

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS  
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANGÉLICO CORTE

SISTEMA DE CONTROLE PARA TERMOCICLADOR

2016

ANGÉLICO CORTE

SISTEMA DE CONTROLE PARA TERMOCICLADOR

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.

Área de concentração: Sistemas de Controle e Automação.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Rosa da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Ivan Goytia Mejía

SÃO LEOPOLDO

2016

C827s      Corte, Angélico.  
              Sistema de controle para termociclador / Angélico  
Corte. – 2016.  
              91 f. : il. ; 30 cm.

              Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio  
dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Elétrica, 2016.

              "Orientador: Prof. Dr. Márcio Rosa da Silva ;  
coorientador. Prof. Dr. Rodrigo Ivan Goytia Mejía."

              1. Termociclador. 2. Controlador PID. 3. PID de Dahlin.  
4. Controlador GMV. 5. Biologia molecular. 6. PCR. I. Título.

CDU 621.3

ANGÉLICO CORTE

SISTEMA DE CONTROLE PARA TERMOCICLADOR

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.

Arprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati

---

Prof. Dr. Jaime Eduardo Navarrete Rodríguez

SÃO LEOPOLDO

2016

Dedico esta dissertação a minha esposa Dra. Ana Lusia Leal Corte, a minha filha Fernanda Henrique Corte e ao meu filho Luiz Fernando Henrique Corte (em memória) por terem transformado minha vida para muito melhor, pela parceria e exemplo de dedicação. Vocês são a razão pela qual eu acordo todos os dias.

***“When I'm feeling lost, I just need to think of you to find out my way!”***

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Márcio Rosa da Silva e Dr. Rodrigo Ivan Goytia Mejía, por terem apoiado e acreditado neste projeto.

Aos professores Alexandre Haupt e Leandro José Cassol, pela amizade e por serem os primeiros apoiadores do projeto, desde a graduação.

Ao professor Dr. Victor Hugo Valiati, por permitir a realização dos testes do protótipo no laboratório de Biologia Molecular do PPG em Biologia e ceder os reagentes necessários.

Ao professor Dr. Luís Fernando da Costa Medina por ceder o DNA e às técnicas do Laboratório de Biologia Molecular, Débora e Gabriela, pelo preparo dos reagentes.

Ao amigo Guilherme Cauduro, pela disponibilidade para realização dos testes de PCR.

Ao meu irmão Éder Corte, pelas discussões técnicas e apoio.

Aos colegas e amigos do PPGEE, pelo companheirismo nas dificuldades e pelos momentos de descontração.

À minha esposa, Dra Ana Lusía Leal Corte, pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos da realização deste trabalho.

À minha filha Fernanda pelo amor, paciência em todos os momentos e compreensão na ausência do pai.

Aos meus pais Afonso Jahn Corte e Beloni Ceschini Corte, por me ensinarem valores.

A minha irmã Roselaine Corte Torrel pela parceria e amizade.

Aos meus sogros Ilca e Cleber, e aos cunhados e agregados, por compreenderem minhas ausências e pelo apoio e carinho.

À Maria Joséh Laureano Godoy, pelo apoio.

Aos amigos membro do Coral UNISINOS-Anchieta, por tornarem os dias mais felizes e os problemas mais amenos, ajudando a criar condições para que eu concluísse este trabalho.

Aos amigos do Yázigi, pelo apoio e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O termociclador é um equipamento utilizado para realizar uma técnica de biologia molecular chamada PCR (*Polymerase ChainReaction* – Reação em Cadeia da Polimerase), que objetiva isolar e amplificar fragmentos alvo de DNA e é amplamente utilizada em pesquisas nas áreas das ciências biológicas, saúde, agropecuária, em diagnósticos animal, vegetal e humano, bem como na medicina forense. O funcionamento do equipamento consiste em realizar ciclos de temperatura variáveis, sendo que o sucesso da reação depende basicamente de três fatores: (1) a velocidade das rampas de subida e descida de temperatura; (2) a precisão e estabilidade da temperatura estipulada no programa; (3) *overshoot* reduzido ao final das rampas de temperatura. Esta pesquisa foi desenvolvida como a primeira fase de um projeto de nacionalização de tecnologia. Os objetivos foram descobrir qual o controlador que melhor atua para o controle de temperatura em termocicladores e montar um protótipo deste equipamento. Os controladores testados foram os tipos PID (Genérico, ISA, Paralelo e com Síntese de Dahlin) e GMV. Esses controladores foram simulados usando Matlab e posteriormente implementados em um sistema de *hardware*. Foram implementadas no controlador PID de Dahlin, durante esse trabalho, a inserção de duas variáveis de ganho na componente proporcional, uma componente proporcional extra, um saturador e um filtro para acelerar a rampa de descida. Essas melhorias permitiram a resolução dos problemas apresentados pelos controladores, já que nenhum dos testados apresentou resultados satisfatórios em sua forma original. O protótipo foi montado e testado no laboratório de biologia molecular da Unisinos. O mesmo apresentou resultados equivalentes aos do equipamento importado em uso no laboratório.

Palavras-chaves: Termociclador. Controlador PID. PID de Dahlin. Controlador GMV. Biologia molecular. PCR.



## ABSTRACT

The thermocycler is an equipment used to perform a molecular biology technique called PCR (Polymerase Chain Reaction), which aims at amplifying target DNA fragments. It is widely used in biology, health and agriculture sciences, animal, plant and human diagnostics, as well as in forensics. The equipment completes variable temperature cycles, and the success of the technique relies on three factors: (1) increasing and decreasing ramp rates; (2) temperature accuracy and stability of the temperatures set in the program; (3) a reduced overshoot at the end of each temperature ramp. This research was developed as the first phase of a Technology Nationalization Project. The aim was to identify the best controller to regulate temperature in thermal cycles and assemble a prototype of such equipment. The controllers tested were PID(Generic, ISA, Parallel and Dahlin Synthesis) andGMV. These controllers were simulated using Matlab and then, implemented in a hardware system. The following improvements were implemented in the Dahlin PID Controller during this work: addition of two gain variables in the proportional component, an extra proportional component, one saturator and a filter to accelerate the decreasing ramp. Such improvements allowed us to solve the problems of the controllers, as none of them presented acceptable results in its original form. The prototype was assembled and tested in the Molecular Biology Laboratory of Unisinos. The PCR results obtained with the prototype were equivalent as those obtained from the imported equipment used regularly in the laboratory.

Keywords: Thermocycler. PID controller. Dahlin PID. GMV Controller. Molecular biology. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da PCR .....	16
Figura 2: Ciclos de temperatura da PCR no termociclador.....	17
Figura 3: Esquema mecânico do termociclador.....	18
Figura 4: Pastilha termoelétrica de efeito Peltier .....	19
Figura 5: Arranjo de cooler termoelétrico em sistema sanduíche .....	21
Figura 6: Representação de um Sistema Térmico.....	23
Figura 7: Resposta ao Degrau Unitário.....	24
Figura 8: Esquema de um sistema de controle de temperatura .....	25
Figura 9: Sistema de controle em malha aberta .....	26
Figura 10: Sistema de controle em malha fechada.....	26
Figura 11: Diagrama de um controlador adaptativo.....	35
Figura 12: Estrutura do Controlador GMV .....	38
Figura 13: Comparação bloco de prata com alumínio .....	40
Figura 14: Resultado controlador Fuzzy PID .....	41
Figura 15: Termociclador portátil .....	42
Figura 16: Resultado termociclador portátil .....	42
Figura 17: Resultado PID Liu.....	43
Figura 18: Resultado PID fuzzy Liu .....	44
Figura 19: Resultados termociclador Xufeng Peng.....	45
Figura 20: Resultado termociclador baseado em micro fluido .....	46
Figura 21: Bloco do Termociclador de Microchip.....	46
Figura 22: Resultado termociclador de microchip.....	47
Figura 23: Desenho esquemático do sistema termo fluídico .....	48
Figura 24: Diagrama de blocos resumido do protótipo .....	52
Figura 25: Foto do Protótipo .....	53
Figura 26: Diagrama da planta do sistema .....	54
Figura 27: Resposta ao degrau da Planta Ga (Aquecimento) .....	62
Figura 28:Resposta ao degrau da planta Gr (Resfriando) .....	63
Figura 29: Validação da Planta.....	64
Figura 30: Resultado Controlador GMV.....	65
Figura 31: Resultado PID Genérico .....	66
Figura 32: Resultado Controlador PID ISA.....	66

Figura 33:Resultado PID Paralelo .....	67
Figura 34: Resultado PID Dahlin .....	68
Figura 35: PID Dahlin Modificado .....	69
Figura 36: P - PID de Dahlin Adaptado.....	70
Figura 37: Visualização dos Produtos de PCR em Gel de Agarose 1% .....	73

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
1.1	Problema .....	10
1.1.1	Problema de ordem técnica.....	10
1.1.2	Problema social.....	11
1.2	Justificativa do Projeto.....	11
1.3	Hipóteses .....	12
1.4	Objetivo Geral.....	13
1.5	Objetivos Específicos .....	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	14
2.1	DNA e RNA .....	14
2.2	Desnaturação e Renaturação do DNA .....	14
2.3	Biologia Molecular .....	15
2.4	Reação em Cadeia da Polimerase - PCR .....	15
2.5	Termociclador.....	16
2.6	Pastilha Termoelétrica de Efeito Peltier.....	19
2.6.1	Carga térmicacondutiva.....	21
2.7	Modelagem de Sistemas Térmicos .....	22
2.8	Sistemas de Controle .....	24
2.8.1	Sistema em malha aberta.....	25
2.8.2	Sistemas em malha fechada .....	26
2.8.3	Controladores PID.....	27
2.8.4	PID Genérico.....	28
2.8.5	PID ISA.....	31
2.8.6	PID Paralelo .....	32
2.8.7	PID de Dahlin .....	32
2.8.8	Controladores Adaptativos .....	35
2.8.9	Controlador de variância mínima (MV).....	36
2.8.10	Controlador de variância mínima generalizado (GMV).....	37
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	39
4	METODOLOGIA.....	52
4.1	Planta do Sistema .....	53

4.1.1	Modelagem da Planta Utilizando a Resposta ao Degrau Unitário.....	54
4.2	Avaliação dos Controladores.....	55
4.2.1	Adaptação Controlador PID com Síntese de Dahlin.....	56
4.3	Sensor de Temperatura e Instrumentalização.....	59
4.4	Sistema de Potência.....	60
4.5	Teste do Protótipo e Comparação com Equipamento do Mercado .....	60
5	RESULTADOS .....	62
5.1	Modelagem e Validação da Planta .....	62
5.1	Controlador GMV.....	64
5.2	Controladores PID.....	65
5.3	Análise dos Resultados .....	70
5.1	Teste do Protótipo e Comparação com Equipamento do Mercado .....	72
6	CONCLUSÃO.....	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE I.....	81
	APÊNDICE II.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico pode fornecer ferramentas importantes nos âmbitos da saúde pública e segurança. A biologia molecular se encaixa neste contexto em diferentes casos, como por exemplo fornecendo subsídios ao diagnóstico e identificação de indivíduos. Uma ferramenta utilizada para tanto é a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*– Reação da Cadeia da Polimerase). Essa técnica pode ser empregada na detecção de doenças (genéticas ou infecciosas) e também na biologia forense (identificação de indivíduos). Atualmente, a PCR depende de um equipamento chamado Termociclador que, programado adequadamente, realiza o controle de temperatura em tempos e variações pré-estabelecidos.

### 1.1 Problema

Os problemas relacionados podem ser divididos em dois subgrupos distintos. O primeiro está vinculado às dificuldades e desafios tecnológicos encontrados para o desenvolvimento do equipamento. O outro subgrupo está ligado à relevância social das políticas públicas elencadas pelo país na área de saúde e segurança. Neste contexto, a ferramenta da PCR pode auxiliar quando utilizada na detecção de doenças e na resolução de crimes.

#### 1.1.1 Problema de ordem técnica

Como será demonstrado no subitem 2.6 (Termociclador), o equipamento deve seguir pré-requisitos mínimos de funcionamento como, por exemplo, rampa de temperatura superior a 1 °C/s e estabilidade inferior a +/- 0,5 °C. Entretanto, quando avalia-se as fichas técnicas dos equipamentos atualmente no mercado ou mesmo as patentes destas tecnologias, estas não explicitam o sistema de controle de temperatura utilizado. Tal realidade levanta a questão sobre qual o controlador que poderia ser considerado com uma performance ótima para atingir os pré-requisitos supracitados.

Segundo Qiu e Yuan (2005), apesar do controlador PID (Proporcional Integral e Derivativo) ser robusto e estável, este não apresenta comportamento de controle de temperatura e rampas dentro das especificações requeridas pela técnica de PCR. É possível atingir rampas acentuadas com PID, porém nesse caso o *overshoot* e a estabilidade do sistema ficam comprometidos. Da mesma forma se for priorizado um

baixo *overshoot* e uma estabilidade dentro dos padrões da técnica, as rampas de temperatura ficam abaixo do esperado. Diversas publicações corroboram estas afirmações (Peng et al., 2013; Ccanto e Rios, 2012; Liu et al., 2011; Maturós et al., 2010; Ai-Xian et al., 2008; Pokfai et al., 2008). Alguns autores utilizam outros tipos de PID, como Fuzzy, ou FVS-PID (FVS - Feedforward Variable Structure), que é um tipo de PID preditivo. Estes relatam a melhoria em comparação ao uso do PID, porém, não relatam se atingiram os requisitos da técnica de PCR (Peng et al., 2013; Xianbo et al., 2006).

### 1.1.2 Problema social

O Brasil é um país que apresenta alta prevalência de contaminação por doenças virais. No caso do vírus HIV, dados do Boletim Epidemiológico HIV-AIDS do ano de 2015 mostram uma média de 40.600 novos casos notificados a cada ano, cerca de 20 casos por 100 mil habitantes. Em 2014, estimava-se que 17 % dos casos não foram diagnosticados (Boletim Epidemiológico HIV-AIDS, 2015). Já os índices de notificação de novos casos para Hepatite B é de 13.000/ano, enquanto para Hepatite C é de cerca de 20.000/ano (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2015). Em 2015, o Ministério da Saúde informou que desconhecia a quantidade real de pessoas infectadas com hepatites virais, mas estimava-se em 1.450.000, mostrando que um grande número de pessoas não sabe que são portadoras do vírus (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2015). A falta de diagnóstico é extremamente crítica já que esses infectados não serão tratados e ainda transmitirão a doença a outras pessoas. O diagnóstico a partir da detecção de ácidos nucleicos pela técnica de PCR se mostra mais rápido e eficaz que as demais metodologias, de forma que, a partir de outubro de 2014, todos os bancos de sangue foram obrigados a incluir o teste de ácidos nucleicos (NAT) na triagem de sangue para doação (Ministério da Saúde, Portaria nº 2.265 de 16 de outubro, 2014,).

## 1.2 Justificativa do Projeto

Equipamentos termocicladores são amplamente utilizados em diferentes projetos de pesquisas e diagnósticos. Apesar deste amplo espectro de utilização, não existe tecnologia nacional para produção destes equipamentos. A indústria resguarda seus projetos de termocicladores com segredo industrial, não revelando pontos chave de sua produção como, por exemplo, os controladores utilizados, suas precisões e

estabilidade da temperatura. Enquanto isso, os trabalhos de pesquisa realizados nas academias muitas vezes não conseguem obter desempenho aceitável (ver seção 3 – Revisão Bibliográfica) e não possuem acesso a informações fundamentais do controle de temperatura dos equipamentos.

Sendo assim, o desenvolvimento de equipamentos nacionais, com qualidade comparável aos importados, deverá ajudar as atividades fim dos mesmos nas áreas de pesquisa e diagnóstico. Mais que isso, ajudará também na formação de recursos humanos qualificados e, conseqüentemente, auxiliará na economia do país com impactos diretos no desenvolvimento social. Para chegar ao desenvolvimento de equipamentos é fundamental o fomento na pesquisa básica visando sua aplicabilidade no ambiente acadêmico. Neste contexto, este trabalho vai testar as hipóteses propostas a seguir.

### 1.3 Hipóteses

Hipótese 1: o sistema deve atuar com rampas de temperaturas acentuadas entre um alvo de temperatura e outro. Quanto mais acentuada for a rampa de temperatura (menor tempo de transição entre um alvo e outro), pior é o desempenho da estabilidade e ocorre elevação no *overshoot* (ver seção 3). Por conta disso, cabe avaliar a possibilidade de uso de um controlador preditivo. Os controladores preditivos têm como característica calcular possíveis respostas futuras de um sistema. O cálculo realizado pelo controlador minimiza uma função custo de estágios definidos para um horizonte de previsão. Essa característica permite a antecipação do controlador agindo de forma preditiva ao erro (Bordons; Camacho, 1998). Trabalhamos com a hipótese de que a capacidade do controlador preditivo em antecipar a atuação sobre a variável de controle seria uma solução viável para nosso problema e permitiria a obtenção de rampas mais acentuadas com diminuição do *overshoot*.

Hipótese 2: o sistema termociclador trabalha com aquecimento e resfriamento. As características dos equipamentos oferecidos no mercado mostram que as rampas de subida de temperatura são mais rápidas que as rampas de descida (Bio Rad, 2015; Applied Biosystems, 2015). Baseado nisso, testaremos também a hipótese de que o comportamento da planta quando está aquecendo seja diferente de quando está resfriando, ou seja, dois comportamentos diferentes no mesmo sistema.



## 1.4 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é testar diferentes tipos de controladores e verificar o que mais se adequa em um protótipo de um equipamento termociclador, obtendo as rampas de temperatura e estabilidade exigidas pelo mercado. Esse protótipo deverá ter a capacidade de realizar a amplificação de fragmentos de DNA via técnica de PCR em microtubos.

## 1.5 Objetivos Específicos

- a) Cumprir requisitos específicos em relação ao seguimento de referência (*set point* de temperatura) com robustez (não seja sensível a perturbações);
- b) Obter rampas de subida de temperatura superiores a 3 °C/s e rampas de descida superiores a 1 °C/s.
- c) Obter a curvatura da temperatura programada com variação inferior a  $\pm 0,2$  °C e *overshoot* inferior a 1 °C;
- d) Avaliar os controladores PID Genérico (PID ISA; PID Paralelo; PID de Dahlin e GMV) e seus comportamentos perante a planta do sistema;
- e) Controlar a temperatura do bloco de aquecimento e resfriamento utilizando a leitura de um sensor de temperatura, calculando o valor da variável de controle e aplicando esse valor ao PWM (*Pulse Width Modulation*) ligado no sistema de potência;
- f) Testar o protótipo do equipamento na amplificação de fragmentos de DNA, em parceria com um laboratório de biologia molecular.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 DNA e RNA**

Os ácidos nucleicos são polímeros, formados por nucleotídeos, que estão presentes em todas as células dos seres vivos contendo informação genética (ZAHA et al., 2003). Estes se dividem em DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico). O DNA possui preferencialmente quatro nucleotídeos distintos, A, T, C e G que se unem por ligações de açúcar e fosfato formando uma cadeia (fita) simples de DNA. Esta fita simples está ligada a outra fita (complementar) por pontes de hidrogênio formando a estrutura conhecida como dupla hélice de DNA (Alberts et al., 2009).

A ligação por pontes de hidrogênio é mais fraca que a ligação açúcar-fosfato, permitindo a separação da fita dupla em duas fitas simples sem danificar sua estrutura esquelética (desnaturação). Dessa forma é possível a criação de duas fitas duplas a partir outra fita dupla durante a replicação celular. Esse processo se repete replicando as fitas de DNA em uma sequência em potência de dois ( $2^n$ ), realizando a cópia da informação hereditária (Alberts et al., 2009).

Normalmente o RNA é composto de fita simples, sendo semelhante a uma fita simples de DNA. A diferença é que o RNA possui ribose no lugar da desoxirribose e (U) uracila ao invés de (T) timina (Zaha et al., 2003).

O RNA mensageiro é uma cópia da informação do DNA que será transportada até o citoplasma onde essa informação é traduzida em forma de aminoácidos para a formação das proteínas (Alberts et al., 2009).

### **2.2 Desnaturação e Renaturação do DNA**

A desnaturação do DNA é o processo que ocorre quando as pontes de hidrogênio existentes entre a fita dupla de DNA se rompem. Dessa forma ocorre a separação da fita dupla que se transforma em duas fitas simples. Esse processo é necessário para efetuar cópias do genoma (Zaha et al., 2003).

A desnaturação pode ser revertida pelo processo conhecido como renaturação ou anelamento. O anelamento é o processo onde duas fitas simples de sequência complementar se unem. O anelamento também pode ocorrer com nucleotídeos que se encontram livres (Zaha et al., 2003).

## 2.3 Biologia Molecular

A Biologia Molecular é o estudo da estrutura e função do material genético. Investiga as interações entre os sistemas celulares e a relação DNA, RNA e síntese proteica envolvendo biofísica, bioquímica e genética (Seadi, 2014).

A biologia molecular tem evoluído rapidamente. Além dos laboratórios de pesquisa que utilizam amplamente as técnicas, os laboratórios de análises clínicas também fazem uso das ferramentas moleculares no diagnóstico de doenças infecciosas causadas por fungos, bactérias ou vírus. Uma das técnicas mais usadas para esse fim é a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction - PCR*) (Zahaet al., 2003).

## 2.4 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A PCR é uma técnica que possibilita a amplificação de fragmentos de DNA obtendo milhões de cópias de uma mesma molécula (Albertset al., 2009). Essa técnica possibilita o diagnóstico de doenças como HIV (*Human Immunodeficiency Virus*– Vírus da Imunodeficiência Humana), hepatites, meningites, HPV (*Human Papilloma Virus*– Vírus do Papiloma Humano), diagnósticos de doenças genéticas, estudos de evolução molecular, clonagem, medicina forense, entre outros (Saiki, 1988).

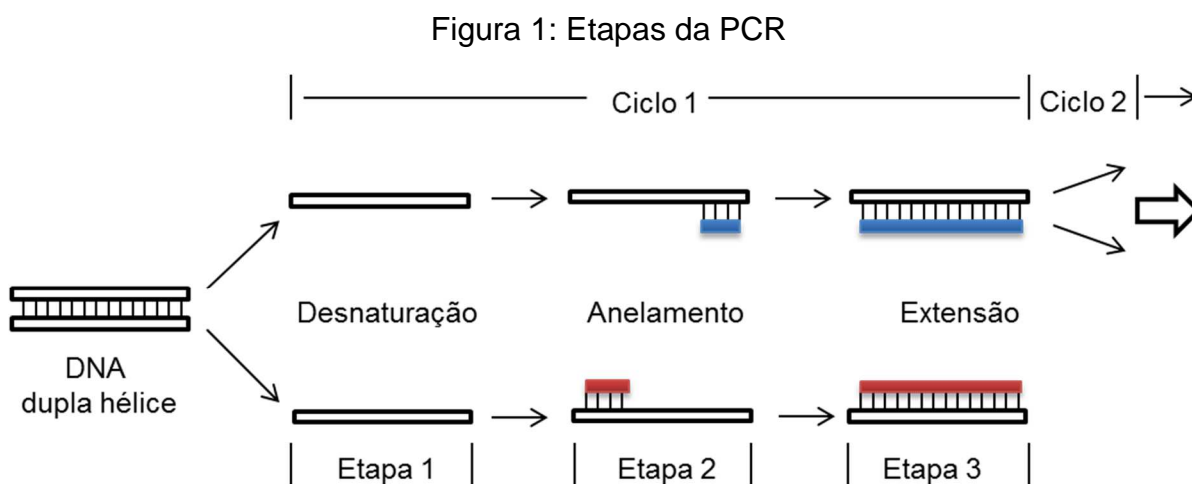
A PCR foi descrita por Kary Mullis como uma técnica a ser realizada em ciclos de temperatura, onde cada ciclo possui três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

A desnaturação é o processo onde a reação é submetida uma temperatura entre 90 °C e 96 °C. Essa temperatura rompe as pontes de hidrogênio entre os pares de bases da dupla hélice de DNA formando fitas simples como pode ser observado na Figura 1, etapa 1 (Mullis apud Saiki, 1988).

O anelamento é o processo onde a reação é submetida à temperatura entre 35 °C e 65 °C. A temperatura depende da especificidade de um pequeno DNA sintético iniciador da reação (*primer*). Uma vez definida a temperatura alvo, esta não deve variar a um limite superior a 0,5°C. Nessa etapa o *primer* se acopla ao DNA alvo de cada fita simples marcando o início da duplicação (Figura 1, etapa 2) (Mullis apud Saiki, 1988).

A região onde o *primer* anelou se tornou uma região de fita dupla. A extensão é a etapa onde uma enzima adiciona os nucleotídeos completando a duplicação da

fita de DNA, nessa etapa a reação é submetida a temperaturas de 68 °C ou 72 °C (dependendo da enzima utilizada), como mostrado na Figura 1 etapa 3 (Mullis apud Saiki, 1988).



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado do Instituto Superior Técnico, 2005.

A maioria das enzimas perdem suas propriedades ao serem submetidas a temperaturas acima de 50°C. Para evitar a inativação da enzima durante a reação, a enzima utilizada na PCR (Taq-DNA polimerase) é retirada da bactéria *Thermus Aquaticus* (*Taq*). A temperatura do habitat natural da *Taq* é em torno de 95°C. Portanto, a enzima não é afetada na etapa de desnaturação resistindo a todo o processo da reação (Mullis apud Saiki, 1988).

