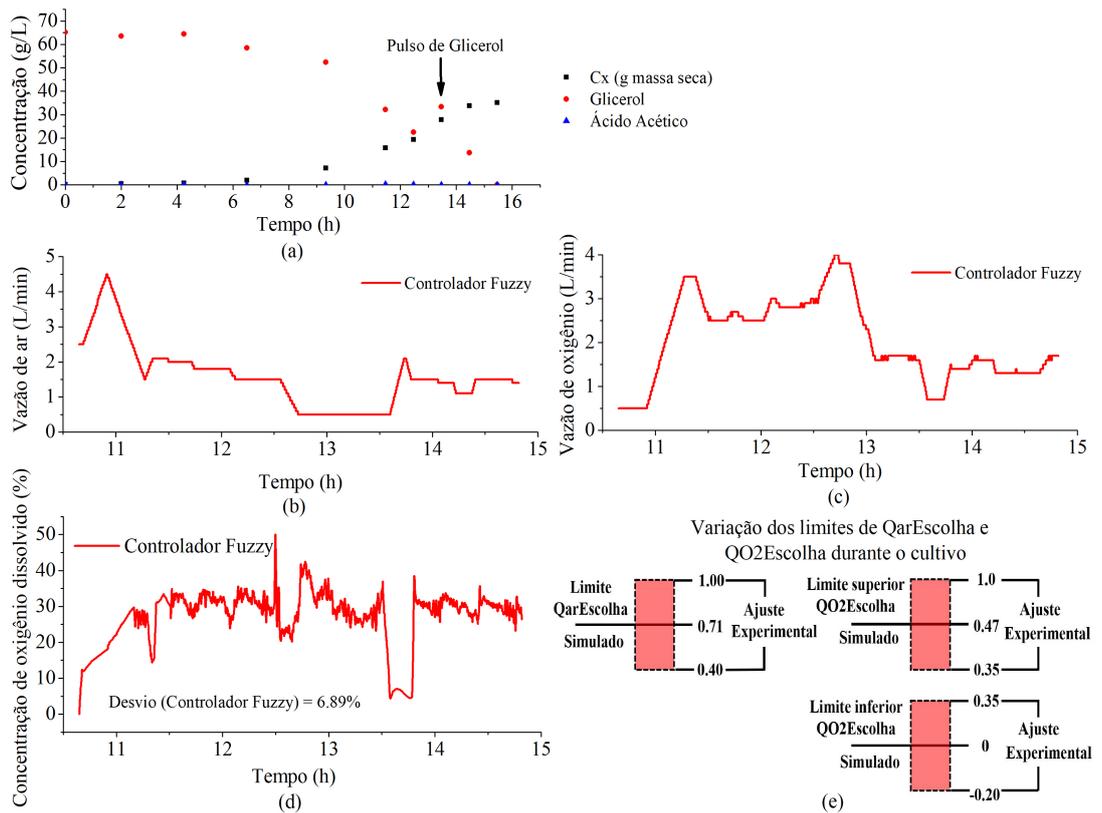
#### 4.2.3 Estrutura final do controlador *fuzzy* e testes com a *E. coli*

Utilizando a estrutura final do controlador *fuzzy* descrita pelas Figuras 16b e 17b (sistemas de inferência Delta e Princ1/Princ2, respectivamente), novos testes (baseados em cultivos de *E. coli*) foram realizados. Em um deles, as primeiras 10 horas foram supervisionadas pela árvore de decisão, enquanto que o período remanescente foi supervisionado pelo controlador *fuzzy*.

Analisando os resultados, foi possível obter uma concentração celular final de 35 g<sub>massa seca</sub>/L. A produção de ácido acético foi negligenciável (com uma concentração máxima atingida de 0,15 g/L, tal como mostra a Figura 29a). As Figuras 29b e 29c mostram a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente). É possível observar que ambas possuem um perfil suave (ou seja, os degraus nas vazões de ar e oxigênio foram abrandados, respeitando as limitações dos equipamentos). Conseqüentemente, a concentração de oxigênio dissolvido também apresentou um comportamento suavizado. A exceção foi o período próximo à décima terceira hora, quando um pulso de glicerol foi injetado no sistema, causando uma queda abrupta na concentração de oxigênio dissolvido (tal como mostra a Figura 29d). A rápida recuperação e estabilização da concentração de oxigênio dissolvido próxima ao seu *setpoint* de 30% provou, mais uma vez, a robustez do controlador *fuzzy*. A Figura 29e compara os resultados das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, otimizados via simulação (e utilizados como condições iniciais para o controlador *fuzzy*) e suas faixas máximas de variação (determinadas heurísticamente

durante o experimento). Ambos os limites ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (com desvios máximos de -0,31 e +0,53 a partir dos valores iniciais).

Figura 29 - Resultados do cultivo de inicial de *E. coli* parcialmente controlado pela versão otimizada do controlador *fuzzy*. Durante as primeiras dez horas o controle da concentração de oxigênio foi realizado via árvore de decisão (dados omitidos). No período remanescente (entre 10 e 15 horas) o controle foi realizado via controlador *fuzzy*. Da esquerda para direita tem-se: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol (a), comportamento das vazões de ar (b) e oxigênio (c) em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso (d). Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha (e) otimizadas heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

Observando os resultados verifica-se que o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30% durante praticamente todo o cultivo. É importante salientar que o desvio padrão ficou em 6,90% (excluindo os *outliers* o desvio padrão

seria de 3,93%), com ambos os valores dentro do padrão esperado. Este resultado positivo foi fruto dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha (que ficaram ainda mais próximos dos valores simulados).

Comparando as Figuras 28 e 29, os ajustes na estrutura do controlador nebuloso refletiram em uma melhora no controle da concentração de oxigênio dissolvido. Em relação à dinâmica das vazões de ar e oxigênio (apresentadas nas Figuras 29a e 29b), é possível observar um comportamento mais suave das variáveis manipuladas. As flutuações na concentração de oxigênio dissolvido, observadas na Figura 28c, foram atenuadas. Nota-se que o desvio padrão nos dados da Figura 29d foi menor que o apresentado no conjunto da Figura 28c (6,89% e 11,10%, respectivamente), o que pode ser interpretado como uma atenuação dos picos de concentração de oxigênio dissolvido. Ainda que algumas correções nos valores limites de QarEscolha e QO2Escolha tenham sido necessárias ao longo do cultivo (em ambos os experimentos), nota-se uma clara redução nos desvios (em relação aos valores obtidos via simulação) ao comparar as Figuras 28d e 29e. Este fato aponta para um aumento da estabilidade e do desempenho do controlador *fuzzy*, fruto nas modificações estruturais propostas.

Os resultados obtidos nos testes apresentados até aqui sugerem um controlador otimizado robusto e maduro, que atingiu um nível de implementação interessante. Tais testes reforçam a viabilidade do emprego da lógica nebulosa para o controle da concentração de oxigênio dissolvido em cultivos de *E. coli*. Com poucas modificações em sua estrutura, foi possível aprimorar os resultados obtidos anteriormente de forma a prosseguir com testes mais intensos e focados em momentos críticos, que requerem o controle preciso da concentração de oxigênio dissolvido (apresentados nos itens subsequentes).

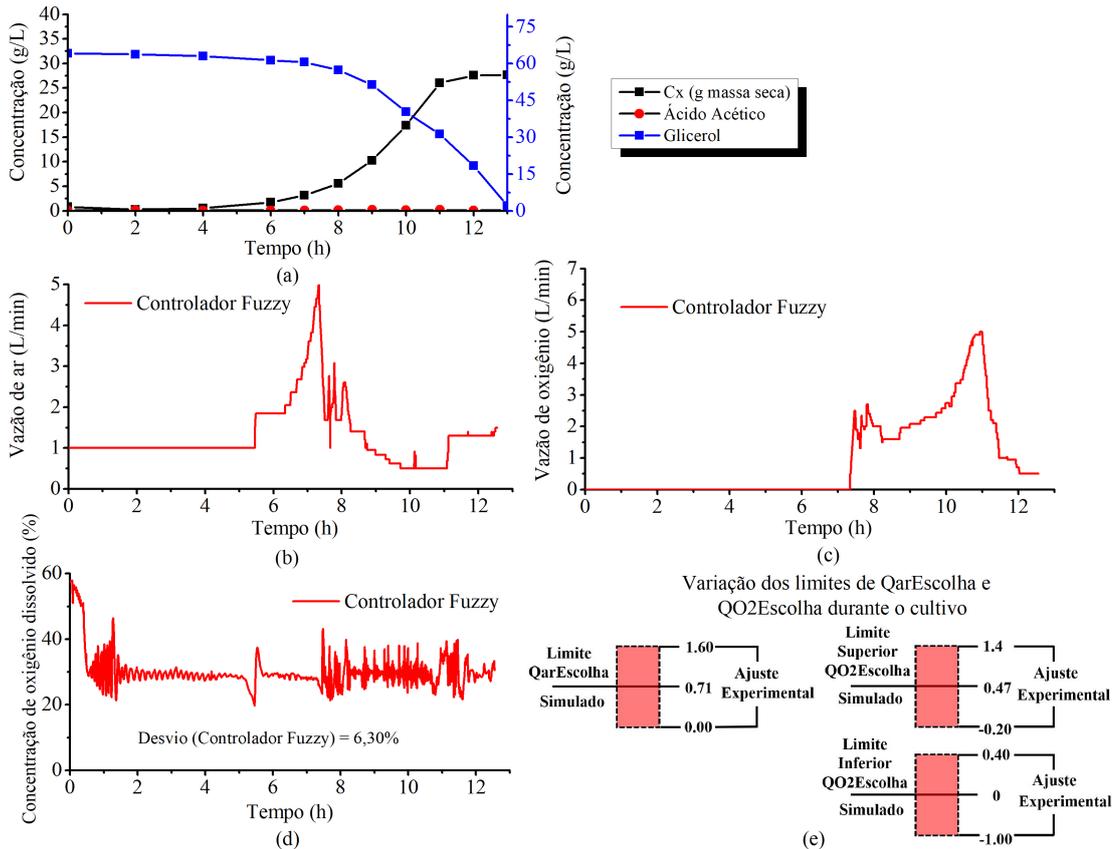
### 4.3 TESTES FINAIS EM BIORREATOR

Após os ajustes pontuais, derivados das análises dos resultados dos testes iniciais, foram realizados cultivos de batelada de *E. coli* inteiramente sob a supervisão do controlador *fuzzy* otimizado. O primeiro almejou a análise do sistema nebuloso controlando o cultivo de *E. coli* do começo ao fim. Já o segundo teste foi direcionado para análise de desempenho do mesmo durante a fase de indução da proteína recombinante.

