

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

WILLIAN CORDEIRO VIEIRA

**SISTEMA DE QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM
TEMPO REAL POR DENSIDADE ÓTICA**

VIÇOSA

2017

WILLIAN CORDEIRO VIEIRA

**SISTEMA DE QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM
TEMPO REAL POR DENSIDADE ÓTICA**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Elétrica do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Viçosa, para a obtenção dos créditos da disciplina ELT 490 – Monografia e Seminário, e cumprimento do requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Elétrica.
Orientador: Prof. Dr. Márcio Arêdes Martins.
Co-orientador: Prof. Dr. Denilson Eduardo Rodrigues.

VIÇOSA
2017

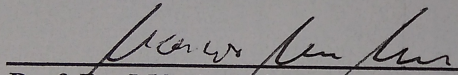
WILLIAN CORDEIRO VIEIRA

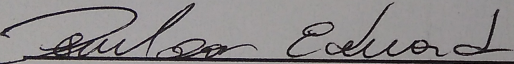
**SISTEMA DE QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS
EM TEMPO REAL POR DENSIDADE ÓTICA**

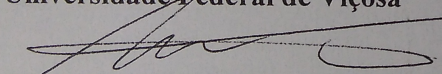
Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Elétrica do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Viçosa, para a obtenção dos créditos da disciplina ELT 490 – Monografia e Seminário e cumprimento do requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Elétrica.

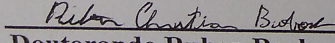
Aprovada em 27 de Junho de 2017.


COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Márcio Arêdes Martins - Orientador
Universidade Federal de Viçosa


Prof. Dr. Denilson Eduardo Rodrigues - Coorientador
Universidade Federal de Viçosa


Prof. Dr. André Gomes Tôrres - Membro
Universidade Federal Viçosa


Doutorando Ruben Barbosa - Membro
Universidade Federal de Viçosa


Mestrando Luís Otávio Maciel de Oliveira - Membro
Instituto Tecnológico de Aeronáutica

“A vida é como o oceano, é preciso mergulhar de cabeça para sentir a sua profundidade. ”

(Carl Gustav Jung)

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus cujos ensinamentos iluminam meu caminho. À meus pais, pelo amor e pela capacidade de acreditar e investir em mim. À meus amigos que compartilharam tantos momentos durante a caminhada que foi a graduação. À todos os professores da UFV que contribuíram na minha formação, em especial ao Prof. Márcio Arêdes Martins e ao Prof. Denilson Eduardo Rodrigues pela orientação neste trabalho e em tantos outros. Finalmente, à Petrobrás – Petróleo Brasileiro S/A pelo apoio financeiro sem o qual este trabalho não seria possível.

Resumo

Nas últimas décadas a humanidade vem procurando maneiras de diminuir a dependência energética por combustíveis fósseis. Nesse contexto, o biodiesel se destaca como uma alternativa ao uso do diesel de petróleo. No entanto, a produção de biodiesel de primeira e segunda geração vem atrelado a outros problemas ambientais, sociais e econômicos que desestimulam seu uso em maior escala. Como solução a esse impasse, o biodiesel de terceira geração, isto é, criado a partir de microalgas, vem sendo apontado como uma solução promissora. Para que o biodiesel de microalgas possa se consolidar como uma alternativa viável, ainda são necessários avanços tecnológicos que permitam o aumento da eficiência energética e a diminuição dos custos do processo de produção do biodiesel. Uma das formas de diminuir os custos é tornar o processo de cultivo de microalgas automatizado e otimizado, objetivando alto rendimento de produção de biomassa seca ao menor custo possível. Para isso, é necessário que vários parâmetros do cultivo sejam monitorados, preferencialmente em tempo real, de forma a oferecer informações confiáveis aos sistemas de controle e ao processo de tomada de decisões. Um dos principais parâmetros que precisam ser monitorados é a concentração de biomassa seca microalgal, uma vez que esse é um indicativo direto do período de colheita e indireto da saúde e desempenho do cultivo como um todo. Assim sendo, este trabalho propõe a construção de um sistema para quantificação da concentração de biomassa microalgal baseado em densidade ótica utilizando absorvância em 6 comprimentos de onda diferentes com uso de um sistema microcontrolado embarcado. Para a tradução da absorvância em concentração de biomassa foram treinadas redes neurais artificiais multicamadas com diferentes configurações de camada escondida e sinais de entrada objetivando encontrar as configurações que apresentassem os melhores desempenhos. O banco de dados utilizado no treinamento das redes consistiu em um conjunto de amostras de diluições consecutivas de concentração de biomassa seca de microalgas conhecidas. Nessas amostras, a concentração e absorvância ótica foram medidas por gravimetria e espectrofotometria. Os resultados desse trabalho apontam para a viabilidade do sensor por densidade ótica com desempenho satisfatório (erro quadrático médio $< 0,00008$) utilizando uma rede neural artificial multicamada simples composta por 6 variáveis de entradas e 6 neurônios em uma camada escondida. Esse sensor foi comparado ao método espectrofotométrico em espectrofotômetro de bancada, obtendo melhores resultados.

Abstract

In recent decades humanity has been looking for ways to reduce energy dependence on fossil fuels. In this context, biodiesel stands out as an alternative to the use of petroleum diesel. However, the production of first and second generation biodiesel is linked to other environmental, social and economic problems that discourage its use on a larger scale. As a solution to this impasse, the third generation biodiesel, that is, created from microalgae, has been pointed as a promising solution. For microalgae biodiesel to be consolidated as a viable alternative, technological advances are still needed to increase energy efficiency and reduce the costs of the biodiesel production process. One of the ways to reduce costs is to make the process of microalgae cultivation automated and optimized, aiming at high production yield of dry biomass at the lowest cost possible. Hence, the monitoring of several parameters of the microalgae culture system are necessary, preferably in real time, to offer reliable information to the control systems and to the process of decision making. One of the main parameters that need to be monitored is the concentration of dry microalgal biomass, since this is a direct indication of the harvest period and indirect health and performance of the culture system as a whole. Thus, this work proposes the construction of a system for quantification of microalgal biomass concentration based on optical density using absorbance at 6 different wavelengths in an embedded microcontrolled system. To translate the absorbance into biomass concentration, several artificial neural networks with different hidden layer configurations and input signals were trained to find the configurations that presented the best performances. The database used in the training of the networks consisted of a set of samples of consecutive dilutions of known microalgae concentration. In these samples, the concentration and optical absorbance were measured by gravimetry and spectrophotometry methods. The results of this work point to the viability of the optical density sensor with satisfactory performance (mean square error <0.00008) using a simple multilayer artificial neural network composed of 6 inputs and 6 neurons in the hidden layer. This sensor was compared to the spectrophotometric method in spectrophotometer, obtaining better results.

Sumário

Lista de Figuras

- Figura 1 – Comparação do espectro de absorbância da clorofila a (linha azul contínua) e da clorofila d (linha vermelha pontilhada)16
- Figura 2 – Diodo emissor de luz. a) Processo de geração de luz no LED por recombinação de elétrons e buracos; b) Símbolo gráfico adotado para LEDs.....18
- Figura 3 – Corte esquemático de um fotodiodo de silício enfatizando as diferentes camadas que compõem os semicondutores.....20
- Figura 4 – Fotodiodo operando em modo fotocondutivo acoplado a um amplificador de transimpedância para tradução de fotocorrente em sinal de tensão.....21
- Figura 5 – Diagrama de blocos do microcontrolador Atmel328P.....23
- Figura 6 – Esquema representativo do neurônio artificial.....24
- Figura 7 – a) Rede neural feedforward de camada simples com 3 entradas e 3 saídas. b) Rede neural feedforward de múltiplas camadas com 3 entradas, 2 saídas e 3 neurônios na camada intermediária.....25
- Figura 8 – Ilustração da construção interna do sensor.....29
- Figura 9 – Circuito de controle de intensidade luminosa do LED por controle de corrente e análise do comportamento da corrente x tempo quando aplicado PWM a 5%, 50 % e 100%.....30

Figura 10 – Resposta em tensão do fotodiodo de absorbância durante o ensaio de diluições.....	34
Figura 11 – Saídas normalizadas do azul e ultravioleta.....	36
Figura 12 – Comparação dos resultados dos métodos gravimétricos, espectrofotométricos e da melhor rede neural treinada.....	43
Figura 13: Curva identidade do método espectrofotométrico em relação ao método gravimétrico ($R^2=0,987$ e Erro Quadrático médio=0,0531)	44
Figura 14: Curva identidade da RNA em relação ao método gravimétrico ($R^2=1$ e Erro Quadrático médio=0,0104)	44
Figura 15 – Resíduos entre o método espectrofotométrico e o método gravimétrico.....	45
Figura 16 – Resíduos entre a resposta da RNA e o método gravimétrico.....	45
Figura 17 – Espectro absorptivo da amostra de microalgas com concentração de $1,4133 \text{ gL}^{-1}$ para o intervalo de comprimento de onda de 400 a 1000 nm.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tipos de radiação eletromagnética e sua energia e comprimento de ondas associados.....	15
Tabela 2 – Valores dos maiores desvios padrão relativos à média de cada comprimento de onda e a média dos desvios padrão relativos.....	32
Tabela 3 – Erro quadrático médio obtido na fase de teste para os diferentes algoritmos de treinamento e número de neurônios na camada escondida quando todos os comprimentos de onda são utilizados.....	35
Tabela 4: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando todos os comprimentos de onda são utilizados.....	37
Tabela 5: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando apenas os comprimentos de ondas infravermelhos são utilizados.....	38
Tabela 6: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando os comprimentos de onda visíveis são utilizados.....	38
Tabela 7: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando apenas o ultravioleta é utilizado.....	39
Tabela 8: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos infravermelhos e visíveis.....	40
Tabela 9: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos de ondas infravermelhos e ultravioletas.....	40

Tabela 10: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos de onda visíveis e o ultravioleta.....41

Tabela 11: Concentração de biomassa microalgal e volume total da amostra durante as diluições.....49

Tabela 12: Média da resposta em tensão (V) de cada patamar para cada comprimento de onda....50

1 Introdução

A utilização irrestrita dos combustíveis fósseis tem gerado sérias consequências à saúde e, principalmente, ao meio ambiente. De acordo com o Conselho Mundial da Energia (2016), o petróleo e seus derivados são a principal fonte energética mundial correspondendo a 32,9% do consumo total. Aproximadamente 63% do consumo de petróleo e seus derivados é realizado pelo setor de transportes e não há, ainda, expectativas de um substituto para essa dependência. A estimativa é que nos próximos cinco anos, apenas 5% do consumo de petróleo seja substituído por fontes alternativas.