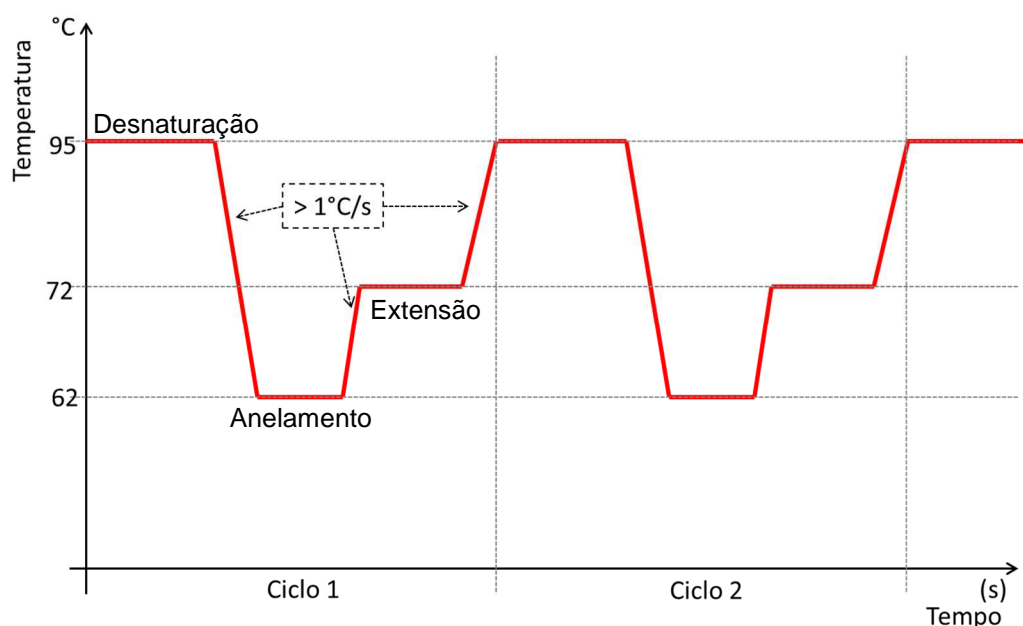
A existência de um equipamento que faça os ciclos de temperatura de forma estável com rampa de subida e descida acentuada facilita a execução da reação. Esse equipamento é chamado termociclador (Zahaet al., 2003). Considerando que a reação é exponencial  $2^n$ , usualmente o termociclador deve realizar entre 20 e 40 ciclos para obter DNA suficiente para a detecção em um gel de agarose, por exemplo. Uma amplificação em ciclos é mostrada na Figura 1 (Mullis apud Saiki, 1988).

## 2.5 Termociclador

Quando ocorreu a descoberta da PCR, o teste era realizado em banho-maria. Eram colocados três banhos-maria com as três temperaturas do ciclo e manualmente era executada a análise trocando o tubo com a reação de um banho para outro. O tempo também era cronometrado de forma manual para cada etapa do ciclo. Cabe salientar que as reações geralmente duram de 2 a 5 horas, sendo assim, um

equipamento que fizesse as trocas de temperaturas facilitaria a rotina dos laboratórios. Para esse fim foi desenvolvido o equipamento termociclador. Esse equipamento é responsável por realizar os ciclos de temperaturas e tempos na reação de amplificação do DNA (Zaha et al., 2003). A Figura 2 representa os ciclos de temperatura do termociclador em função do tempo. A estabilidade da temperatura após atingir o alvo necessário e o número de ciclos mínimos para a realização da técnica são pontos críticos. Esses pré-requisitos são fundamentais, pois a especificidade do teste depende da temperatura e se esta não for criticamente estável em torno do alvo, o comportamento dos componentes da PCR será alterado. A estabilidade de temperatura no alvo deve ser inferior a  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e a taxa de variação das rampas de temperatura devem ser superiores a  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  por segundo (Chenet al., 2011). De outra forma, uma excessiva variação da temperatura em torno do alvo (instabilidade) poderá acarretar em falhas na reação de amplificação (Qiu; Yuan, 2005).

Figura 2: Ciclos de temperatura da PCR no termociclador



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Pal D. et al, 2004.

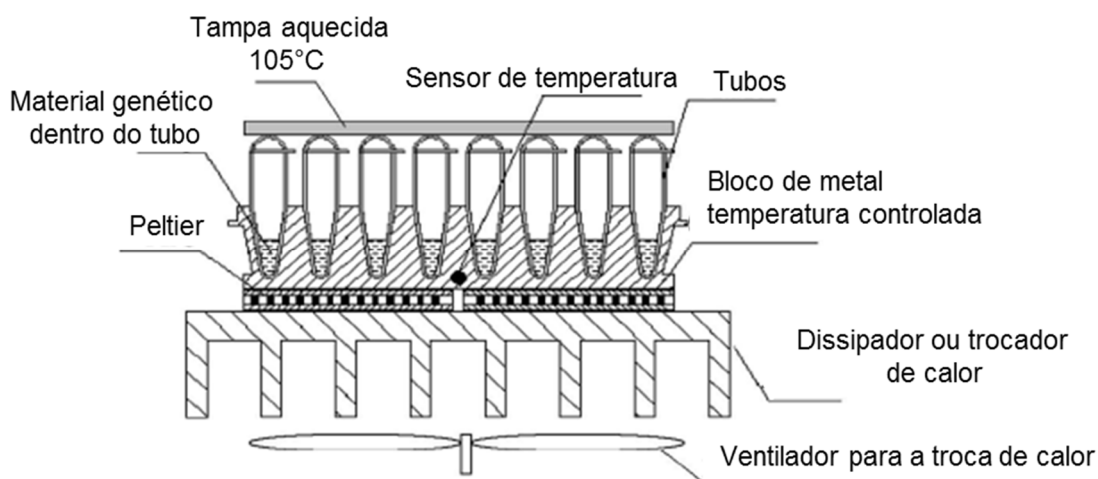
A figura representagráficamente dois ciclos de temperatura de uma PCR realizada em um termociclador destacando as regiões de desnaturação, anelamento, extensão e a velocidade mínima das rampas.

A maioria dos termocicladores utilizam pastilhas termoelétricas de efeito Peltier como componente de aquecimento e resfriamento da reação. Para o controle das temperaturas, os fabricantes não divulgam os tipos de controladores utilizados nos

equipamentos comercializados. Entretanto, em trabalhos acadêmicos é comum encontrar controladores do tipo PID convencional. Apesar de esse controlador ser robusto e estável ele apresenta algumas deficiências quando utilizado para realizar as rampas de temperatura dentro do ciclo, apresentando resultados fora dos tempos-limite mínimos estabelecidos (Qiu; Yuan, 2005).

A estrutura física básica do bloco de aquecimento do termociclador é na formasanduíche. Na parte superior está o bloco de amostras onde serão inseridos os tubos com amostras de DNA para a amplificação. Esse é o bloco que deve ter sua temperatura controlada nos alvos requeridos pelo operador. Na parte inferior encontra-se o dissipador de calor ou trocador de calor. O dissipador é responsável por fornecer calor quando da elevação de temperatura do compartimento das amostras ou dissipar calor quando da diminuição de temperatura. Para auxiliar o processo, é inserida dissipação com ventilação forçada a fim de estabelecer uma temperatura média de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  no dissipador (Danvic, 2006). Essa temperatura do dissipador é um pré-requisito da pastilha termoelétrica Peltier que é responsável por realizar a troca de calor entre o bloco de amostras e o dissipador (Figura 3) (Qiu; Yuan, 2005).

Figura 3: Esquema mecânico do termociclador



Fonte: Adaptado de Peng et al, 2013

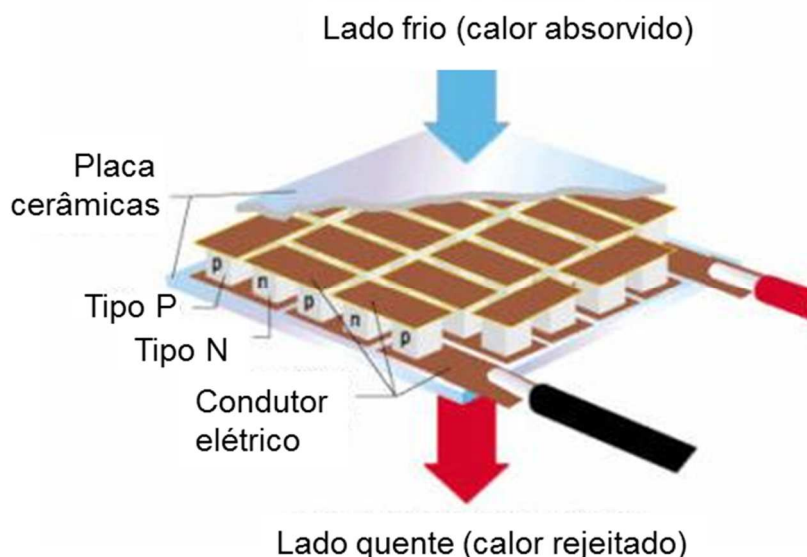
A figura mostra o esquema mecânico do bloco de aquecimento de um termociclador com os respectivos elementos internos.

## 2.6 Pastilha Termoelétrica de Efeito Peltier

A pastilha termoelétrica tem como propriedade converter energia elétrica em gradiente de temperatura. É fabricada de material sólido e dispensa o uso de gás refrigerante no seu funcionamento (Becker et al., 2012). Essa propriedade foi descoberta em 1834 por Jean Charles Athanase Peltier (Riffat et al.,2003).

A pastilha é formada por uma sequência de materiais semicondutores tipo P e tipo N contendo duas faces denominadas face fria ou lado frio e face quente ou lado quente(Figura 4). Ao circular corrente elétrica nos pares tipos P e N na direção tipo N para tipo P a temperatura diminui na face fria e aumenta na face quente. Nessa condição, a pastilha absorve calor na face fria e expela na face quente, com esse processo é possível refrigerar materiais em contato com a face fria e aquecer substâncias em contato com a face quente. De maneira oposta, ao circular a corrente elétrica do sentido tipo P para tipo N a temperatura diminui na face quente e aumenta na face fria tendo um comportamento semelhante ao anterior, porém de forma oposta (Riffat et al.,2003).

Figura 4: Pastilha termoelétrica de efeito Peltier



Fonte: Danvic, 2006.

A figura mostra uma pastilha termoelétrica de efeito Peltier, com destaque para as placas cerâmicas e semicondutores tipo P e tipo N, além da direção do fluxo de calor.

A propriedade térmica da pastilha Peltier depende do fluxo e intensidade da corrente elétrica. A equação característica para modelagem da pastilha Peltier é dada pelas Equações 1 e 2.

$$P = \alpha \Delta_T I + I^2 R \quad (1)$$

$$Tq = P + \alpha T_f I - \frac{1}{2} I^2 R \quad (2)$$

Onde:

$\Delta_T$  = temperatura face quente menos temperatura face fria;

$\alpha$  = coeficiente Seebeck, diferença de potencial gerado por dois diferentes metais ou semimetais em contato um com o outro submetidos a um gradiente de temperatura (Ioffe, 1957);

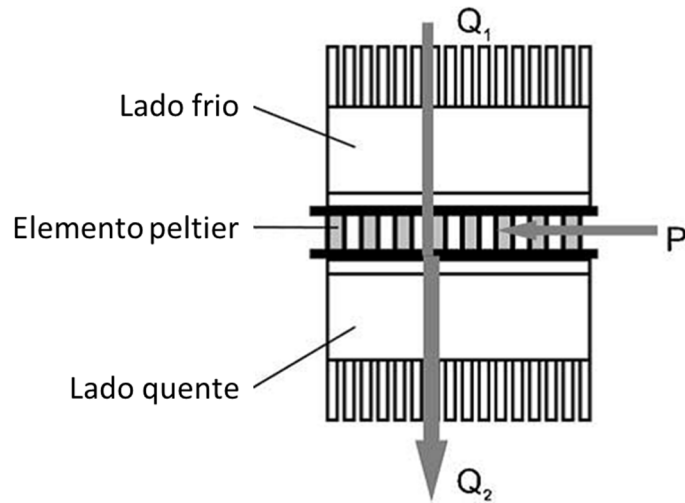
$T_f$  = temperatura face fria.

Para o funcionamento correto da pastilha Peltier, é necessária a montagem em um sistema sanduíche com três elementos. De um lado o dispositivo onde a temperatura será controlada, no meio a pastilha Peltier e do outro lado o dissipador para realizar a troca de calor, Figura 5 (Riffat et al., 2003).

A pastilha de efeito Peltier é dimensionada por três fatores seguindo a lei de Joule. O  $I_{max}$  que é a corrente máxima suportada pelo componente, o  $V_{max}$  que é a tensão máxima suportada pelo componente e o  $\Delta T_{max}$  que é a diferença máxima de temperatura entre uma face e outra do dispositivo. A troca de calor para no momento em que um dos três fatores é atingido. Essas determinações encontram-se no *datasheet* de cada componente específico Peltier (Riffat et al., 2003).



Figura 5: Arranjo de cooler termoelétrico em sistema sanduíche



Fonte: Riffat e Xiaoli, 2003.

A figura mostra a organização de um cooler termoelétrico em forma de sanduíche, com o fluxo de calor do lado quente para o lado frio.

### 2.6.1 Carga térmica condutiva

A carga térmica é do tipo passiva quando a temperatura de um ambiente ou componente é controlada. Cargas térmicas passivas podem ser obtidas por radiação, convecção ou condução.

A carga térmica condutiva é aquela em que a transferência de calor é realizada entre as moléculas de um determinado material para outro com contato direto. Com a utilização do elemento Peltier, o calor é retirado de um componente que está em contato direto com uma face e transferido para outro em contato com outra face. Com isso pode ser classificado como carga térmica condutiva (Halliday, 2009).

A quantidade de carga térmica aplicada a um material por um determinado período resulta na potência térmica. A potência térmica é calculada a partir da área, da espessura do material e da diferença de temperatura entre as duas faces como mostra a Equação 3 (Halliday, 2009).

$$P = \frac{Q}{t} = \frac{KA\Delta T}{\Delta L} \quad (3)$$

Onde:

$P$  = potência condutiva;

$Q$  = energia transferida;

$t$  = tempo;

$K$  = constante de condutividade térmica (Tabela 1);

$\Delta L$  = espessura do material, o trajeto que o calor irá percorrer;

$A$  = área do material;

$\Delta T$  = diferença de temperatura entre a face fria e a face quente, Equação 4.

$$\Delta T = T_q - T_f \quad (4)$$

Onde:

$T_q$  = temperatura da face quente;

$T_f$  = temperatura da face fria (Halliday, 2009).

A potência condutiva depende diretamente da condutividade térmica do material. A Tabela 1 mostra a condutividade térmica de alguns materiais (Halliday, 2009).

Tabela 1: Condutividade térmica

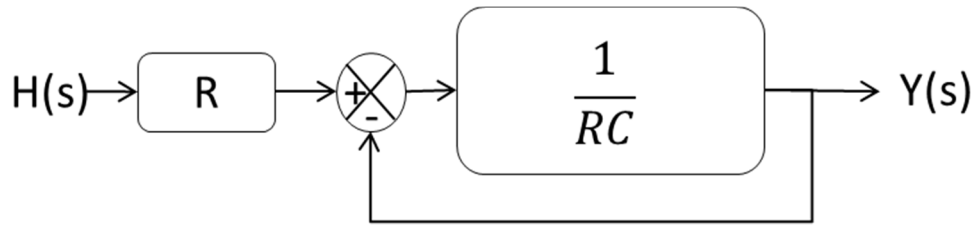
Materiais	Condutividade Térmica K (W/mC)
Prata	428
Cobre	401
Ouro	315
Alumínio	235
Latão	109
Ferro	67

Fonte: Halliday, 2009.

## 2.7 Modelagem de Sistemas Térmicos

Os sistemas térmicos podem ser analisados em termos de Resistência Térmica (R) e Capacitância Térmica (C), podendo ser aproximados por um sistema de primeira ordem, onde  $H(s)$  representa a entrada e  $Y(s)$  representa a saída, Figura 6 (Ogata, 2010).

Figura 6: Representação de um Sistema Térmico



Fonte: Ogata, 2010.

A figura apresenta uma representação de sistema térmico com realimentação negativa, onde  $H(s)$  representa a entrada,  $R$  é a resistência térmica,  $C$  é a capacitância térmica e  $Y(s)$  é a saída do sistema.

Desenvolvendo as operações matemáticas do sistema da Figura 6, é possível chegar a um sistema de primeira ordem conforme Equação 5 (Ogata, 2010).

$$\frac{Y(s)}{H(s)} = \frac{R}{RC(s) + 1} \quad (5)$$

Outra forma de modelar um sistema térmico é com a técnica de análise de resposta ao degrau unitário, pela técnica de Ziegler-Nichols (Ogata, 2010). Essa técnica consiste em aplicar um degrau unitário na entrada do processo e observar o comportamento até o regime de estado estacionário. Dessa forma é possível encontrar o ganho  $K$ , a constante de tempo  $\tau$  e o atraso de transporte  $\theta$  do sistema, Figura 7. A constante  $\tau$  é o tempo em que o processo necessita para atingir 63,2% de  $K$ , sendo  $K$  definido pela Equação 6.

$$K = \frac{Vf - Vi}{Pr} \quad (6)$$

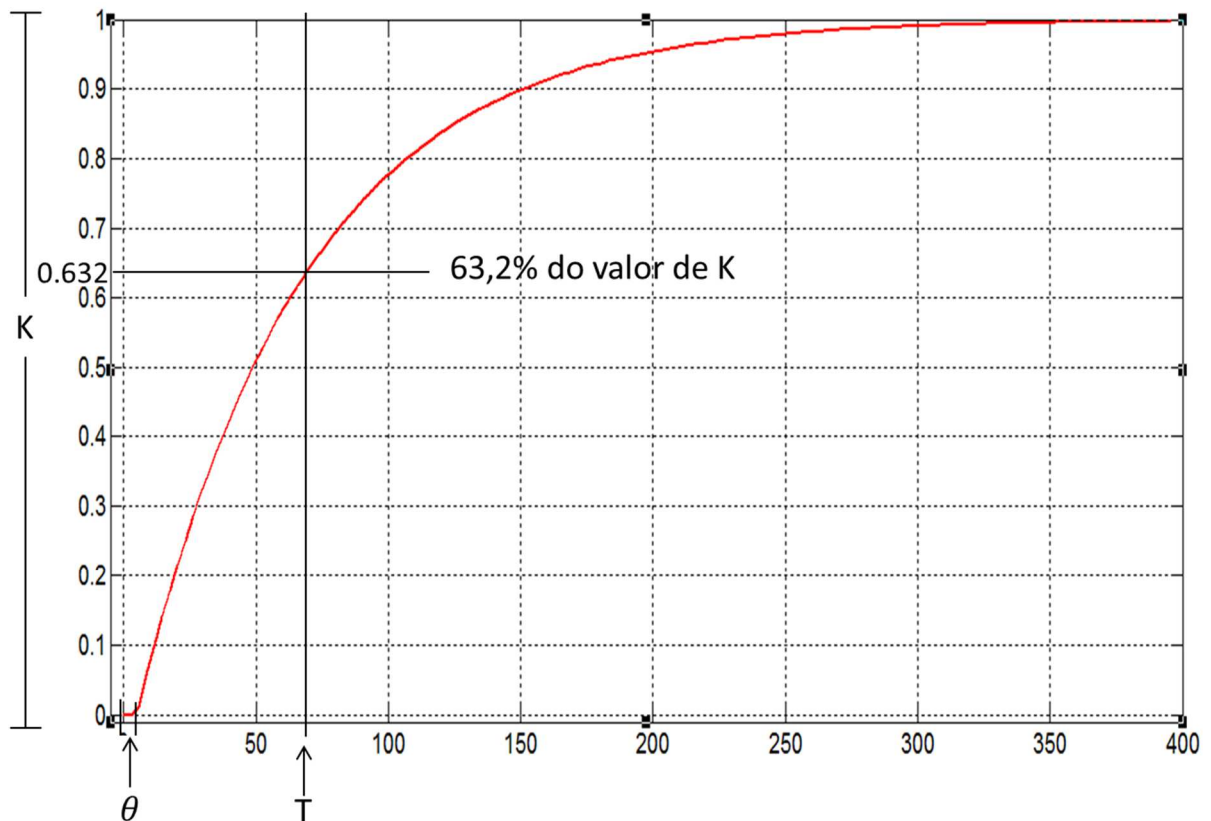
Onde:

$Vf$  = valor final;

$Vi$  = valor inicial;

$Pr$  = intensidade do pulso de entrada, normalmente 1 (pulso unitário).

Figura 7: Resposta ao Degrau Unitário



Fonte: autoria própria, adaptada de Ogata (2009).

A figura é uma representação gráfica da resposta ao degrau unitário, onde o eixo y mostra o ganho (K) em função do tempo em segundos (eixo x). T é o tempo que o sistema necessita para atingir 63,2 % do ganho, e  $\theta$  é o atraso de transporte do sistema.

Com os parâmetros K,  $\tau$  e  $\theta$  é possível descrever a planta de um sistema de primeira conforme Equação 7.

$$G(s) = \frac{K * e^{-\theta}}{\tau s + 1} \quad (7)$$

Onde:

$e$  = constante de Euler.

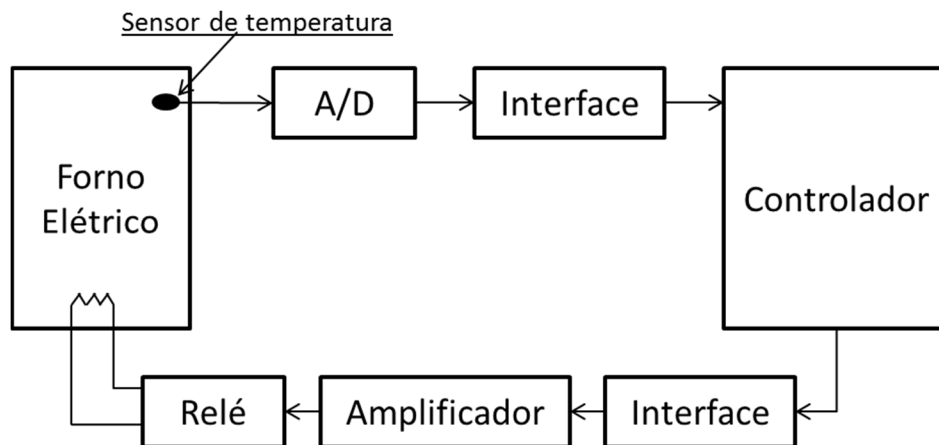
## 2.8 Sistemas de Controle

O sistema de controle é, na maioria das vezes, um algoritmo capaz de reagir baseado na resposta de uma planta, aplicando intensidade de potência necessária para o funcionamento da mesma. Tem como princípio a medição via sensores e o

controle das ações responsivas de acordo com os valores obtidos pela leitura destes sensores (Ogata, 2010).

Existem sistemas de controle que podem ser utilizados para várias finalidades como por exemplo no controle de velocidade, controle de temperatura, controle de pressão, entre outros. Como exemplo, pode ser mostrado um sistema de controle de temperatura de um forno elétrico(Figura 8)(Ogata, 2010).

Figura 8: Esquema de um sistema de controle de temperatura



Fonte: Adaptado Ogata, 2010.

A figura mostra os componentes e o fluxo de informações de um sistema de controle de temperatura de um forno elétrico.

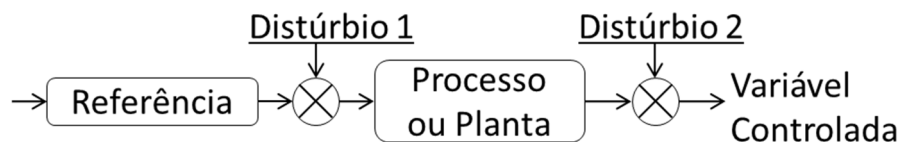
Com a evolução dos sistemas de controle, tornou-se necessário montar e analisar os controles através de equações matemáticas complexas. Podem ser encontrados controladores em malha aberta ou fechada com apenas uma planta de primeira ordem tanto quanto plantas com muitas malhas e ordens superiores. Diversos tipos de controladores já foram desenvolvidos com as mais diferentes formas de realizar os cálculos. Entretanto, os controladores mais encontrados são do tipo PID, alguns deles são descritos a seguir (Ogata, 2010).

### 2.8.1 Sistema em malha aberta

Um sistema é dito em malha aberta quando não há realimentação, ou seja, não há monitoramento do comportamento da planta via sensor, Figura 9. O sistema possui uma entrada chamada de referência que é inserida diretamente no controlador que aciona um processo ou uma planta. A característica distintiva de um sistema de circuito aberto é que ele não pode compensar quaisquer distúrbios que poderão

ocorrer na variável controlada. Esse sistema é simplesmente comandado pela entrada (Nise, 2010).

Figura 9: Sistema de controle em malha aberta



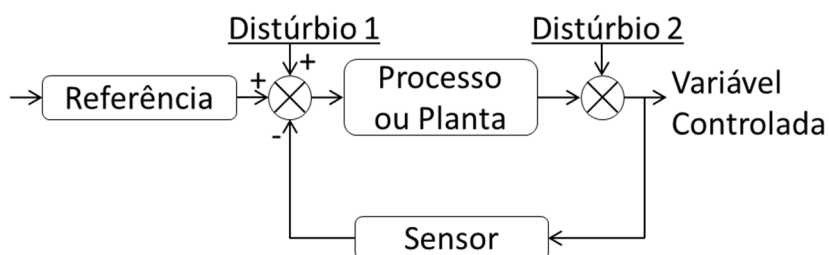
Fonte: Adaptado de Nise, 2010.

A figura é uma representação esquemática de um sistema de malha aberta. Esse sistema é unidirecional, ou seja, ele não recebe informações da variável controlada.

### 2.8.2 Sistemas em malha fechada

Os sistemas em malha fechada compensam a deficiência encontrada no sistema de malha aberta, recebendo informações da variável controlada, via sensores. Esse sistema, ao receber informações, pode corrigir as perturbações existentes no processo. A realimentação é recebida através de um caminho de retorno e é comparada com a entrada na junção de soma, Figura 10. A realimentação é normalmente negativa permitindo ao controlador atuar no processo sobre a diferença entre a referência e a variável de controle (erro) para que se aproxime de zero (Nise, 2010).