### 4.3.1 Cultivo *E. coli* sem indução

Analisando os resultados, foi possível obter uma concentração celular final de 27,50  $\text{g}_{\text{massa seca}}/\text{L}$  (tal como mostra a Figura 30a). Novamente, a produção de ácido acético foi negligenciável (com uma concentração máxima atingida de 0,25 g/L, tal como apresentado na Figura 30a). As Figuras 30b e 30c mostram a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente). É possível observar que ambas possuem um perfil suave (ou seja, os degraus nas vazões de ar e oxigênio foram abrandados, respeitando as limitações dos equipamentos) durante quase todo o cultivo (principalmente durante a transição entre a aeração e o enriquecimento de oxigênio puro). Este comportamento refletiu em menos oscilações na concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, se manteve próxima ao seu *setpoint* durante quase todo o cultivo (tal como mostra a Figura 30d). A Figura 30e compara os resultados das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, otimizadas via simulação (e utilizadas como condições iniciais para o controlador *fuzzy*) e suas faixas máximas de variação (determinadas heurísticamente durante o experimento). Ambos os limites ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (com desvios máximos de -1,00 e +0,93 a partir dos valores iniciais).

Figura 30 - Resultados do cultivo *E. coli* controlado pela versão otimizada do controlador *fuzzy*: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol (a), comportamento das vazões de ar (b) e oxigênio (c) em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso (d). Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha (e) otimizadas heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

Observando os resultados verifica-se que o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30% durante praticamente todo o cultivo. É importante salientar que a concentração de oxigênio dissolvido média foi mantida a 30,50% e o desvio padrão ficou em 6,30% (valor dentro do padrão esperado). Este resultado muito positivo foi fruto dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha (que ficaram próximos dos valores simulados).

É possível notar que o metabolismo da cepa PspA4Pro (utilizada no cultivo) é mais lento do que da cepa PspA3 (utilizada para treinamento dos sistemas de inferência nebulosos –

HORTA, 2011). Todavia, o processo de melhoria contínua foi fundamental para incorporação destas diferenças intrínsecas. Tal como apresentado na seção 3.1, do capítulo de Material e Métodos, a análise do perfil do cultivo ficou a cargo dos sistemas Princ1 e Princ2. A escolha das variáveis linguísticas concentração de microrganismos (Cx) e velocidade específica de crescimento (mi) (e seus respectivos valores linguísticos) foi acertada, de modo que foi englobado um perfil de crescimento genérico e flexível. O perfil de crescimento está de acordo com o observado por SILVA (2015) e CARDOSO (2019) que utilizaram a mesma cepa.

É importante destacar que a manipulação das vazões de ar e oxigênio foi feita integralmente sob a supervisão do controlador *fuzzy*. Ao se comparar os perfis de atuação dos controladores de oxigênio dissolvido (árvore de decisão e lógica *fuzzy*) foi possível observar quatro fases: controle via agitação, saturação da agitação e início da vazão de ar, saturação da vazão de ar e troca pelo enriquecimento de oxigênio puro e por fim a queda no consumo de oxigênio com consequente diminuição da vazão de oxigênio. Esta similaridade reforça o argumento de que as tendências das necessidades de vazões de ar e oxigênio foram satisfeitas pelo controlador nebuloso otimizado, tanto nas simulações quanto no cultivo. Ao mesmo tempo, o seu comportamento se mostrou mais suave (ou seja, os degraus nas vazões de ar e oxigênio foram suavizados), o que refletiu diretamente numa diminuição dos picos de oxigênio dissolvido. Comparando com cultivos mais recentes (utilizando a mesma cepa PspA4 PRO), é possível observar que esse comportamento mais suave das vazões de ar e oxigênio refletiu numa atenuação dos picos de concentração de oxigênio dissolvido (CARDOSO, 2019; SILVA, 2015)

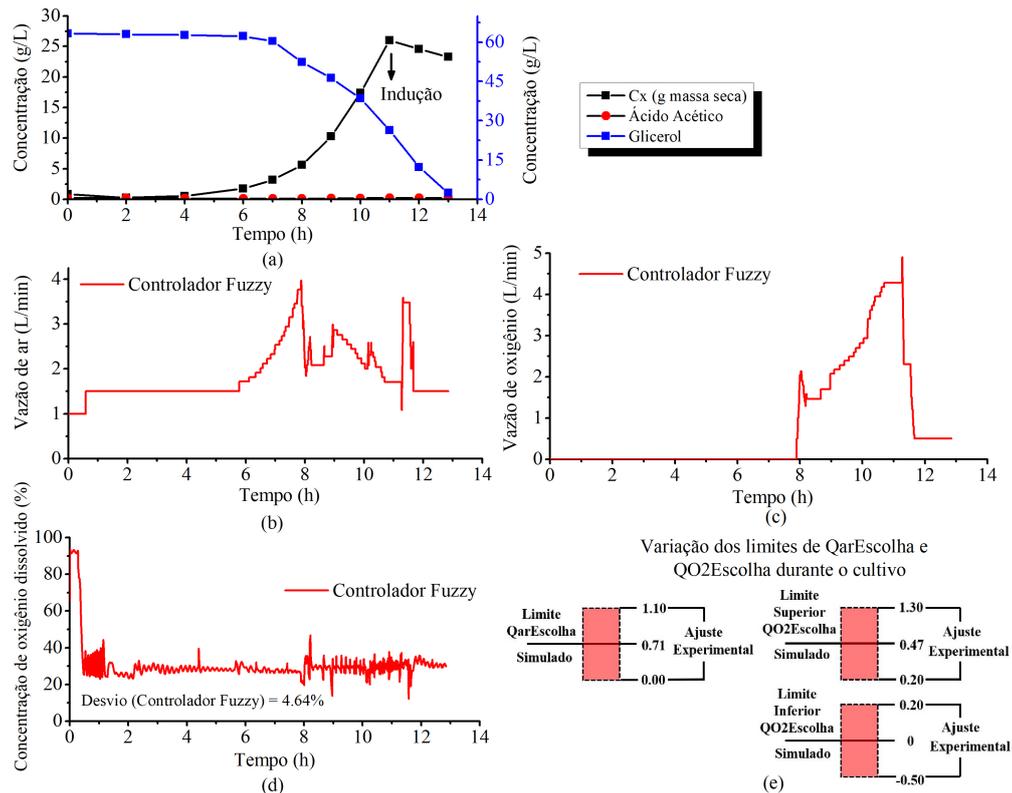
Por fim, devido aos fatores estruturais (limite da pressão interna do biorreator e limites dos fluxômetros de massa) e fatores ligados ao próprio cultivo (como aumento exponencial da temperatura e no requerimento de oxigênio), ele foi limitado até uma densidade óptica de cerca de 51. Contudo, foi atingido o objetivo de análise do desempenho do controlador *fuzzy* durante um cultivo completo de *E. coli*. O mesmo provou ter flexibilidade para manipulação das vazões de ar e oxigênio nos diferentes estágios do cultivo (da fase *lag* até a fase exponencial com alta concentração celular) mantendo, com sucesso, a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30%.

### 4.3.2 Cultivo de *E. coli* com indução

Como último teste foram realizados cultivos de *E. coli* seguidos de um período de indução. No primeiro cultivo, a indução se deu com uma  $DO_{600nm}$  de 42, sendo acompanhada por cerca de 2,5 horas. Já no segundo cultivo, a indução se deu com uma  $DO_{600nm}$  de 65, sendo acompanhada por cerca de 4,5 horas. Para ambos os cultivos foi utilizado o IPTG (1mM) como indutor.

Analisando os resultados do primeiro cultivo, foi possível obter uma concentração celular final de 26,40  $g_{massa\ seca}/L$  (tal como mostra a Figura 31a). Novamente, a produção de ácido acético foi negligenciável (com uma concentração máxima atingida de 0,23 g/L, tal como apresentado na Figura 31a). As Figuras 31b e 31c mostram a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente). Novamente, ambas apresentaram um perfil suave (respeitando as limitações dos equipamentos). Tanto durante a transição da aeração para o enriquecimento de oxigênio puro, quanto durante a fase de indução, os degraus nas vazões de ar e oxigênio foram abrandados. Este comportamento refletiu em menos oscilações na concentração de oxigênio dissolvido, que por sua vez, se manteve próxima ao seu *setpoint* durante quase todo o cultivo (tal como mostra a Figura 31d). A Figura 31e compara os resultados das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, otimizados via simulação (e utilizados como condições iniciais para o controlador *fuzzy*) e suas faixas máximas de variação (determinadas heurísticamente durante o experimento). Ambos os limites ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (com desvios máximos de -0,71 e +0,83 a partir dos valores iniciais).