Dentre as fontes alternativas, os biocombustíveis vêm sendo considerados como mais viáveis e sustentáveis. O biodiesel se destaca como substituto do diesel de petróleo por apresentar boas características de operação nos motores de ciclo diesel com poucas ou nenhuma mudança estrutural, redução na emissão de gases estufa e compatibilidade com a infraestrutura de distribuição e comercialização do diesel de petróleo (DU et al., 2008). No entanto, a produção atual de biodiesel enfrenta problemas que limitam seu uso, como o alto custo de produção, diretamente associado ao alto custo de matéria-prima (PARAWIRA, 2009), a competição por áreas agricultáveis e recursos hídricos em culturas usadas na alimentação (RULLI et al., 2016), desmatamento causado pela expansão da cultura de oleaginosas como soja, girassol e palma (GAO et al., 2011), e limitação do estoque de matérias-primas mais sustentáveis, como óleo de cozinha usado e gordura animal (NORAINI et al., 2014).

Visando contornar os problemas associados à produção de biodiesel, as microalgas aparecem como uma alternativa promissora para a produção de biodiesel de terceira geração. O cultivo de microalgas apresenta maior taxa de crescimento e produção de lipídeos quando comparada a culturas oleaginosas, capacidade elevada de fixação de CO₂, não competem com culturas alimentares, não necessitam de terra fértil e podem ter sua necessidade nutricional suprida por fertilizantes comumente utilizados na agricultura, rejeitos agroindustriais e esgoto doméstico (CHISTI, 2007; LEE; LAVOIE, 2013; MAITY et al., 2014). Porém, novas tecnologias e técnicas que permitam o cultivo de microalgas a custos baixos, abaixo de \$1000,00 / tonelada

de massa seca livre de cinzas, precisam ser desenvolvidas para que se atinja a viabilidade do uso de microalgas como matéria-prima na indústria de biocombustíveis (BENEMANN, 2013).

Em vista desse desafio, novos métodos visando a diminuição dos custos de cultivo por meio da automação das etapas de produção, desde a inoculação até a colheita, tem sido propostos por diversos autores e instituições. Nesse modelo automatizado de produção, o controle e monitoramento das variáveis biológicas (concentração de biomassa, contagem de células, concentração de lipídeos, dentre outras) em tempo real e em todas as etapas do cultivo são de extrema importância, visto que mudanças na dinâmica do cultivo podem ocorrer em questão de horas, demandando tomadas de decisão igualmente rápidas para garantir a eficiência e estabilidade do sistema (FAN et al., 2016).

A estimação de parâmetros biológicos por métodos clássicos padronizados, em sua maioria laboratoriais, é onerosa e demanda tempo de análise inadequado para ser empregada em conjunto a um sistema automatizado, fazendo-se necessário o uso de métodos analíticos mais ágeis, de menor custo e confiáveis. Nesse contexto, uma das técnicas mais promissoras e que vem ganhando atenção e credibilidade com o crescente desenvolvimento e uso em cultivos de microalgas é a espectrofotometria. Por meio da medição da densidade ótica, definida como a absorvância em determinados comprimentos de onda, é possível obter estimativas da concentração de biomassa seca microalgal de forma rápida, confiável, com baixo custo e fácil incorporação em sistemas automatizados (MEIRELES et al., 2002).

Atualmente, existem muitos sensores criados para a avaliação da concentração de microalgas, no entanto, seu uso se restringe à concentrações de microalgas abaixo do que é visto em cultivos dedicados ou o alto custo dos mesmos não é compatível com o objetivo de minimização do custo de produção. Assim sendo, alguns autores propõem a construção de sistemas personalizados baseados em densidade ótica para monitoramento de biomassa microalgal. Por exemplo, Sandnes et al. (2006) propuseram com sucesso o uso de LEDs infravermelhos de 880 nm e fotodiodos na estimação de biomassa seca. Marxen et al. (2005) e Nedbal et al. (2008) incorporaram sistemas de medição de densidade ótica, também utilizando LEDs infravermelhos e visíveis, respectivamente, em fotobiorreatores para estimação da concentração de clorofila e número de células. Briassoulis et al. (2010) utilizaram LEDs de 470, 518, 630 e 940 nm alinhados com fotodiodos nos comprimentos visíveis e fototransistores no

infravermelho juntamente a uma rede neural na estimação do número de células por volume em fotobiorreator. Jia, Kacira e Ogden (2015) desenvolveram um sensor de monitoramento de microalgas utilizando diodos laser de 650, 685 e 780 nm pareados com fotodiodos em um sistema microcontrolado, testado em fotobiorreator e cultivo aberto tipo raceway de microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus obliquus*, obtendo boa correlação para contagem de células e biomassa.

Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema de quantificação de biomassa de microalgas utilizando-se sensores de densidade ótica de baixo custo em seis comprimentos de onda, desde o infravermelho próximo ao ultravioleta, com objetivo de atingir pontos chave do espectro de absorbância típico da microalga *Scenedesmus obliquus*, de forma a precisar a concentração de biomassa microalgal na amostra.

1.1 Espectrofotometria e absorbância

Métodos espectrofotométricos são métodos que utilizam as propriedades da interação da radiação eletromagnética com a matéria para inferências qualitativas e quantitativas de substâncias.

A forma como a radiação eletromagnética interage com a matéria depende, em geral, da energia e do comprimento de onda da radiação. Essa relação de energia e comprimentos de onda são parâmetros intrínsecos da radiação em questão e são definidas pela Equação 1 (Boylestad e Nashelsky, 2013).

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Em que:

E é a energia associada a radiação (eV);

h é a constante de Planck (J.s);

ν é a frequência de oscilação da onda eletromagnética (Hz);

c é a velocidade da luz no vácuo ($m.s^{-1}$), e

λ é o comprimento da onda eletromagnética (m).

A Tabela 1 apresenta alguns dos principais tipos de radiação eletromagnética, e sua energia e comprimento de onda associados.

Tabela 1: Tipos de radiação eletromagnética e sua energia e comprimento de ondas associados.

Tipo de Radiação	Energia (J/mol)	Comprimento de onda (nm)
Raios Cósmicos	10^{12} a 10^{11}	10^{-5} a 10^{-4}
Raios X	10^8 a 10^7	10^{-1} a 1
Ultravioleta	6×10^6 a 3×10^5	2×10^1 a 4×10^2
Visível	3×10^5 a $1,5 \times 10^5$	4×10^2 a 8×10^2
Infravermelho	$1,5 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^2$	8×10^2 a 10^6
Micro-ondas	2×10^2 a 4×10^1	5×10^6 a 4×10^7
Ondas de Televisão	1 a 2×10^{-1}	3×10^8 a 2×10^9
Ondas de Rádio	2×10^{-2} a 4×10^{-4}	3×10^{10} a 7×10^{12}

Pela física quântica, sabe-se que os átomos possuem elétrons em camadas energéticas específicas (níveis quantizados de energia) e que os elétrons de cada camada são capazes de receber ou emitir energia também de forma quantizada para que mudem de uma camada energética para outra. As ligações químicas possuem movimentos rotacionais e vibracionais cuja energia é quantizada, em outras palavras, os elementos químicos e suas interações possuem estados eletrônicos rotacionais e vibracionais em níveis quantizados de energia, que são capazes de receber ou emitir energia em quantidades exatas e bem específicas que possuem também comprimentos de onda específicos, como mostrado na Equação 1.

Quando a radiação eletromagnética atinge a matéria, o efeito provocado depende da energia da radiação. Radiações de maior energia (raios X e radiação gama) provocam ionização molecular por retirarem elétrons da estrutura atômica, radiações de energia intermediária (infravermelho, visível e ultravioleta próximo) podem ser absorvidas pelos elétrons, que se

movem para camadas de maior nível energético (excitação eletrônica), enquanto radiações de menor energia causam apenas deformações em ligações químicas de moléculas ou outras perturbações inespecíficas, que são dissipadas na forma de calor.

Quando uma amostra desconhecida é exposta a uma radiação eletromagnética, apenas a radiação cujo comprimento de onda está em sincronia com as moléculas e átomos da amostra, será absorvida. Substâncias distintas possuem moléculas e átomos distintos e, portanto, apresentam um conjunto distinto de ondas que serão absorvidas. Esse conjunto distinto é denominado de espectro de absorção da substância. A Figura 1 mostra uma comparação entre os espectros de absorbância de dois pigmentos fotossintetizantes distintos.