Figura 10: Sistema de controle em malha fechada



Fonte: Adaptado de Nise, 2010.

A figura é uma representação esquemática de um sistema de malha fechada com realimentação negativa, onde sensores transmitem informações sobre a saída (variável controlada), permitindo ações corretivas.

### 2.8.3 Controladores PID

Controladores PID são os mais utilizados em diversas aplicações, já que são robustos e de simples implementação. Atualmente mais de 84% dos controladores utilizados na indústria em geral são do tipo PID (Song, 2016), chegando a 97% nas indústrias química e de celulose. Até mesmo os controladores mais sofisticados possuem em suas estruturas hierárquicas um controlador PID, devido as características citadas (Aström; Hägglund, 2004).

O controlador PID possui a ação de três (3) diferentes cálculos chamados de proporcional (P), Integral (I) e o Derivativo (D). Como o próprio nome diz, o controle proporcional é proporcional ao erro de controle. Na maioria das vezes um controlador proporcional puro tem o mesmo comportamento de um controlador liga e desliga mantendo um erro estacionário. A lei de controle proporcional é descrita pela Equação (8) (Astrom; Hagglund, 1995).

$$u(t) = Ke(t) \quad (8)$$

Onde:

$u(t)$  = sinal de controle no tempo  $t$ ;

$K$  = ganho do controle;

$e(t)$  = erro no instante  $t$ .

A parcial integral, Equação 9, tem como função diminuir o erro em estado estacionário deixado pela parcial proporcional. A ação da integral forçará a diminuição do sinal de controle quando houver um pequeno erro positivo e forçará um aumento do sinal quando houver um pequeno erro negativo. Essa ação ocorre sempre no decorrer da ação de controle, não importando o quão pequeno é o erro (Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = K \int e dt \quad (9)$$

A ação derivada tem como finalidade melhorar a estabilidade do sistema. Devido à dinâmica do processo, há um atraso entre alterações na variável de controle e sua percepção pelo sistema. A parcial derivativa atua de forma preditiva se antecipando ao erro. Esse cálculo é realizado analisando a curva tangente do erro, Equação 10 (Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = K \frac{\partial e}{\partial t} \quad (10)$$

O controlador PID é a soma das três parciais, a Equação 11 descreve a estrutura básica do controlador (Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = K_p e(t) + K_i \int e dt + K_d \frac{\partial e}{\partial t} \quad (11)$$

Onde:

$K_p$ ,  $K_i$  e  $K_d$  = parâmetros de sintonia do controlador.

Como descrito anteriormente, existem diferentes estruturas de controladores PID. A seguir serão apresentadas algumas delas.

#### 2.8.4 PID Genérico

O PID Genérico está baseado na Equação 11, dessa forma, pode ser simplificado pela soma algébrica das parciais P (Proporcional), I (Integral) e Derivativo, conforme Equação 12 (Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = P(t) + I(t) + D(t) \quad (12)$$

A parcial Proporcional é o ganho proporcional multiplicado pelo erro conforme Equação 13, quando na forma contínua. Na forma discreta, pode ser descrito conforme Equação 14.

$$P(t) = K_p * e(t) \quad (13)$$

$$P(n) = K_p * e(n) \quad (14)$$

Onde:

$n$  = número da amostra atual do erro em relação ao tempo de amostragem.

A parcial Integral pode ser aproximada pela soma da área dos trapézios como é demonstrado abaixo, sendo  $T_s$  o tempo de amostragem do sinal:

$$I(n * T_s) = K_i * \int_0^{n * T_s} e(n) dt \quad (15)$$



$$I(n * Ts) = Ki * \int_0^{(n-1)*Ts} e(n) dt + [e(n * Ts) + e((n - 1) * Ts)] * \frac{Ts}{2} \quad (16)$$

$$I(n) = I(n - 1) + Ki * e(n) * \frac{Ts}{2} + Ts * e(n - 1) \quad (17)$$

A transformada Z da parcial integral (Equação 17) é demonstrada na Equação 18 e simplificada na Equação 19:

$$I(z) = I(z) * z^{-1} * \frac{Ki * Ts}{2} * (E(z) + E(z) * z^{-1}) \quad (18)$$

$$I(z) = \frac{Ki * Ts}{2} * \frac{1 + z^{-1}}{1 - z^{-1}} * E(z) \quad (19)$$

A parcial Derivativa segue o mesmo conceito da parcial Integral, conforme demonstrado na Equação 20.

$$D(n * Ts) = Kd * \frac{de(t)}{dt} \quad (20)$$

Sabendo que a derivada é uma reta tangente, esta pode ser aproximada pela diferença entre a distância entre dois pontos. Os pontos são os períodos de amostragem sendo a distância entre eles igual ao tempo entre uma amostra e outra. A aproximação é descrita pelas Equações 21 e 22.

$$D(n * Ts) = Kd * \frac{e(n * Ts) - e[(n - 1) * Ts]}{Ts} \quad (21)$$

$$D(n) = \frac{Kd}{Ts} * e(n) - e(n - 1) \quad (22)$$

A transformada Z da parcial derivativa é demonstrada na Equação 23.

$$D(z) = \frac{Kd}{Ts} * (1 - z^{-1}) * E(z) \quad (23)$$

Sendo a Equação 24 a transformada Z da parte proporcional, o PID Genérico pode ser descrito pela soma das três partes, logo a equação Z do controlador pode ser demonstrada segundo o conjunto de Equações 24, 25 e 26.

$$P(z) = Kp * E(z) \quad (24)$$

$$U(z) = P(z) + I(z) + D(z) \quad (25)$$

$$U(z) = Kp * e(z) + \frac{Ki * Ts}{2} * \frac{1 + z^{-1}}{1 - z^{-1}} * E(z) + (Kd * \frac{1 - z^{-1}}{Ts} * E(z)) \quad (26)$$

Simplificando a Equação 26, a relação do controle pelo erro de referência (diferença entre o alvo e o resultado lido), é demonstrada abaixo.

$$\frac{U(z)}{E(z)} = \left( Kp - \frac{Ki * Ts}{2} \right) + \left( \frac{Ki * Ts}{1 - z^{-1}} \right) + \left( \frac{Kd * (1 - z^{-1})}{Ts} \right) \quad (27)$$

Separando a Equação 27 nas partes A, B e C é possível encontrar a lei de controle digital do controlador PID Genérico conforme equação das diferenças demonstrado nas Equações 28 e 29.

$$\frac{U(z)}{E(z)} = A + \frac{B}{1 - z^{-1}} + C * (1 - z^{-1}) \quad (28)$$

$$U(z) * (1 - z^{-1}) = A * E(1 - z^{-1}) + B * E(z) + C * E(1 - 2z^{-1} + z^{-2}) \quad (29)$$

Sabendo que  $X(z) = x(n)$ ,  $X(z^{-1}) = x(n-1)$  e  $X(z^{-2}) = x(n-2)$ , a Equação 29 pode ser simplificada como descrito na Equação 30.

$$u(n) = u(n - 1) + (A + B + C) * e(n) - (A + 2C) * e(n - 1) + C * e(n - 2) \quad (30)$$

Separando as partes da Equação 30 em função do erro onde  $q_0$  corresponde a parte do erro atual,  $e(n)$ ,  $q_1$  corresponde a parte do erro da amostra anterior,  $e(n-1)$  e  $q_2$  correspondendo a parte do erro de duas amostras anteriores,  $e(n-2)$ ,

podem ser seguidos os passos conforme Equações 31, 32 e 33 para encontrar a lei de controle descrita na Equação 34 (Aström e Hägglund, 1995).

$$q_0 = A + B + C = K_p - \frac{K_i * T_s}{2} + \frac{K_d}{T_s} \quad (31)$$

$$q_1 = -(A + 2C) = -\left(K_p - \frac{K_i * T_s}{2} + 2 * \frac{K_d}{T_s}\right) \quad (32)$$

$$q_2 = C = \frac{K_d}{T_s} \quad (33)$$

$$u(n) = u(n - 1) + q_0 * e(n) - q_1 * e(n - 1) + q_2 * e(n - 2) \quad (34)$$

#### 2.8.5 PID ISA

As equações do Controlador PID ISA são semelhantes às equações do Controlador PID Genérico. Existe uma diferença entre os dois controladores no que diz respeito aos parâmetros de ganhos utilizados nas parciais Proporcional, Integral e Derivativa conforme demonstrado na Equação 35 (Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = K_p e(t) + \frac{K_p}{K_i} \int e(t) dt + K_p * K_d \frac{\partial e}{\partial t} \quad (35)$$

Desenvolvendo a Equação 35 da mesma forma que foi desenvolvida a Equação 11, é possível encontrar a lei de controle do Controlador PID ISA conforme descrito abaixo. Extraíndo os parâmetros  $q_0$ ,  $q_1$  e  $q_2$  (Equações 36, 37 e 38), estes podem ser inseridos na Equação 34, pois é a mesma para os dois controladores, tendo assim a lei de controle do controlador PID ISA.

$$q_0 = K_p + \frac{K_c * T_s}{2 * K_i} + \frac{K_c * K_d}{T_s} \quad (36)$$

$$q_1 = -\left(K_p - \frac{K_c * T_s}{2 * K_i} + 2 * \frac{K_c * K_d}{T_s}\right) \quad (37)$$

$$q2 = \frac{Kc * Kd}{Ts} \quad (38)$$

### 2.8.6 PID Paralelo

Da mesma forma que o PID ISA, o Controlador PID Paralelo também é semelhante ao Controlador PID Genérico. A diferença entre os dois controladores também está nos parâmetros de ganhos utilizados nas parciais Proporcional, Integral e Derivativa conforme demonstrado na Equação 65(Aström; Hägglund, 1995).

$$u(t) = K_p e(t) + \frac{1}{K_i} \int e(t) dt + K_d \frac{\partial e}{\partial t} \quad (39)$$

Da mesma forma que o PID ISA, desenvolvendo a Equação 39 utilizando as mesmas regras utilizadas na Equação 11, é possível encontrar a lei de controle do Controlador PID Paralelo conforme descrito abaixo. A Equação 34 é a mesma para os dois controladores, logo os parâmetros  $q_0$ ,  $q_1$  e  $q_2$  (Equações 40, 41 e 42) podem ser inseridos nessa equação.

$$q_0 = Kp + \frac{Ts}{2 * Ki} + \frac{Kd}{Ts} \quad (40)$$

$$q_1 = - \left( Kp - \frac{Ts}{2 * Ki} + 2 * \frac{Kd}{Ts} \right) \quad (41)$$

$$q_2 = \frac{Kd}{Ts} \quad (42)$$

### 2.8.7 PID de Dahlin

Dahlin desenvolveu um algoritmo para ser utilizado em sistema com atraso de transporte. Nesse controlador foi inserido um parâmetro de velocidade que aumenta ou diminui o tempo em que o erro deve chegar a 0 (zero). A Equação 43 demonstra os parâmetros do controlador de Dahlin(Seborg et al., 2004).

$$\frac{y(t)}{u(t)} = \frac{(1-p)z^{-d-1}}{1-pz^{-1}} \quad (43)$$

$$p = e^{-Ts/\tau mF} \quad (44)$$

$$d = \frac{\theta}{T_s} \quad (45)$$

Onde:

$p$  = parâmetro de velocidade do controlador definido pela Equação 44;

$d$  = número de amostras de atraso de transporte do sistema, Equação 45;

$\tau mF$  = tempo de resposta desejado do sistema em malha fechada;

$\theta$  = atraso de transporte contínuo do sistema;

$e$  = constante de Euler.

Sendo um processo  $Gp(z)$  descrito pela Equação 46, aplica-se o controle multiplicando a Equação 43 pelo inverso da planta como demonstrado na Equação 47.

$$Gp(z) = \frac{z^{-(d+1)}(b_0 + b_1z^{-1} + b_2z^{-2})}{1 + a_1z^{-1} + a_2z^{-2}} \quad (46)$$

$$Gc(z) = \frac{1}{Gp(z)} * \frac{(1-p)z^{-(d+1)}}{1-pz^{-1} - (1-p)z^{-(d+1)}} \quad (47)$$

Por aproximação, o numerador (B) do processo pode ser comparado conforme Equação 48. Essa simplificação faz com que B seja um produto escalar e o controlador pode ser escrito conforme Equação 49.

$$b_0 + b_1z^{-1} + b_2z^{-2} = b_0 + b_1 + b_2 \quad (48)$$

$$Gc(z) = \frac{(1-p)}{b_0 + b_1 + b_2} * \frac{1 + a_1z^{-1} + a_2z^{-2}}{1-pz^{-1} - (1-p)z^{-(d+1)}} \quad (49)$$

Por estar utilizando amostras passadas para fazer uma predição da variável de controle, o denominador do controlador pode ser expresso conforme evolução da aproximação, Equações 50 e 51.

$$1 - pz^{-1} - (1 - p)z^{-(d+1)} = (1 - z^{-1}) * [1 + d * (1 - p)] \quad (50)$$

$$G_c(z) = \frac{(1 - p)}{(b_0 + b_1 + b_2) * (1 + d * (1 - P))} * \frac{1 + a_1z^{-1} + a_2z^{-2}}{1 - z^{-1}} \quad (51)$$

Como a primeira parte da Equação 51 é um produto escalar, pode ser transformado em um ganho  $\bar{K}$  conforme Equação 52.

$$\bar{K} = \frac{(1 - p)}{(b_0 + b_1 + b_2) * (1 + d * (1 - P))} \quad (52)$$

Logo o controlador pode ser escrito conforme Equação 53.

$$G_c(z) = \bar{K} * \frac{1 + a_1z^{-1} + a_2z^{-2}}{1 - z^{-1}} \quad (53)$$

Tomando como base a Equação 54, que é a equação do Controlador PID Ideal, pode ser igualado  $\bar{K}$  com o primeiro parâmetro do controlador,  $\bar{K}a_1$  igualado ao segundo parâmetro e  $\bar{K}a_2$  igualado com o terceiro parâmetro como demonstrado nas Equações 55, 56 e 57.

$$G_{c\_PID}(z) = K_c * \frac{\left[ \left( 1 + \frac{T_s}{K_i} + \frac{Kd}{T_s} \right) - \left( 1 + \frac{2Kd}{T_s} \right) z^{-1} + \frac{Kd}{T_s} z^{-2} \right]}{1 - z^{-1}} \quad (54)$$

$$\bar{K} = K_c * \left( 1 + \frac{T_s}{K_i} + \frac{Kd}{T_s} \right) \quad (55)$$

$$\bar{K} * a_1 = -K_c * \left( 1 + \frac{2Kd}{T_s} \right) \quad (56)$$

$$\bar{K} * a_2 = K_c * \frac{Kd}{T_s} \quad (57)$$

Desenvolvendo os cálculos das Equações 55, 56 e 57, é possível encontrar os parâmetros do controlador, conforme descrito nas Equações 58, 59 e 60.

$$Kc = -\bar{K}(a1 + 2 * a2) \quad (58)$$

$$Ki = -\frac{(a1 + 2 * a2)Ts}{1 + a1 + a2} \quad (59)$$

$$Kd = \frac{-a2Ts}{a1 + 2 * a2} \quad (60)$$

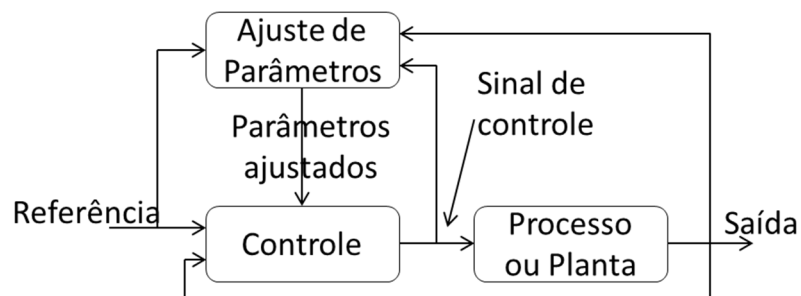
Dessa forma a lei de controle do Controlador PID com síntese de Dahlin pode ser descrita pela Equação 61.

$$u(n) = u(n - 1) + q0 * e(n) - q1 * e(n - 1) + q2 * e(n - 2) \quad (61)$$

### 2.8.8 Controladores Adaptativos

Um controlador adaptativo tem como característica se adaptar a mudanças que venham a ocorrer durante a operação de controle. Portanto o controlador pode modificar o seu comportamento em resposta a mudanças na dinâmica do processo e do caráter dos distúrbios. Esse controlador possui parâmetros ajustáveis e um mecanismo para ajustar tais parâmetros. Um sistema de controle adaptativo pode ser visto contendo dois laços (*loops*). Um laço é um circuito normal com o processo e o controlador e o outro laço é o circuito de ajuste de parâmetros, Figura 11 (Aström; Wittenmark, 2008).

Figura 11: Diagrama de um controlador adaptativo



Fonte: Adaptada de Aström e Wittenmark, 2008.

A figura é uma representação esquemática de um controlador adaptativo com uma malha de controle e uma malha de ajuste dos parâmetros do controle. As setas indicam a direção do fluxo de informações.

### 2.8.9 Controlador de variância mínima (MV)

O controlador de variância mínima tem por objetivo controlar a saída do sistema para que a diferença em relação à referência seja a menor possível. Esse controlador utiliza uma predição baseada no modelo da planta para calcular a saída do controle atual e permitir que as saídas futuras sigam as trajetórias desejadas. A predição proporciona ao controlador a observação em 'd' passos a frente, onde 'd' é o número de amostras futuras estimadas baseando-se em amostras anteriores (Silveira, 2012). Uma das características do controlador é a aplicação total do valor da variável de controle sem considerar a limitação do sinal de controle disponibilizado pelo hardware (Mejía, 2008).

Um controlador de variância mínima clássico é implementado com o objetivo de minimizar uma função custo definida a partir de critérios de desempenho do sistema de controle em malha fechada (Paz et al., 2005).

O controlador preditivo de variância mínima pode ser projetado utilizando o modelo matemático CARMA (*Controlled Auto-Regressive Moving Average*) conforme equação característica apresentada na Equação (62) (Mejía, 2008).

$$A(z^{-1})y(t) = z^{-d}B(z^{-1})u(t) + C(z^{-1})\zeta(t) \quad (62)$$

Onde:

$y(t)$  = saída da planta;

$u(t)$  = sinal de controle;

$\zeta(t)$  = perturbação aleatória;

$A(z^{-1}), B(z^{-1})$  = polinômios da planta discretizados;

$C(z^{-1})$  = polinômio do filtro, Equação 63.

$$C(z^{-1}) = A(z^{-1})E(z^{-1}) + z^{-d}S(z^{-1}) \quad (63)$$

Onde:

$$E(z^{-1}) = 1 + e_1z^{-1} + \dots + e_nz^{-ne}$$

$$S(z^{-1}) = s_0 + s_1z^{-1} + \dots + s_nz^{-ns}$$

Para eliminar os efeitos de perturbação e obter uma variância mínima possível da saída frente ao sinal de referência, é sugerido escolher o sinal de controle que minimize a função custo dada pela Equação 64 (Mejía, 2008).



$$J = E[y_r(t) - y(t + d)]^2 \quad (64)$$

Onde:

$y_r(t)$  = sinal de referência;

$E$  = operador esperança matemática.

Sendo, o controlador MV preditivo, é necessário estimar “d” passos futuros no cálculo baseado nas amostras anteriores. O modelo do processo de predição é demonstrado na Equação 65.

$$y(t + d) = \left[ \frac{B(z^{-1})}{A(z^{-1})} u(t) + \frac{C(z^{-1})}{A(z^{-1})} \right] + E(z^{-1})\zeta(t + d) \quad (65)$$

Onde:

$y(t + d)$  = saída da planta com “d” amostras futuras estimadas;

$u(t)$  = sinal de controle;

$\zeta(t + d)$  = perturbação aleatória com “d” amostras futuras estimadas, essa variável pode ser obtida através da equação do tipo CARMA;

$A(z^{-1}), B(z^{-1})$  = polinômios da planta discretizados;

$C(z^{-1})$  = polinômio do filtro;

$E(z - 1)$  = representa os “d” primeiros termos da relação  $C(z-1)/A(z-1)$ ;

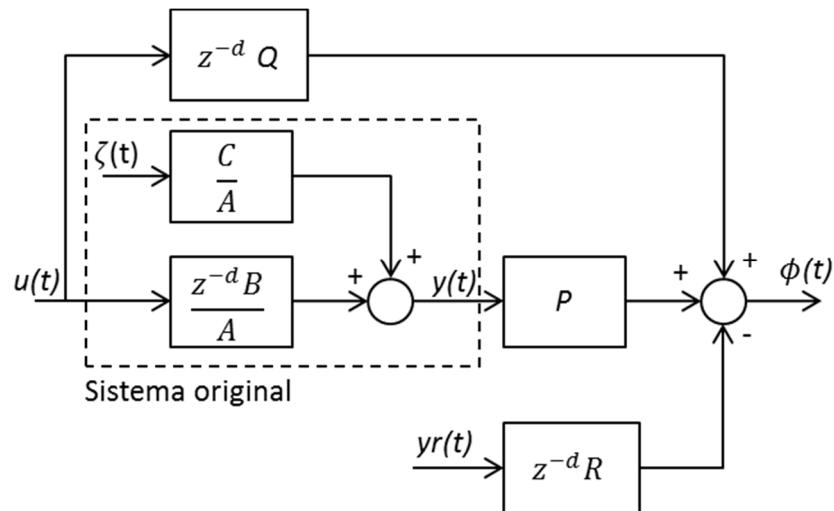
$ne = d - 1$ ;

$ns = \text{máximo}(na - 1, nc - d)$ .

#### 2.8.10 Controlador de variância mínima generalizado (GMV)

O controlador GMV é similar ao MV, sendo a principal diferença que este leva em consideração o nível do sinal de controle. Aqui, o controlador utiliza uma ponderação para que não ocorra a saturação do sinal de controle ou até mesmo a tentativa de aplicar um sinal de controle impossível de ser fornecido pelo sistema. A estrutura do controlador GMV é mostrada na Figura 12 seguido pela Equação 66 (Mejía, 2008).

Figura 12: Estrutura do Controlador GMV



Fonte: Mejía, 2008.

A figura mostra a estrutura de um controlador GMV de forma esquemática. As setas indicam a direção do fluxo de informações. A linha pontilhada indica o controlador GM na sua forma original (MV), enquanto as letras representam variáveis e polinômios da Equação 66.

$$\phi(t+d) = P(z^{-1})y(t+d) + Q(z^{-1})u(t) - R(z^{-1})y_r(t) \quad (66)$$

Onde:

$y(t+d)$  = saída do sistema “d” números de amostragem a frente,

$d$  = atraso de transporte do sistema;

$u(t)$  = sinal de controle;

$y_r(t)$  = referência (set point);

$P$ ,  $Q$  e  $R$  = polinômios de ponderação sobre os respectivos sinais (Mejía, 2008).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Essa seção inicia citando as características de alguns equipamentos encontrados no mercado. Logo após, mostra trabalhos de pesquisa desenvolvidos nessa área, seguido de patentes. No final da seção encontra-se a Tabela 2 onde é mostrado um comparativo entre os trabalhos apresentados, o mínimo de eficácia desejado pela técnica e os equipamentos de mercado.

Em recente pesquisa realizada junto a fornecedores, verificou-se que grandes empresas possuem em seu portfólio diferentes equipamentos, sendo que os de melhor desempenho apresentam rampas de temperatura de até 5 °C/s com estabilidade de +/- 0,2 °C (Bio-Rad, 2015), ou de até 6,4 °C/s com estabilidade inferior a +/- 0,2 °C (Applied Biosystems, 2015). Apesar do avanço tecnológico que permitiu este aumento de desempenho, equipamentos com rampas mais lentas e estabilidade inferior ainda são comumente encontrados no mercado e são utilizados em pesquisa e diagnóstico. Um dos modelos frequentemente encontrados é o PTC-100 (MJ Research). Este equipamento tem rampa de temperatura máxima de 1 °C/s em seu modelo básico de 60 poços, 1,2 °C/s em seu modelo intermediário de 96 poços e até 2,5 °C/s em seu modelo superior que utiliza bloco de aquecimento em ouro ou prata. A estabilidade do PTC-100 é de +/- 0,5 °C para a temperatura de 60 °C. Outros exemplos são: EdvoCycler™ (Edvotec) com rampa de temperatura máxima de 3 °C/s, estabilidade não informada; 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) com rampa de temperatura de até 2,5 °C/s e estabilidade de +/- 0,5 °C a 95 °C somente 30 segundos após atingir o alvo.

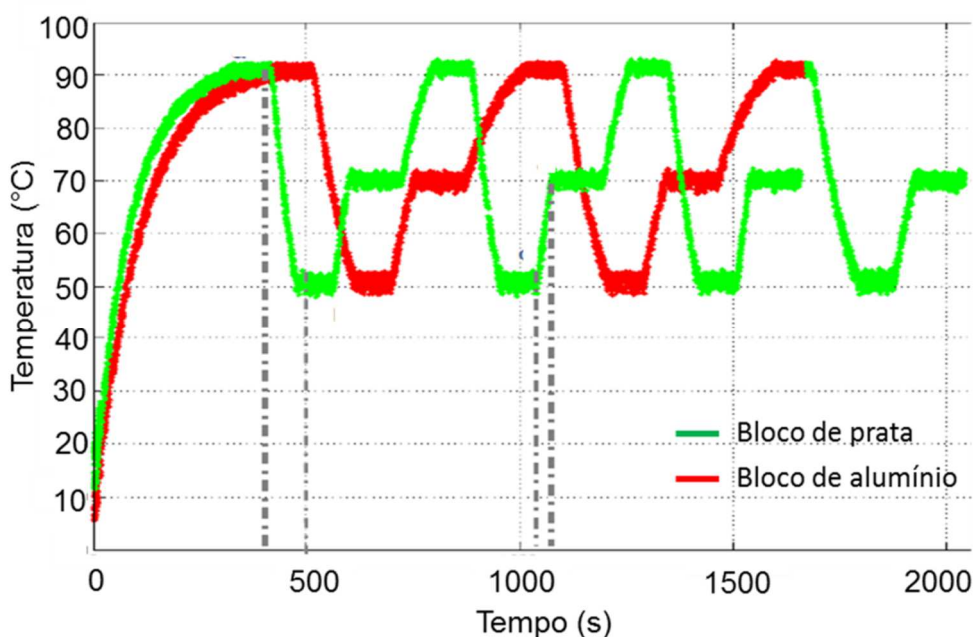
É crescente nos últimos anos o interesse pelo melhoramento dessa tecnologia, o que pode ser visto pela sequência de depósitos de patentes efetuados pelas grandes empresas de tecnologia médica analítica e pesquisas científicas realizadas na área. Alguns desses projetos estão descritos a seguir.