Figura 31 - Resultados do cultivo *E. coli* com período curto de indução: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol (a), comportamento das vazões de ar (b) e oxigênio (c) em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso (d). Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha (e) otimizadas heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

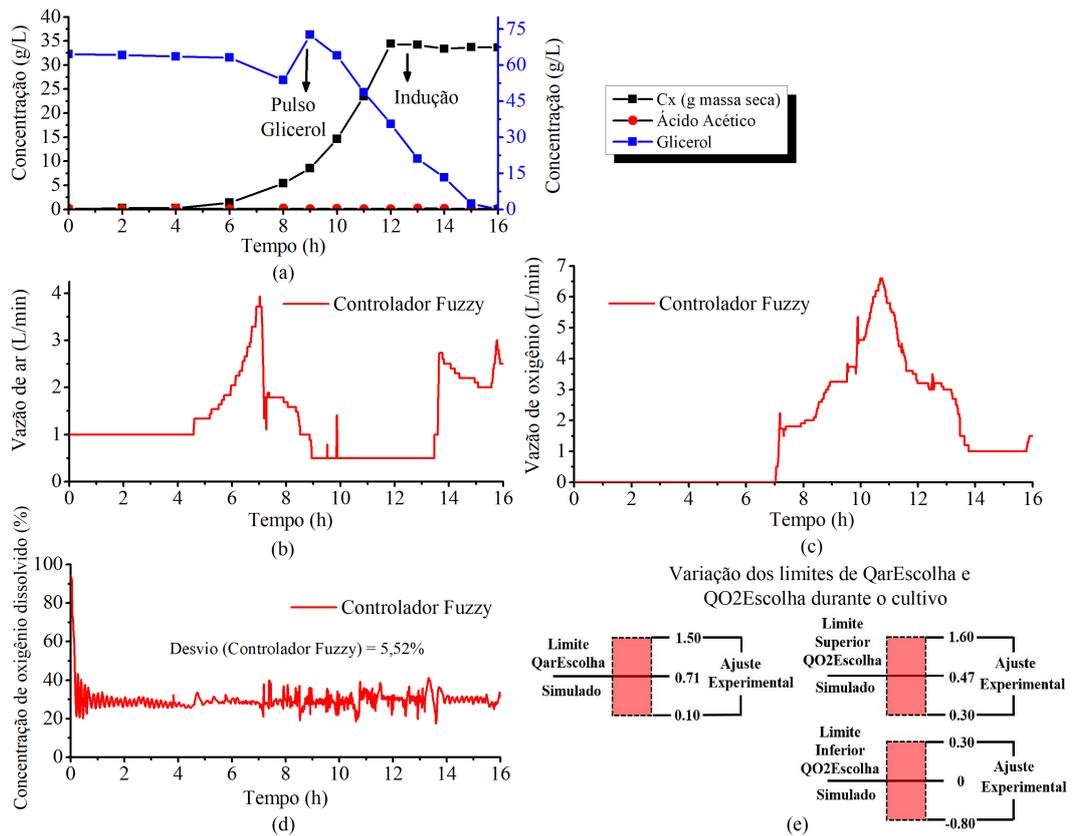
Observando os resultados verifica-se que o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu *setpoint* de 30% durante praticamente todo o cultivo. É importante salientar que a concentração de oxigênio dissolvido média foi mantida a 30,60% e o desvio padrão ficou em 10,53% (excluindo os *outliers* o desvio padrão seria de 4,64%), ambos os valores dentro do padrão esperado. Este resultado positivo decorreu dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha (que ficaram próximos dos valores simulados).

Diferentemente do cultivo sem indução, logo após a injeção do IPTG no biorreator ocorreu uma mudança drástica no metabolismo da *E. coli*, o que afetou a dinâmica do cultivo/ consumo de oxigênio. Tal como elucidado no capítulo de Revisão Bibliográfica, o IPTG é tóxico para a célula, e os recursos celulares são direcionados para a síntese da proteína

recombinante. Este comportamento é observado na Figura 31a, em que o crescimento celular praticamente cessa após a indução. Como consequência do *shift* metabólico, o consumo de oxigênio também é drasticamente afetado, exigindo ações mais incisivas por parte do controlador *fuzzy* (tal como mostram as Figuras 31b e 31c). Todavia, ressalta-se que mesmo durante uma fase crítica (com oscilações metabólicas), o controlador *fuzzy* manteve a porcentagem de oxigênio dissolvido próxima ao seu valor de *setpoint*. Comparando-se com os resultados obtidos por GONÇALVES (2015) e CARDOSO (2019), foi possível suavizar os picos de oxigênio dissolvido durante a indução, com comportamentos mais suaves das vazões de ar e oxigênio.

Para o segundo cultivo de alta densidade celular, o tempo de acompanhamento após a indução foi aumentado para 4,5 horas. Analisando os resultados do primeiro cultivo, foi possível obter uma concentração celular máxima de 35,00 g<sub>massa seca</sub>/L. Novamente, a produção de ácido acético foi negligenciável (com uma concentração máxima atingida de 0,17 g/L, tal como mostra a Figura 32a). As Figuras 32b e 32c mostram a dinâmica das vazões de ar e oxigênio (respectivamente). Novamente, ambas apresentaram um perfil suave (respeitando as limitações dos equipamentos). Tanto durante a transição entre a aeração e o enriquecimento de oxigênio puro, quanto durante a fase de indução os degraus nas vazões de ar e oxigênio foram abrandados. Este comportamento refletiu em uma menor quantidade de oscilações na concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, se manteve próxima ao seu *setpoint* durante quase todo o cultivo (tal como mostra a Figura 32d). A Figura 32e compara os resultados das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, otimizados via simulação (e utilizados como condições iniciais para o controlador *fuzzy*) e suas faixas máximas de variação (determinadas heurísticamente durante o experimento). Ambos os limites ficaram próximos aos obtidos durante as simulações (com desvios máximos de -0,80 e +1,13 a partir dos valores iniciais).

Figura 32 - Resultados do cultivo *E. coli* com período longo de indução: perfil de crescimento celular (massa seca), produção de ácido acético e consumo de glicerol (a), comportamento das vazões de ar (b) e oxigênio (c) em função do tempo, perfil da concentração de oxigênio dissolvido utilizando o controlador nebuloso (d). Faixas de ajustes experimentais dos limites de QarEscolha e QO2Escolha (e) otimizadas heurísticamente durante o cultivo.



Fonte: Acervo pessoal

Observando os resultados verifica-se que o controlador *fuzzy* manteve a concentração de oxigênio dissolvido próxima ao seu *setpoint* de 30% durante praticamente todo o cultivo. Importante salientar que a concentração de oxigênio dissolvido média foi mantida a 29,80% e o desvio padrão ficou em 5,52% (valor dentro do padrão esperado). Este resultado muito positivo foi fruto dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha (que ficaram próximos dos valores simulados).

Ao aumentar o período de indução, notou-se que a demanda por oxigênio dissolvido reduziu vertiginosamente num curto período de tempo, sendo o enriquecimento de oxigênio

puro (até então praticamente no máximo) substituído apenas pela agitação e aeração. Este perfil foi acompanhado com sucesso pelo controlador *fuzzy* através de modificações nas faixas (limites) de QarEscolha e QO2Escolha. Quando comparados os desvios de ambos os experimentos (Figuras 31e e 32e) com os seus valores simulados, é possível observar um aumento de ambos os desvios. Isso se deve ao comportamento mais oscilatório apresentado pelo cultivo durante uma indução prolongada. Como consequência, ações mais incisivas por parte do controlador *fuzzy* foram novamente exigidas (tal como descritas nas Figuras 32b, 32c e 32e). Ressalta-se que, mesmo durante uma fase crítica de mudança no metabolismo da *E. coli*, não foram observadas mudanças drásticas das faixas de QarEscolha e QO2Escolha (em relação aos valores simulados), o que comprova a robustez destes parâmetros. Comparando-se com os resultados obtidos por GONÇALVES (2015) e CARDOSO (2019), foi possível suavizar os picos de oxigênio dissolvido durante a indução, com comportamentos mais suaves das vazões de ar e oxigênio.

Outro fator que interferiu diretamente na concentração de oxigênio dissolvido foi a oscilação da temperatura. Tal como descrito nos resultados do cultivo sem indução, um dos limites para se estabelecer o fim do cultivo foi a saturação do sistema de controle de temperatura. Durante o cultivo de alta densidade celular aumenta-se exponencialmente a geração de calor, o que interfere na solubilidade do oxigênio no meio (quanto maior a temperatura, menor a solubilidade do oxigênio). Ao cessar o crescimento celular e direcionar os recursos para a síntese da proteína recombinante, o metabolismo diminuiu e, conseqüentemente, a geração de calor (o que aumentou a solubilidade do oxigênio). Este aumento da solubilidade, aliado com o menor consumo de oxigênio pela célula, faz com que o período de indução seja crítico em relação ao controle do oxigênio dissolvido, exigindo flexibilidade do controlador nebuloso. Mesmo assim o controlador manteve a porcentagem de oxigênio dissolvido próxima ao valor de *setpoint* de 30%.

Os resultados apresentados neste capítulo ilustram que o controlador *fuzzy* otimizado foi implementado com sucesso na ferramenta SUPERSYS. O mesmo se mostrou capaz de manter a concentração de oxigênio dissolvido próximo ao seu valor ótimo de 30% em cultivos de alta densidade celular por longos períodos de indução. A lógica *fuzzy* se mostrou uma alternativa viável para o controle do oxigênio dissolvido em biorreatores, sendo esta uma contribuição relevante na área de controle de bioprocessos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese foi provada a viabilidade da aplicação da lógica *fuzzy* para o controle da concentração de oxigênio dissolvido aplicado a bioprocessos. Em relação às estratégias clássicas de controle – baseadas em equações matemáticas complexas – a lógica *fuzzy* superou as não linearidades do controle da concentração de oxigênio dissolvido ao traduzir o conhecimento do especialista em um controlador baseado em linguística e regras condicionais. Além disso, da sua conceitualização até a operacionalização, o controlador *fuzzy* se mostrou mais simples e intuitivo do que as estratégias clássicas. Com variáveis de entrada e saída cuidadosamente selecionadas e dados de cultivo, o controlador nebuloso otimizado provou-se robusto (em relação aos seus parâmetros) e adaptável (uma vez que modificações podem ser facilmente realizadas dada sua subdivisão em sistemas independentes).

Os resultados das simulações mostraram que o comportamento das variáveis manipuladas (vazões de ar e oxigênio), obtido utilizando o controlador *fuzzy*, foi suavizado (quando comparado com as respostas obtidas utilizando a árvore de decisão). Como consequência, houve uma atenuação dos picos de concentração de oxigênio dissolvido. Em média, as simulações apontaram um desvio padrão abaixo de 5%, provando que os picos de oxigênio dissolvido foram atenuados. As modificações estruturais no controlador *fuzzy* se mostraram acertadas, trazendo o mesmo para um nível de implementação.

Após a implementação bem sucedida do controlador nebuloso na ferramenta SUPERSYS\_HCDC, os resultados dos testes iniciais apontaram sua viabilidade para o controle da concentração de oxigênio dissolvido e atestaram sua robustez durante situações críticas. Além disso, os valores das faixas de QarEscolha e QO2Escolha ficaram próximos aos resultados obtidos via simulação, provando a robustez dos parâmetros do controlador nebuloso.