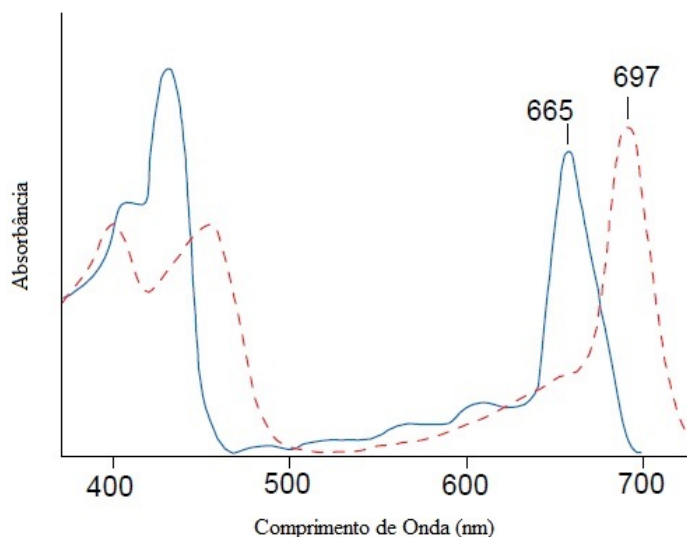


Figura 1: Comparação do espectro de absorbância da clorofila a (linha azul contínua) e da clorofila d (linha vermelha pontilhada). Adaptado de Larkum e Kühl (2005).

Define-se então como transmitância a quantidade de luz que atravessa uma substância em relação a intensidade da luz incidente. Se é o soluto dessa substância que absorve radiação nesse determinado comprimento de onda, temos que a transmitância é proporcional à concentração do soluto e ao comprimento do caminho ótico, ou seja, comprimento percorrido pela luz na amostra da substância. A transmitância pode ser expressa pela Equação 2, também conhecida como Lei de Beer-Lambert.

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot l} \quad (2)$$

Em que:

ε é o coeficiente de extinção molar da substância para um determinado comprimento de luz ($\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$);

C é a concentração do soluto ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), e

l é o comprimento do caminho ótico (m).

A transmitância é uma grandeza adimensional e usualmente expressa em porcentagem. Outra forma de se expressar a Lei de Beer-Lambert é na forma linear como mostrado na Equação 3, onde é aplicado logaritmo em ambos os lados da equação 2 de tal forma que:

$$-\log T = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (3)$$

Atribui-se a $-\log T$ a denominação de Absorbância (A) ou densidade ótica da substância em questão para um determinado comprimento de onda, como exposto na Equação 4.

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (4)$$

A Equação 4 é a forma mais usual da Lei de Beer-Lambert, onde pode-se traduzir que, para um caminho ótico fixo, a absorbância de uma substância é diretamente proporcional à concentração do soluto.

Em sistemas microbiológicos, onde não há apenas uma substância, mas sim microrganismos complexos compostos das mais variadas moléculas, é possível a utilização da espectrofotometria para determinar a concentração desses microrganismos na amostra utilizando-se dos mesmos princípios descritos. Por exemplo, Santos-Ballardo et al. (2015) estimaram a concentração de células de quatro espécies diferentes de microalgas a partir da absorbância, em determinadas frequências particulares, de cada microalga.

1.2 Optoeletrônica

A optoeletrônica é a área da eletrônica que envolve o estudo, desenvolvimento e produção de dispositivos fontes, detectores e controladores de luz. Sua aplicação varia desde dispositivos capazes de converter eletricidade em luz e vice-versa, como os LEDs e fotodiodos, até

dispositivos capazes de manipular potência, fase e polarização da luz controlados por sinais elétricos. A optoeletrônica é fundamental em áreas como a comunicação por fibra ótica e tecnologia de televisores LED e OLED, por exemplo.

1.2.1 Diodos Emissores de Luz

Diodos emissores de luz (LEDs) são dispositivos semicondutores que emitem luz durante a passagem de corrente elétrica, quando diretamente polarizados. Sob passagem de corrente elétrica, na junção P-N diretamente polarizada, ocorre recombinação dos elétrons e buracos espontaneamente, característica de materiais semicondutores que liberam fótons como ilustrado na Figura 2. Esse tipo de emissão é dita emissão espontânea de fótons.

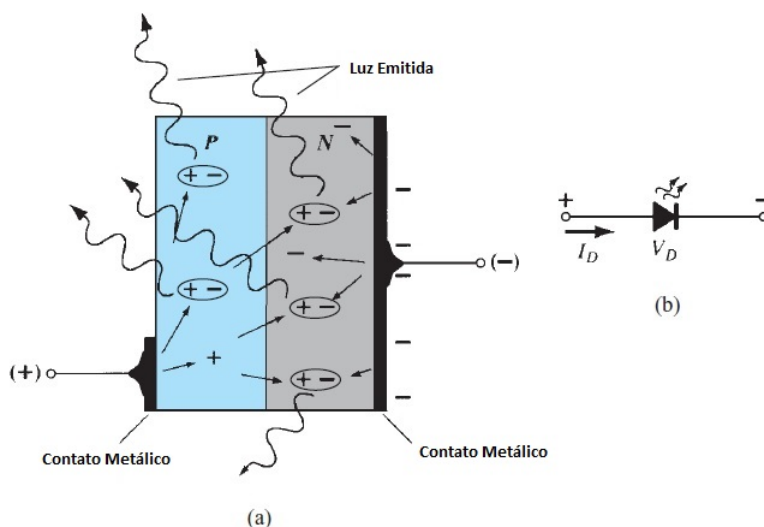


Figura 2: Diodo emissor de luz. a) Processo de geração de luz no LED por recombinação de elétrons e buracos; b) Símbolo gráfico adotado para LEDs. Traduzido de Boylestad e Nashelsky (2013).

Os LEDs são capazes de emitir luz em diferentes comprimentos de onda, dependendo do material semicondutor utilizado. Por exemplo, a luz vermelha é obtida a partir de materiais como arseneto de alumínio e gálio (AlGaAs), fosfeto de arseneto de gálio (GaAsP), fosfeto de alumínio e gálio-índio (AlGaInP) e fosforeto de galio (III) (GaP).

O valor da energia do fóton (E) é dado como a diferença no nível de energia do elétron, para que este se torne excitado e seja capaz de promover a recombinação com os buracos presentes na junção p. O arseneto de gálio (AsGa), por exemplo, possui valor de E igual a

1.43eV, o que fornece um comprimento de onda de aproximadamente 869 nm, de acordo com a Equação 1. Já a potência luminosa de um LED pode ser obtida de acordo com a Equação 5 (KASAP; SINHA, 2013), onde

$$P_{opt} = \left(\frac{I}{e} \right) \cdot \eta \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (5)$$

Em que:

P_{opt} a potência ótica de saída do LED (W);

I é a corrente que atravessa a junção do semicondutor (A);

e é a carga de um elétron (C);

η é a eficiência quântica externa, isto é, a eficiência com que a recombinação de elétrons e buracos produz fótons emitidos para o exterior da junção;

c é a velocidade da luz no vácuo ($m \cdot s^{-1}$), e

λ é o comprimento de onda (m).

A intensidade luminosa dos LEDs ocorre em função da corrente aplicada e não da tensão, visto que esta é constante e depende do material semicondutor (Equação 5). Portanto, no controle da intensidade dos leds é necessário que se faça o controle da corrente. Quanto menos variações e ruídos na corrente aplicada aos LEDs, menor as variações na intensidade luminosa.

Atualmente, o uso de LEDs vem crescendo devido à sua elevada durabilidade e vida útil, eficiência, baixo custo e versatilidade, principalmente com a inserção de lâmpadas de LED para iluminação residencial, de ruas e iluminação portátil.

1.2.2 Fotodiodos

Fotodiodos são dispositivos optoeletrônicos semicondutores, que convertem radiação eletromagnética em corrente ou tensão elétrica. Seu princípio de operação se assemelha ao de um diodo comum, ou seja, os fotodiodos são construídos a partir da junção de materiais semicondutores tipo N e tipo P. Na junção desses materiais (junção p-n) ocorre a recombinação livre de transportadores majoritários de cada material criando uma região de esgotamento

(camada de depleção) onde, conseqüentemente, ao esgotamento dos transportadores majoritários, haverá formação de duas camadas iônicas de cargas opostas. No material semiconductor tipo N ocorrerá o aparecimento de uma camada iônica positivamente carregada, devido à perda dos elétrons (transportadores majoritários dos semicondutores tipo N) na recombinação e no semiconductor tipo P uma camada negativamente carregada, devido à perda dos buracos (transportadores majoritários dos semicondutores tipo P). Como consequência do aparecimento dessas regiões de cargas opostas, ocorre a formação de um campo elétrico na camada de depleção, que funciona como barreira à passagem de novos transportadores (Figura 3). Quando transportadores minoritários entram na região de depleção, o campo elétrico criado acelera essas partículas em sentidos opostos, fazendo com que elétrons migrem para o semiconductor tipo N e os buracos para o semiconductor tipo P. A esse fluxo de transportadores minoritários se dá o nome de corrente reversa.

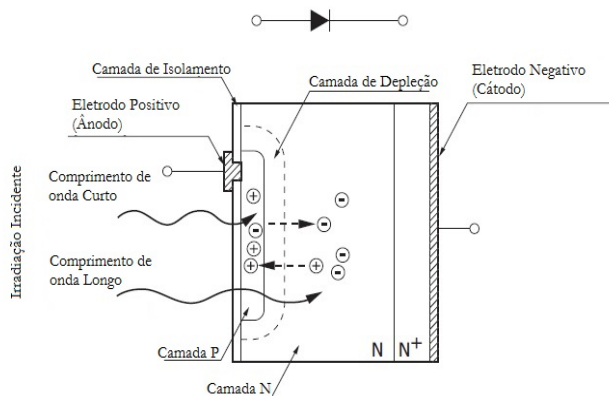


Figura 3: Corte esquemático de um fotodiodo de silício enfatizando as diferentes camadas que compõem os semicondutores. Acima do corte, símbolo gráfico adotado para o fotodiodo. Traduzido de Hamamatsu Photonics (2017).

Quando há incidência de radiação, com energia suficiente para causar excitação dos elétrons na camada de depleção, há formação de pares elétron-buraco que serão acelerados em direções opostas, assim como transportadores minoritários.