Um trabalho foi desenvolvido pelo próprio autor em 2012. Foram testadas as rampas de aquecimento de um termociclador a partir de um ponto de referência dentro do range de temperatura de um teste de PCR. O sistema de controle do tipo PID foi embarcado em um micro controlador PIC 18 tendo esse o objetivo de controlar o processo de aquecimento. A planta foi montada com um Peltier em um sistema sanduiche, sendo essa monitorada por um sensor LM 35. A placa de potência foi montada com isolador ótico com a finalidade de isolar ruídos externos. O acionamento

da placa de potência foi realizado através de PWM com a intensidade controlada pelo controlador PID. Nesse trabalho foram atingidas rampas de temperatura de  $4,7\text{ }^{\circ}\text{C/s}$  com estabilidade inferior a  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O *overshoot* do foi de  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  e que acentua o tempo de estabilização ficando esse próximo a 13 segundos (Corte, 2012).

Ccanto e Rios (2012) desenvolveram a montagem e os testes com um protótipo de um termociclador. Os testes foram realizados de duas formas. A primeira delas foi com um bloco de amostras usinado em alumínio. Utilizando uma célula Peltier no formato sanduíche, o controlador utilizado foi do tipo PID. Os resultados obtidos foram rampas de temperatura de  $0,4\text{ }^{\circ}\text{C/s}$  e estabilidade de acima  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a realização do segundo teste foi substituído o bloco de alumínio por um bloco de prata obtendo melhora no desempenho. As rampas de temperaturas passaram para  $0,8\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ , porém a estabilidade da temperatura continua superior a  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  conforme Figura 13, não atendendo o mínimo requerido pelo método ( $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Figura 13: Comparação bloco de prata com alumínio



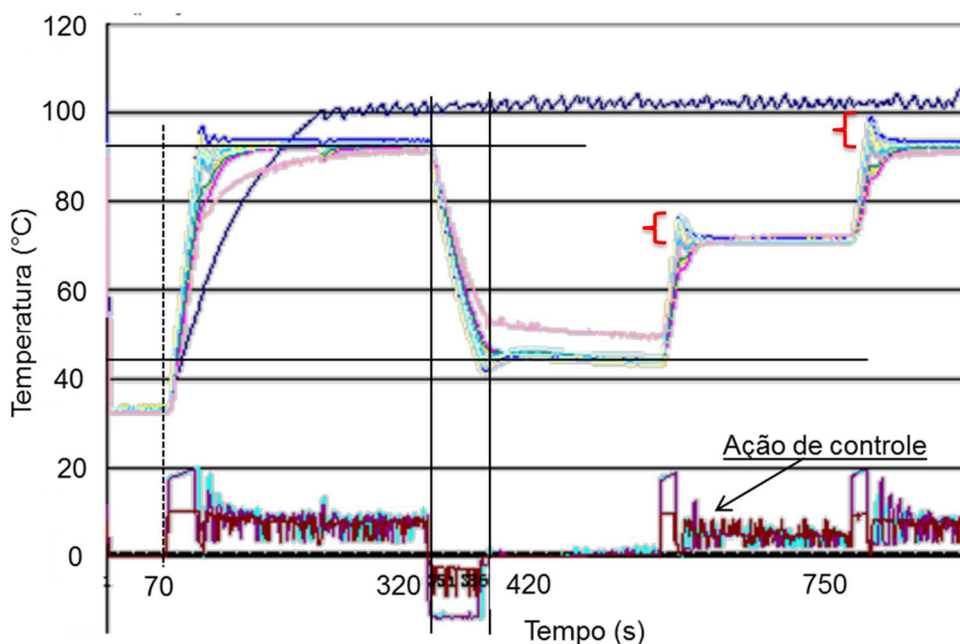
Fonte: adaptado de Ccanto e Rios, 2012.

Comparação dos ciclos de temperatura entre um bloco de aquecimento de alumínio e um bloco de aquecimento de prata. As linhas pontilhadas verticais fortes marcam o início e o fim das rampas de descida e subida.

Outro projeto visando otimizar o desempenho deste equipamento foi desenvolvido utilizando um controlador PID do tipo Fuzzy com auto ajuste. O termociclador possui bloco de amostras de alumínio, sensor de temperatura PT 100 e

célula de Peltier para transferências de calor entre o bloco de amostras e o dissipador. Após os testes os resultados ficaram próximos, mas não atingiram os requisitos mínimos exigidos pela técnica de PCR. A precisão do controle de temperatura é  $\pm 0,1$  °C quando a temperatura do bloco de amostras está entre 20 °C e 72 °C;  $\pm 0,5$  °C entre 72 °C e 90 °C; e  $\pm 0,8$  °C quando está entre 90 e 95 °C. As rampas de temperatura são em torno de 1 °C/s. Esse trabalho priorizou a estabilidade de temperatura, porém o *overshoot* visto no gráfico (Figura 14) não é mencionado ou discutido nos resultados (Ai-Xian et al., 2008).

Figura 14: Resultado controlador Fuzzy PID



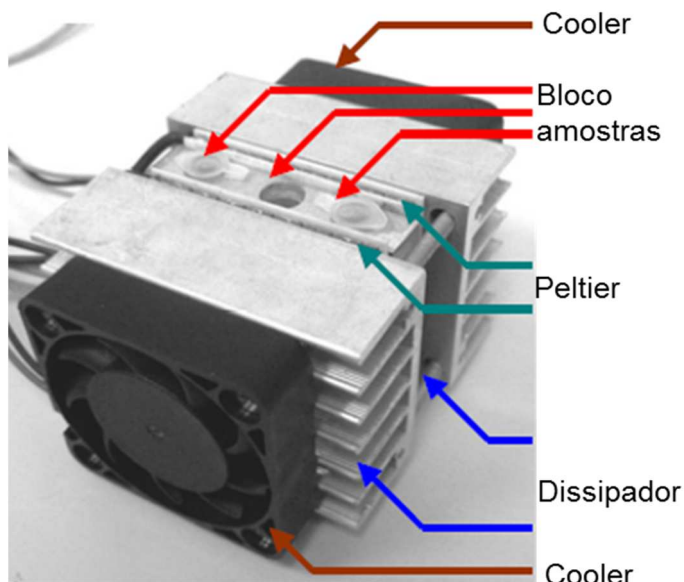
Fonte: Ai-Xian, et al., 2008

Os colchetes em vermelho mostram o *overshoot* apresentado pelo sistema. As diferentes linhas coloridas mostradas na figura são referentes aos diferentes testes que o autor realizou.

Termocicladores portáteis também são foco de trabalhos. Um exemplo pode ser observado no trabalho de Pokfai et al. (2008), onde o sensoriamento é realizado com um sensor de temperatura Lm 35 e o sistema de controle (PID) embarcado em um microcontrolador PIC 16. A planta do sistema foi montada com dois elementos Peltier de modo que o bloco de amostras está entre ambas, Figura 15. As rampas de temperaturas desse trabalho ficaram próximas a 1 °C/s atendendo os requisitos mínimos da PCR para esse parâmetro. Porém, para as temperaturas de 52 °C e 72 °C, o *overshoot* se aproxima de 4 °C e o tempo de estabilização ultrapassa os 50

segundos apresentando variações de temperatura superiores a 1 °C nesse período, Figura 16.

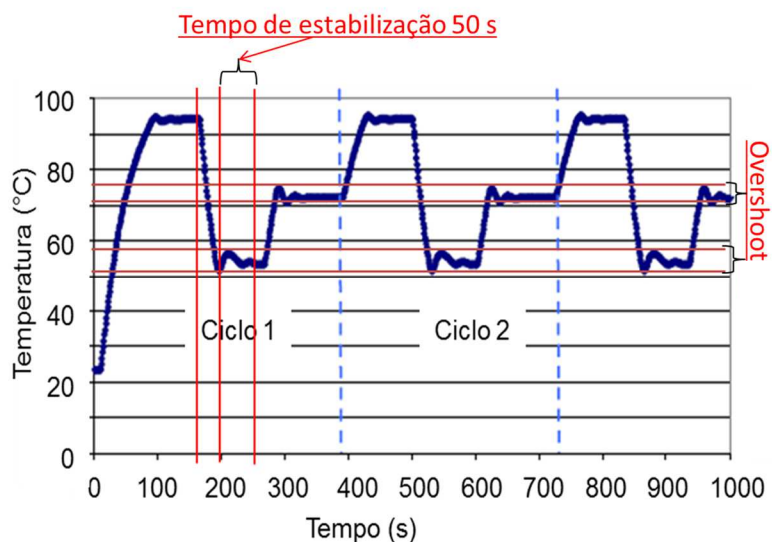
Figura 15: Termociclador portátil



Fonte: Pokfaiet al, 2008 traduzido pelo autor.

A figura apresenta um bloco de aquecimento do termociclador portátil com capacidade para três amostras.

Figura 16: Resultado termociclador portátil

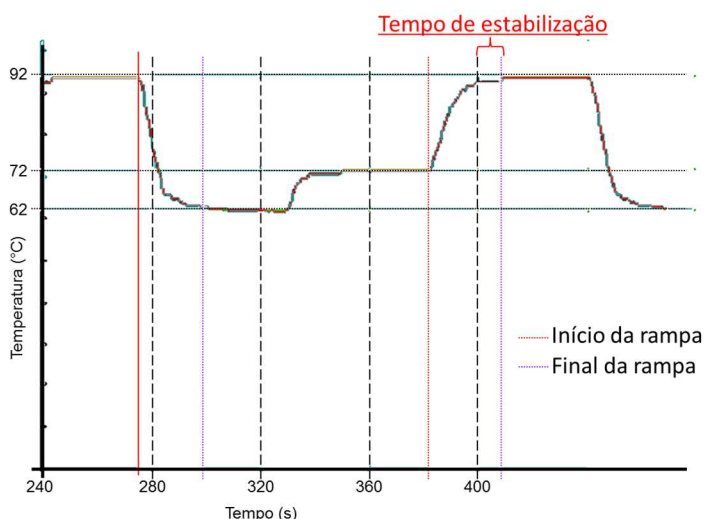


Fonte: Pokfaiet al, 2008 adaptado pelo autor.

A figura mostra um gráfico de temperatura em função do tempo descrevendo os resultados do termociclador portátil. Em vermelho estão destacados o overshoot e o tempo de estabilização.

Em 2011 foi publicado um trabalho sobre o desenvolvimento de controle para termociclador comparando o controlador PID com o PID fuzzy. O sensor de temperatura escolhido foi o PT 100. Após a instrumentação o sinal do sensor foi digitalizado em um conversor AD de 24 bits e o controle foi embarcado em um microcontrolador AD $\mu$ C845. A troca de calor entre o bloco de amostras e o dissipador foi realizada através de uma célula Peltier. Os resultados obtidos com o controlador PID foram de estabilidade em  $\pm 0,5$  °C para o intervalo de temperatura entre 20 °C e 72 °C. Quando a temperatura se aproxima de 90 °C a estabilidade é reduzida atingindo  $\pm 0,8$  °C. As rampas de temperaturas para a refrigeração são próximas a 1,2 °C/s enquanto para o aquecimento são de 0,6 °C/s aproximadamente, Figura 17. Os resultados para o controlador PID Fuzzy apresentam melhor estabilidade de temperatura. Para o intervalo de temperatura entre 20 °C e 72 °C a estabilidade é de  $\pm 0,3$  °C. Quando a temperatura se aproxima de 90 °C, a estabilidade passa para  $\pm 0,5$  °C. As rampas de temperaturas com controlador Fuzzy para refrigeração são de aproximadamente 1,5 °C/s e para aquecimento as rampas são de 0,7 °C/s (abaixo do mínimo exigido que é de 1 °C), Figura 18. Os dados das rampas de temperatura foram obtidos nas figuras dos gráficos apresentados pelos autores do trabalho (Liu et al., 2011).

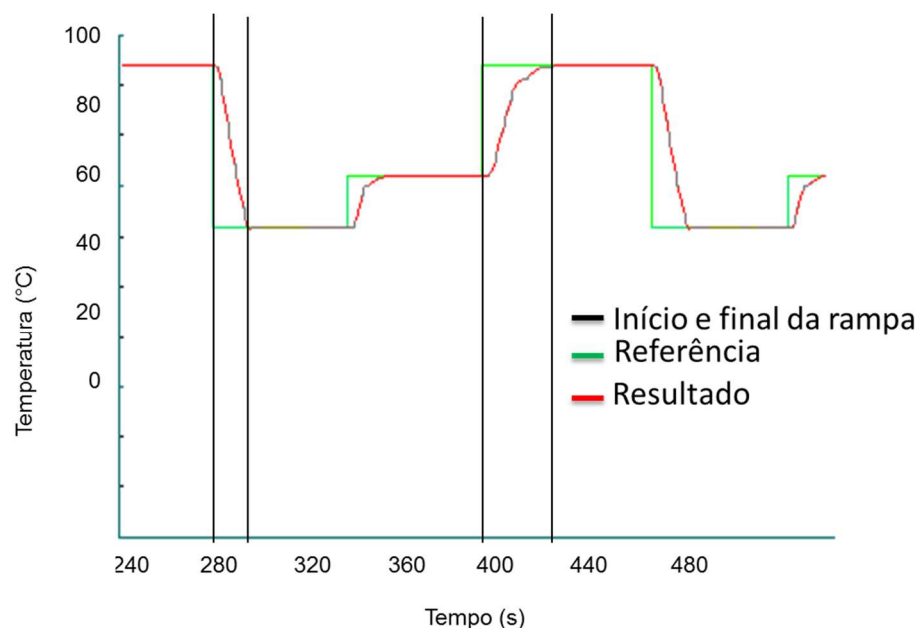
Figura 17: Resultado PID Liu



Fonte: Adaptado de Liu et al, 2011.

A figura apresenta o resultado obtido pelo teste de um termociclador com PID. As linhas verticais destacam o início e final das rampas de temperatura.

Figura 18: Resultado PID fuzzy Liu



Fonte: Adaptado de Liu et al, 2011.

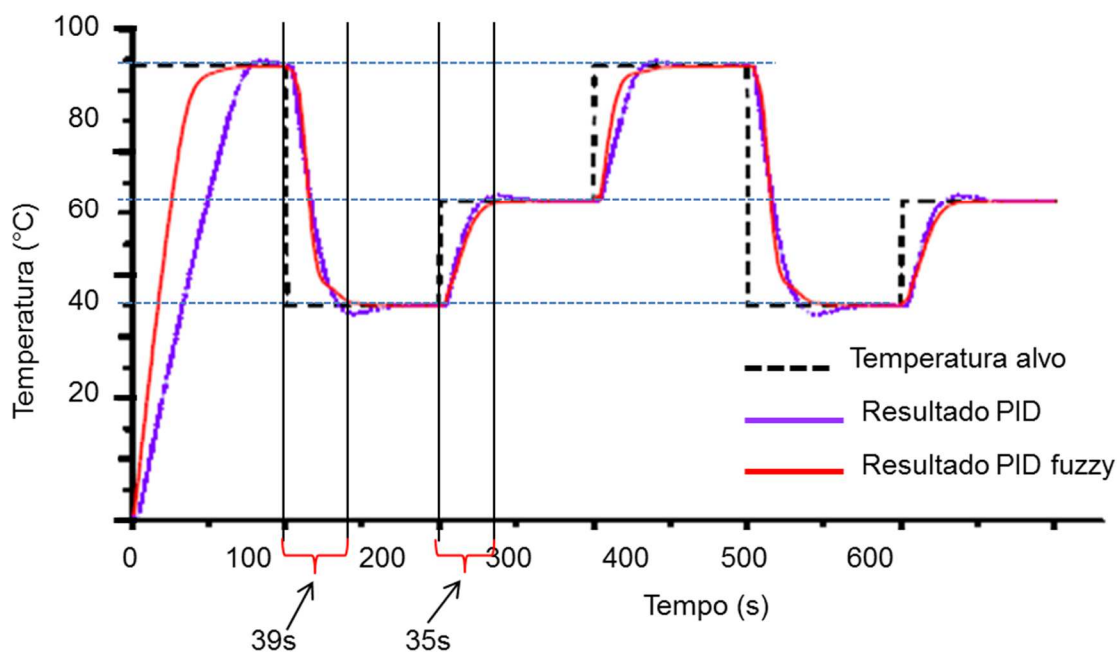
A figura apresenta o resultado obtido pelo teste de um termociclador com PID Fuzzy. A linha vermelha mostra o resultado obtido, a linha verde mostra o resultado esperado e as linhas verticais em preto mostram o tempo entre um alvo e outro de temperatura.

Recentemente Peng et al, (2013) compararam um controlador PID frente a um PID fuzzy. Para realizar os testes os autores montaram uma estrutura sanduiche habitual com uma célula Peltier entre o dissipador de calor e o bloco de amostras.

Conforme Figura 19, foram obtidos resultados diferentes entre o controlador PID e o PID fuzzy. O tempo de resfriamento no intervalo de 95 °C a 55 °C para o controlador PID foi de 33 segundos e para o fuzzy foi de 39 segundos caracterizando respectivamente rampas de 1,2 °C/s e 1 °C/s. Quando o sistema está em modo de aquecimento, o tempo percorrido para o intervalo de temperatura entre 55 °C e 72 °C foi de 26 segundos para o controlador PID e 35 segundos para o controlador fuzzy caracterizando respectivamente rampas de 0,8 °C/s e 0,6 °C/s. Apesar do controlador PID fuzzy demonstrar rampas mais acentuadas no início do controle, o tempo percorrido para atingir o alvo é maior que o PID. Em relação ao overshoot e a estabilidade, o controlador PID fuzzy apresenta melhora de 90 % e 30 % respectivamente em relação ao PID (Peng et al., 2013).



Figura 19: Resultados termociclador Xufeng Peng

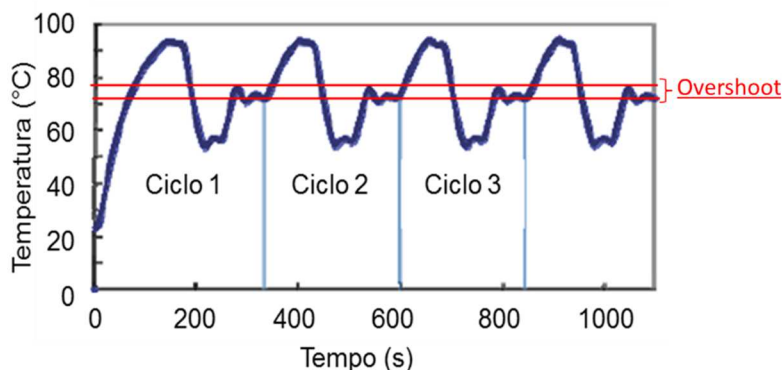


Fonte: Adaptada de Peng et al, 2013.

A figura apresenta o resultado obtido pelo teste de um comparativo de um termociclador com PID Fuzzy frente a um PID. A linha vermelha mostra o resultado obtido com PID Fuzzy, a linha lilás mostra o resultado obtido com o PID, a linha pontilhada em preto mostra o resultado esperado e as linhas verticais em preto mostram o tempo entre um alvo e outro de temperatura.

Outra linha de pesquisa é a PCR em micro chip (*PCR on chip*). Em comparação com a PCR convencional, a *PCR on chip* utiliza menor quantidade de reagentes e amostras. O protótipo montado para essa tecnologia foi desenvolvido em forma de sanduiche com uma célula Peltier entre o dissipador e a câmara do *micro chip* (local destinado para inserir o chip com a amostra a ser amplificado). A rampa de aquecimento foi testada partindo de 25 °C até 92 °C, o tempo percorrido a partir do início do teste até atingir o alvo foi de 130 segundos caracterizando uma rampa de 0,5 °C/s. O teste de arrefecimento iniciado com a temperatura em 92 °C com o alvo a ser atingido de 54 °C. O tempo percorrido entre os dois pontos foi de 45 segundos caracterizando uma rampa de temperatura de 0,8 °C/s. Os resultados dos testes com os ciclos de PCR podem ser vistos na Figura 20 onde é apresentado um *overshoot* próximo a 5 °C na temperatura de 72 °C e uma estabilidade acima de +/-1 °C.

Figura 20: Resultado termociclador baseado em micro fluido

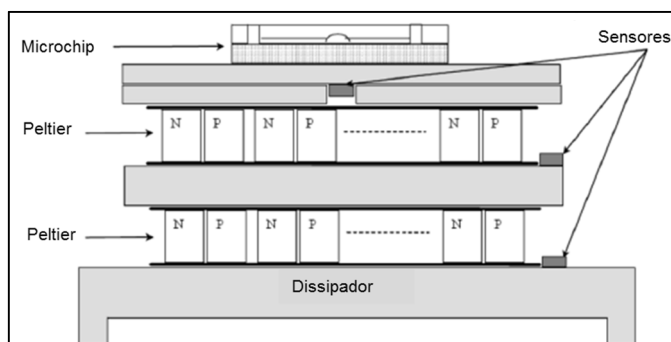


Fonte: Adaptado de Maturus et al, 2010.

A figura apresenta o resultado obtido pelo teste de um termociclador de micro fluido. A linha vermelha dá destaque para o overshoot.

Um modelo teórico para *microchip* também foi desenvolvido testando a configuração de células de Peltier em cascata. O modelo montado possui um mini bloco na parte superior onde é inserido o *microchip* com o micro fluido, logo abaixo, uma célula de Peltier seguida de uma placa de metal em contato com outra célula Peltier. Na parte inferior do sistema está localizado o dissipador de calor responsável por dissipar ou fornecer calor para as trocas de calor das células Peltier, Figura 21. O controlador utilizado é o IMC (*Internal Model Controller* – Controlador de Modelo Interno) baseado em PID. Foram colocados três sensores de temperatura (LM 50), um em cada bloco de metal com o objetivo de monitorar as temperaturas de operação e dissipação. O controlador foi embarcado em um PIC 18 sendo este responsável por receber as informações dos sensores e aplicar a ação de controle através da variável de saída (Jiang et al., 2012).

Figura 21: Bloco do Termociclador de Microchip

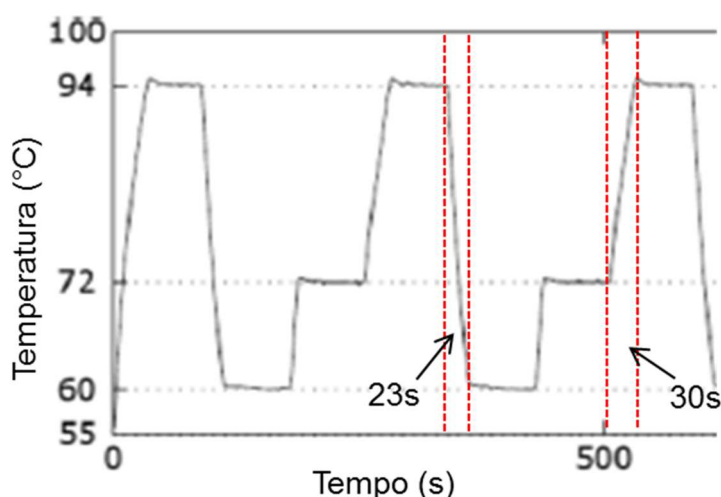


Fonte: Jiang et al, 2012 traduzido pelo autor, 2015.

Figura apresenta um termociclador para testes em microchip com duas células Peltier em cascata onde: N= Junção tipo N (Negativo); P= Junção tipo P (Positivo).

O valor de *overshoot* apresentado pelo sistema é menor que 1 °C e a estabilidade do sistema é inferior a +/- 0,2 °C. Quando o sistema está resfriando, as rampas de temperaturas são de 1,4 °C/s e em modo de aquecimento as rampas ficaram em 0,7 °C/s, Figura 22(Jiang et al., 2012).

Figura 22: Resultado termociclador de microchip



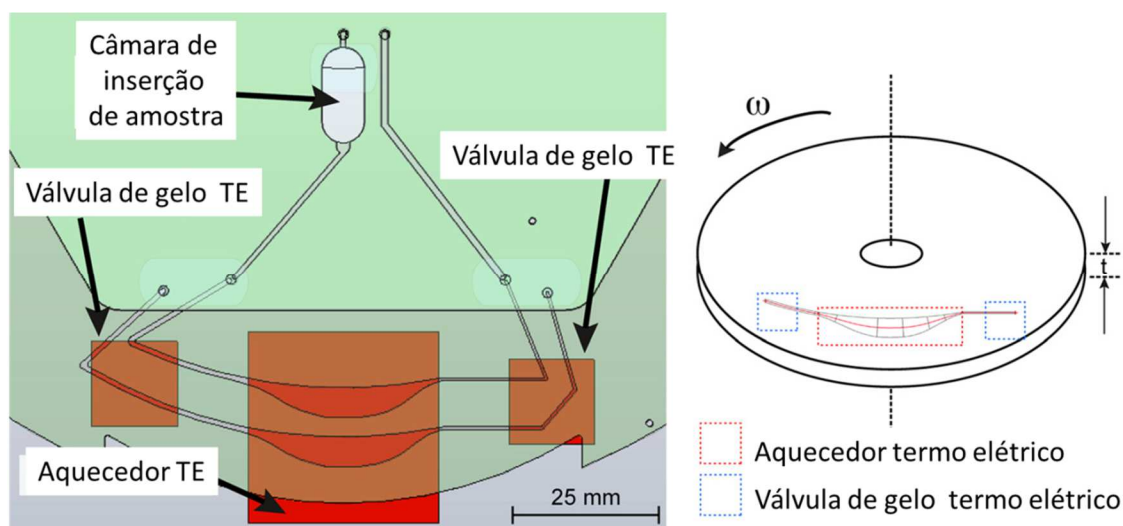
Fonte: Adaptado de Jiang et al, 2012.