Os resultados dos cultivos de *E. coli* sem indução provaram que o controlador *fuzzy* otimizado é capaz de controlar a concentração de oxigênio dissolvido em todas as fases do cultivo. Além disso, este controle foi realizado sem sobrecarregar os fluxômetros de massa (transições entre aeração e o enriquecimento de oxigênio puro foram suavizadas). Os cultivos de alta densidade celular foram acompanhados também por períodos de indução (momento em que o metabolismo da *E. coli* é alterado, influenciando na dinâmica do cultivo/consumo de oxigênio). O controlador nebuloso respondeu de forma ágil e com poucas oscilações até retornar ao ponto de equilíbrio. Toda esta flexibilidade derivou dos valores ajustáveis das faixas de QarEscolha e QO2Escolha, cujos valores ficaram próximos aos obtidos durante as simulações.

De forma geral, os resultados apresentados nesta tese atestam não apenas um aumento da vida útil dos fluxômetros de massa (dada a sua sensibilidade a oscilações abruptas nas vazões de ar e oxigênio), mas também apontam para uma possível redução do estresse metabólico sofrido pela *E. coli* (dada sua sensibilidade a oscilações na concentração de oxigênio dissolvido). Investigações adicionais podem atestar um aumento de produtividade da proteína recombinante e uma possível redução nos custos de produção.

Computacionalmente, o controlador *fuzzy* provou sua flexibilidade ao ser implementado em dois *softwares* de programação bem estabelecidos (MATLAB e LabVIEW). Além disso, o controlador otimizado é uma importante atualização do programa de monitoramento e controle de biorreatores (SUPERSYS\_HCDC). Ao incorporar a lógica nebulosa no módulo de controle de concentração de oxigênio dissolvido foi possível simplificar a lógica de controle e fornecer mais flexibilidade ao permitir pequenos ajustes pelo operador durante o cultivo. Dada a diversidade de cultivos já realizados utilizando o SUPERSYS\_HCDC, é possível concluir que mais estudos, com diferentes microrganismos, serão beneficiados com um controle robusto da concentração de oxigênio dissolvido.

Ainda que a aplicabilidade da lógica *fuzzy* tenha sido exitosa em diversas áreas, sua implementação no controle de biorreatores é tímida. Esta tese é uma das poucas aplicações recentes, numa tentativa de rediscutir o tema do controle de oxigênio dissolvido em biorreatores, uma área que requer soluções novas para problemas complexos.

Em virtude dos resultados mostrados na tese, ainda há um campo fértil de investigações a serem feitas. Algumas sugestões para trabalhos futuros são:

A) Otimização automática das faixas de QarEscolha e QO2Escolha baseada numa ferramenta de inteligência artificial.

B) Testes com o controlador nebuloso otimizado em outros cultivos celulares.

C) Avaliar o desempenho de uma versão simplificada do controlador *fuzzy*. Simplificando o número de variáveis de entrada, seria possível desvincular o controlador de variáveis que dependem de sensores de alto custo e difícil manutenção.

D) Integrar o controle PID da agitação ao controlador nebuloso ou atualizá-lo empregando técnicas de inteligência artificial.

E) Realizar um estudo dos fluxômetros de massa a fim de determinar um possível aumento na vida útil das partes mecânicas.

F) Dada a modularidade do SUPERSYS\_HCDC – característica extremamente atrativa para pesquisadores na área de otimização e controle – são sugeridos estudos exploratórios em outros módulos que influenciam diretamente a concentração de oxigênio dissolvido:

- Otimização do módulo de controle da temperatura e atualização da estrutura física do banho térmico. Dada a correlação direta entre o aumento da temperatura e a diminuição da solubilidade, faz-se necessário um controle preciso da temperatura. Este apresenta alguns problemas de desempenho durante a fase de alta densidade celular.

- Propor um mecanismo de controle integrando os módulos de controle de oxigênio dissolvido, temperatura e alimentação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIOĞLU, S. et al. Fuzzy Control with Genetic Algorithm in a Batch Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 2201–2219, dez. 2013.
- AKISUE, R. A.; HORTA, A. C. L.; DE SOUSA, R. Development of a fuzzy system for dissolved oxygen control in a recombinant Escherichia coli cultivation for heterologous protein expression. Em: **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 43p. 1129–1134.
- AL-HMOUZ, A. et al. Modeling and Simulation of an Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) for Mobile Learning. **IEEE Transactions on Learning Technologies**, v. 5, n. 3, p. 226–237, jul. 2012.
- AREVALO, H. et al. Gain-Scheduled Oxygen Concentration Control System for a Bioreactor. **IEEE Latin America Transactions**, v. 16, n. 11, p. 2689–2697, nov. 2018.
- BABAEIPOUR, V. et al. Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant Escherichia coli. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 112–117, jan. 2007.
- BADINO JR, A. C. Notas de aula: Agitação e Aeração em Biorreatores. Em: 1. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1.
- BAEZ, A.; MAJDALANI, N.; SHILOACH, J. Production of recombinant protein by a novel oxygen-induced system in Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 50, dez. 2014.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2nd ed ed. New York: McGraw-Hill, 1986.
- BEALE, M.; HAGAN, M. T.; DEMUTH, H. B. **Neural Network Toolbox: User's Guide**. 37. ed. Natick, MA, EUA: MathWorks Inc, 2017. v. 1
- BĚLOHLÁVEK, R.; DAUBEN, J. W.; KLIR, G. J. **Fuzzy logic and mathematics: a historical perspective**. New York, NY, United States of America: Oxford University Press, 2017.
- BETTENBROCK, K. et al. Towards a Systems Level Understanding of the Oxygen Response of Escherichia coli. Em: **Advances in Microbial Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 64p. 65–114.
- BLOOIS, E. VAN. **Letting bacteria breath**, 30 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.edwinvanbloois.com/2019/12/30/letting-bacteria-breathe/>>
- BOJORGE, N. **Dinâmica de modelagem de processos** Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 8 set. 2009.
- BOJORGE, N. **Modelagem de Processos - Técnicas de Linearização** Universidade Federal Fluminense (UFF), 2017.

CARCAMO, M. et al. Effective Dissolved Oxygen Control Strategy for High-Cell-Density Cultures. **IEEE Latin America Transactions**, v. 12, n. 3, p. 389–394, maio 2014.

CARDOSO, V. M. **Produção de proteína recombinante A de superfície de pneumococo em Escherichia coli: análise econômica e influência da plataforma de expressão**. Tese—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2019.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 396–408, abr. 2013.

CARVALHO, R. J. et al. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in Escherichia coli using different carbon sources and chromatography sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 683–694, maio 2012.

CDC, C. FOR D. C. AND P. E coli (**Escherichia coli**), 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. **Biotechnology**. Second edition ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP Cell, Academic Cell is an imprint of Elsevier, 2016.

DEMUTH, H.; BEALE, M. **Neural Network Toolbox: for Use with MATLAB**. 4. ed. Natick, MA, EUA: MathWorks Inc, 2004. v. 1

DIAZ, C. et al. Adaptive predictive control of dissolved oxygen concentration in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 21–32, nov. 1995.

DVORAK, P. et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 201, dez. 2015.

ESTRADA-FLORES, S. et al. Development and validation of “grey-box” models for refrigeration applications: A review of key concepts. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 6, p. 931–946, set. 2006.

FAULKNER, E. et al. Use of Fed-Batch Cultivation for Achieving High Cell Densities for the Pilot-Scale Production of a Recombinant Protein (Phenylalanine Dehydrogenase) in Escherichia coli. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 3, p. 889–897, 2 jun. 2006.

FAUST, G. et al. Feeding strategies enhance high cell density cultivation and protein expression in milliliter scale bioreactors. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 10, p. 1293–1303, out. 2014.

GOMES, J.; MENAWAT, A. S. Fed-batch bioproduction of spectinomycin. Em: **Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis**. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1998. v. 59p. 1–46.

GOMIDE, F. A. C.; GUDWIN, R. R. MODELAGEM. CONTROLE, SISTEMAS E LÓGICA FUZZY. **SBA Controle & Automação**, v. 4, n. 3, p. 19, 1994.

HENKEL, S. G. et al. Basic Regulatory Principles of Escherichia coli’s Electron Transport Chain for Varying Oxygen Conditions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107640, 30 set. 2014.

HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Fuzzy control of bioprocess. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 401–408, jan. 2000.

HORIUCHI, J.-I.; KISHIMOTO, M. Application of fuzzy control to industrial bioprocesses in Japan. **Fuzzy Sets and Systems**, v. 128, n. 1, p. 117–124, maio 2002.

HORTA, A. C. L. **Sistema Automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de E. coli recombinante**. Tese—São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

HORTA, A. C. L. et al. Robust artificial intelligence tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant E. coli cultivations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 7, p. 891–901, set. 2011.

HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of rE. coli for production of S. pneumoniae antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1269–1280, out. 2012.

HORTA, A. C. L. et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 457–468, jun. 2014.

HSIAO, J. et al. Adaptive Control Strategy for Maintaining Dissolved Oxygen Concentration in High Density Growth of Recombinant E. coli. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 665, n. 1 Biochemical E, p. 320–333, out. 1992.

JANG, J.-S. R. ANFIS: adaptive-network-based fuzzy inference system. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. 23, n. 3, p. 665–685, jun. 1993.

JESUINO, A. C. B. M. **Diferentes estratégias de cultivo de Escherichia coli recombinante para produção de proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)**. Doctoral dissertation—Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

KONSTANTINOV, K. B.; YOSHIDA, T. Knowledge-based control of fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 5, p. 479–486, 5 mar. 1992.

KOPOT, A. **Regulation of Citric Acid Cycle**: Biochemistry: Introduction to proteins., 2015. Disponível em: <<http://www.aklectures.com/subject/biochemistry#184-Carbohydrate%20Metabolism>>. Acesso em: 2 dez. 2017

KRISHNA RAO, D. V. et al. Impact of dissolved oxygen concentration on some key parameters and production of rhG-CSF in batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 991–1000, set. 2008.

LASKA, M. E. **The effect of dissolved oxygen on recombinant protein degradation in Escherichia coli**. Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2001.

LEE, C. C. Fuzzy logic in control systems: fuzzy logic controller. I. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. 20, n. 2, p. 404–418, abr. 1990.