Se eletrodos são conectados aos semicondutores, estes fornecem um caminho para que o acúmulo de elétrons na camada N e buracos na camada P possam novamente se recombinar. Assim, ocorre o aparecimento de uma corrente elétrica (fotocorrente) que será proporcional à

quantidade de luz incidente. Em fotodiodos a corrente gerada é linearmente proporcional à quantidade de luz aplicada, até que se atinja a saturação do dispositivo, ou seja, a corrente gerada não irá aumentar com o aumento da incidência luminosa.

Um fotodiodo pode operar de dois modos distintos: fotocondutivo ou fotovoltaico. No modo fotocondutivo, é aplicado ao fotodiodo uma tensão reversamente polarizada (tensão positiva no cátodo e negativa no ânodo) que aumenta a camada de depleção da junção p-n, fazendo com que a separação de pares elétron-buraco causados pela incidência de radiação, seja mais eficiente. No modo fotovoltaico não há aplicação de tensão e o fotodiodo funciona como uma fonte. O modo fotocondutivo é largamente aplicado, devido à alta velocidade de resposta e linearidade. O modo fotocondutivo é preferível em aplicações de baixa frequência e de pouquíssima luz.

Para medição da resposta de um fotodiodo geralmente é feita a tradução da corrente gerada para um sinal de tensão. Para isso, um amplificador de transimpedância é ligado à saída do fotodiodo. A Figura 4 ilustra a configuração de um fotodiodo operando em modo fotocondutivo integrado a um amplificador de transimpedância. Os valores de C_f e R_f podem ser ajustados de acordo com o desempenho em frequência e ganho, respectivamente, necessários a aplicação desejada.

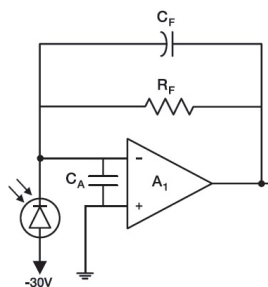


Figura 4: Fotodiodo operando em modo fotocondutivo acoplado a um amplificador de transimpedância para tradução de fotocorrente em sinal de tensão.

1.3 Microcontroladores

Microcontroladores são uma classe de dispositivos eletrônicos que integram as funcionalidades de um computador em um circuito integrado, ou seja, um microcontrolador pode desempenhar as funções de um computador sem a necessidade de nenhum ou de alguns poucos

dispositivos externos. Em sua estrutura, um microcontrolador possui uma ou mais unidades de processamento central (CPU – *central processing unit*), memória volátil (RAM – *random access memory*) e não-volátil (ROM – *read only memory*, EEPROM – *electrically erasable programmable read only memory*) e periféricos programáveis de entrada e saída (I/O) escolhidos para atender as necessidades da atividade à qual o microcontrolador atende. Como exemplo de periféricos programáveis podemos citar os conversores analógico digitais, comunicação serial USB, geradores de onda PWM e vários outros.

A Figura 5 mostra o diagrama de blocos do microcontrolador ATmega328P, no qual é possível ver as diversas funcionalidades de um computador integrado.

Uma grande vantagem dos microcontroladores é sua característica reprogramável. Por meio de compiladores, um programador pode escrever códigos para as instruções desejadas a realização de tarefas pelo microcontrolador, geralmente utilizando linguagens de alto nível. Isso permite a criação de um conjunto de instruções específicas para a atividade em questão bem como sua fácil adaptação e modificação, além de permitir que um mesmo chip seja usado para atividades diferentes, bastando apenas que um novo código seja carregado no microcontrolador. A maioria dos fabricantes de microcontroladores disponibilizam *softwares* próprios para criação, compilação e implementação de código para o microcontrolador.

Uma das principais funções dos microcontroladores é servir como ponte entre grandezas analógicas (contínuas) e digitais (discretizadas). Essa tarefa é muito empregada em sistemas sensores e controladores e, para tal, faz-se necessário o uso de conversores analógico-digitais (ADC). Esses periféricos são responsáveis por discretizar e digitalizar um valor contínuo, como por exemplo, a tensão elétrica de saída de um sensor de luminosidade. A resolução de um ADC dita em quantos níveis discretos um sinal analógico pode ser percebido, ou seja, um ADC de 10 bits é capaz de perceber $2^{10} = 1024$ níveis digitais de um sinal analógico. Se o sinal analógico varia entre 0 a 5 V, um ADC de 10bits é capaz de perceber variações de, aproximadamente, 0.005 V. Para a maioria das aplicações, resoluções de 8 a 10 bits são suficientemente precisas e robustas a ruído e, por isso, comumente integradas em microcontroladores.

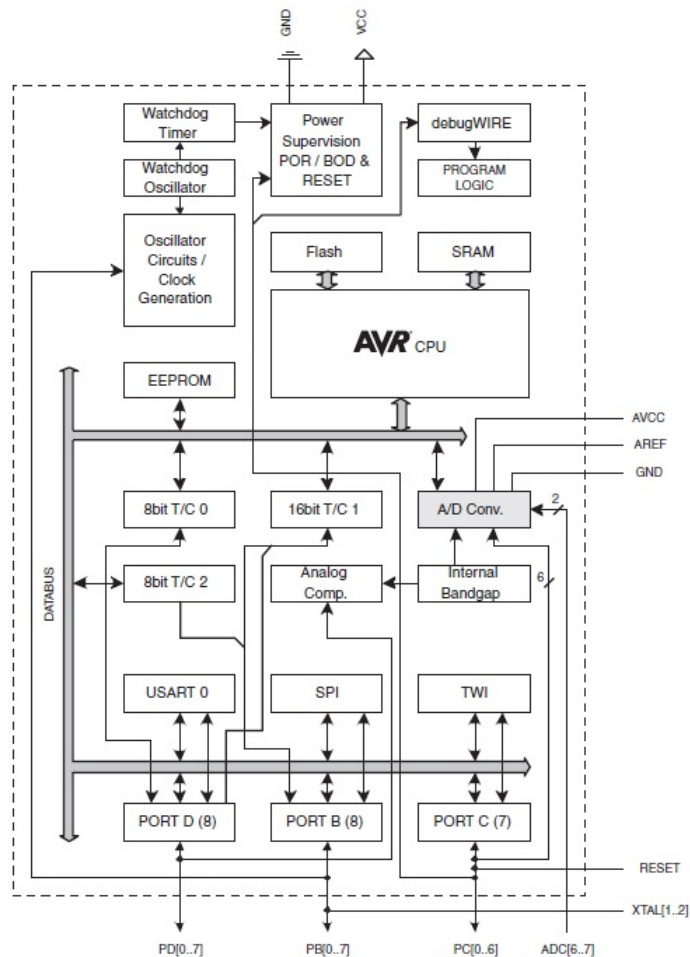


Figura 5: Diagrama de blocos do microcontrolador Atmel328P. Fonte: ATmega328P Datasheet.

Geralmente, os microcontroladores são empregados em sistemas embarcados e sistemas automatizados, onde são responsáveis pelo controle e monitoramento do processo, em parte ou para um todo. Esses sistemas apresentam vantagens significativas em relação a computadores normais por serem menores, baratos, robustos, flexíveis quanto à aplicação, facilmente expansíveis e apresentarem baixo consumo de energia. O uso de microcontroladores vem ganhando mais espaço devido a redução dos custos de produção e desenvolvimento de novas tecnologias, que permitem atividades mais complexas e que demandam maior poder computacional, como sistemas de supervisão, sistemas de controle em automóveis híbridos e elétricos e equipamentos de diagnóstico médico.

1.4 Redes Neurais Artificiais

Redes neurais artificiais (RNA) são modelos computacionais de inteligência artificial inspirados no funcionamento e estrutura do cérebro humano. RNAs, assim como o cérebro, são compostas de unidades elementares denominadas neurônios e agrupados em camadas. De forma análoga ao neurônio biológico, um neurônio artificial é composto por três partes: os dendritos são análogos aos pesos das entradas, relacionando neurônios de camadas diferentes de forma excitatória ($w > 1$), neutra ($w = 1$) ou inibitória ($w < 1$); o corpo celular é modelado como uma função somadora de todas as entradas, multiplicadas pelos respectivos pesos; o axônio é a função ativadora do neurônio artificial, que resulta a amplitude da saída do neurônio, geralmente de 0 a 1 ou -1 a 1, e a transmite para os neurônios das próximas camadas. A Figura 6 mostra um esquema representativo do neurônio artificial.

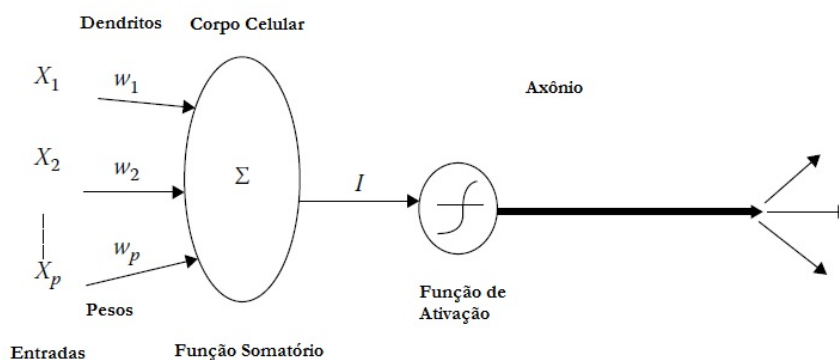


Figura 6: Esquema representativo do neurônio artificial.

O neurônio artificial também pode ser descrito matematicamente. Considerando um conjunto de entradas $X = (x_1, x_2, x_3, x_4 \dots x_n)$, um conjunto de pesos $W = (w_1, w_2, w_3, w_4 \dots w_n)$ e uma função de ativação genérica f , tem-se que a saída do neurônio artificial (Y) será dada pela Equação 6 (HEATON, 2015).

$$Y = f\left(\sum\left(\left(x_1 \cdot w_1 + x_2 \cdot w_2 + x_3 \cdot w_3 \dots + x_n \cdot w_n\right)\right)\right) \quad (6)$$

As RNAs podem ser classificadas de acordo com sua topologia, ou seja, sua arquitetura e complexidade. Redes de camada simples possuem apenas uma camada de neurônios entre as entradas e saída. As redes multicamadas possuem duas ou mais camadas de neurônios entre as

entradas e saída, também chamadas de camadas ocultas. Redes *feedforward* só possuem neurônios se comunicando com os neurônios das camadas posteriores da rede e redes *feedback* podem possuir neurônios se comunicando com camadas posteriores e anteriores. A Figura 7 mostra a configuração de redes neurais *feedforward* de camada simples e multicamada (THEODORIDIS; KOUTROUMBAS, 2009).