A figura apresenta o resultado obtido com o termociclador de microchip, salientando os tempos percorridos nas rampas de descida e subida.

Diferente dos demais trabalhos revisados, uma Centrífuga em Plataforma para Micro Fluido foi testada. Este dispositivo utiliza o bombeamento dos fluidos sem contato com mecanismos de válvulas. O dispositivo apresentado foi criado com um sistema de válvulas de gelo capaz de suportar as altas pressões e temperaturas encontradas em uma reação de PCR. Esse equipamento consiste de um disco multicamadas com compartimentos internos onde são colocadas as amostras dos pacientes. O disco em questão possui as válvulas de gelo para evitar a saída do material e está acoplado a um servomotor que é responsável pelo giro do disco. O ciclo de temperatura é realizado quando o disco está sobre uma pastilha termoelétrica, nesse momento o disco sofre uma pressão de um servomotor a fim de ficar pressionado contra a pastilha termoelétrica. O equipamento possui um controlador do tipo PID. O diagrama do sistema pode ser visto na Figura 23. O deslocamento das amostras para blocos com temperatura fixa, minimiza o problema das rampas, mas diminui a flexibilidade de programação do método, já que iguala os tempos das etapas do ciclo durante a reação. Além disso, não é aplicável para volumes comumente

utilizados em diagnóstico ou pesquisa, apenas para micro volumes. Ainda, durante o deslocamento do microfluido (por se tratar de micro volume), pode haver queda de temperatura na amostra, prejudicando a reação (Amasia *et al.*, 2013).

Figura 23: Desenho esquemático do sistema termo fluídico



Fonte: Traduzido de Amasia *et al.*, 2013.

A figura apresenta o desenho esquemático da centrífuga para ciclos de temperatura em microfluidos.

Além dos trabalhos acadêmicos, a indústria possui patentes depositadas de projetos de termocicladores. Foi realizada uma revisão bibliográfica dos projetos patenteados, onde foi observado que estas não divulgam os dados do controlador. Algumas dessas patentes são destacadas a seguir.

De acordo com a patente EP 2 520 667 A1 depositada por Hoffmann Eitle em 2012, um modelo foi lançado contendo terminal para usuário, CPU ou controlador, tampa aquecida, bloco de amostras, sistema de aquecimento e sistema de resfriamento. A CPU contém memória que armazena um programa de controle desejado, dados definidos de um protocolo de PCR e determinações de calibrações necessárias. Através da CPU são gerenciados os programas de controle, tomando por base as leituras dos diversos sensores, atuando no sistema de controle de temperatura e disponibilizando todas as informações ao usuário. O bloco de amostras é fabricado em prata, é termicamente isolado do restante do equipamento e possui tampa aquecida a 104 °C a fim de reduzir a transferência de calor entre o ambiente externo e a amostra, evaporação e condensação do material biológico (Hoffmann Eitle, 2012).

O sistema de arrefecimento pode diminuir a temperatura do bloco a um nível inferior a temperatura ambiente se associado com algum gás refrigerante do tipo CO<sub>2</sub>, nitrogênio líquido ou outro gás pressurizado (Hoffmann Eitle, 2012).

O sistema de aquecimento pode conter aquecedores de película, aquecedores resistivos, aquecedor de ar, aquecimento infravermelho, aquecimento por convecção ou aquecimento indutivo por elementos termelétricos Peltier. Os sistemas de arrefecimento e aquecimento podem estar em um único sistema. O sensor de temperatura por infravermelho ou óptico detecta a coloração gerada pela temperatura nas amostras. O sistema está configurado para receber uma amostra, tubos capilares ou outra estrutura de armazenamento de amostras. Para a fabricação deste equipamento foi tomado como base o instrumento *Fast Real-Time PCR System* da Applied Biosystems, Inc., com modificação da eletrônica, do software e utilizado uma pastilha termoelétrica Peltier XLT 2393 fabricado pela Marlow Industries. Como resultado, o equipamento apresenta *overshoot* e *undershoot* de até 4 °C (Hoffmann Eitle, 2012).

De acordo com a patente EP 2 353 722 A1 depositada pela empresa F. Hoffmann-La Roche AG, foi lançado um termociclador similar aos já mencionados nesse trabalho. O referido dispositivo tem como diferença utilizar o sistema de arrefecimento do termociclador como dissipador das placas de circuito impresso que fornecem alta corrente para o sistema. Essa característica previne superaquecimento do sistema eletrônico garantindo o bom funcionamento e a longa durabilidade. Outra diferença é a inserção de uma câmera CCD (*Charge-Coupled Device*) com o objetivo de realizar as leituras das amostras em tempo real dentro do bloco de amostras. Essa leitura ocorre no momento em que os ciclos de temperatura estão ocorrendo (Paul et al., 2011).

Segundo a patente US 2012/0308990 A1, depositada pela Streck Inc., o instrumento descrito possui um dispositivo de controle que faz parte de um sistema de controle em malha fechada. Esse dispositivo está adaptado para fazer a interface entre o sistema de controle e o sistema de fornecimento de potência. O sistema de potência fornece corrente e tensão necessárias para as células de aquecimento e resfriamento. O sistema de controle está adaptado para alterar parâmetros internos de acordo com a leitura dos sensores de temperatura. Com o sistema de controle adaptativo é possível obter *overshoot* inferior a 1 °C e a estabilidade do sistema menor

que 0,25°C. O sistema de controle é calculado por uma placa Arduino Mega (TerMaat et al., 2012).

A patente US 8,198,051 B2 depositada pela empresa Eppendorf AG, mostra um equipamento com três blocos de amostras independentes e isolados termicamente entre si. Cada segmento (1, 2 e 3) está ligado diretamente a uma unidade de controle e potência que pode regulá-los nas temperaturas desejadas de forma independente. Na concretização mostrada, os segmentos são idênticos e cada um é fornecido com 7 espaços para a colocação de amostras. A parte inferior dos segmentos está em contato com elementos termoelétricos Peltier para que possa ser controlada a temperatura desejada (Schicke; Hofmann, 2012).

Foi realizado um comparativo de desempenho dos projetos dos trabalhos pesquisados na revisão bibliográfica. Os parâmetros comparados são rampa de subida em °C/s, rampa de descida em °C/s, *overshoot*, tempo de estabilização em segundos, estabilidade da temperatura em torno do alvo em °C e tipo de controlador utilizado (Tabela 2).

Tabela 2: Comparativo de resultados da bibliografia

Autor e ano ou modelo e marca	Ram S (°C/s)	Ram D (°C/s)	Oversh (°C)	T est (s)	Est (+/- °C)	Ctr
Resultado desejável	> 1	> 1	< 1	nc	< 0,5	na
PTC 100, 60 wb – MJ Research	1*	nc	nc	30	0,5	nc
PTC 100, 96 wb – MJ Research	1,2*	nc	nc	30	0,5	nc
PTC 100, prata – MJ Research	2,5*	nc	nc	30	0,5	nc
Edvocycler™ 541 – Edvotek	3*	nc	nc	nc	nc	nc
2720 Thermal Cycler – Life Technologies	2,7*	nc	nc	30	0,5	nc
3PRIME – Techne	3*	2,1	nc	nc	0,25 a 55 °C	nc
T-100™ – Bio-Rad	2,5	nc	nc	nc	0,5	nc
Corte, 2012	4,7	Na	6	13	< 0,3	PID
Ccanto e Rios, 2012	0,4	0,4	nc	nc	> 1	PID
Ccanto e Rios, 2012	0,8	0,8	nc	nc	> 1	Fuzzy
Ai-Xian et al, 2008	1	1	nc	nc	0,1 a 0,8	Fuzzy
Pokfai	1	1	4	50	> 1	PID
Liu et al, 2011	1,5	0,7	nc	nc	0,5	Fuzzy
Peng et al, 2013	0,8	1,2	nc	nc	nc	Fuzzy
Hoffman Eitle, 2012	Nc	nc	4	nc	nc	nc
Paul et al, 2011	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
TerMaat et al, 2012	Nc	nc	< 1	nc	< 0,25	nc

Fonte: Autoria própria, 2015.

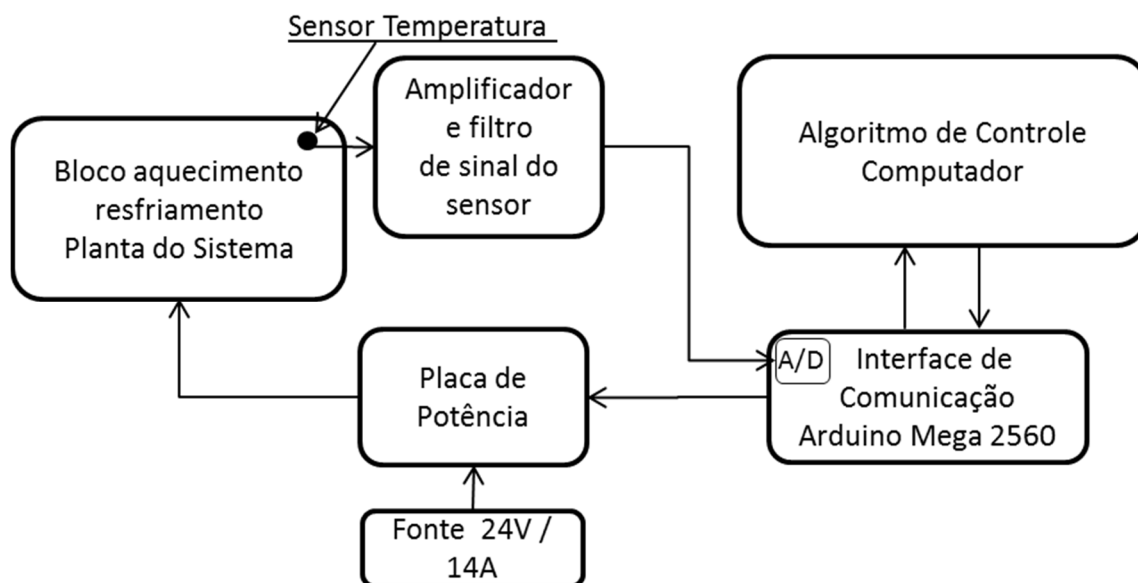
Ram S (°C/s): rampa de subida em °C/s; Ram D: tampa de descida em °C/s; *Oversh*: *overshoot*; T est (s): tempo de estabilização em segundos, Est (+/- °C): estabilidade da temperatura em torno do alvo em °C; Ctr: tipo de controlador utilizado; nc: não consta; na: não aplicado; \*: rampa máxima atingida pelo equipamento, média não citada. Em vermelho estão salientados os resultados que não atendem a especificação requerida.

## 4 METODOLOGIA

Essa seção descreve como foi desenvolvido o trabalho, apresenta os materiais e os métodos utilizados para atingir os objetivos descritos na seção 1.

O protótipo desenvolvido é composto das seguintes partes: um bloco de aquecimento e resfriamento que consiste na planta ou processo a ser controlado; um sensor de temperatura com a finalidade de monitoramento da planta; uma placa de amplificação e filtragem para realizar a instrumentalização do sinal do sensor; uma placa de interface responsável pela comunicação entre o algoritmo de controle e as placas de amplificação e potência; uma placa de potência com a finalidade de isolar os diferentes níveis de potência existentes entre o sinal oriundo da placa de interface e a planta. O protótipo como um todo é demonstrado no diagrama de blocos na Figura 24, também é mostrado uma foto com vista de cima através da Figura 25.

Figura 24: Diagrama de blocos resumido do protótipo

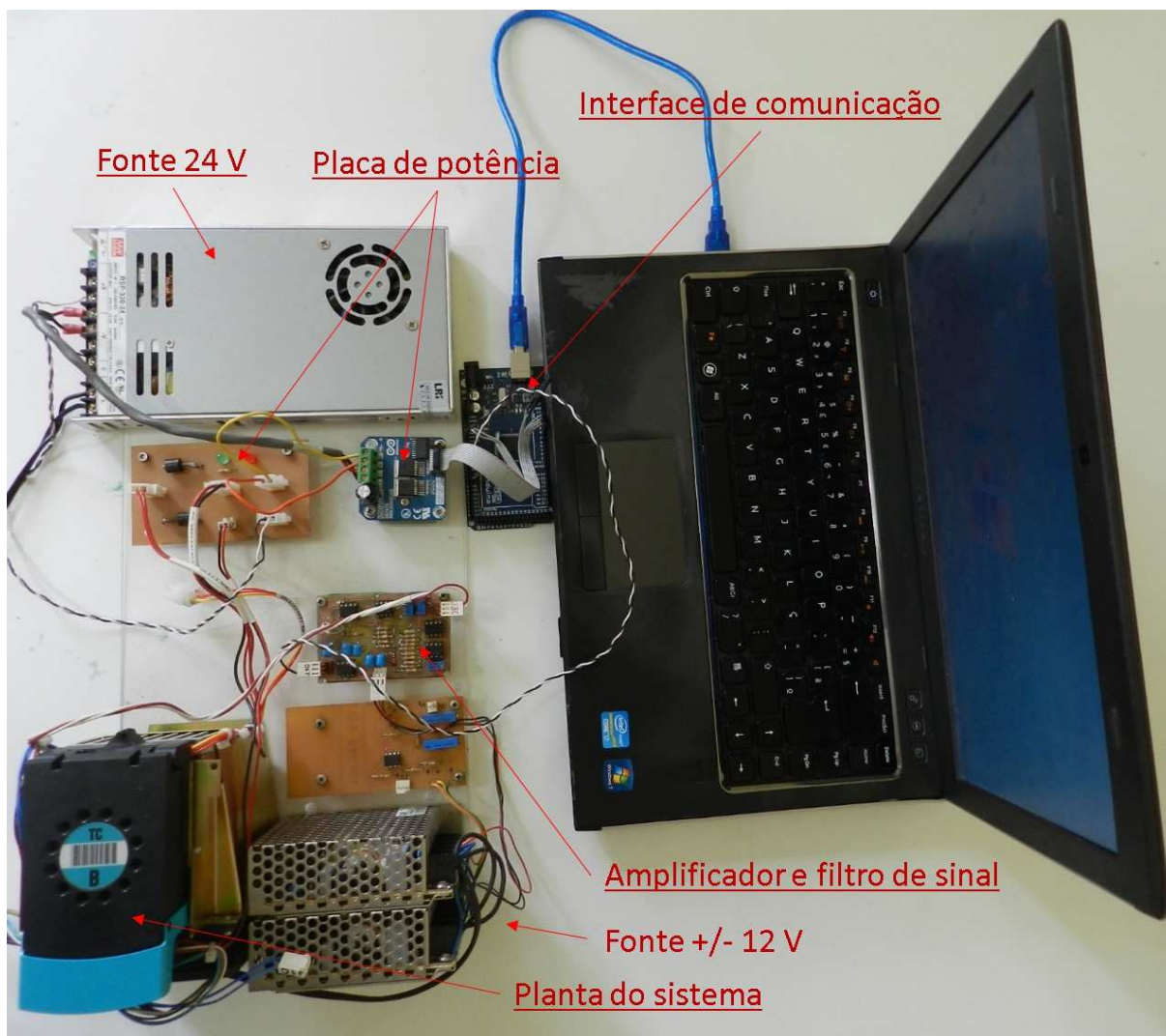


Fonte: Autoria própria, 2016.

A figura mostra as principais etapas e componentes do protótipo com as setas indicando a direção do fluxo de sinal/informação.



Figura 25: Foto do Protótipo



Fonte: Autoria própria, 2016.

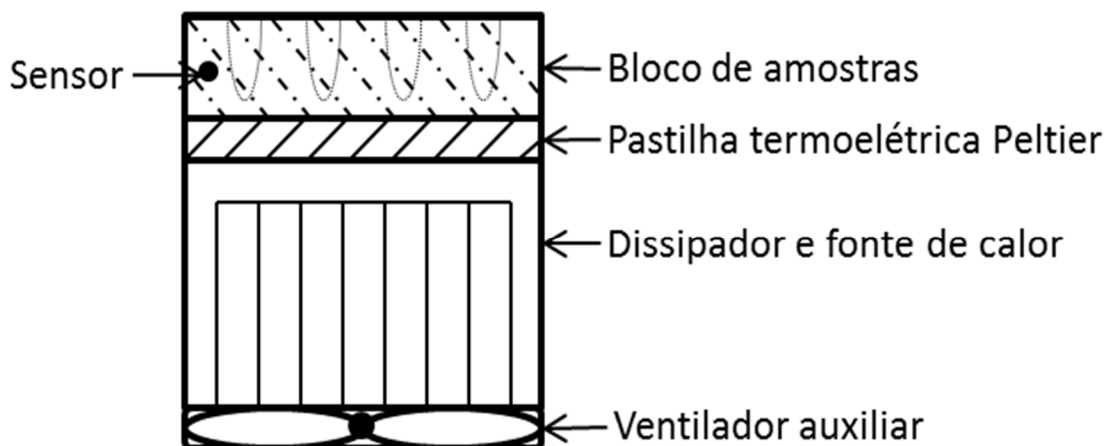
A figura é uma foto do protótipo que foi fotografado após a realização dos testes.

#### 4.1 Planta do Sistema

A planta do protótipo (peça reaproveitada de um equipamento Amplicor da empresa Roche Diagnostics) está dividida em cinco partes distintas. O bloco de amostras, local onde são inseridos os tubos com as reações para a realização dos testes. Essa peça é fabricada em alumínio, contendo as dimensões de 40 por 40 mm de área com 10 mm de altura. A massa desse item é de 29 g. Esse é o bloco onde a temperatura deve ser controlada, por esse motivo possui o sensor de temperatura. Logo abaixo do bloco de amostras encontra-se a pastilha termoelétrica de efeito Peltier. Esse item é responsável por realizar a troca de calor entre o bloco de amostras e o dissipador conforme sinal enviado pelo sistema de controle. A dissipação e o

fornecimento de calor ao Peltier são realizados por um dissipador com o auxílio de ventilação forçada. O material utilizado no dissipador é o alumínio, devido a boa condutividade térmica desse material (Tabela 1). A Figura 26 apresenta o diagrama da planta do sistema.

Figura 26: Diagrama da planta do sistema



Fonte: Autoria própria, 2015.

A figura apresenta a planta do sistema e as partes que compõem o bloco de aquecimento.

#### 4.1.1 Modelagem da Planta Utilizando a Resposta ao Degrau Unitário

Com o protótipo montado, foi desenvolvido um algoritmo em Matlab para realizar a modelagem. Esse algoritmo estabiliza a planta em 35 °C (1,15 V na entrada do ADC) por um tempo de 100 segundos. Essa temperatura foi escolhida devido ao faixa de variação de temperatura pretendido para a atuação do protótipo, que varia entre 45 °C e 100 °C. Após esse período, aplica-se um pulso unitário na planta e espera-se até a estabilização da temperatura, valor final. O tempo de estabilização foi de 400 segundos, para garantir que o processo permanecesse estável foram acrescentados mais 100 segundos no período, completando 500 segundos. Após os 500 segundos, o algoritmo aplica um pulso unitário inversamente proporcional ao anterior na planta, ou seja, inverte a polaridade de alimentação da célula Peltier com a mesma intensidade para baixar a temperatura. O período de estabilização também foi de 500 segundos.

Com a aplicação de um pulso unitário positivo e um pulso unitário negativo, foi possível modelar a planta na situação de aquecimento e na situação de resfriamento. A leitura do sensor foi capturada durante os 1000 segundos com taxa de amostragem

de uma amostra a cada 100 milissegundos (ms). Com os dados capturados no sensor, foi modelada uma equação de primeira ordem para a rampa de subida e outra equação de primeira ordem para a rampa de descida.

Para validar a modelagem descrita acima, foram comparadas as equações de primeira ordem da planta com o processo funcionando em tempo real. Para tanto, foi desenvolvido um algoritmo observador e comparador (em Matlab) que simula o modelo matemático, em paralelo com a planta, aplicando o mesmo valor na variável de controle para ambos. A resposta do modelo matemático foi obtida por meio dos cálculos realizados pelo algoritmo e a resposta da planta foi capturada através da leitura do sensor de temperatura.

## 4.2 Avaliação dos Controladores

A partir da modelagem da planta, foram calculados o modelo matemático e a sintonizados controladores. A placa Arduino Mega 2560 foi usada como interface entre o Matlab e suas saídas e/ou entradas. Dessa forma um algoritmo rodando em Matlab pode ler as entradas analógicas e digitais, bem como escrever nas portas da placa. Na maioria dos casos, os algoritmos de controle são implementados em Matlab para efeitos de simulação sem contato com a planta física, somente através das equações matemáticas. Entretanto, neste trabalho o Matlab foi utilizado para ambas as situações: simulação do controle e aplicação do controlador na planta através da placa Arduino, sendo esta utilizada como interface.

Primeiramente, foram testados os controladores do tipo PID (Genérico, ISA, Paralelo e com Síntese de Dahlin). O último controlador testado foi o controlador GMV. Todos os controladores foram testados em suas formas originais como descrito na seção 2.8. O controlador PID de Dahlin foi testado também com adaptações (seção 4.2.1).

Para verificar qual controlador seria mais adequado à planta, foi realizado um comparativo entre os resultados obtidos a partir do teste de cada um. Primeiramente foi verificado se cada controlador foi estável ao atuar na planta do protótipo. Esse teste foi realizado com a referência (set point) em 75 °C, essa temperatura foi escolhida por ser o ponto médio de trabalho do termociclador. Neste teste foram descartados os controladores com estabilidade superior a +/- 1 °C bem como os que apresentaram *overshoot* acima de 4 °C.

O próximo teste foi realizado com os controladores durante a realização dos ciclos de temperatura. As temperaturas de cada ciclo foram 60 °C, 72 ° e 95 ° com o tempo de 180 segundos para cada ciclo sendo 60 segundos para cada temperatura. Foram testados nessa etapa as sintonias de Ziegler/Nichols e Cohen/Coon para os controladores PID (Genérico, ISA e Paralelo) e *Lambda Tuning* para o PID com Síntese de Dahlin. Aqui foram avaliados rampa de subida, rampa de descida, *overshooting*, tempo de estabilização, precisão e erro de referência para as três temperaturas utilizadas no ciclo. Também foram realizados cálculos estatísticos para verificar o comportamento dos controladores, entre eles, a variância do erro, a soma do erro quadrático e o coeficiente de correlação múltipla entre a entrada e a saída (valor referência X valor lido). Estes testes estatísticos foram aplicados a duas situações diferentes. A primeira foi aplicar os cálculos aos dados obtidos do protótipo enquanto este realizava os ciclos de temperaturas (60, 72 e 95 °C, com 60s em cada temperatura, num total de 10 ciclos), dessa maneira foi possível avaliar o comportamento dos controladores de uma forma ampla, com todo o funcionamento do protótipo, durante o período de troca de temperaturas e após a estabilização.

A outra forma foi coletando os dados do protótipo quando o mesmo já estava com a temperatura estável no alvo de 72 °C. Para isso foi permitido um tempo de estabilização de 1 (um) minuto, e após esse tempo, os dados foram coletados por um período de 10 (dez) minutos. Dessa forma foi possível avaliar o quão estável e preciso são os controladores após atingir o alvo.

#### 4.2.1 Adaptação Controlador PID com Síntese de Dahlin

A implementação do PID de Dahlin foi realizada dividindo a lei de controle em quatro termos da equação do controlador. Cada termo dependendo do fator de velocidade do controlador, a lei de controle aplicada a variável controlada é a soma algébrica dos quatro termos conforme Equações 67, 68, 69, 70 e 71.

$$term1(n) = \frac{(1 - p) * e(n)}{b0} \quad (67)$$

$$term2(n) = \frac{a1 * (1 - p) * e(n - 1)}{b0} \quad (68)$$

$$term3(n) = p * u(n - 1) \quad (69)$$

$$term4(n) = (1 - p) * u(n - (d + 1)) \quad (70)$$

$$u(n) = term1(n) + term2(n) + term3(n) + term4(n) \quad (71)$$

Como mostrado na seção de resultados, os testes preliminares demonstraram que o controlador é estável, porém com uma deficiência de ganho para esse processo tanto no modo aquecimento quanto no modo resfriamento. Para melhorar sua adaptação ao sistema, foram realizadas as alterações a seguir.