- LEE, S. C. et al. Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 7, p. 597–607, 25 mar. 1991.
- LEE, S. C. et al. Characteristics and performance of an autotuning proportional integral derivative controller for dissolved oxygen concentration. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 4, p. 447–450, jul. 1994.
- LEE, S. Y. High cell-density culture of escherichia coli. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, 1996.
- LI, X.; ROBBINS, J. W.; TAYLOR, K. B. Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant Escherichia coli strains. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, jan. 1992.
- LIN, C. et al. Optimization of culture conditions to improve the expression level of beta1-epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type B in *Escherichia coli*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 324–331, 3 mar. 2016.
- LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004–1011, abr. 1990.
- MAJEWSKI, R. A.; DOMACH, M. M. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in E. coli. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, p. 732–738, 25 mar. 1990.
- MÄRKL, H. et al. Cultivation of Escherichia coli to high cell densities in a dialysis reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 48–52, abr. 1993.
- MARTIN, T. W.; COUCH, L. T. Fuzzy Logic Control of Dissolved Oxygen in a Bioreactor. **Proceedings of IEEE 5th International Fuzzy Systems**, p. 936–940, 8 nov. 1996.
- MATHWORKS. **Fuzzy Logic Toolbox: User's Guide**. 33. ed. Natick, MA, EUA: MathWorks Inc, 2018. v. 1
- MATS, Å.; HAGANDER, P. **Control of dissolved oxygen in stirred bioreactors**. [s.l.] Lund Institute of Technology (LTH), 1998. Disponível em: <<https://portal.research.lu.se/en/publications/control-of-dissolved-oxygen-in-stirred-bioreactors>>.
- MATSUOKA, Y.; KURATA, H. Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in Escherichia coli at different oxygen concentrations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 183, dez. 2017.
- MESQUITA, T. J. B. et al. Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 150, dez. 2019.
- MORI, H. et al. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. **JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN**, v. 12, n. 4, p. 313–319, 1979.

MUNOZ, A. A. G.; QUINTERO, O. L. **Comparison on the Estimation of the Biomass of a Batch Bioreactor through Fuzzy Systems, Neural Networks and Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System**. 2011 International Conference on Technologies and Applications of Artificial Intelligence. **Anais...** Em: 2011 INTERNATIONAL CONFERENCE ON TECHNOLOGIES AND APPLICATIONS OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE (TAAI). Chung-Li, TBD, Taiwan: IEEE, nov. 2011. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6120717/>>. Acesso em: 21 dez. 2021

NAKAMURA, T.; KURATANI, T.; MORITA, Y. Fuzzy Control Application to Glutamic Acid Fermentation. **IFAC Proceedings Volumes**, v. 18, n. 17, p. 231–235, dez. 1985.

NAKANO, K. et al. Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 5, p. 597–601, 1997.

NATIONAL INSTRUMENTS. **LabVIEW**, 2019. Disponível em: <<https://www.ni.com/pt-br/shop/labview.html>>. Acesso em: 3 abr. 2019

NELLES, O. **Nonlinear system identification: from classical approaches to neural networks and fuzzy models**. [s.l.: s.n.].

NUCCI, E. R. et al. A fuzzy logic algorithm for identification of the harvesting threshold during PGA production by Bacillus megaterium. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 521–527, dez. 2005.

O'BEIRNE, D.; HAMER, G. Oxygen availability and growth of Escherichia coli W3110: Dynamic responses to limitation and starvation. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 4, p. 381–387, 20 out. 2000a.

O'BEIRNE, D.; HAMER, G. Oxygen availability and the growth of Escherichia coli W3110: A problem exacerbated by scale-up. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 5, p. 487–494, 22 nov. 2000b.

PAREDES, S. A. H. **Escherichia coli detoxificada como plataforma para produção de proteína recombinante A de superfície de pneumococo**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2018.

PHAM, P. V. Medical Biotechnology. Em: **Omics Technologies and Bio-Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 449–469.

PHUE, J.-N.; SHILOACH, J. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of E. coli BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. **Metabolic Engineering**, v. 7, n. 5–6, p. 353–363, set. 2005.

RIESENBERG, D. High-cell-density cultivation of Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 380–384, jun. 1991.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422–430, 23 abr. 1999.

SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 33, dez. 2016.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r.Ecoli utilizando glicerol como fonte de carbono**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial - Vol.2 Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001.

SEBORG, D. E.; EDGAR, T. F.; MELLICHAMP, D. A. **Process dynamics and control**. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2004.

SHALEL-LEVANON, S.; SAN, K.-Y.; BENNETT, G. N. Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 7, n. 5–6, p. 364–374, set. 2005.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 5, p. 345–357, jul. 2005.

SHIOYA, S.; SHIMIZU, K.; YOSHIDA, T. Knowledge-based design and operation of bioprocess systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 3, p. 261–266, jan. 1999.

SHOJAOSADATI, S. A. et al. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. **IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY**, v. 6, n. 2, p. 22, 2008.

SILVA, G. G. **Aspectos morfológicos, reológicos e fisiológicos dos cultivos de escherichia coli recombinante**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2015.

SOUSA JÚNIOR, R. **Aplicação da lógica nebulosa no controle de reatores bioquímicos para a produção de Cefalosporina C em regime de batelada alimentada**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1999.

SOUSA, R.; ALMEIDA, P. I. F. Design of a fuzzy system for the control of a biochemical reactor in fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 461–469, dez. 2001.

SPIRO, S.; GUEST, J. R. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 310–314, jan. 1991.

STEPHANOPOULOS, G. **Chemical process control: an introduction to theory and practice**. Englewood Cliffs, N.J: Prentice-Hall, 1984.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Control of carbon source supply and dissolved oxygen by use of carbon dioxide concentration of exhaust gas in fed-batch culture. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 4, p. 317–326, jan. 1986.

TAKAGI, T.; SUGENO, M. Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. SMC-15, n. 1, p. 116–132, jan. 1985.

TAKEMURA, R. Y. **Controle inteligente: lógica difusa**, 2016. Disponível em: <<http://www.din.uem.br/ia/control/index.html>>. Acesso em: 2 ago. 2016

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12. ed. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

UNDEN, G. et al. Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, n. 1–3, p. 3–22, 1994.

YASUNOBU, S.; MIYAMOTO, S.; IHARA, H. FUZZY CONTROL FOR AUTOMATIC TRAIN OPERATION SYSTEM. Em: **Readings in Fuzzy Sets for Intelligent Systems**. [s.l.] Elsevier, 1993. p. 348–354.

ZADEH, L. A. Fuzzy Sets. **Information and control**, v. 8, n. 3, p. 338–353, 1965.

ZADEH, L. A. Fuzzy logic and approximate reasoning. **Sythese**, v. 30, p. 22, 1975.

ZADEH, L. A. Fuzzy logic, Neural Networks, and Soft Computing. **Communications of the ACM**, v. 37, n. 3, p. 77–84, 1994.

ZHAO, C. et al. Improvement of the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* by application of a dissolved oxygen stage control strategy. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 843–854, jun. 2016.

## APÊNDICE A – REGRAS NEBULOSAS AJUSTADAS PARA OS SISTEMAS PRINC1 E PRINC2

Na Tabela 5 são descritas as regras nebulosas para os sistemas Princ1 e Princ2 (ajustados pelo *ANFIS*). Uma vez que ambos os sistemas de inferência *fuzzy* possuem as mesmas variáveis linguísticas (e os mesmos valores linguísticos), foram ajustadas as mesmas 108 regras nebulosas para cada sistema. Logo é apresentada apenas uma tabela para ambos os sistemas.

Tabela 5 - Regras nebulosas para os sistemas de inferência Princ1 e Princ2 ajustadas pelo *ANFIS*

Regra	Agit	DO	Mi	CX	QarSe	Saída
1	MP	BP	BP	MP	INSAT	F1
2	MP	BP	BP	MP	SAT	F2
3	MP	BP	BP	MP	SUPERSAT	F3
4	MP	BP	BP	AP	INSAT	F4
5	MP	BP	BP	AP	SAT	F5
6	MP	BP	BP	AP	SUPERSAT	F6
7	MP	BP	MP	MP	INSAT	F7
8	MP	BP	MP	MP	SAT	F8
9	MP	BP	MP	MP	SUPERSAT	F9
10	MP	BP	MP	AP	INSAT	F10
11	MP	BP	MP	AP	SAT	F11
12	MP	BP	MP	AP	SUPERSAT	F12
13	MP	MP	BP	MP	INSAT	F13
14	MP	MP	BP	MP	SAT	F14
15	MP	MP	BP	MP	SUPERSAT	F15
16	MP	MP	BP	AP	INSAT	F16
17	MP	MP	BP	AP	SAT	F17
18	MP	MP	BP	AP	SUPERSAT	F18
19	MP	MP	MP	MP	INSAT	F19
20	MP	MP	MP	MP	SAT	F20
21	MP	MP	MP	MP	SUPERSAT	F21
22	MP	MP	MP	AP	INSAT	F22
23	MP	MP	MP	AP	SAT	F23
24	MP	MP	MP	AP	SUPERSAT	F24
25	MP	AP	BP	MP	INSAT	F25

26	MP	AP	BP	MP	SAT	F26
27	MP	AP	BP	MP	SUPERSAT	F27
28	MP	AP	BP	AP	INSAT	F28
29	MP	AP	BP	AP	SAT	F29
30	MP	AP	BP	AP	SUPERSAT	F30
31	MP	AP	MP	MP	INSAT	F31
32	MP	AP	MP	MP	SAT	F32
33	MP	AP	MP	MP	SUPERSAT	F33
34	MP	AP	MP	AP	INSAT	F34
35	MP	AP	MP	AP	SAT	F35
36	MP	AP	MP	AP	SUPERSAT	F36
37	AP	BP	BP	MP	INSAT	F37
38	AP	BP	BP	MP	SAT	F38
39	AP	BP	BP	MP	SUPERSAT	F39
40	AP	BP	BP	AP	INSAT	F40
41	AP	BP	BP	AP	SAT	F41
42	AP	BP	BP	AP	SUPERSAT	F42
43	AP	BP	MP	MP	INSAT	F43
44	AP	BP	MP	MP	SAT	F44
45	AP	BP	MP	MP	SUPERSAT	F45
46	AP	BP	MP	AP	INSAT	F46
47	AP	BP	MP	AP	SAT	F47
48	AP	BP	MP	AP	SUPERSAT	F48
49	AP	MP	BP	MP	INSAT	F49
50	AP	MP	BP	MP	SAT	F50
51	AP	MP	BP	MP	SUPERSAT	F51
52	AP	MP	BP	AP	INSAT	F52
53	AP	MP	BP	AP	SAT	F53
54	AP	MP	BP	AP	SUPERSAT	F54
55	AP	MP	MP	MP	INSAT	F55
56	AP	MP	MP	MP	SAT	F56
57	AP	MP	MP	MP	SUPERSAT	F57
58	AP	MP	MP	AP	INSAT	F58
59	AP	MP	MP	AP	SAT	F59
60	AP	MP	MP	AP	SUPERSAT	F60
61	AP	AP	BP	MP	INSAT	F61
62	AP	AP	BP	MP	SAT	F62
63	AP	AP	BP	MP	SUPERSAT	F63