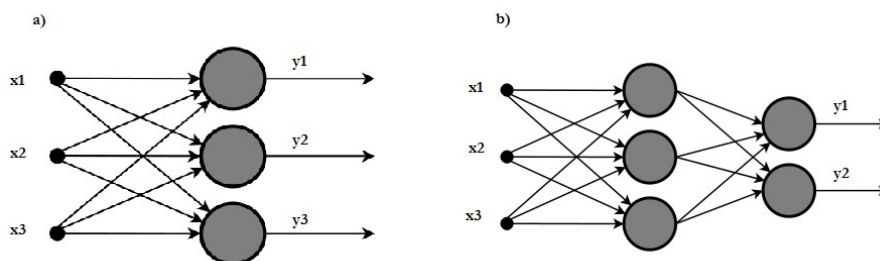


Figura 7: a) Rede neural *feedforward* de camada simples com 3 entradas e 3 saídas. b) Rede neural *feedforward* de múltiplas camadas com 3 entradas, 2 saídas e 3 neurônios na camada intermediária.

As RNAs de camada única apresentam bom desempenho na resolução de problemas lineares, no entanto, são inadequadas para problemas não-lineares, o que limita seu uso. Desta forma, várias outras ferramentas clássicas mais eficientes podem ser empregadas para resolução de problemas lineares. Já as RNAs multicamadas, apesar de mais complexas, apresentam bons resultados para problemas não lineares e com grande número de variáveis de entrada, sendo assim, as mais utilizadas.

No desenvolvimento de uma RNA não há uma metodologia padrão a se seguir, apenas linhas gerais que podem ou não ser seguidas dependendo da complexidade do problema. O processo de desenvolvimento pode ser dividido em 2 fases: treinamento e teste. No treinamento da rede, definem-se parâmetros, como o número de neurônios por camada, função de ativação dos neurônios, número de camadas ocultas, técnicas de pré e pós-processamento de dados e o algoritmo de treinamento, com seus critérios de avaliação de desempenho e parada. Todos esses parâmetros são definidos de forma empírica, levando ao desenvolvimento de várias redes com

configurações diferentes na procura por uma que melhor se adeque à resolução do problema. Dentre os vários algoritmos de treinamento, os mais utilizados são o algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM), o algoritmo de regulação Bayesiana (RB) e o algoritmo do método de gradiente conjugado (MGC). Esses algoritmos são de aprendizado supervisionado de propagação do erro, ou seja, fazem a atualização dos pesos de entrada dos neurônios a partir do erro existente, entre o conjunto de respostas desejadas e o de respostas obtidas com os pesos atuais. Heaton (2015) expõe de maneira simplificada o algoritmo genérico de redes *feedforward*:

1. Por meio do uso de uma matriz de pesos iniciais aleatórios, calcula-se o erro quadrático médio.
2. Atualiza-se os pesos das entradas, baseado no erro quadrático médio e por uma equação particular, para o cálculo de novos pesos de cada algoritmo.
3. Com os novos pesos, avalia-se o erro quadrático médio novamente.
4. Se o erro aumentar, volta-se aos valores de pesos anteriores e uma nova mudança nos pesos é calculada, aumentando-se o fator de aprendizado. Se o erro diminuir, a mudança nos pesos é mantida e o fator de aprendizado diminuído.
5. Repete-se os passos 2 e 3, até que um erro quadrático médio mínimo seja atingido.

Para aumentar a generalização do algoritmo de LM e do algoritmo MGC, um teste de validação é efetuado. Esse teste é um critério de parada do algoritmo que procura evitar o *over-fitting* da rede neural, ou seja, um treinamento excessivo da rede que pode prejudicar a sua capacidade de generalização. Assim, o conjunto de dados é dividido em 3 partes: um conjunto de treinamento que será usado como entrada para algoritmo de treinamento, visando encontrar os pesos das entradas; um conjunto de validação, que será usado como critério de parada do treinamento, e um conjunto de teste, para avaliação do desempenho da rede frente a novos dados. Ao conjunto de validação é aplicado os pesos encontrados no treinamento a cada iteração e as saídas calculadas e comparadas com as desejadas, se o erro aumenta consecutivamente após um número determinado de interações, o processo de treinamento é parado. Na fase de teste, a rede treinada é apresentada a um conjunto de dados inéditos para avaliar o desempenho obtido. Quanto menor o erro obtido nessa fase, melhor será a rede neural.

1.5 Objetivos

Este trabalho teve por objetivo a quantificação de biomassa microalgal em cultivos de *Scenedesmus obliquus* por densidade ótica, realizada com uso de um conjunto de sensores de baixo custo em um sistema microcontrolado embarcado.

Os objetivos específicos foram:

- Construir e avaliar o desempenho de um sistema de medição com sensores quanto ao ruído e intervalo de medição.
- Avaliar quais comprimentos ou conjunto de comprimentos de onda apresentam, em conjunto com a rede neural treinada, o melhor desempenho para medição da concentração de biomassa.
- Definir os melhores parâmetros para o desenvolvimento da rede neural.

Comparar a resposta do sensor com outros métodos usados na quantificação de biomassa

2 *Materiais e Métodos*

2.1 *Sistema de medição por densidade ótica*

Os sensores utilizados no sistema são capazes de medir seis comprimentos distintos de luz, cada um objetivando picos e vales absorptivos diferentes da amostra da microalga *Scenedesmus obliquus*. Assim, foram selecionados os comprimentos de 850 e 950 nm (infravermelho) como valores relacionados à turbidez da amostra, uma vez que a coloração da microalga não interfere nesses valores. Os comprimentos de 625 nm (vermelho), 525 nm (verde) e 470 nm (azul) foram escolhidos por estarem relacionados à absorbância da clorofila e de outros pigmentos presentes na célula. Finalmente, o comprimento de 400 nm (ultravioleta) foi escolhido por apresentar o maior pico absorptivo encontrado para a amostra de microalgas, estando

comumente relacionado à absorção por aminoácidos. A figura 13 mostra o espectro de absorção de uma amostra de microalgas onde é possível notar esses picos e vales absorptivos mencionados.

2.1.1 Componentes e funcionamento ótico

Foram utilizados quatro LEDs para obtenção dos comprimentos de onda desejados: 1 LED 5 mm infravermelho de 950 nm (YSL-R531FR1C-F1, China Young Sun LED Technology), 1 LED 5 mm infravermelho de 850 nm (YSL-R531FR2C-F1, China Young Sun LED Technology), 1 LED 5 mm RGB de anodo comum (OSTAPA5B3AA, OptoSupply) para os comprimentos de cor vermelha (625 nm), verde (525 nm) e azul (470 nm) e 1 LED 5 mm ultravioleta 400 nm (YSL-R547P4C-E3, China Young Sun LED Technology). Os LEDs são representados pelo número 1 na Figura 8.

Como elementos sensores, foram utilizados dois fotodiodos monolíticos com amplificadores de transimpedância *on-chip* (OPT101, Texas Instruments), com intervalo de detecção entre 280 a 1100 nm, operando com tensão de alimentação de 5V_{dc}. Os fotodiodos são mostrados nos números 3 e 4 na Figura 8.

As medidas de densidade foram efetuadas em fluxo, ou seja, a amostra é bombeada do cultivo e escoada por um tubo de vidro transparente de borossilicato de espessura de aproximadamente 0,9 mm (número 2, Figura 8). O tubo possui 17 mm de diâmetro interno, sendo este diâmetro o comprimento do caminho ótico onde ocorre a absorbância pela amostra de alga. Um sensor de luminosidade foi colocado oposto aos LEDs, para captar a intensidade luminosa que passa pela amostra (fotodiodo de absorbância, número 3 na Figura 8). O outro foi colocado em paralelo aos LEDs para captar a intensidade luminosa de saída que é refletida por uma lâmina de borossilicato (fotodiodo de referência, número 4 na Figura 8).

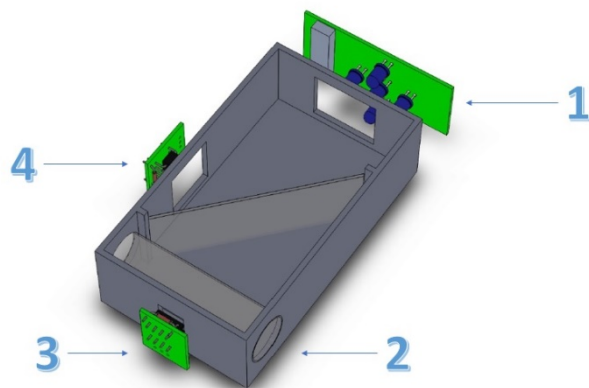


Figura 8: Ilustração da construção interna do sistema.

2.1.2 Componentes Estruturais

A parte estrutural, onde são fixadas as placas, tubos e laminas, foi personalizada no programa Rhinoceros 4.0 e confeccionada em impressora 3D Cube 3D (3D Systems, Estados Unidos da América). Por se tratar de um protótipo, as partes necessárias para a fixação, como suportes para parafusos e canaletas, foram excluídas e a fixação entre os elementos foi feita por cola e fita adesiva.

As placas de circuito impresso (PCBs) foram desenhadas no software Proteus Design Suite 8.3, e confeccionadas por processo de termotransferência com posterior corrosão química por solução de perclorato de ferro.