Para o modo de aquecimento, a primeira modificação foi adicionar um ganho multiplicador nos termos 1 e 2, Equações 72 e 73. Esta estratégia foi utilizada já que, em geral, a adição de ganho na componente proporcional aumenta a velocidade de resposta do sistema de controle (Aström; Hägglund, 1995).

$$term1(n) = 4.01 * \frac{(1 - p) * e(n)}{b0} \quad (72)$$

$$term2(n) = 4 * \frac{a1 * (1 - p) * e(n - 1)}{b0} \quad (73)$$

Com essa modificação foi obtido ganho suficiente na variável de controle, porém com saturação do valor em determinados momentos. Para evitar esse fenômeno é necessário um saturador na variável  $u(n)$  limitando o valor em 5 (valor que corresponde a 100% do PWM). A utilização de um saturador na variável de controle interfere no cálculo do controlador ocasionando perda de ganho e estabilidade. Para solucionar este problema foi realizada uma segunda modificação, trabalhou-se com duas variáveis sendo uma a variável  $u(n)$  e outra  $auc(n)$  (variável calculada). A variável calculada recebe o valor da soma dos quatro termos do controlador, essa variável também realimenta os termos 3 e 4 da lei de controle, Equações 74 e 75. A Equação 76 recebe a soma dos quatro termos e atribui à variável  $u(n)$ , que não realimenta o cálculo do controlador, tendo a função de fornecer o valor calculado ao PWM. Dessa forma a variável  $u(n)$  possui um saturador que limita

seu valor de -5 até 5 e a variável  $uc(n)$  não possui saturador. O valor da variável é negativo quando o sistema resfria invertendo a polaridade de tensão no Peltier, quando o valor for positivo o sistema está em aquecimento.

$$term3(n) = p * uc(n - 1) \quad (74)$$

$$term4(n) = (1 - p) * uc(n - (d + 1)) \quad (75)$$

$$uc(n) = term1(n) + term2(n) + term3(n) + term4(n) \quad (76)$$

A terceira modificação foi adicionar uma componente proporcional ao controlador. Essa componente é somada na variável de controle  $u(n)$  não interferindo no cálculo do controlador de Dahlin e sim na aplicação do processo. Essa modificação deixa o controlador com a resposta mais rápida nos casos onde o erro é elevado bem como na correção do *overshoot*. Como é proporcional ao erro, o valor da componente se aproxima a 0 (zero) quando a resposta do controle se aproxima do alvo desejado (Aström; Hägglund, 1995). A variável  $u(n)$  recebe o valor da variável calculada somado a componente proporcional, porém não realimenta o cálculo, tendo a função de alimentar o PWM que é aplicado ao hardware. O controlador pode ser descrito como um PID com síntese de Dahlin mais P (PID + P).

As modificações descritas acima são aplicadas nas rampas de subida e após a estabilização das temperaturas. A quarta modificação foi realizada para acelerar a rampa de descida. Foi adicionado um filtro que atua na variável de controle, esse filtro força o algoritmo a aplicar o máximo de potência no Peltier enquanto o erro for maior que 1 °C, ou seja, até a temperatura do sistema atingir 1 °C acima do alvo. Neste caso quando o erro atingir 1 °C, o controlador passa a trabalhar da mesma forma que o aquecimento, respeitando os cálculos da lei de controle. Isso é possível já que a temperatura de trabalho mais baixa utilizada no equipamento é superior a temperatura ambiente, normalmente superior a 45 °C. Portanto, para as rampas de descida o filtro assume o controle de potência do sistema liberando esse controle após atingir o alvo limite para filtragem.

### 4.3 Sensor de Temperatura e Instrumentalização

O sensor de temperatura foi escolhido com base na avaliação conjunta de critérios do *data sheet*, conhecimento do autor deste trabalho e facilidade de implementação. O conjunto de critérios dessa avaliação foi chamado de parâmetros de ponderação, e variaram do pior ao melhor com notas de 1 a 5. O primeiro critério de avaliação foi o tipo de medição, sendo que somente poderiam ser usados aqueles com medição interna. A segunda fase foi eleger o sensor com a maior soma algébrica da ponderação, Tabela 3.

Tabela 3: Sensor de Temperatura

Sensor	Est	P est	Lin	I / E	Range	Con autor	Fácil	Total
PT 100	1 °C	4	5	I	> 0 a 100	4	4	17
NTC	1 °C	4	1	I	> 0 a 100	3	2	10
LM 35	0,5 °C	5	5	E	> 0 a 100	5	5	20
KTY 81	8 °K	1	3	E	> 0 a 100	2	3	9
MP3193 NTC	1 °C	4	1	E	> 0 a 100	3	2	10

Fonte: Autoria própria, 2015

Est: estabilidade; P est: ponderação da estabilidade; I / E: medição interna ou externa; Con aut: conhecimento do autor; Fácil: facilidade de implementação; Total: soma dos pesos de ponderação. Destacado em vermelho o sensor escolhido juntamente com a soma dos parâmetros de ponderação.

O sensor de temperatura do tipo PT 100 é um sensor consolidado para medição de temperaturas. Conforme ponderação representada na Tabela 3 e por ser encontrado em outros equipamentos da literatura, o PT 100 classe A foi o sensor escolhido para o monitoramento da temperatura no bloco de aquecimento.

O sensor de temperatura é excitado, condicionado e filtrado por uma placa amplificadora. O condicionamento do sinal é realizado para o funcionamento do sensor em temperaturas de 0 °C até 100°C, sendo a saída do circuito com tensão entre 0 a 3,3 vem uma escala linear de acordo com a temperatura. O circuito de condicionamento utilizado foi o RTD SIGNAL-CONDITIONING PATH, recomendado pela empresa Microchip Technology Inc. (Backer, 2008). A única alteração realizada no circuito foi referente ao ganho e ao range de atuação, que originalmente tinha saída que variava entre 0 a 5 volts em uma faixa de temperatura entre -200 °C a 600 °C.

#### 4.4 Sistema de Potência

A placa Arduino (interface) foi usada para receber o sinal de PWM da variável controlada e envia-lo para o sistema de potência da planta. Para que seja possível o funcionamento correto do protótipo, é necessária uma placa que faça a amplificação da corrente e da tensão do sinal PWM oriundo do controlador. Outra característica que essa placa deve ter é o comportamento de chave H para que possa ser invertido o fluxo de corrente no Peltier. Para determinar o circuito a ser escolhido foram selecionados os critérios mínimos da placa de potência conforme Tabela 4.

Tabela 4: Placa de potência

Int P	I min	Chave H	PWM
3,3 para 24 V	15 A	Y	Y

Fonte: Autoria própria, 2015.

Int P: conversão de baixa tensão recebida do microcontrolador para tensão de trabalho do Peltier; I min: corrente mínima suportada; PWM: trabalhar com PWM na entrada transferindo para a saída; Y: possui ou suporta o item desejado.

A placa encontrada no mercado foi a *Dual BTS7970 68A Motor Driver Drive Module HBridge*. Essa placa possui dois componentes BTS7970 em ponte H para alta corrente, isolamento de 5 volts para MCU e proteção para microcontrolador. O nível de entrada pode variar de 3,3 a 5 volts e aceita pulsos de PWM de até 25 kHz. A alimentação do circuito de potência pode variar de 5,5 a 27 volts. Com essa placa é possível fornecer corrente e tensão ao Peltier com nível e polaridade determinado pelo sistema de controle.

#### 4.5 Teste do Protótipo e Comparação com Equipamento do Mercado

O protótipo do termociclador desenvolvido neste trabalho foi testado para amplificação de DNA no Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, sob supervisão do Professor Dr. Victor Hugo Valiati, coordenador do Laboratório e do PPG em Biologia. O teste foi feito utilizando DNA de algas (gentilmente cedido pelo Professor Luis Fernando Medina), onde foi amplificado um fragmento do gene *rbcL* (chloroplast-encoded large subunit of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), utilizado na identificação de algas (Nozaki et al., 1995; Kadereit et al., 2003).



As reações foram realizadas em volume final de 30  $\mu$ L contendo 50 ng de DNA genômico, 0,7  $\mu$ M de cada um dos *primers*(*rbcl* 1f: 5' ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCA 3' e *rbcl* 1460r: 5' CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG 3') e demais reagentes contidos no Master Mix (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. Um mix contendo todos os reagentes necessários para oito reações foi preparado e dividido entre oito microtubos, onde posteriormente foi adicionado DNA da alga 1 (em dois dos microtubos), alga 2 (em dois dos microtubos), mix de algas (em dois dos microtubos) e os outros dois tubos foram deixados sem DNA para servirem de controle negativo, formando dois grupos de quatro amostras preparados exatamente da mesma forma. Um dos grupos de quatro amostras foi submetido à reação no termociclador T-100™ Thermo Cycler, marca Biorad, número de série 621BR03153 (atualmente em uso no Laboratório de Biologia Molecular da Unisinos). Ao mesmo tempo, o outro grupo de amostras foi submetido à reação no protótipo desenvolvido neste trabalho. As condições da reação, para ambos os testes foram as seguintes: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 56 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto, seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os resultados foram analisados por visualização sob luz ultravioleta, após migração dos produtos em gel de agarose 1% corado com GelRed, em cuba de eletroforese e documentados fotograficamente.

## 5 RESULTADOS

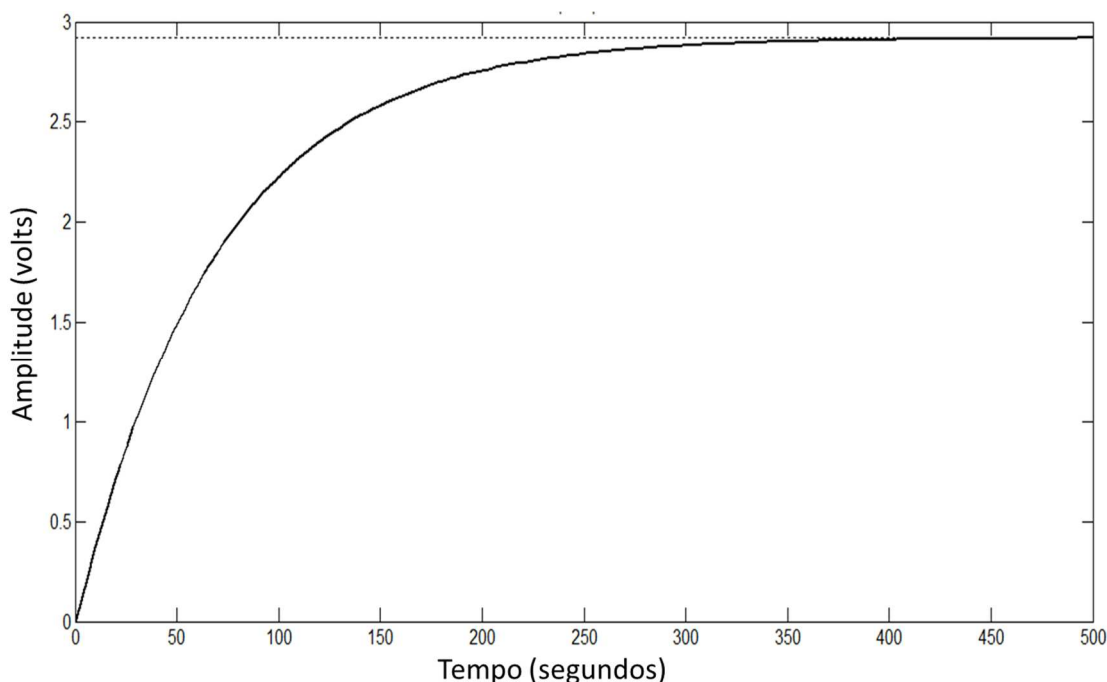
Essa seção demonstra os resultados de todos os testes realizados na tentativa de atingir os objetivos. A prova positiva ou negativa das hipóteses é demonstrada nessa seção.

### 5.1 Modelagem e Validação da Planta

Após a modelagem através de pulso unitário aplicado ao sistema (degrau unitário), a planta apresentou dois comportamentos. Comparando o sistema em aquecimento e resfriando foi possível verificar que durante o aquecimento o ganho K foi maior que durante o resfriamento. O tempo de estabilização foi maior para o aquecimento. A Equação 77 descreve o comportamento do sistema aquecendo e a Figura 27 descreve a resposta ao degrau dessa equação simulada usando Matlab. A Equação 78 descreve o comportamento do sistema resfriando e a Figura 28 descreve a resposta ao degrau da equação simulada usando Matlab.

$$G_a = \frac{2.92 * e^{-0.7}}{69s + 1} \quad (77)$$

Figura 27: Resposta ao degrau da Planta  $G_a$  (Aquecimento)

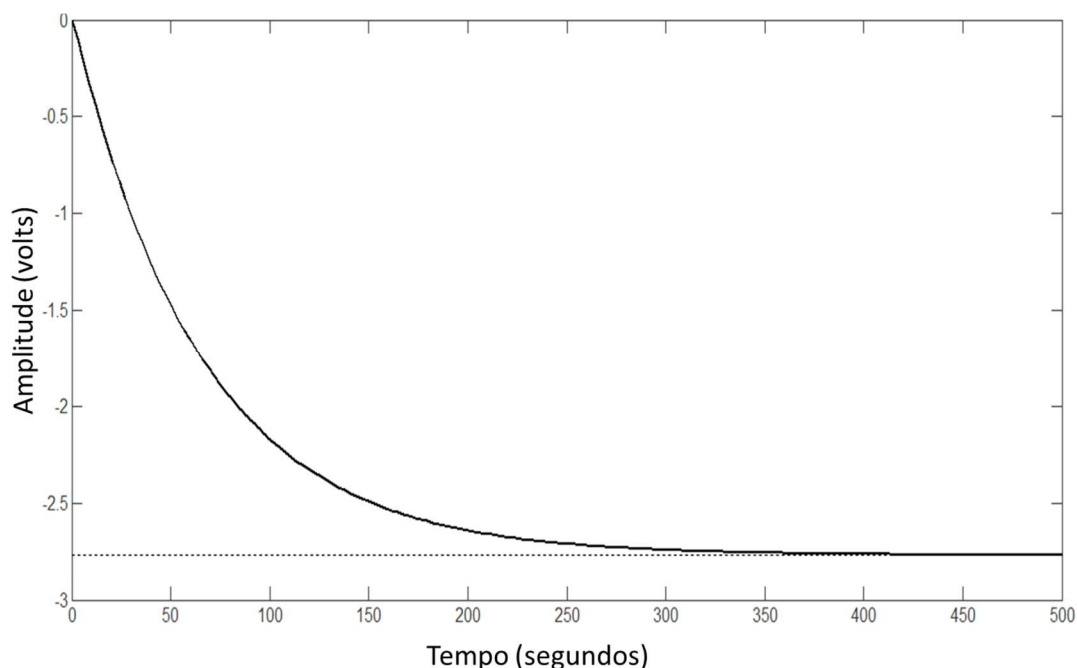


Fonte: Autoria própria, 2016

A figura apresenta um gráfico de amplitude por tempo mostrando a resposta da planta ao degrau unitário testado em aquecimento.

$$Gr = \frac{-2.77 * e^{-0.7}}{65s + 1} \quad (78)$$

Figura 28:Resposta ao degrau da planta Gr (Resfriando)

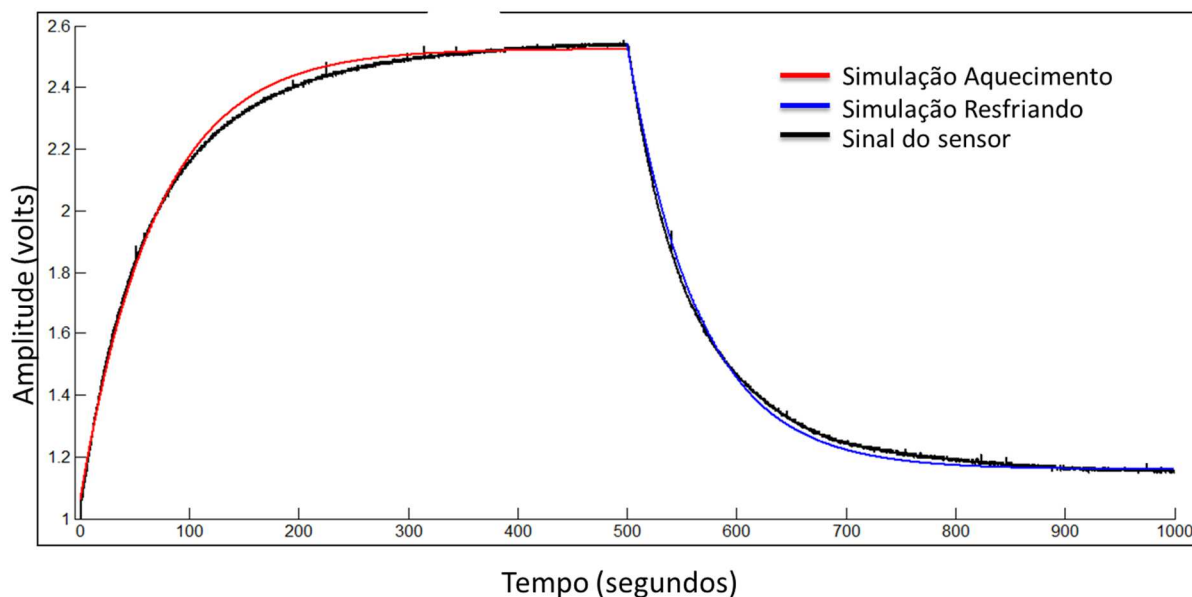


Fonte: Autoria própria, 2016.

A figura apresenta um gráfico de amplitude por tempo mostrando a resposta da planta ao degrau unitário testado em resfriamento.

O resultado da validação foi plotado em um gráfico em tempo real comparando o sinal calculado do modelo e o sinal oriundo do sensor de temperatura. Em um mesmo experimento foi possível testar a planta em modo de aquecimento e em modo de refrigeração. O resultado da comparação dos dois resultados está demonstrado na (Figura 29). Conforme observado no gráfico de validação da planta, os resultados obtidos pelo sinal do sensor são fortemente semelhantes aos esperados de acordo com a modelagem. Essa afirmação é corroborada pela técnica de modelagem por resposta ao degrau unitário (seção 2.8) e pelas técnicas de sintonia de Ziegler, onde é avaliada a semelhança de dados quanto ao atraso de transporte ( $\theta$ ), quando atinge 63% do valor final ( $\tau$ ) e o valor final (K).

Figura 29: Validação da Planta



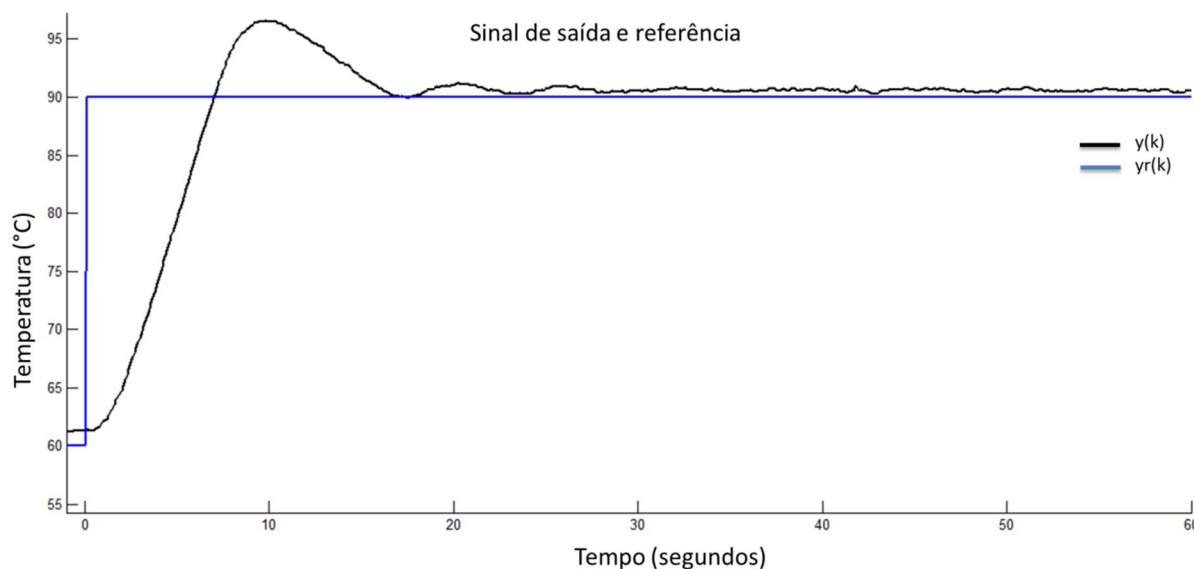
Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura representa a resposta ao impulso comparando a simulação teórica e o teste realizado na prática.

### 5.1 Controlador GMV

O controlador GMV teve um comportamento adequado quanto aos seguimentos de referência e precisão. Entretanto o *overshoot* foi maior que 4 °C e o tempo de estabilização foi superior a 10 segundos, valores considerados elevados quando comparados com os demais controladores (Figura 30). Devido a estes resultados, este controlador foi considerado inadequado para o protótipo e, portanto, não foi testado nos ciclos de temperatura.

Figura 30: Resultado Controlador GMV



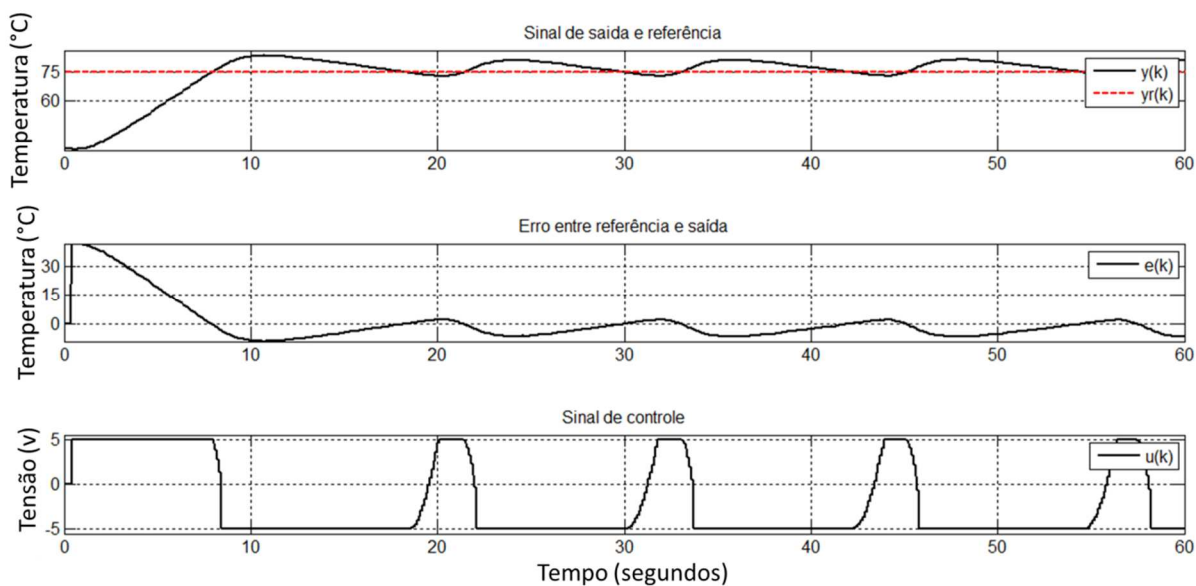
$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  
A figura mostra o gráfico Temperatura X Tempo obtido com o controlador GMV. Pode ser observado o tempo de estabilização superior a 10 s e o *overshoot* acima de 4 °C.

## 5.2 Controladores PID

A descrição dos resultados dos testes realizados com diferentes controladores, bem como a apresentação das figuras contendo os gráficos dos mesmos será apresentada a seguir.

O primeiro controlador testado foi o PID Genérico. Este apresentou *overshoot* elevado, tempo de estabilização (não estabiliza) e precisão fora dos padrões recomendados. Nos testes preliminares, foi observada uma oscilação em torno da referência superior a 3 °C e *overshoot* superior a 10 °C. Por esses motivos, não foram realizados os testes de ciclagem de temperatura com esse controlador, já que os dados extraídos nos testes preliminares foram suficientes para concluir que esse controlador não é adequado para a planta, Figura 31.

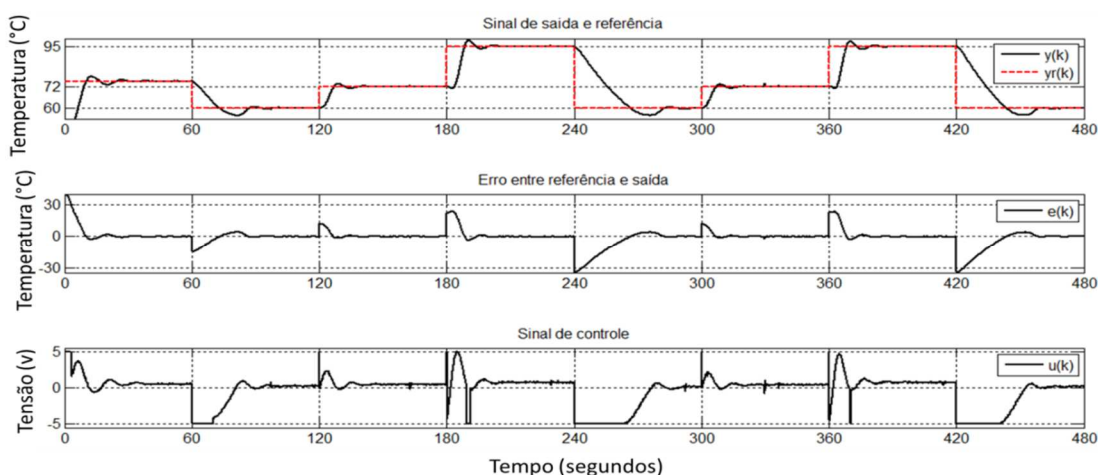
Figura 31: Resultado PID Genérico



$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

O segundo controlador testado foi o PID ISA, que apresentou, nos testes preliminares, um melhor desempenho em comparação com o PID Genérico em critérios avaliados como tempo de estabilização, *overshoot* e precisão (Tabela 5). Dessa forma foram realizados os testes de ciclagem de temperatura, Figura 32.