64	AP	AP	BP	AP	INSAT	F64
65	AP	AP	BP	AP	SAT	F65
66	AP	AP	BP	AP	SUPERSAT	F66
67	AP	AP	MP	MP	INSAT	F67
68	AP	AP	MP	MP	SAT	F68
69	AP	AP	MP	MP	SUPERSAT	F69
70	AP	AP	MP	AP	INSAT	F70
71	AP	AP	MP	AP	SAT	F71
72	AP	AP	MP	AP	SUPERSAT	F72
73	MAP	BP	BP	MP	INSAT	F73
74	MAP	BP	BP	MP	SAT	F74
75	MAP	BP	BP	MP	SUPERSAT	F75
76	MAP	BP	BP	AP	INSAT	F76
77	MAP	BP	BP	AP	SAT	F77
78	MAP	BP	BP	AP	SUPERSAT	F78
79	MAP	BP	MP	MP	INSAT	F79
80	MAP	BP	MP	MP	SAT	F80
81	MAP	BP	MP	MP	SUPERSAT	F81
82	MAP	BP	MP	AP	INSAT	F82
83	MAP	BP	MP	AP	SAT	F83
84	MAP	BP	MP	AP	SUPERSAT	F84
85	MAP	MP	BP	MP	INSAT	F85
86	MAP	MP	BP	MP	SAT	F86
87	MAP	MP	BP	MP	SUPERSAT	F87
88	MAP	MP	BP	AP	INSAT	F88
89	MAP	MP	BP	AP	SAT	F89
90	MAP	MP	BP	AP	SUPERSAT	F90
91	MAP	MP	MP	MP	INSAT	F91
92	MAP	MP	MP	MP	SAT	F92
93	MAP	MP	MP	MP	SUPERSAT	F93
94	MAP	MP	MP	AP	INSAT	F94
95	MAP	MP	MP	AP	SAT	F95
96	MAP	MP	MP	AP	SUPERSAT	F96
97	MAP	AP	BP	MP	INSAT	F97
98	MAP	AP	BP	MP	SAT	F98
99	MAP	AP	BP	MP	SUPERSAT	F99
100	MAP	AP	BP	AP	INSAT	F100
101	MAP	AP	BP	AP	SAT	F101
102	MAP	AP	BP	AP	SUPERSAT	F102

103	MAP	AP	MP	MP	INSAT	F103
104	MAP	AP	MP	MP	SAT	F104
105	MAP	AP	MP	MP	SUPERSAT	F105
106	MAP	AP	MP	AP	INSAT	F106
107	MAP	AP	MP	AP	SAT	F107
108	MAP	AP	MP	AP	SUPERSAT	F108

---

Fonte: Acervo pessoal

**APÊNDICE B – PARÂMETROS DE SAÍDA DAS FUNÇÕES LINEARES DO  
SISTEMA NEBULOSO PRINC1**

Na Tabela 6 são descritos os parâmetros das funções lineares de saída para o sistema Princ1 (ajustados pelo *ANFIS*).

Tabela 6 – Parâmetros *a, b, c, d, e e f* das funções lineares de saída do sistema Princ1

Função	a	b	c	d	e	f
F1	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F2	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,32 \times 10^{-3}$	$0,31 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F3	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-5}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F4	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F5	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,31 \times 10^{-3}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F6	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,24 \times 10^{-5}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F7	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F8	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,33 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F9	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,21 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F10	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,95 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F11	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,32 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F12	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,22 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F13	$0,55 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F14	$0,55 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F15	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,81 \times 10^{-6}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F16	$0,41 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F17	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F18	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,11 \times 10^{-5}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F19	$0,55 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F20	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,14 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F21	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,10 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-4}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F22	$0,41 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,97 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F23	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F24	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,10 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F25	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,14 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F26	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,60 \times 10^{-5}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F27	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,25 \times 10^{-6}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F28	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F29	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,61 \times 10^{-5}$	$0,25 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$

F30	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-6}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F31	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F32	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,61 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F33	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,41 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
F34	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,96 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,24 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F35	$0,40 \times 10^{-3}$	$0,59 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F36	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,41 \times 10^{-6}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F37	$0,63 \times 10^{-5}$	$0,83 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10^{-7}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,18 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F38	$0,42 \times 10^{-4}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,22 \times 10^{-7}$	$0,91 \times 10^{-6}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F39	$0,40 \times 10^{-4}$	$0,32 \times 10^{-4}$	$0,21 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F40	$-0,22 \times 10^{-5}$	$0,83 \times 10^{-2}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-7}$	$0,97 \times 10^{-7}$
F41	$0,33 \times 10^{-4}$	$0,52 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-7}$	$0,15 \times 10^{-4}$	$0,67 \times 10^{-7}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F42	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,32 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F43	$0,63 \times 10^{-5}$	$0,83 \times 10^{-2}$	$0,67 \times 10^{-7}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,18 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F44	$0,42 \times 10^{-4}$	$0,52 \times 10^{-3}$	$0,84 \times 10^{-7}$	$0,91 \times 10^{-6}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F45	$0,40 \times 10^{-4}$	$0,32 \times 10^{-4}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F46	$-0,21 \times 10^{-5}$	$0,83 \times 10^{-2}$	$0,46 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-7}$	$0,13 \times 10^{-7}$	$0,97 \times 10^{-7}$
F47	$0,33 \times 10^{-4}$	$-0,52 \times 10^{-3}$	$0,63 \times 10^{-7}$	$0,15 \times 10^{-4}$	$0,67 \times 10^{-7}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F48	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,62 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,14 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F49	$-0,16 \times 10^{-3}$	$0,41 \times 10^{-2}$	$-0,29 \times 10^{-8}$	$-0,43 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-8}$	$-0,27 \times 10^{-7}$
F50	$0,52 \times 10^{-4}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,23 \times 10^{-7}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,98 \times 10^{-7}$	$0,19 \times 10^{-6}$
F51	$0,39 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,21 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F52	$-0,16 \times 10^{-3}$	$0,41 \times 10^{-2}$	$-0,82 \times 10^{-8}$	$-0,69 \times 10^{-5}$	$0,29 \times 10^{-8}$	$-0,62 \times 10^{-7}$
F53	$0,44 \times 10^{-4}$	$0,26 \times 10^{-3}$	$0,62 \times 10^{-7}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,76 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F54	$0,30 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F55	$-0,16 \times 10^{-3}$	$0,41 \times 10^{-2}$	$-0,11 \times 10^{-7}$	$-0,47 \times 10^{-7}$	$0,22 \times 10^{-8}$	$-0,23 \times 10^{-7}$
F56	$0,52 \times 10^{-4}$	$-0,26 \times 10^{-3}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,99 \times 10^{-6}$	$0,98 \times 10^{-7}$	$0,19 \times 10^{-6}$
F57	$0,39 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$-0,17 \times 10^{-6}$
F58	$-0,16 \times 10^{-3}$	$0,41 \times 10^{-2}$	$-0,33 \times 10^{-7}$	$-0,75 \times 10^{-5}$	$-0,31 \times 10^{-8}$	$-0,63 \times 10^{-7}$
F59	$0,43 \times 10^{-4}$	$-0,26 \times 10^{-4}$	$0,68 \times 10^{-7}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F60	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,62 \times 10^{-7}$	$-0,14 \times 10^{-4}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F61	$-0,77 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-2}$	$0,73 \times 10^{-8}$	$0,98 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-7}$	$0,57 \times 10^{-7}$
F62	$0,47 \times 10^{-4}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,22 \times 10^{-7}$	$0,95 \times 10^{-6}$	$0,94 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F63	$0,40 \times 10^{-4}$	$0,59 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F64	$-0,82 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-2}$	$0,19 \times 10^{-8}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,48 \times 10^{-8}$	$0,15 \times 10^{-7}$
F65	$0,38 \times 10^{-4}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^{-7}$	$0,15 \times 10^{-4}$	$0,71 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F66	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,58 \times 10^{-5}$	$0,16 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}$
F67	$-0,75 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-2}$	$0,29 \times 10^{-7}$	$0,80 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-7}$	$0,60 \times 10^{-7}$