2.1.3 Controle, aquisição e processamento de dados

O controle, a aquisição e o processamento de dados do sensor foram feitos pelo microcontrolador ATmega328P, na placa de desenvolvimento Arduino UNO r3.

O controle de intensidade luminosa dos LEDs foi feito por PWM, gerado pelo microcontrolador por meio do circuito mostrado na Figura 9. Esse circuito permite o controle da intensidade luminosa pelo controle da corrente de alimentação do LED, feito pelo chaveamento do transistor em resposta ao PWM. A filtragem é aplicada junto ao circuito, por um filtro passa-baixa com frequência de corte de 7,2 Hz, para atenuar o *ripple* da corrente durante o chaveamento.

A aquisição de dados dos fotodiodos foi feita pelo conversor analógico digital (ADC) de 10 bit de resolução do microcontrolador. Entre a saída do fotodiodo e o ADC aplicou-se um filtro eletrônico passa-baixa com frequência de corte de 7,2 Hz para a atenuação de ruídos.

Cada comprimento de onda foi ativado individualmente, garantindo que a amostra de microalgas estivesse sujeita a apenas uma faixa do espectro luminoso por vez. Após o acionamento do LED, correspondente ao comprimento de onda desejado, foi feita uma pausa de 500 ms para que o regime estacionário da corrente fosse atingido com segurança onde, então, foram feitas as medições da saída de cada fotodiodo.

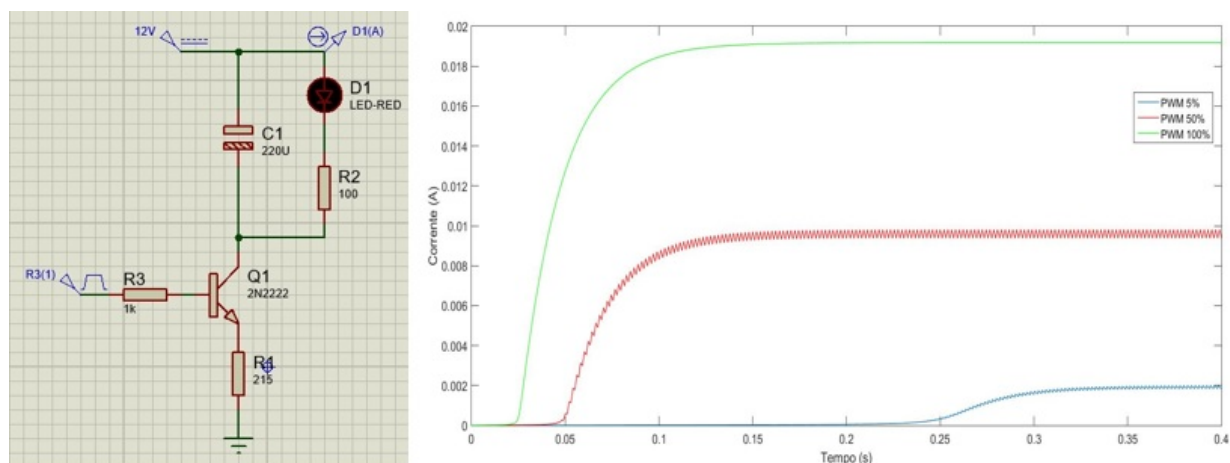


Figura 9: Circuito de controle de intensidade luminosa do LED por controle de corrente e análise do comportamento da corrente em função do tempo, quando aplicado PWM a 5%, 50 % e 100%.

Para cada comprimento de onda foram feitas 100 medições da saída de cada fotodiodo (absorbância e referência). A média das medições foi registrada como a resposta dos fotodiodos ao dado comprimento de onda selecionado. A adoção da média das medições como resposta dos fotodiodos foi feita para minimizar ruídos e variações decorrentes da movimentação da suspensão de microalgas pelo tubo. Esse valor de resposta foi utilizado como entrada para uma rede neural artificial previamente treinada, cuja resposta foi o valor estimado de biomassa microalgal da amostra em questão.

Os dados de saída do sensor foram gravados em um computador que se comunica com o microcontrolador através de uma porta USB, pelo software *CoolTerm*.

2.2 Rede Neural e Banco de Dados

Para a tradução da resposta dos fotodiodos para valores de biomassa da amostra, foi escolhido a utilização de rede neural, uma vez que a relação entre absorvância e concentração de biomassa microalgal apresentaram uma relação não linear e a resposta dos fotodiodos apresentaram um ruído significativo, proveniente do escoamento contínuo de material pelo tubo. Em configurações experimentais anteriores ao protótipo atual, observou-se que as redes neurais apresentavam desempenho melhor que métodos clássicos, tais como a regressão não-linear.

O banco de dados utilizado no treinamento da rede neural foi elaborado por diluições sucessivas de amostra de microalga *Scenedesmus obliquus*, cuja concentração de biomassa e absorvância foram previamente medidas por métodos gravimétrico e espectrofotométrico, respectivamente, como feito por Adams et al. (2013).

No presente trabalho, o banco de dados foi construído a partir de uma amostra concentrada de microalgas, totalizando um volume inicial de 300 mL. A partir da amostra inicial, foram feitas diluições sucessivas por adição de água deionizada com volume conhecido e, a cada diluição, a absorvância da amostra foi novamente medida conforme o método descrito. Desta forma, o banco de dados foi composto pelos valores de resposta do sensor, relacionados com o valor de concentração de biomassa, calculados a partir do método gravimétrico, e dos valores de absorvância e concentração de biomassa, medidos em espectrofotômetro de bancada (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos da América).

O programa MatLab 2015 foi utilizado para a criação e treinamento das redes neurais a serem avaliadas. O treinamento foi feito sem aplicação de técnicas de pré-processamento dos dados de entrada. O conjunto de dados foi aleatorizado e dividido de tal forma que, 60 % dos dados foram utilizados para treinamento da rede, 20 % para teste de validação e 20 % para conjunto de teste nos algoritmos que possuem teste de validação como critério de parada (LM e MGC). No algoritmo de RB, a divisão dos dados foi feita de forma randômica tal que, 70 % dos dados foram usados para treinamento e 30 % para conjunto de teste. Os critérios de parada foram o número máximo de épocas como 1000, quadrático médio inferior à 0.00001 ou se o teste de validação excedesse 10 incrementos, após 1 decréscimo de performance nos algoritmos que o usam.

Para avaliar o conjunto de parâmetros que apresenta a melhor RNA, variou-se as entradas da rede em sete conjuntos distintos de comprimentos de onda: apenas os LEDs infravermelhos, apenas o LED ultravioleta, apenas o LED RGB, os LEDs infravermelhos e o ultravioleta, os LEDs infravermelhos e o RGB, os LED ultravioleta e o RGB e, por fim, todos os LEDs. Além disso, variou-se o número de neurônios em cada configuração, sendo o número mínimo de neurônios igual a metade do valor de entradas da rede e, no máximo, igual a 2.5 vezes o número de entradas. Para cada configuração, foram treinadas 10 redes neurais e mantida a que obteve o melhor desempenho na fase de teste.

2.1.5 Condições do Cultivo

Os cultivos foram feitos em sistema tipo batelada, utilizando uma cepa da microalga *Scenedesmus obliquus* (BR003), pertencentes à Coleção de Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do DEA/UFV, que são mantidas em câmara B.O.D (LS-550FT-2, Logen Scientific, Brasil) com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 8:16h (luz:escuro).

O cultivo foi feito em galão de vidro borosilicato de 10 L, com volume útil de 6 L, em meio de cultura L4-m (Tabela 2) formulado a base de fertilizantes, preparados com água ozonizada oriunda da rede pública de abastecimento. A agitação do cultivo foi mantida utilizando-se uma bomba de ar com injeção de ar atmosférico, com vazão de 0,2 vvm (volume de ar por volume de cultivo por minuto) com fotoperíodo de 12:12 h e irradiância média de $800\text{ }\mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, proveniente de sistema de lâmpadas LED (Luminator 2x, Lush Lighting, Estados Unidos da América). Dentre as condições de cultivo, a temperatura foi mantida a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH foi mantido entre 7,0 e 7,5 pela adição de soluções de HCl ou NaOH 2 M. O carbono foi fornecido diariamente na forma de bicarbonato de sódio com concentração de $0,7\text{ g L}^{-1}$.

Tabela 2: meio L4-modificado a base de fertilizantes agrícola.

Fertilizantes	Teor	mg L ⁻¹
Uréia	45% N	180,0
Cloreto de Potássio	60% K	173,9
Super Fosfato Simples	16% P	114,3
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	9% Mg	71,0
Sulfato de Ferro Monohidratado	30% Fe	13,3

2.1.6 Métodos de Quantificação

O método gravimétrico consiste na pesagem da massa seca de um pequeno volume conhecido do cultivo. Uma amostra de 15 mL do cultivo de microalgas foi coletada e filtrada em membrana com porosidade de 0,22 μm (Milipore Indústria e Comércio Ltda., GVWP04700, Brasil) previamente seca em estufa a 60 °C por 24 h. As membranas com o filtrado permaneceram na estufa, a 60 °C, até atingirem massa constante. Em seguida, foram retiradas e, imediatamente, colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente. Após esse período, as membranas com o filtrado foram pesadas e a massa seca determinada, descontando-se o valor da massa da membrana. A pesagem foi realizada, utilizando-se uma balança de precisão (modelo AY220, Shimadzu Corporation, Japão). Esse método foi aplicado em triplicata e o valor médio foi adotada como valor representativo.

O método espectrofotométrico, conforme descrito em Adams et al. (2013), consiste na inferência da concentração, utilizando a absorbância em 750 nm, da amostra multiplicada por um fator de conversão próprio do cultivo. O fator de conversão é obtido aplicando o método gravimétrico previamente descrito. Utilizou-se o espectrofotômetro Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Esse método também foi realizado em triplicata e a média adotada como valor representativo.