Figura 32: Resultado Controlador PID ISA



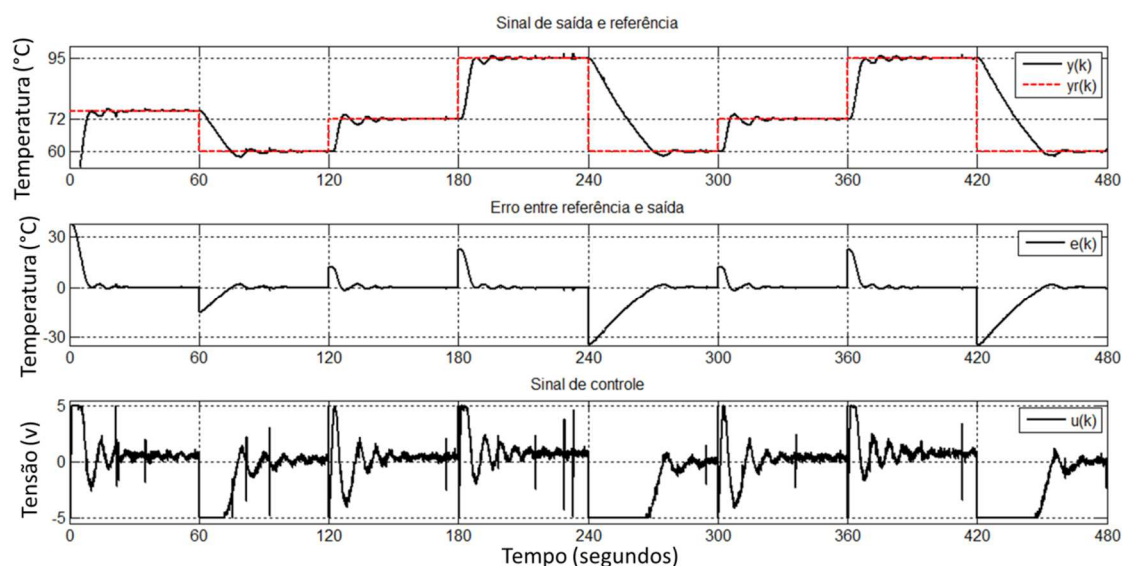
$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

Tabela 5: Comparativo entre controladores

Controlador	Rampa Subida (°C/s)	Rampa Descida (°C/s)	Over-shoot (°C)	Tempo Estabilização (s)	Precisão (+/- °C)	Erro de Referência (°C)
PID Genérico	5	-	9	Não estável	3,5	0,5
PID ISA	2,8	1,38	3,6	21	0,15	0,1
PID Paralelo	3,21	1,15	0,5	22	0,2	0,1
PID Dahlin	2	0,9	0	10	0,2	3,5
PID Dahlin +P	3	1,5	0,5	4	0,15	0,2
GMV	4	-	6	10	0,3	0,5

O terceiro controlador testado foi o PID Paralelo. Nos testes preliminares, este controlador apresentou *overshoot* inferior a 2 °C, rampa de subida superior a 2 °C e o erro de precisão inferior a 1 °C. O resultado desses três parâmetros validou o controlador para realizar a ciclagem de temperatura. Os gráficos resultantes dos testes de ciclagem de temperatura estão representados na Figura 33 e o comparativo os entre controladores estão descritos na Tabela 5.

Figura 33: Resultado PID Paralelo

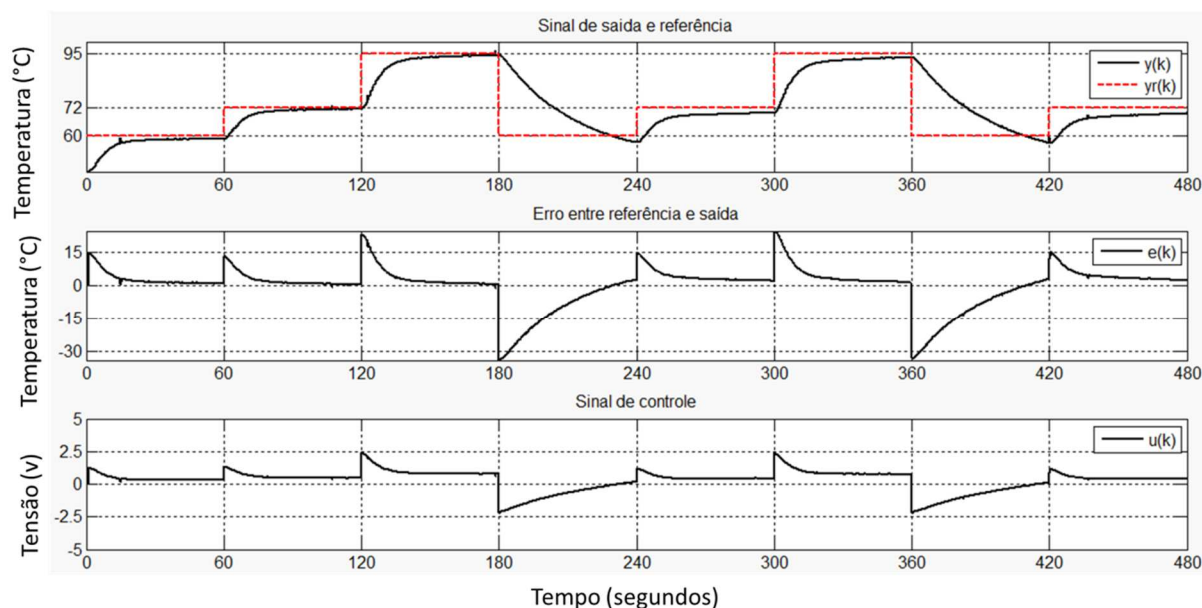


$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

O último PID testado foi o PID com Síntese de Dahlin, cujos resultados são apresentados na Figura 34. Este controlador apresentou resultados com o tempo de reação mais lento em comparação com os demais, como pode ser observado na

Tabela 5 e na Figura 34, a velocidade apresentada nas rampas de subida e descida são inferiores em comparação com os outros controladores. O tempo para atingir o alvo também é mais elevado em comparação com os demais. A vantagem observada aqui é que esse controlador é mais estável e apresentou 0 (zero) de *overshoot*. Pode ser verificado ainda na Figura 34 que esse controlador não apresenta mudanças abruptas no sinal de controle no instante próximo a estabilização.

Figura 34: Resultado PID Dahlin

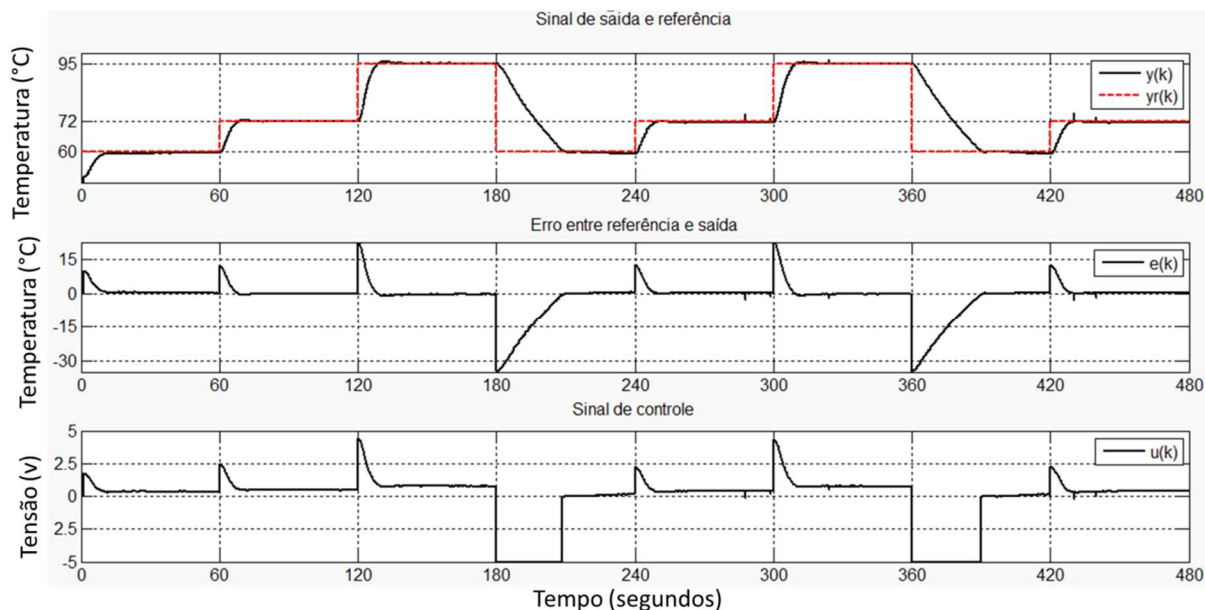


$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $yr(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

O segundo teste realizado com o controlador PID de Dahlin (Figura 35) foi feito após aplicadas as modificações descritas na metodologia, exceto pela componente proporcional. Neste teste foi observada melhoria quanto ao seguimento de referência, (Tabela 5). Comparando os gráficos da Figura 35 com os demais gráficos dos controladores apresentados até aqui, pode ser verificado que a relação entre a variável  $y$  (sinal capturado no sensor de temperatura) a variável  $yr$  (sinal desejado ou referência) é mais forte. Isso comprova melhor performance desse controlador em relação aos demais. Outra melhoria observada após essa modificação é quanto a rampa de descida. Comparando a Figura 34 e a Figura 35 verifica-se que a rampa de descida do PID de Dahlin é de  $0,9\text{ }^{\circ}\text{C/s}$  e o PID de Dahlin modificado apresenta rampa de descida de  $1,5\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ , Tabela 5.



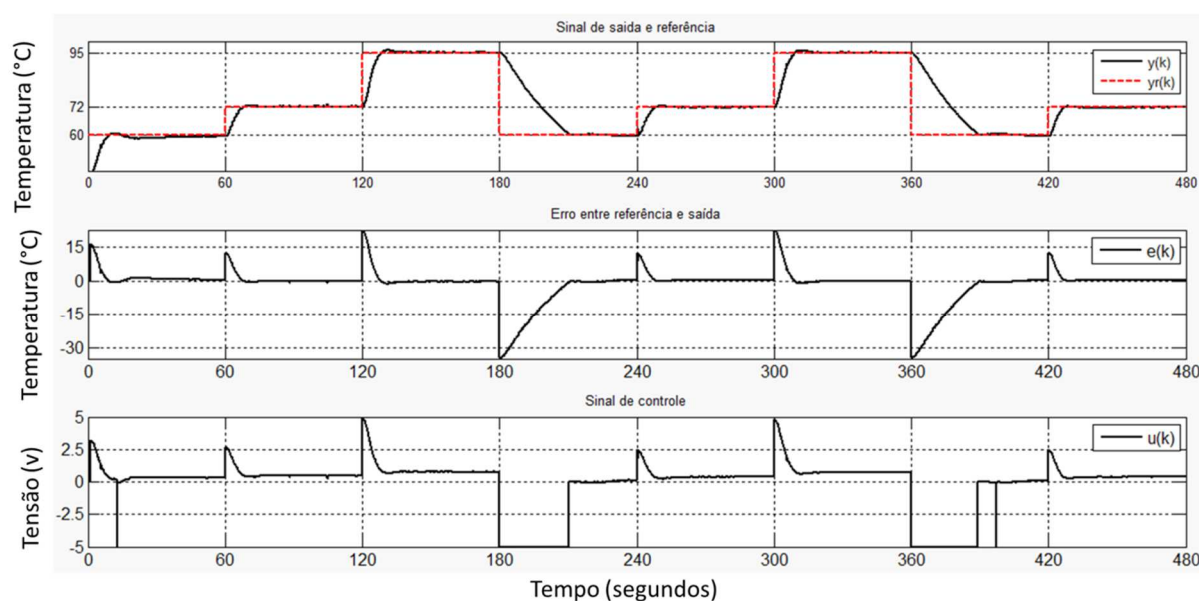
Figura 35: PID Dahlin Modificado



$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

Na Figura 36 são apresentados os testes realizados com o controlador PID de Dahlin após aplicação de todas as modificações descritas na seção Metodologia (PID + P). Esse controlador apresentou melhores resultados nos critérios avaliados em relação aos demais controladores comparados. O tempo de estabilização é um item fundamental para a técnica biológica que na qual será aplicado o equipamento termociclador (PCR). Na PCR, a ciclagem de temperatura é feita com a manutenção da temperatura em cada alvo por tempos que podem ser tão curtos como 60 segundos ou menos. Após os testes é possível afirmar que as melhorias realizadas no controlador o tornaram viável para aplicação no equipamento termociclador (Tabela 5).

Figura 36: P - PID de Dahlin Adaptado



$y(k)$ : valor capturado no sensor de temperatura;  $y_r(k)$ : valor de referência ou *setpoint*;  $e(k)$ : erro apresentado pelo sistema;  $u(k)$ : sinal de controle.

Os critérios de avaliação utilizados para avaliação dos controladores foram rampa de subida, rampa de descida, *overshoot*, tempo de estabilização, precisão e erro de referência, conforme pré-requisitos do equipamento termociclador. Com base nesses critérios, foi realizado um comparativo entre os resultados obtidos a partir dos diferentes controladores, conforme apresentado na Tabela 5. O controlador modificado de Dahlin (destacado em cinza, Tabela 5) apresentou resultados melhores que o GMV para essa planta, sendo, portanto, o mais indicado para realizar os testes práticos (técnica de PCR) com o protótipo em laboratório.

### 5.3 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos na realização de 10 ciclos completos de temperatura pelo protótipo foram avaliados utilizando os critérios de variância, somatório do erro quadrático e coeficiente de correlação entre valor de referência e valor lido. Essa análise mostrou que o PID ISA apresentou melhor desempenho com a sintonia de Ziegler e Nicholz em comparação com a sintonia de Cohen e Coon. O PID Paralelo também apresentou melhor desempenho com a sintonia de Ziegler e Nicholz nos mesmos critérios. Comparando os controladores, o que apresentou melhor desempenho foi o PID de Dahlin modificado (PID Dahlin+P) marcado com sombreamento cinza na Tabela 6.

Tabela 6: Desempenho dos Controladores em Regime de Ciclos

Controlador	Sintonia	Variância do Erro	Somatório do Erro Quadrático	Coefficiente de Correlação
PID ISA	Ziegler/Nicholz	0,1131	3257	0,5182
	Cohen/Coon	0,2037	5848	0,2633
PID Paralelo	Ziegler/Nicholz	0,0882	2554	0,5812
	Cohen/Coon	0,0925	2683	0,5355
PID Dahlin	Lambda Tuning	0,0852	2351	0,7314
PID Dahlin + P	Lambda Tuning e Ziegler/Nicholz	0,0709	2048	0,7616

O próximo comparativo realizado entre os controladores foi feito com os resultados obtidos após a estabilização. Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram um coeficiente de correlação semelhante entre os controladores. Em relação a variância do erro e o somatório do erro quadrático foram observadas diferenças, com destaque para o PID Dahlin +P (destacado em cinza) que apresentou a menor variância, o menor somatório de erro quadrático e o coeficiente de correlação igual a 1 (um). Outra diferença apresentada foi com relação ao tipo de sintonia, todos os controladores implementados com a sintonia de Ziegler/Nichols apresentaram melhor desempenho em comparação com a sintonia de Cohen/Coon.

Tabela 7: Desempenho dos Controladores em Regime Permanente

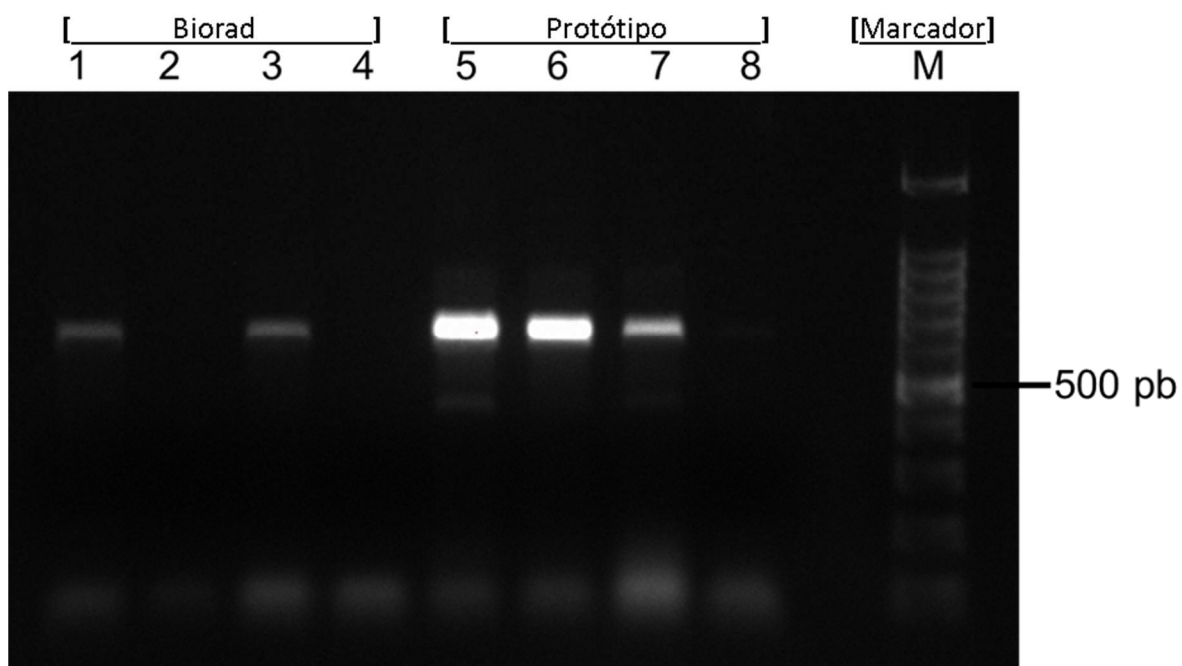
Controlador	Sintonia	Variância do Erro	Somatório do Erro Quadrático	Coefficiente de Correlação
PID ISA	Cohen/Coon	2,32E-04	0,6039	0,9997
	Ziegler	1,78E-05	0,0126	1
PID Paralelo	Cohen/Coon	8,20E-05	0,2134	0,9999
	Ziegler	7,21E-05	0,0505	1
PID Dahlin	Lambda Tuning	2,70E-03	12,4632	0,9937
PID Dahlin + P	Lambda Tuning Ziegler/Nicholz	2,06E-06	0,0052	1

Fazendo um comparativo entre a Tabela 6 e a Tabela 7 pode ser verificado que o maior desafio ao desenvolver o trabalho está no ajuste do controlador nos regimes transitórios entre uma temperatura e outra.

### 5.1 Teste do Protótipo e Comparação com Equipamento do Mercado

Um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) do gene *rbcl* foi amplificado a partir de DNA extraído de algas (identificadas como alga 1, alga 2 e mix das duas algas) pela técnica da PCR. Como pode ser observado na Figura 37, o protótipo teve sucesso na amplificação dos fragmentos-alvo a partir dos DNAs das três amostras testadas. Nas condições do teste, o equipamento da Biorad amplificou em duas das três amostras. Esses resultados indicam que o protótipo teve desempenho comparável ao equipamento importado utilizado no laboratório de Biologia Molecular, para estas amostras, nas condições do ensaio.

Figura 37: Visualização dos Produtos de PCR em Gel de Agarose 1%



Fonte: Autoria própria, 2016.

1. Produto de PCR da alga 1 amplificado no equipamento Biorad; 2. Produto de PCR da alga 2 amplificado no equipamento Biorad; 3. Produto de PCR do mix de algas amplificado no equipamento Biorad; 4. Controle negativo no equipamento Biorad; 5. Produto de PCR da alga 1 amplificado no protótipo; 6. Produto de PCR da alga 2 amplificado no protótipo; 7. Produto de PCR do mix de algas amplificado no protótipo; 8. Controle negativo no protótipo. M. Marcador de tamanho molecular, com indicação da região correspondente a 500 pares de base.

## 6 CONCLUSÃO

Os testes dos controladores PID Genérico; PID ISA; PID Paralelo; PID de Dahlin e GMV permitiram a escolha do controlador mais adequado para implementação no protótipo. Este controlador, PID de Dahlin, ainda não atendia aos requisitos do método em sua configuração original. A implementação das melhorias propostas nesse trabalho (inserção de um saturador na variável de controle, ganho na estrutura básica e a adição de uma componente proporcional) possibilitou que a planta cumprisse os requisitos específicos em relação ao seguimento de referência com robustez, permitindo atingir o primeiro objetivo. Também foram atingidos o segundo e terceiro objetivos deste trabalho, referentes as rampas de temperatura e acurácia. As rampas de 3 °C/s obtidas na subida e 1,5 °C/s na descida, bem como a variação de  $\pm 0,15$  °C e *overshoot* de 0,5 °C, atenderam aos requisitos pré-estabelecidos.

Finalmente, o teste do protótipo do equipamento no laboratório de biologia molecular da UNISINOS, mostrou que o mesmo foi apropriado para a realização da PCR, tendo sucesso na amplificação do DNA testado. Desta forma, todos os objetivos deste trabalho foram atingidos com sucesso.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira hipótese testada nesse trabalho foi a de que o uso de um controlador preditivo permitiria a obtenção de rampas mais acentuadas com diminuição do *overshoot*. Essa hipótese foi refutada, já que apesar da elevada rampa de subida (4 °C/s) o controlador GMV apresentou *overshooting* elevado (superior a 4 °C). Outros controladores preditivos poderiam apresentar resultados diferentes. Entretanto, nesse trabalho, a melhor combinação de rampa e *overshooting* foi obtida a partir da modificação e melhoria de um controlador do tipo PID de Dahlin (PID + P).

A segunda hipótese era de que o comportamento da planta durante o aquecimento seria diferente de seu comportamento durante o resfriamento. Essa hipótese foi confirmada, conforme pode ser observado nas Equações 77 e 78 dos modelos da planta e nos resultados obtidos nos testes dos controladores. O resultado mais evidente que corrobora esta hipótese são os testes do controlador PID de Dahlin em sua versão original (Figura 34) e após a sua modificação, já que para o melhor comportamento deste foi necessária a colocação de um filtro somente para ajuste do resfriamento e não do aquecimento.

Cabe ainda salientar que a nacionalização de tecnologias é uma estratégia fundamental para o desenvolvimento socioeconômico do país, que deve ser alvo de pesquisas acadêmicas, abrindo caminho para aplicações industriais futuras. Sendo um projeto multidisciplinar, esta pesquisa colaborou na aproximação de dois programas de pós-graduação, sendo o protótipo em desenvolvimento testado fora do PPG de Engenharia, pelos usuários propositores da demanda (PPG de Biologia). Outro fato importante é a viabilidade econômica do projeto, estima-se que o custo de produção do equipamento chegaria a aproximadamente R\$ 2.000,00 (dois mil Reais). Comparando com os equipamentos encontrados no mercado esse valor é bastante inferior. Em orçamentos solicitados a empresas do setor, o termociclador com valor mais baixo, nos mesmos padrões do pretendido no protótipo, foi de R\$ 17.600,00 (dezessete mil e seiscentos Reais).

## REFERÊNCIAS

- Ai-Xian, P.; Weihua, Z.; Min, Z. **Temperature-Control algorithm design of the PCR instrument**. IEEE, E-ISBN: 978-1-4244-2108-4, p. 1-6, 2008.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Robets, K.; Walter, P. Traduzido. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- Amasia, M.; Kang, S. W.; Banerjee, D.; Madou, M. **Experimental validation of numerical study on thermoelectric-based heating in anintegrated centrifugal microfluidic platform for polymerase chain reaction amplification**. *Biomicrofluidics* 7, 014106, doi: 10.1063/1.4789756, 2013.
- Applied Biosystems. **Thermal cycler temperature accuracy: a comparison of several models**. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/PCR/pdfs/App-Note-Thermal-Performance-of-AB-thermal-cyclers.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2015.
- Applied Biosystems. **Thermal cyclers: key termal concepts and ramp rates**. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/PCR/pdfs/Thermal-Cycler-Ramp-Rates-AppNote.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2015.
- ASTM International. **Standard specification for industrial platinum resistance thermometers**. E1137/E1137M – 08, Reapproved 2014.
- Aström, K.J.; Hägglund, T. **Revisiting the Ziegler–Nichols step response method for PID control**. *Journal of Process Control*, n. 14, pag 635–650, 2004.
- Aström, K.J.; Wittenmark, B. **Adaptative control**, 2ª edição. Dover Publications, Inc. 2008.
- Aström, K.J; Hägglund, T. **PID Controllers, 2ª edição: Theory, design and tuning**. Instrument Society of America, 1995.
- Atual Controles Industriais. **Sensores PT100 - Termorresistência PT100 - Sonda PT100**. Disponível em: <http://www.pt100sensores.com.br/>. Acessado em 26/04/2014.
- Baker, B. C. **AN687 Precision Temperature-Sensing With RTD Circuits**.2008. Microchip Technology Inc. DS00687C. 2008.
- Becker, A.; Angst, S.; Schmitz, A.; Engenhorst, M.; Stoetzel, J.; Gautam, D.; Wiggers, H.; Wolf, D. E.; Schierning, G.; Schmechel, R. **The effect of Peltier heat during current activated densification**. *Applied Physics Letters* 101, 013113, doi: 10.1063/1.4731272, 2012.
- BioRad. **Pesquisa de Ciências da Vida: Thermal Cyclers for PCR**. Disponível em: <http://www.biorad.com/ptbr/category/thermalcyclersforpcr>. Acesso em: 05 Abr. 2015.
- Bordons, C.; Camacho, E. F. **A generalized predictive controller for a wide class of industrial processes**. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, v. 6, n. 3, 1998.



Bray S; Medina M; Smith C. A. **A Method for the Determination of Dahlin's Algorithm Parameters**. Chemical Engineering Department. University of South Florida. Tampa, Florida 33620. February, 1990.

Ccanto, J., L., P.; Rios, D., A., Z. **Diseño e implementação de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (pcr) en la replicación de adn**. Tesis para optar el título de Ingeniero Electrónico que presentan los bachilleres, Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Peru, 2012.

CHEN, J. J.; YANG, Y. T. **Modeling and experiment of shuttling speed effects of the Ostrych**. Applid Thermal Engineering, n. 31 p. 2797-2807, 2011.