F68	$0,47 \times 10^{-4}$	$-0,59 \times 10^{-4}$	$0,87 \times 10^{-7}$	$0,95 \times 10^{-6}$	$0,94 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F69	$0,40 \times 10^{-4}$	$0,58 \times 10^{-5}$	$0,82 \times 10^{-7}$	$0,90 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F70	$-0,81 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-2}$	$0,85 \times 10^{-8}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,48 \times 10^{-8}$	$0,16 \times 10^{-7}$
F71	$0,38 \times 10^{-4}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,66 \times 10^{-7}$	$0,15 \times 10^{-4}$	$0,71 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F72	$0,31 \times 10^{-4}$	$0,58 \times 10^{-5}$	$0,62 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-7}$
F73	$-0,44 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^0$	$-0,55 \times 10^{-7}$	$-0,31 \times 10^{-5}$	$-0,40 \times 10^{-7}$	$-0,44 \times 10^{-6}$
F74	$0,14 \times 10^{-3}$	$-0,84 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10^{-7}$	$0,98 \times 10^{-6}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F75	$-0,10 \times 10^{-3}$	$0,51 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-7}$	$0,75 \times 10^{-6}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-6}$
F76	$-0,43 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^0$	$-0,54 \times 10^{-7}$	$-0,49 \times 10^{-4}$	$-0,40 \times 10^{-7}$	$-0,43 \times 10^{-6}$
F77	$0,14 \times 10^{-2}$	$-0,84 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10^{-7}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,82 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F78	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,51 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-6}$
F79	$-0,44 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^0$	$-0,21 \times 10^{-6}$	$-0,31 \times 10^{-5}$	$-0,40 \times 10^{-7}$	$-0,44 \times 10^{-6}$
F80	$0,14 \times 10^{-3}$	$-0,84 \times 10^{-2}$	$0,67 \times 10^{-7}$	$0,98 \times 10^{-6}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F81	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,51 \times 10^{-3}$	$0,49 \times 10^{-7}$	$0,73 \times 10^{-6}$	$0,90 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-6}$
F82	$-0,43 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^0$	$-0,21 \times 10^{-6}$	$-0,49 \times 10^{-4}$	$-0,40 \times 10^{-7}$	$-0,44 \times 10^{-6}$
F83	$0,13 \times 10^{-3}$	$-0,84 \times 10^{-2}$	$0,66 \times 10^{-7}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,82 \times 10^{-7}$	$0,14 \times 10^{-6}$
F84	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,51 \times 10^{-3}$	$0,49 \times 10^{-7}$	$0,12 \times 10^{-4}$	$-0,89 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-6}$
F85	$-0,31 \times 10^{-2}$	$-0,66 \times 10^{-1}$	$-0,39 \times 10^{-6}$	$-0,21 \times 10^{-4}$	$-0,30 \times 10^{-6}$	$-0,31 \times 10^{-5}$
F86	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,41 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-7}$	$0,22 \times 10^{-5}$	$0,23 \times 10^{-6}$	$0,31 \times 10^{-6}$
F87	$0,93 \times 10^{-4}$	$0,25 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,66 \times 10^{-6}$	$0,72 \times 10^{-7}$	$0,94 \times 10^{-7}$
F88	$-0,30 \times 10^{-2}$	$0,66 \times 10^{-1}$	$-0,38 \times 10^{-6}$	$-0,35 \times 10^{-3}$	$-0,29 \times 10^{-6}$	$-0,31 \times 10^{-5}$
F89	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,42 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-7}$	$0,35 \times 10^{-4}$	$0,23 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F90	$0,92 \times 10^{-4}$	$0,25 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,71 \times 10^{-7}$	$0,93 \times 10^{-7}$
F91	$-0,31 \times 10^{-2}$	$0,66 \times 10^{-1}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,21 \times 10^{-4}$	$-0,30 \times 10^{-6}$	$-0,31 \times 10^{-5}$
F92	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,41 \times 10^{-2}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,21 \times 10^{-5}$	$0,23 \times 10^{-6}$	$0,31 \times 10^{-6}$
F93	$0,93 \times 10^{-4}$	$0,25 \times 10^{-3}$	$0,45 \times 10^{-7}$	$0,66 \times 10^{-6}$	$0,72 \times 10^{-7}$	$0,94 \times 10^{-7}$
F94	$-0,30 \times 10^{-2}$	$0,66 \times 10^{-1}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,35 \times 10^{-3}$	$-0,29 \times 10^{-6}$	$-0,31 \times 10^{-5}$
F95	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,42 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-6}$	$0,35 \times 10^{-4}$	$0,23 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F96	$0,92 \times 10^{-4}$	$0,25 \times 10^{-3}$	$0,44 \times 10^{-7}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,71 \times 10^{-7}$	$0,93 \times 10^{-7}$
F97	$-0,18 \times 10^{-2}$	$0,25 \times 10^{-1}$	$-0,22 \times 10^{-6}$	$-0,12 \times 10^{-4}$	$-0,17 \times 10^{-6}$	$-0,18 \times 10^{-7}$
F98	$0,22 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,28 \times 10^{-7}$	$0,16 \times 10^{-5}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-6}$
F99	$0,98 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-4}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,70 \times 10^{-6}$	$0,81 \times 10^{-7}$	$0,99 \times 10^{-7}$
F100	$-0,17 \times 10^{-2}$	$0,25 \times 10^{-1}$	$-0,22 \times 10^{-6}$	$-0,20 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-6}$	$-0,17 \times 10^{-5}$
F101	$0,22 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,27 \times 10^{-7}$	$0,25 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-6}$
F102	$0,97 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-4}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,80 \times 10^{-7}$	$0,98 \times 10^{-7}$
F103	$-0,17 \times 10^{-2}$	$0,25 \times 10^{-1}$	$-0,84 \times 10^{-6}$	$-0,12 \times 10^{-4}$	$-0,17 \times 10^{-6}$	$-0,18 \times 10^{-5}$
F104	$0,22 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,16 \times 10^{-5}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-6}$
F105	$0,98 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-4}$	$0,47 \times 10^{-7}$	$0,69 \times 10^{-6}$	$0,81 \times 10^{-7}$	$0,99 \times 10^{-7}$
F106	$-0,17 \times 10^{-2}$	$0,25 \times 10^{-1}$	$-0,84 \times 10^{-6}$	$-0,20 \times 10^{-3}$	$-0,17 \times 10^{-6}$	$-0,17 \times 10^{-5}$

F107	$0,22 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,10 \times 10^{-6}$	$0,25 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,22 \times 10^{-6}$
F108	$0,97 \times 10^{-4}$	$0,94 \times 10^{-4}$	$0,47 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,80 \times 10^{-7}$	$0,98 \times 10^{-7}$

---

Fonte: Acervo pessoal

**APÊNDICE C – PARÂMETROS DE SAÍDA DAS FUNÇÕES LINEARES DO  
SISTEMA NEBULOSO PRINC2**

Na Tabela 7 são descritos os parâmetros das funções lineares de saída para o sistema Princ2 (ajustados pelo *ANFIS*).

Tabela 7 – Parâmetros *a, b, c, d, e e f* das funções lineares de saída do sistema Princ2

Função	a	b	c	d	e	f
F1	$0,21 \times 10^{-2}$	$-0,49 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-4}$
F2	$0,22 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-3}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,54 \times 10^{-4}$	$0,52 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-4}$
F3	$0,42 \times 10^{-3}$	$-0,94 \times 10^{-5}$	$0,26 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-5}$
F4	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,70 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,83 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F5	$0,16 \times 10^{-2}$	$0,11 \times 10^{-3}$	$0,98 \times 10^{-6}$	$0,87 \times 10^{-3}$	$0,38 \times 10^{-5}$	$0,79 \times 10^{-5}$
F6	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,68 \times 10^{-5}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F7	$0,21 \times 10^{-2}$	$0,23 \times 10^{-4}$	$0,49 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-4}$
F8	$0,22 \times 10^{-2}$	$-0,36 \times 10^{-3}$	$0,53 \times 10^{-5}$	$0,54 \times 10^{-4}$	$0,53 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-4}$
F9	$0,42 \times 10^{-3}$	$0,23 \times 10^{-4}$	$0,98 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-5}$
F10	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,84 \times 10^{-5}$	$0,36 \times 10^{-5}$	$0,83 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F11	$0,16 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-3}$	$0,38 \times 10^{-5}$	$0,87 \times 10^{-3}$	$0,38 \times 10^{-5}$	$0,79 \times 10^{-5}$
F12	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,95 \times 10^{-5}$	$0,72 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F13	$0,21 \times 10^{-2}$	$-0,43 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-4}$
F14	$0,22 \times 10^{-2}$	$0,98 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,54 \times 10^{-4}$	$0,51 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-4}$
F15	$0,42 \times 10^{-3}$	$-0,63 \times 10^{-5}$	$0,26 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-5}$
F16	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,48 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,84 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F17	$0,17 \times 10^{-2}$	$0,74 \times 10^{-4}$	$0,96 \times 10^{-6}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$0,37 \times 10^{-5}$	$0,78 \times 10^{-5}$
F18	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,47 \times 10^{-5}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F19	$0,21 \times 10^{-2}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,49 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-5}$
F20	$0,22 \times 10^{-2}$	$-0,24 \times 10^{-3}$	$0,53 \times 10^{-5}$	$0,53 \times 10^{-4}$	$0,54 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-5}$
F21	$0,42 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,98 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F22	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,59 \times 10^{-5}$	$0,36 \times 10^{-5}$	$0,84 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F23	$0,17 \times 10^{-2}$	$0,98 \times 10^{-4}$	$0,37 \times 10^{-5}$	$0,85 \times 10^{-3}$	$0,37 \times 10^{-5}$	$0,77 \times 10^{-5}$
F24	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,64 \times 10^{-5}$	$0,73 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F25	$0,21 \times 10^{-2}$	$-0,20 \times 10^{-5}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-4}$
F26	$0,22 \times 10^{-2}$	$0,53 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,54 \times 10^{-4}$	$0,51 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-4}$
F27	$0,42 \times 10^{-3}$	$-0,34 \times 10^{-5}$	$0,26 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-5}$
F28	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,26 \times 10^{-5}$	$0,94 \times 10^{-6}$	$0,84 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F29	$0,17 \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-4}$	$0,96 \times 10^{-6}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$0,37 \times 10^{-5}$	$0,78 \times 10^{-5}$