3 Resultados e Discussão

A resposta em tensão, da saída do fotodiodo de absorbância durante as diluições, pode ser observada na Figura 10. Cada degrau no gráfico indica uma diluição feita na amostra de microalgas. No patamar inicial, a amostra apresenta em sua maior concentração (1,4133 g L⁻¹), e o patamar final mostra a resposta à água deionizada, ou seja, absorbância próxima de zero. A concentração e o volume total da amostra durante as 23 diluições são mostrados na Tabela 11 no Apêndice A. Na Tabela 3 é mostrado, para cada comprimento de onda, qual diluição apresentou o maior coeficiente de variação na resposta do sensor e a média dos coeficientes de variação de todos as diluições. Com exceção do comprimento de onda azul, a resposta do sensor aos diferentes comprimentos de onda não apresenta coeficiente de variação expressivo.

É interessante salientar a resposta ao comprimento ultravioleta que apresenta, de fato, a maior sensibilidade à variação na concentração de biomassa. Este resultado já era esperado, uma vez que esse é o comprimento de onda apontado como o de maior absorbância pela amostra de microalgas em espectrofotômetro, como mostrado no Apêndice A. A sensibilidade à variação da concentração pode ser evidenciada pelo tamanho do degrau, entre uma diluição e outra. Isso é mostrado na Tabela 12 no Apêndice A onde a média da resposta de cada patamar é exposta. Já a imunidade a ruído é evidenciada pela linearidade de cada patamar e pode ser comparada na Tabela 3.

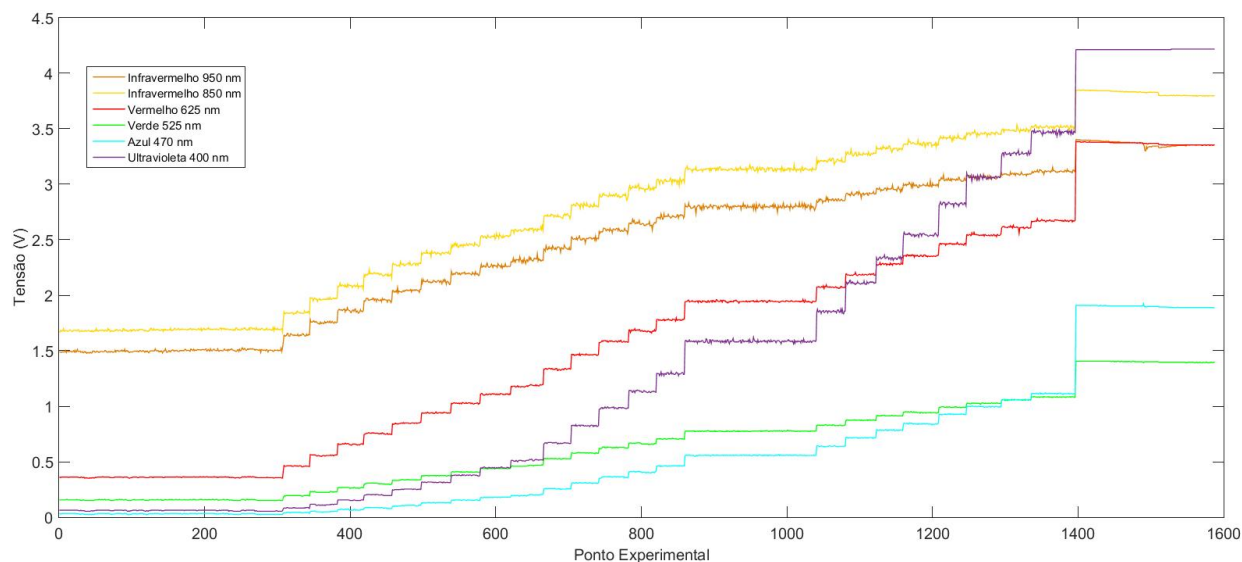


Figura 10: Resposta em tensão do fotodiodo de absorbância durante o ensaio de diluições.

O comprimento de onda azul não apresentou resposta similar ao ultravioleta, apesar de também ser um pico absorptivo. Quanto a isso, sugere-se que a intensidade do LED não foi satisfatória, o que pode ser comprovado pelo seu baixo patamar final na Figura 10 em relação aos comprimentos infravermelhos e ultravioleta. A Figura 11 mostra a saída normalizada para o azul e ultravioleta, onde é possível ver que ambas poderiam ter resposta muito semelhante, caso a intensidade luminosa do LED RGB azul fosse equivalente à do LED ultravioleta.

Tabela 3: Valores dos maiores coeficientes de variação de cada comprimento de onda e a média dos coeficientes de variação.

Comprimento de Onda	Máximo Coeficiente de Variação	Patamar do Máximo Coeficiente de Variação	Média dos Coeficientes de Variação
Infravermelho (950 nm)	1,94%	2	0,53%
Infravermelho (850 nm)	2,03%	2	0,46%
Vermelho (625 nm)	5,56%	2	0,6%
Verde (525 nm)	5,29%	2	0,81%
Azul (470 nm)	13,10%	1	2,32%
UV (400 nm)	8,07%	2	1,30%

O comprimento de onda vermelho e verde mostraram-se sensíveis às diluições e apresentaram baixo ruído, o que pode ser verificado pela presença de pequenos patamares distintos em cada passo da diluição na Figura 10. No entanto, é sensato dizer que a intensidade luminosa do LED verde não é satisfatória, assim como argumentado para o comprimento de onda azul, o que também é evidenciado pela baixa posição do patamar final (a partir do ponto experimental 1400) em relação aos patamares infravermelhos e ultravioleta. Assim sendo, uma intensidade maior pode garantir que a resposta a esse comprimento de onda seja mais imune a ruídos e apresente um comportamento semelhante ao ultravioleta, com patamares lineares e degraus distintos.

Os comprimentos de onda no infravermelho se mostraram adequados para as maiores concentrações de biomassa. A resposta do sensor a esses comprimentos no primeiro patamar da Figura 10 foi em torno de 1,5 V (evidenciando passagem de luz pela amostra) em contraste com os demais comprimentos de onda cuja resposta se aproximava de 0 V (evidenciando que quase não há passagem de luz). Com isso pode-se dizer que, para os comprimentos de onda infravermelhos, é possível analisar amostras de concentração superior as analisadas no primeiro patamar ($1,4133 \text{ g.L}^{-1}$) visto que a resposta do sensor ainda pode variar 1,5 V. Também, nota-se que em concentrações baixas a resposta a esse comprimento de onda apresenta baixa sensibilidade e ruído elevado, o que pode comprometer o seu uso na medição de biomassa. Isso é evidenciado pela falta de patamares distintos entre diluições sucessivas a partir do ponto 1200.

Para definição da rede neural artificial (RNA) que melhor pudesse estimar a biomassa de microalgas, escolheu-se sete configurações de entrada diferentes, como descrito na seção de material e métodos. Na Tabela 4 são apresentados os resultados do desempenho das melhores RNAs, feitas para distintos algoritmos de treinamento e número de neurônios na camada oculta (NNCO), quando todos os comprimentos de ondas são utilizados como entradas. Da mesma forma, as Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mostram os resultados obtidos das demais configurações adotadas.

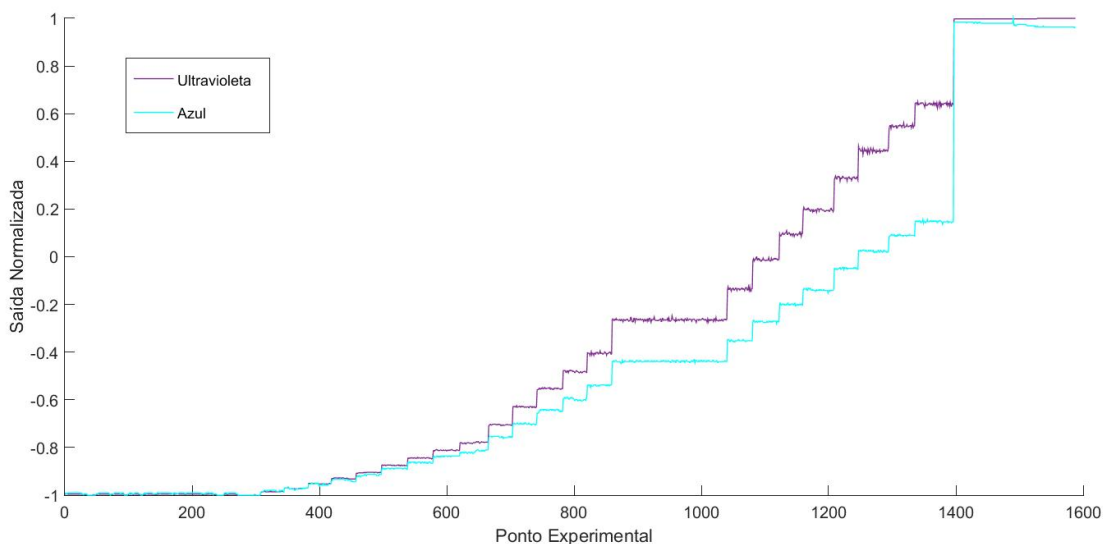


Figura 11: Saídas normalizadas do azul e ultravioleta.

Pode-se notar pelos resultados obtidos para a configuração 1 (Tabela 4) que os algoritmos LM e RB apresentam os melhores resultados para um número intermediário de neurônios, como esperado. O erro quadrático médio das redes encontra-se dentro do satisfatório (menor que 10^{-4}) ou marginalmente aceitável (entre 10^{-4} e 3×10^{-4}), uma vez que estão abaixo ou próximos da incerteza encontrada na metodologia de medição por gravimetria, cuja precisão está condicionada à precisão da balança utilizada.