Chunfeng, A.; Yonghui, C. **Applications of DMC-PIDalgorithm the measurement and control system for a greenhouse environmental factors**. IEEE, p. 483-485, 2011.

Corte, A; **Desenvolvimento de Termociclador**. Monografia de graduação em engenharia de computação, Unilasalle, 2012.

Dahlin E. B. **Designing and Tuning Digital Controllers**. Instruments and Control Systems, 41(6): 77-83, 1968.

Danvic. **Pastilha termoeétrica de efeito peltier**. Disponível em: <<http://www.peltier.com.br/index.php?url=faq>>. Acesso em: 22 Mai. 2016.

Dechechi, E. C. **Controle avançado preditivo adaptativo: DMC multivariavel adaptativo**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas: Faculdade de Engenharia Química, 1998.

Demircioglu, H. **Generalized predictive control: A practical application and comparison of discrete- and continuous-time versions**. Control Systems, IEEE. DOI: 10.1109/37.872902. Outubro, 2000.

Dusen, M. S. V. **Platinum-resistance thermometry at low temperatures**. Contribution from the Bureau of Standards, United States Department of Commerce. v. 47, p. 326. 1925.

Freedman, R. W.; Bhatia, A. **Adaptive dynamic matrix control: online evaluation of the DMC model coefficients**. IEEE, p. 220 – 225. Junho, 1985.

Halliday, D; Walker, J; Resnick, R. **Fundamentos da Física: gravitação, ondas e termodinâmica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. v. 2.

Hoffmann Eitle, Patent und Rechtsanwälte Arabellastrasse 4 81925 München (DE). **Cooling in a thermal cycler using heat pipes**. European Patent Application EP 2 520 667 A1. Application number: 12168029.2, novembro, 2012.

Instituto Superior Técnico.**E-Escola:Grupo de Ciências Biológicas**. PCR - Amplificação de DNA in vitro. nov. 2005. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

Ioffe, A.F. **Semiconductor Thermoelements and Thermoelectric Cooling** Infosearch Limited [S.I.] ISBN 0-85086-039-3, 1957.

Jiang, J.; Kaigala, G. V.; Marquez, H. J.; Backhouse, C. J. **Nonlinear Controller Designs for Thermal Management in PCR Amplification**. IEEE Transactions on Control Systems Technology, v. 20, n. 1, January 2012.

Kadereit, G.; Borsch, T.; Weising, K.; Freitag, H. **Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the Evolution of C<sub>4</sub> Photosynthesis**. Int. J. Plant Sci. 164(6):959–986. 2003.

Lake Shore Cryotronics INC. **DIN IEC 751 Temperature/Resistance Table for Platinum Sensors**. Form Number F038-00-00. Revision May 2014.

Liu, B.; Guo, L.; Deng, Y.; Zhang, B.; He, N. **Research of Temperature Control Algorithm in PCR Gene Amplify Instrument**. IEEE, pag. 119 – 122, ISBN: 978-1-4577-0076-7, 2011.

Matuross, T.; Pogfay, T.; Mongpraneet, S.; Wisitsoraat, A.; Lomas, T.; Tuantranont, A. **Temperature cycle and Surface Treatment Study of Thermoelectric Based Micro PCR**. Proceedings of the 2010 5th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems. January 20-23, Xiamen, China, 2010.

Mejía, R. I. G. **Metodos para análise do desempenho e robustez de processos industriais orientado a dados: abordagem determinística e estocástica**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2008.

Mejía, R. I. G. **Projeto integral de uma máquina automática para o envasado de tintas**, Universidad Privada Boliviana, 2001.

Ministério da Saúde – Gabinete do Ministro. **Portaria nº 2.265**, de 16 de outubro de 2014.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST**. ISSN: 1517-1159, 2015.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**, 2015.

Nise N. S. **Control Systems Engineering**. 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc. December 2010.

Nova Analítica Importação e Exportação LTDA. **P R O P O S T A BP-009288/15/AI/EY/BG: ITEM 001 Termociclador modelo 3PRIME marca Techne**. SAO PAULO, Abril de 2015.

Nozaki, H.; Itoh, M.; Sano, R.; Uchida, H.; Watanabe, M, M.; Kuroiwa, T. **Phylogenetic Relation Ships Within the Colonial Volvocales (Chlorophyta) Inferred from rbcL Gene Sequence Data**. J. Phycol. 31, 970-979, 1995.

Ogata, K. **Engenharia de controle moderno**. 5. ed. São Paulo: Pearson: Prentice-Hall, 2010.

Pal D.; Venkataraman, V.; Mohan, K. N.; Chandra, H. S.; Natarajan, V. **A power-efficient thermocycler based on induction heating for DNA amplification by polymerase chain reaction.** Review of Scientific Instruments 75, 2880, doi: 10.1063/1.1781368, 2004.

Paul, F.; Roman, E.; Pius, H., inventor; Roche Diagnostics AG Patent Department Forrenstrasse 6343 Rotkreuz (CH), assignee; F. Hoffmann-La Roche AG, application. **Heat dissipation of power electronics for thermocyclers.** European Patent Application EP 2 353 722 A1. Application number: 10153012.9, agosto, 2011.

Paz, M. A.; Busto, R. F.; Olguín, E.; Santos, O. J.; Ponce, P.; Garibo, S. **Improving Stability and Performance in a Generalized Minimum Variance Controller using Dynamic Pole Assignment.** IEEE, Catalog Number: 05EX1097 ISBN: 0-7803-9230-2, 2005.

Peng, X.; Chen, Z.; Mao, H. **Adaptive Fuzzy PID Control for Polymerase Chain Reactions.** 6th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics. Hangzhou, 310027, P.R.China, 2013.

Platero, C.; Castedo, L.; Ferre, M.; Vicente, C. **Control clásico y moderno sobre células Peltier en un entorno didáctico,** XXI Jornadas de Automática, ISBN: 84-699-3163-6, Sevilla, setembro, 2000.

Pokfai, T.; Wong-ek, K.; Mongpraneet, S.; Wisitsoraat, A.; Tuantranont, A. **Portable Polymerease Chain Reaction System with Thermoelectric Cooling.** Proceedings of ECTI-CON, IEEE, 78-1-4244-2101-5/08, 2008.

Qiu, X.; Yuan, J. **Temperature Control for PCR Thermocyclers Based on Peltier-Effect Thermoelectric.** IEEE, Engineering in Medicine and Biology, 27th Annual Conference Shanghai, p. 7512, China, Setembro, 2005.

Riffat, S. B.; Xiaoli, M. A. **Thermoelectrics: a review of present and potential applications.** Applid Thermal Engineering, n. 23, p. 913-935, 2003.

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K B.; Erlich, H. A. **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.** Science, n. 239, p. 487-491, 1988.

Schicke, K; Hofmann, C, inventor; Eppendorf AG, assignee; **Thermocycler with a temperature control block driven in cycles.** United States Patent US008198051B2, junho, 2012.

SEADI, C. **Principios básicos de imunologia.** Canoas: Ulbra, 2ª ed. 2014.

Seborg, D. E; Edgar T. F.; Mellichamp D. A. **Process Dynamics and Control,** 2nd Edition. Johan Wiley & Sons, Inc. Printed in the United States of America, 2004.

Silveira, A. S. **Contribuições ao controle de variância mínima generalizado: abordagem de projeto no espaço de estados.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2012.

Song, J.; Cheng, W.; Xu, Z.; Yuan, S.; Liu M. **Study on PID temperature control performance of a novel PTC material with room temperature Curie point.** International Journal of Heat and Mass Transfer 95: 1038-1046, 2016.

TerMaat, J; Whitney, S. E.; Viljoen, H.J.; Kreifels, M. R, inventor; Streck, Inc., assignee; **Rapid thermocycler system for rapid amplification of nucleic acids and related methods.** United States Patent Application, Publication US 2012/0308990 A1, dezembro, 2012.

Xianbo, Q.; Jingqi, Y.; Zhifeng, W. **Feedforward Variable Structural Proportional-Integral-Derivative form Temperature Control of Polymerase Chain Reaction.** Chinese J. Chem. Eng., Vol. 14, No.2, p. 200-206, 2006.

Zaha, A.; Schrank, A.; Loreto, E. L. S.; Ferreira, H. B.; Schrank, I. S.; Rodrigues, J. J. S.; Regner, L. P.; Passaglia, L. M. P.; Rosseti, M. L. R.; Vaistein, M. H.; Silva, S. C.; Gaiessky, V. L. S. V. et al. **Biologia Molecular Básica.** 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

## APÊNDICE I

### Algoritmo em Matlab Implementação PID Dahlin + P

```

% -----
% Implementação do controlador PID Dahlin + P
% Angélico Corte
% Rodrigo Ivan Goytia Mejia
% -----
closeall
clc
clearall

% Configurando o Arduino
% % -----
if exist ('ar', 'var') && isa (ar, 'arduino') && isvalid(ar)

else
ar = arduino ('COM3');
end
writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 10, 1);
writeDigitalPin(ar, 11, 1);

%% Parametros de inicialização do termocilcador

ciclos=35;
denat=600;           % 1 minuto
anel=600;           % 1 minuto
ext=1200;           % 2 minutos
t_anel=denat+anel;
t_ext=ext+t_anel;
init_stab=600;      % 1 minuto
init_denat=3000;   % 5 minuto
post=3000;         % 5 minuto

yr(1:init_stab)=2;
yr(init_stab+1:init_denat + init_stab)=3.16;
t_ciclos = init_stab + init_denat + 1;

for i=1:ciclos
% denaturation
for j=t_ciclos: denat + t_ciclos - 1
yr(j) = 3.13;
end

% aneeling
for j=t_ciclos + denat: t_ciclos + t_anel - 1
yr(j) = 1.76;
end

%extention
for j=t_ciclos + t_anel: t_ciclos + t_ext -1
yr(j) = 2.4;
end

t_ciclos=t_ciclos + t_ext;

```

```

end
nit=j + post;
% Extensão final
yr (t_ciclos: t_ciclos + post - 1)=2.4;

%% Parâmetros iniciais do controlador
% -----
N          = 4800;      % Número de amostras
Fs         = 10;       % Frequencia de amostragem, Hz
Ts         = 1/Fs;     % Período de amostragem, seg
k          = 0:Ts:nit*Ts; % Vetor de tempo de simulação, seg
t          = 0:Ts:nit*Ts; %t= k;
kini       = 10;
e          = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de erro
eap        = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de erro plicavel
y          = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de saída
ys         = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de saída
u          = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de entrada
uc         = zeros (nit,1); % Inicialização do vetorx de entrada
umax       = 5;        % Máximo valor do sinal de controle
umin       = -5;      % Mínimo valor do sinal de controle

Te         = zeros (N,1); % Inicialização do tempo de espera no ciclo

% Inicialização do gráfico online
Stop       = 1;
ysaida    = line (nan,nan,'Color','k','LineWidth',2);
uctrle    = line (nan,nan,'Color','r','LineWidth',2);
yrsaida   = line (nan,nan,'Color','b','LineWidth',2);
ucsaida   = line (nan,nan,'Color','c','LineWidth',2);
uicontrol ('Style','Pushbutton','String','Parar','Callback','Stop = 0;');

%% Modelo de 1ra ordem Aquecimento
% -----
Kph        = 2.92;
tauh       = 69;
theta      = 0.7;
Gpsh       = tf(Kph,[tauh 1]);
Gpsdh      = Gpsh;
Gpsdh.ioDelay = theta;
Gpzh       = c2d(Gpsh,Ts,'zoh');
d          = round(theta/Ts);
Gpzh.Variable = 'z^-1';
bh         = Gpzh.num{:};
b0h = bh(2);
ah         = Gpzh.den{:};
alh = -ah(2);

%% Modelo de 1ra ordem Refrigerera
% -----
Kpc        = 2.77;
tauc       = 65;
theta      = 0.7;
Gpsc       = tf(Kpc,[tauc 1]);
Gpsdc      = Gpsc;
Gpsdc.ioDelay = theta;

Gpzc       = c2d(Gpsc,Ts,'zoh');
d          = round(theta/Ts);

```

```

Gpzc.Variable      = 'z^-1';
bc                 = Gpzc.num{:};
b0c = bc(2);
ac                 = Gpzc.den{:};
alc = -ac(2);

%% Parâmetros de ajuste do controlador de Dahlin
% -----
tauMF              = 18;
q                  = exp(-(Ts/tauMF));

%% Algoritmo de Controle PID
% -----
for k=1:kini
ys(k) = readVoltage (ar,1);
end
%% 5 min iniciais

%%
for k=kini:nit
tic;

% Saida do processo
% -----
y(k) = readVoltage (ar,1);
e(k) = yr(k) - y(k);

% Lei de controle de Dahlin
% -----
term1(k) = 4.006 * ((1-q)* e(k)) / b0h;
term2(k) = 4 * (alh * (1-q) * e(k-1)) / b0h;
term3(k) = q * uc(k-1);
term4(k) = 1.0 * ((1 - q) * uc(k-(d-1)));
term5(k) = 150 *e(k)*b0h;

uc(k) = term1(k) - term2(k) + term3(k) + term4(k); %+ term5(k);

% Saturação do sinal de controle
% -----
if uc(k) >= umax * 1.4;
uc(k) = umax * 1.4;
elseif uc(k) <= umin
uc(k) = umin;
end
if e(k) > 5
u(k)=5;
elseif e(k) < -0.025 && yr(k)< 2.3;

u(k)= -5;
uc(k-1)= -0.45;
uc(k)= -0.1;
else
u(k) = uc(k) + term5(k);
end

if u(k) >= umax
u(k) = umax;
elseif u(k) <= umin
u(k) = umin;

```

```

end

if u(k) > 0
writePWMVoltage(ar,8,0);
writePWMVoltage(ar,9,u(k));
else
pw= - u(k);
writePWMVoltage(ar,9,0);
writePWMVoltage(ar,8,pw);
end

set(ysaida,'xdata',t(1:k),'ydata',30*y(1:k)); drawnow
set(uctrle,'xdata',t(1:k),'ydata',u(1:k)); drawnow
set(yrsaida,'xdata',t(1:k),'ydata',30*yr(1:k)); drawnow

if Stop == 0
writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 8, 0);
break
end

Te(k)=Ts - toc;
if Te(k)>0
pause(Te(k));
end
toc
end

% Temperatura final (hold)
while (1)
adc=readVoltage (ar, 1);
temperatura=adc*30
if (adc > .3)
writePWMDutyCycle (ar, 8,1);
else
writePWMDutyCycle (ar, 8,0);
end

if Stop == 0
writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 8, 0);
break
end
end

writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 8, 0);

%% Indices de desempenho
% -----
varetra= var(e(1:100)); % Variância do erro de estimação
segetra = sum(e(1:100).^2); % Somatório do erro quadrático
ytra(1:100) = y(1:100);
cor2tra = 1-(segetra/sum((ytra-mean(ytra)).^2)) % Coeficiente de correlação
múltipla

%% Impressão dos resultados
% -----
tk = 1:length(y);

```



```
figure;
subplot(3,1,1),
plot(tk, y(tk), 'k', 'linewidth',2), hold on
plot(tk, yr(tk), '--r', 'linewidth',2), legend('y(k)', 'yr(k)'), grid
title('Sinal de saída e referência'),
axis([0 length(y) 1 3.4])

subplot(3,1,2),
plot(tk, e(tk), 'k', 'linewidth',2), legend('e(k)'), grid
title('Erro entre referência e saída'), xlabel('Amostra');
axis([0 length(y) min(e) max(e)])

subplot(3,1,3),
stairs(tk,u(tk), 'k', 'linewidth',2), grid, legend('u(k)')
title('Sinal de controle'), xlabel('Amostra');
axis([0 length(y) -5 5])

figure;
hold on;
plot(uc, 'b');
plot(term5, 'r');
```

## APÊNDICE II

```

% -----
% Implementação do controlador PID ISA, Paralelo, Generico, Dahlin
% Para a utilização do algoritmo descomentar o controlador e a sintonia
% desjada

% Angélico Corte
% Rodrigo Ivan Goytia Mejia
% -----
closeall
clc
clearall

% %% Configurando o Arduino
% % -----
if exist ('ar','var')&& isa (ar,'arduino')&& isvalid(ar)
%     %Não Fazer Nada
else
ar = arduino ('COM3');
end

writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 10, 1);
writeDigitalPin(ar, 11, 1);

%% Parâmetros iniciais
%% Parametros de inicialização do termocilcador

ciclos=35;
denat=600;
anel=600;
ext=1200;
t_anel=denat+anel;
t_ext=ext+t_anel;
init_stab=600;
init_denat=3000;
post=3000; %0;

% nit = tempo*ciclos+nit_add+nit_post;

yr(1:init_stab)=2;
yr(init_stab+1:init_denat + init_stab)=3.16;
t_ciclos = init_stab + init_denat + 1;

for i=1:ciclos
% denaturation
for j=t_ciclos: denat + t_ciclos - 1
yr(j) = 3.13;
end

% aneeling
for j=t_ciclos + denat: t_ciclos + t_anel - 1
yr(j) = 1.76;
end

```

```

%extention
for j=t_ciclos + t_anel: t_ciclos + t_ext -1
yr(j) = 2.4;
end

    t_ciclos=t_ciclos + t_ext;

end
nit=j + post;
% Extensão final
yr (t_ciclos: t_ciclos + post - 1)=2.4;

%% Parâmetros iniciais
% -----
N          = nit;                % Número de amostras
Fs         = 10;                % Frequencia de amostragem, Hz
Ts         = 1/Fs;              % Período de amostragem, seg
k          = 0:Ts:N*Ts;         % Vetor de tempo de simulação, seg
t          = 0:Ts:N*Ts;         %t                = k;
kini       = 4;
e          = zeros (N,1);       % Inicialização do vetorx de erro
y          = zeros (N,1);       % Inicialização do vetorx de saída
ys         = zeros (N,1);       % Inicialização do vetorx de saída
u          = zeros (N,1);       % Inicialização do vetorx de entrada
uc         = zeros (N,1);       % Inicialização do vetorx de entrada

umax       = 5;                 % Máximo valor do sinal de controle
umin       = -5;                % Mínimo valor do sinal de controle

Te         = zeros (N,1);       % Inicialização do tempo de espera no ciclo

Stop       = 1;
ysaida    = line (nan,nan,'Color','k','LineWidth',2);
uctrle    = line (nan,nan,'Color','r','LineWidth',2);
yrsaida   = line (nan,nan,'Color','b','LineWidth',2);
usaida    = line (nan,nan,'Color','c','LineWidth',2);
uicontrol ('Style','Pushbutton','String','Parar','Callback','Stop = 0;');

%% Modelo de 1ra ordem
% -----
Kp         = 2.92;
tau        = 69;
theta      = 0.7;
Gps        = tf(Kp,[tau 1]);
Gpsd       = Gps;
Gpsd.ioDelay = theta;

Gpz        = c2d(Gps,Ts,'zoh');
d          = round(theta/Ts);
Gpz.Variable = 'z^-1';
b          = Gpz.num{:};
b0 = b(2);
a          = Gpz.den{:};
a1 = -a(2);
ad = a(2);

%% Parâmetros do controlador PID estrutura incremental
% -----
tauMA=tau;

```

```

% % Lambda tunning 1ra ordem com atraso curto ou zero
% Kc      = tauMA/(Kp*(taxa+theta));
% Ti      = tau;
% Td      = 0;

% % Lambda tuning 1ra ordem com atraso dominante (NAO USAR NESTE CASO)
% Kc      = theta/(2*Kp*(taxa+theta));
% Ti      = theta/2;
% Td      = 0;

% PI - Ziegler/Nicholoz
% Kc      = 0.9*(tauMA/theta);
% Ti      = theta/0.3;
% Td      = 0;

%% Modificação da sintonia de Ziegler/Nicholoz Melhor performance
% PID - Ziegler/Nicholoz
Kc      = 1 * (tauMA/theta); % ISA 0.9 * (tauMA/theta);
Ti      = 2 * 2*theta; % ISA 4*theta;
Td      = theta/4; % ISA theta/4;
%%
% % PI - Cohen/Coon
% Kc      = (1/Kp)*(tauMA/theta)*(9/10+theta/(12*tauMA));
% Ti      = theta*((30+3*(theta/tauMA))/(9+20*(theta/tauMA)));
% Td      = 0;

%% Melhor que o Ziegler
% % PID - Cohen/Coon
% Kc      = 0.5 * (1/Kp)*(tauMA/theta)*(4/3+theta/(4*tauMA));
% Ti      = 4 * theta*((32+6*(theta/tauMA))/(13+8*(theta/tauMA)));
% Td      = 1 * theta*(4/(11+2*(theta/tauMA)));
%% Tipos de controladores
%fator = 10;

q0      = Kc*(1 + Td/Ts);
q1      = -Kc*(1 + 2*Td/Ts - Ts/Ti);
q2      = Kc*Td/Ts;

% Generico
% fator = .01;
% q0      =fator* (Kc - (Ti * Ts)/2) + (Ti * Ts) + (Td/Ts);
% q1      =fator* -(Kc - (Ti * Ts)/2) + 2*(Td/Ts);
% q2      =fator* Td/Ts;

% PID ISA*
% fator = 10;
% q0      = ((Kc + (Kc * Ts)/(2*Ti)) + (Kc*Td)/Ts) /fator;
% q1      = -((Kc - (Kc * Ts)/(2*Ti)) + (2*Kc*Td)/Ts)/fator;
% q2      = (Kc*Td/Ts)/fator;

% PID Paralelo
fator = .1;
Tip = Ti/Kc;
Tdp = Td*Kc;
q0      = (Kc + Ts/(2*Tip) + (Tdp)/Ts)/fator;
q1      = -(Kc - Ts/(2*Tip) + (2*Tdp)/Ts)/fator;
q2      = (Tdp)/Ts)/ fator;

```

```

% PID Dahlin
% Lambda tuning
% taxa          = 9;
% tauMA         = tau;
% tauMF         = tauMA / taxa;
% %taxa         = tauMA/tauMF;
%
% % Sintonia Para PID Dahlin
% p1=exp(-Ts/tauMF);
% klinha=(1-p1)/(sum(b)*(1+d*(1-p1)));
% Kc            = 4* klinha * al;
% Ti            = 100*(al/ (1+al)); %0.29; % 7;
% Td            = Ts/al; %3.3; % 0.16;
%
% fator = 1;
% q0            = (Kc * ( 1+ Ts/Ti + Td/Ts)) * fator;
% q1            = -(Kc * (1 + 2*(Td/Ts))) * fator;
% q2            = (Kc * (Td/Ts)) * fator;

%% Algoritmo de Controle PID
% -----
for k=1:kini
ys(k) = readVoltage (ar,1);
y      = ys;
end
for k=kini:N
tic;

% Saida do processo
% -----
ys(k) = readVoltage (ar,1);
y(k)  = (ys(k) + ys(k-1))/2;
%y(k) = al * y(k-1) + b0 * u(k-1);

e(k) = yr(k) - y(k);

q3   = (e(k)) /50;

% Lei de controle PID incremental
% -----
u(k) = u(k-1) + q0*e(k) + q1*e(k-1) + q2*e(k-2);
%uc(k) = uc(k-1) + (q0*e(k) + q1*e(k-1) + q2*e(k-2));

%u(k)= uc(k); % + q3;
% Saturação do sinal de controle
% -----
%   if uc(k) >= umax * 4;
%       uc(k) = umax * 4;
%   elseif uc(k) <= umin * 4;
%       uc(k) = umin * 4;
%   end

if u(k) >= umax
u(k) = umax;
elseif u(k) <= umin

```

```

u(k) = umin;
end

if e(k) < -5; %-0.07
u(k) = umin;
uc(k)= -1.2;
elseif e(k) > 5
u(k) = umax;
end

if u(k) > 0
writePWMVoltage(ar,8,0);
writePWMVoltage(ar,9,u(k));
else
pw= - u(k);
writePWMVoltage(ar,9,0);
writePWMVoltage(ar,8,pw);
end

set(ysaida, 'xdata',t(1:k), 'ydata',y(1:k)); drawnow
%set(uctrle, 'xdata',t(1:k), 'ydata',uc(1:k)); drawnow
set(usaida, 'xdata',t(1:k), 'ydata',u(1:k)); drawnow
set(yrsaida, 'xdata',t(1:k), 'ydata',yr(1:k)); drawnow

if Stop == 0
writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 8, 0);
break
end

Te(k)=Ts- toc;
if Te(k)>0
pause(Te(k));
end
end

writeDigitalPin(ar, 9, 0);
writeDigitalPin(ar, 8, 0);

%% Indices de desempenho
% -----
varetra      = var(e(1:100));           % Variância do erro de estimação
segetra      = sum(e(1:100).^2);       % Somatório do erro quadrático
ytra(1:100)   = y(1:100);
cor2tra = 1-(segetra/sum((ytra-mean(ytra)).^2))%Coeficiente de correlação
múltipla

eest         = e(100:N);
vare        = var(eest);               % Variância do erro de
estimação
yesta(100:N) = y(100:N);
sege = sum(eest.^2);                   % Somatório do erro quadrático
cor2 = 1-(sege/sum((yesta-mean(yesta)).^2)); % Coeficiente de correlação
múltipla

```

```
%% Impressão dos resultados
% -----
tk = 1:length(y);

figure;
subplot(3,1,1),
plot(tk,y(tk),'k','linewidth',2), hold on
plot(tk,yr(tk),'--r','linewidth',2),legend('y(k)','yr(k)'), grid
title('Sinal de saída e referência'),
axis([0 length(y) 0 3.5])

subplot(3,1,2),
plot(tk,e(tk),'k','linewidth',2), legend('e(k)'), grid
title('Erro entre referência e saída'),xlabel('Amostra');
axis([0 length(y) min(e) max(e)])

subplot(3,1,3),
stairs(tk,u(tk),'k','linewidth',2), grid, legend('u(k)')
title('Sinal de controle'),xlabel('Amostra');
axis([0 length(y) -5.5 5.5])
```