F30	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,25 \times 10^{-5}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F31	$0,21 \times 10^{-2}$	$0,84 \times 10^{-5}$	$0,49 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-5}$	$0,10 \times 10^{-4}$
F32	$0,22 \times 10^{-3}$	$-0,13 \times 10^{-3}$	$0,53 \times 10^{-5}$	$0,53 \times 10^{-4}$	$0,53 \times 10^{-5}$	$0,11 \times 10^{-5}$
F33	$0,42 \times 10^{-3}$	$0,84 \times 10^{-5}$	$0,96 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-5}$	$0,20 \times 10^{-5}$
F34	$0,16 \times 10^{-2}$	$-0,31 \times 10^{-5}$	$0,36 \times 10^{-5}$	$0,84 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-5}$
F35	$0,17 \times 10^{-2}$	$0,53 \times 10^{-4}$	$0,37 \times 10^{-5}$	$0,85 \times 10^{-3}$	$0,37 \times 10^{-6}$	$0,78 \times 10^{-5}$
F36	$0,31 \times 10^{-3}$	$-0,35 \times 10^{-5}$	$0,73 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F37	$0,49 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,93 \times 10^{-5}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$
F38	$0,54 \times 10^{-3}$	$-0,23 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,99 \times 10^{-5}$	$0,71 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-5}$
F39	$0,98 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-7}$	$0,19 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-6}$
F40	$0,54 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F41	$0,56 \times 10^{-3}$	$-0,18 \times 10^{-2}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,16 \times 10^{-3}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$
F42	$0,11 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^{-3}$	$0,33 \times 10^{-7}$	$0,30 \times 10^{-4}$	$0,21 \times 10^{-6}$	$0,26 \times 10^{-6}$
F43	$0,51 \times 10^{-3}$	$-0,37 \times 10^{-3}$	$0,66 \times 10^{-6}$	$0,93 \times 10^{-5}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$
F44	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,57 \times 10^{-2}$	$0,39 \times 10^{-6}$	$0,10 \times 10^{-4}$	$0,40 \times 10^{-6}$	$0,86 \times 10^{-6}$
F45	$0,12 \times 10^{-3}$	$-0,37 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,18 \times 10^{-5}$	$0,26 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F46	$0,53 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,63 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F47	$0,58 \times 10^{-3}$	$-0,23 \times 10^{-2}$	$0,69 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,70 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$
F48	$0,11 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,12 \times 10^{-6}$	$0,29 \times 10^{-4}$	$0,21 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-6}$
F49	$0,49 \times 10^{-3}$	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,92 \times 10^{-5}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F50	$0,61 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,12 \times 10^{-4}$	$0,87 \times 10^{-6}$	$0,18 \times 10^{-5}$
F51	$0,93 \times 10^{-4}$	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,32 \times 10^{-7}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,24 \times 10^{-6}$
F52	$0,53 \times 10^{-3}$	$0,79 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F53	$0,61 \times 10^{-3}$	$-0,12 \times 10^{-2}$	$0,21 \times 10^{-6}$	$0,19 \times 10^{-3}$	$0,81 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$
F54	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,79 \times 10^{-4}$	$0,30 \times 10^{-7}$	$0,28 \times 10^{-4}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,25 \times 10^{-6}$
F55	$0,52 \times 10^{-3}$	$-0,25 \times 10^{-3}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,91 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$
F56	$0,63 \times 10^{-4}$	$0,39 \times 10^{-2}$	$0,32 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,72 \times 10^{-6}$
F57	$0,13 \times 10^{-3}$	$-0,25 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-6}$	$0,31 \times 10^{-6}$
F58	$0,53 \times 10^{-3}$	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,62 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-7}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F59	$0,64 \times 10^{-3}$	$-0,16 \times 10^{-2}$	$0,83 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-3}$	$0,84 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$
F60	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-4}$	$0,18 \times 10^{-6}$	$0,24 \times 10^{-6}$
F61	$0,60 \times 10^{-3}$	$-0,85 \times 10^{-3}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,12 \times 10^{-4}$	$0,84 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$
F62	$0,47 \times 10^{-4}$	$-0,97 \times 10^{-4}$	$0,22 \times 10^{-7}$	$0,95 \times 10^{-6}$	$0,94 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F63	$0,94 \times 10^{-4}$	$0,54 \times 10^{-4}$	$0,32 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-5}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,25 \times 10^{-6}$
F64	$0,53 \times 10^{-3}$	$0,42 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F65	$0,60 \times 10^{-3}$	$-0,66 \times 10^{-3}$	$0,20 \times 10^{-6}$	$0,18 \times 10^{-3}$	$0,79 \times 10^{-6}$	$0,16 \times 10^{-5}$
F66	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,42 \times 10^{-4}$	$0,31 \times 10^{-7}$	$0,28 \times 10^{-4}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,25 \times 10^{-6}$
F67	$0,52 \times 10^{-3}$	$-0,14 \times 10^{-3}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,92 \times 10^{-5}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,14 \times 10^{-5}$

F68	$0,86 \times 10^{-4}$	$0,21 \times 10^{-2}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,12 \times 10^{-4}$	$0,34 \times 10^{-6}$	$0,74 \times 10^{-6}$
F69	$0,13 \times 10^{-3}$	$-0,13 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-6}$	$0,31 \times 10^{-6}$
F70	$0,53 \times 10^{-3}$	$0,55 \times 10^{-4}$	$0,62 \times 10^{-6}$	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,17 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-5}$
F71	$0,63 \times 10^{-3}$	$-0,85 \times 10^{-3}$	$0,81 \times 10^{-6}$	$0,20 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-5}$
F72	$0,10 \times 10^{-3}$	$0,55 \times 10^{-4}$	$0,12 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-4}$	$0,19 \times 10^{-6}$	$0,24 \times 10^{-6}$
F73	$0,41 \times 10^{-3}$	$-0,71 \times 10^{-2}$	$0,52 \times 10^{-7}$	$0,29 \times 10^{-5}$	$0,46 \times 10^{-7}$	$0,42 \times 10^{-6}$
F74	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^0$	$0,22 \times 10^{-7}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,80 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F75	$0,95 \times 10^{-4}$	$-0,70 \times 10^{-2}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,68 \times 10^{-6}$	$0,84 \times 10^{-7}$	$0,97 \times 10^{-7}$
F76	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,71 \times 10^{-2}$	$0,51 \times 10^{-7}$	$0,47 \times 10^{-4}$	$0,45 \times 10^{-7}$	$0,41 \times 10^{-6}$
F77	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^0$	$0,21 \times 10^{-7}$	$0,20 \times 10^{-4}$	$0,80 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$
F78	$0,93 \times 10^{-4}$	$0,70 \times 10^{-2}$	$0,12 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,95 \times 10^{-7}$
F79	$0,41 \times 10^{-3}$	$-0,71 \times 10^{-2}$	$0,20 \times 10^{-6}$	$0,29 \times 10^{-5}$	$0,46 \times 10^{-7}$	$0,42 \times 10^{-6}$
F80	$0,19 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^0$	$0,93 \times 10^{-7}$	$0,12 \times 10^{-5}$	$0,89 \times 10^{-7}$	$0,19 \times 10^{-6}$
F81	$0,94 \times 10^{-4}$	$-0,70 \times 10^{-2}$	$0,46 \times 10^{-7}$	$0,67 \times 10^{-6}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,96 \times 10^{-7}$
F82	$0,40 \times 10^{-3}$	$-0,71 \times 10^{-2}$	$0,20 \times 10^{-6}$	$0,47 \times 10^{-4}$	$0,45 \times 10^{-7}$	$0,41 \times 10^{-6}$
F83	$0,17 \times 10^{-3}$	$0,11 \times 10^0$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,20 \times 10^{-4}$	$0,79 \times 10^{-7}$	$0,17 \times 10^{-6}$
F84	$0,92 \times 10^{-4}$	$-0,70 \times 10^{-2}$	$0,45 \times 10^{-7}$	$0,11 \times 10^{-4}$	$0,83 \times 10^{-7}$	$0,95 \times 10^{-7}$
F85	$0,62 \times 10^{-3}$	$-0,49 \times 10^{-2}$	$0,78 \times 10^{-7}$	$0,44 \times 10^{-5}$	$-0,99 \times 10^{-8}$	$0,63 \times 10^{-6}$
F86	$-0,33 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-1}$	$-0,37 \times 10^{-6}$	$-0,21 \times 10^{-4}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,30 \times 10^{-5}$
F87	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,37 \times 10^{-7}$	$0,21 \times 10^{-5}$	$0,34 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F88	$0,61 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,76 \times 10^{-7}$	$0,70 \times 10^{-4}$	$-0,99 \times 10^{-8}$	$0,62 \times 10^{-6}$
F89	$-0,30 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-1}$	$-0,38 \times 10^{-6}$	$-0,33 \times 10^{-3}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,30 \times 10^{-5}$
F90	$0,24 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,37 \times 10^{-7}$	$0,34 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F91	$0,62 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,43 \times 10^{-5}$	$-0,95 \times 10^{-8}$	$0,63 \times 10^{-6}$
F92	$-0,30 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-1}$	$-0,14 \times 10^{-5}$	$-0,21 \times 10^{-4}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,30 \times 10^{-5}$
F93	$0,30 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-6}$	$0,21 \times 10^{-5}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F94	$0,61 \times 10^{-3}$	$-0,49 \times 10^{-2}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,70 \times 10^{-4}$	$-0,97 \times 10^{-8}$	$0,62 \times 10^{-6}$
F95	$-0,30 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-1}$	$-0,14 \times 10^{-5}$	$-0,34 \times 10^{-3}$	$-0,15 \times 10^{-5}$	$-0,30 \times 10^{-5}$
F96	$0,29 \times 10^{-3}$	$-0,48 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-6}$	$0,34 \times 10^{-4}$	$0,33 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
F97	$0,59 \times 10^{-3}$	$-0,27 \times 10^{-2}$	$0,74 \times 10^{-7}$	$0,41 \times 10^{-5}$	$-0,18 \times 10^{-8}$	$0,60 \times 10^{-6}$
F98	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-1}$	$-0,32 \times 10^{-6}$	$-0,18 \times 10^{-4}$	$-0,13 \times 10^{-5}$	$-0,26 \times 10^{-5}$
F99	$0,27 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,34 \times 10^{-7}$	$0,19 \times 10^{-5}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-6}$
F100	$0,56 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,73 \times 10^{-7}$	$0,67 \times 10^{-4}$	$-0,21 \times 10^{-8}$	$0,59 \times 10^{-6}$
F101	$-0,25 \times 10^{-2}$	$0,41 \times 10^{-1}$	$-0,31 \times 10^{-6}$	$-0,29 \times 10^{-3}$	$-0,13 \times 10^{-5}$	$-0,25 \times 10^{-5}$
F102	$0,27 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,33 \times 10^{-7}$	$0,30 \times 10^{-4}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-6}$
F103	$0,59 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,29 \times 10^{-6}$	$0,42 \times 10^{-5}$	$-0,16 \times 10^{-8}$	$0,60 \times 10^{-6}$
F104	$-0,25 \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-1}$	$-0,12 \times 10^{-5}$	$-0,18 \times 10^{-4}$	$-0,13 \times 10^{-5}$	$-0,26 \times 10^{-5}$
F105	$0,27 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,13 \times 10^{-6}$	$0,19 \times 10^{-5}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,27 \times 10^{-6}$
F106	$0,58 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,28 \times 10^{-6}$	$0,67 \times 10^{-4}$	$-0,21 \times 10^{-8}$	$0,59 \times 10^{-6}$

F107	$-0,25 \times 10^{-2}$	$0,40 \times 10^{-1}$	$-0,12 \times 10^{-5}$	$-0,29 \times 10^{-5}$	$-0,13 \times 10^{-5}$	$-0,25 \times 10^{-5}$
F108	$0,27 \times 10^{-3}$	$-0,26 \times 10^{-2}$	$0,13 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$

---

Fonte: Acervo pessoal