O algoritmo MGC apresenta resultados piores quando comparado aos demais algoritmos, porém, o treinamento da rede é consideravelmente mais rápido (resultado não mostrado). Ainda assim, visto que a velocidade e simplicidade de treinamento da rede não é um fator importante nesse trabalho, as redes MGC apresentam desempenho inaceitável (maior que 3×10^{-4}) para essa

configuração de entradas. De fato, como é possível ver nas demais tabelas de resultados dos treinamentos das redes, o algoritmo MGC, apesar de mais rápido no treinamento em qualquer configuração, não apresenta um desempenho satisfatório nem marginalmente aceitável. Assim sendo, este não será mais discutido.

Na configuração 2, utilizou-se apenas os LEDs infravermelhos e na Tabela 5 são mostrados os resultados obtidos das redes treinadas. Pode-se afirmar que os desempenhos das redes foram marginalmente aceitáveis para os algoritmos LM e RB, para todos os NNCO.

Na configuração 3 utilizou-se apenas o LED RGB e seus três comprimentos de onda, como entrada. Na Tabela 6 é possível observar que os resultados das redes treinadas pelo algoritmo LM e RB foram aceitáveis ou marginalmente aceitáveis para todos NNCO, ainda que, como discutido, as intensidades do verde e azul tenham sido insatisfatórias. É importante mencionar que as redes RB com mais de 3 NNCO obtiveram resultados melhores que os observados quando foram utilizados todos os comprimentos de onda como entrada.

Tabela 4: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando todos os comprimentos de onda são utilizados.

Configuração 1: Infravermelhos (950 e 850 nm)+RGB(625, 525 e 470 nm)+UV(400 nm)			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
6	$9,98 \times 10^{-5}$	$9 \times 86. 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-3}$
12	$9,33 \times 10^{-5}$	$9 \times 10. 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-3}$
18	$9,51 \times 10^{-5}$	$9 \times 65. 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-3}$
24	$1,32 \times 10^{-4}$	$1 \times 61. 10^{-4}$	$5,53 \times 10^{-4}$
30	$2,53 \times 10^{-4}$	$1 \times 40. 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-3}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Tabela 5: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando apenas os comprimentos de ondas infravermelhos são utilizados.

Configuração 2: Infravermelhos (950 e 850 nm)			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
2	$1,32 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$	$4,90 \times 10^{-3}$
4	$1,39 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-4}$	$5,60 \times 10^{-3}$
6	$1,29 \times 10^{-4}$	$1,03 \times 10^{-4}$	$4,20 \times 10^{-3}$
8	$1,19 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-3}$
10	$1,37 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-3}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Tabela 6: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando os comprimentos de onda visíveis são utilizados.

Configuração 3: RGB (625, 525, 470 nm)			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
3	$1,16 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$
6	$1,15 \times 10^{-4}$	$8,74 \times 10^{-5}$	$4,40 \times 10^{-3}$
9	$8,62 \times 10^{-5}$	$8,26 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-3}$
12	$9,43 \times 10^{-5}$	$8,42 \times 10^{-5}$	$9,86 \times 10^{-4}$
15	$8,44 \times 10^{-5}$	$8,54 \times 10^{-5}$	$5,21 \times 10^{-4}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Na configuração 4 utilizou-se apenas o LED ultravioleta e na Tabela 7 é possível observar que o algoritmo LM obteve resultado insatisfatório apenas quando houve 1 NNCO, e o algoritmo RB teve desempenho satisfatório ou marginalmente aceitável com todos os NNCO.

Na configuração 5 utilizou-se os LEDs infravermelhos e o RGB, no intuito de aliar a boa resposta dos infravermelhos em altas concentrações e a boa resposta dos comprimentos de onda visíveis, quando em baixas concentrações. De fato, as performances dos algoritmos LM e RB

foram satisfatórias ou marginalmente aceitáveis para todos os NNCO como mostrado na Tabela 8. O algoritmo RB, de 5 a 20 NNCO, obtiveram resultados melhores ou equiparáveis aos melhores resultados das redes da configuração 1 (todos os LEDs).

Tabela 7: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando apenas o ultravioleta é utilizado.

Configuração 4: UV (400 nm)			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
1	$9,10 \times 10^{-3}$	$9,30 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$
2	$6,66 \times 10^{-4}$	$6,75 \times 10^{-4}$	$4,80 \times 10^{-3}$
3	$2,47 \times 10^{-4}$	$2,74 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-3}$
4	$6,31 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-3}$
5	$2,15 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$1,30 \times 10^{-3}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Na configuração 6 utilizou-se os LEDs infravermelhos e o ultravioleta, no intuito de aliar as respostas do pico e dos vales absorptivos de absorbância. Os resultados são mostrados na Tabela 9, onde é possível observar que os algoritmos LM e RB são satisfatórios ou marginalmente aceitáveis para todos os NNCO. Destaca-se que a rede com seis neurônios na camada oculta treinada pelo algoritmo RB apresentou o melhor desempenho entre todas as redes treinadas neste trabalho.

Na configuração 7 utilizou-se o LED RGB e o ultravioleta, com intuito de averiguar se a eliminação dos LEDs infravermelhos ofereceria alguma vantagem. Como pode ser visto na Tabela 10, os resultados obtidos para os algoritmos LM e RB foram satisfatórios.

Tabela 8: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos infravermelhos e visíveis.

Configuração 5: Infravermelho + RGB

NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
5	$1,0 \times 10^{-4}$	$8,72 \times 10^{-5}$	$2,20 \times 10^{-3}$
10	$9,16 \times 10^{-5}$	$8,51 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-3}$
15	$9,97 \times 10^{-5}$	$8,95 \times 10^{-5}$	$6,51 \times 10^{-4}$
20	$1,00 \times 10^{-4}$	$9,79 \times 10^{-5}$	$1,10 \times 10^{-3}$
25	$1,09 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-3}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Tabela 9: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos de ondas infravermelhos e ultravioletas.

Configuração 6: Infravermelho + UV			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
3	$1,17 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-3}$
6	$1,53 \times 10^{-4}$	$7,45 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-3}$
9	$1,00 \times 10^{-4}$	$8,18 \times 10^{-5}$	$1,10 \times 10^{-3}$
12	$9,68 \times 10^{-5}$	$9,31 \times 10^{-5}$	$7,84 \times 10^{-4}$
15	$1,13 \times 10^{-4}$	$8,94 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-3}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

Tabela 10: Erros quadráticos médios (EQM) obtidos na fase de teste quando se utiliza os comprimentos de onda visíveis e o ultravioleta.

Configuração 7: RGB + UV			
NNCO	EQM LM	EQM RB	EQM MGC
4	$1,18 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-3}$
8	$9,22 \times 10^{-5}$	$7,93 \times 10^{-5}$	$1,80 \times 10^{-3}$
12	$9,23 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-4}$	$9,88 \times 10^{-4}$
16	$9,33 \times 10^{-5}$	$8,67 \times 10^{-5}$	$6,62 \times 10^{-4}$
20	$9,02 \times 10^{-5}$	$9,42 \times 10^{-5}$	$5,27 \times 10^{-4}$

NNCO: Número de neurônios de camada oculta; LM: Levenberg-Marquardt; RB: Regularização Bayesiana; MGC: Método do Gradiente Conjugado.

A Equação 7 que define a relação entre biomassa e absorbância, medida no espectrofotômetro de bancada a 750 nm, foi definida por regressão para o mesmo cultivo utilizado nos ensaios com o sistema de quantificação de biomassa proposto.

$$Y = 0,643 \cdot x^2 + 0,8849 \cdot x - 0,001558 \quad (7)$$

Para a construção de uma curva de resposta, utilizando a Equação 7, gerou-se o mesmo número de pontos para cada diluição e atribuiu-se a esses pontos o valor de absorbância como a média da absorbância mais ou menos o seu desvio padrão, no comprimento de 750 nm. O ajuste da curva obteve parâmetros $R^2 = 0,9916$ e erro quadrático médio de $RMSE = 0,0358$.

Afim de comparar os métodos com a solução de referência, na Figura 12 apresentam-se as três curvas de concentração de biomassa, medidas por gravimetria, em espectrofotômetro, e obtida pelo sistema proposto utilizando a melhor rede treinada (configuração 6, com 6 neurônios na camada oculta).

Os valores obtidos por densidade ótica pelo sistema proposto em sua melhor configuração e em espectrofotômetro de bancada foram comparados com o valor real de concentração de biomassa, obtido por gravimetria. O erro quadrático médio, utilizando-se todos os pontos da curva de diluição para as medidas em espectrofotômetro foi de 0,0045. A mesma análise, feita para a rede treinada em sua melhor configuração (configuração 6, com 6 neurônios na camada oculta) obteve um erro quadrático médio de 0,000107. Esse resultado pode ser corroborado na Figura 12, onde a curva da concentração medida em espectrofotômetro apresenta vários pontos distantes da curva obtida por gravimetria. Observa-se também que a curva de concentração de biomassa obtida pelo sistema proposto está sobreposta aquela obtida por gravimetria em praticamente todos os pontos.

Nas Figuras 13 e 14 é apresentado a qualidade dos ajustes das respostas do método espectrofotométrico e da RNA, respectivamente, em comparação ao método gravimétrico, representado pela linha de identidade destacada em vermelho. Comparando-se as Figuras 13 e 14 verifica-se que a resposta da RNA apresenta melhor aderência dos dados à linha de identidade.

Na Figura 14 é possível verificar que o método espectrofotométrico superestima as concentrações de biomassa em valores de maiores concentrações.

Objetivando avaliar se as respostas dos métodos em questão são tendenciosas, foi efetuada uma análise de resíduos, sumarizada nas Figuras 15 e 16. Novamente, pode-se constatar que, de fato, a resposta do método espectrofotométrico é tendenciosa, pois não se verifica a completa aleatorização dos resíduos em relação ao método gravimétrico, como verificado na Figura 16 para as respostas da RNA. O método espectrofotométrico não se mostrou preciso quando em alta concentração mostrando erro máximo de aproximadamente 18% em relação ao método gravimétrico. Em contrapartida, a resposta da RNA apresentou um menor erro máximo (2%).

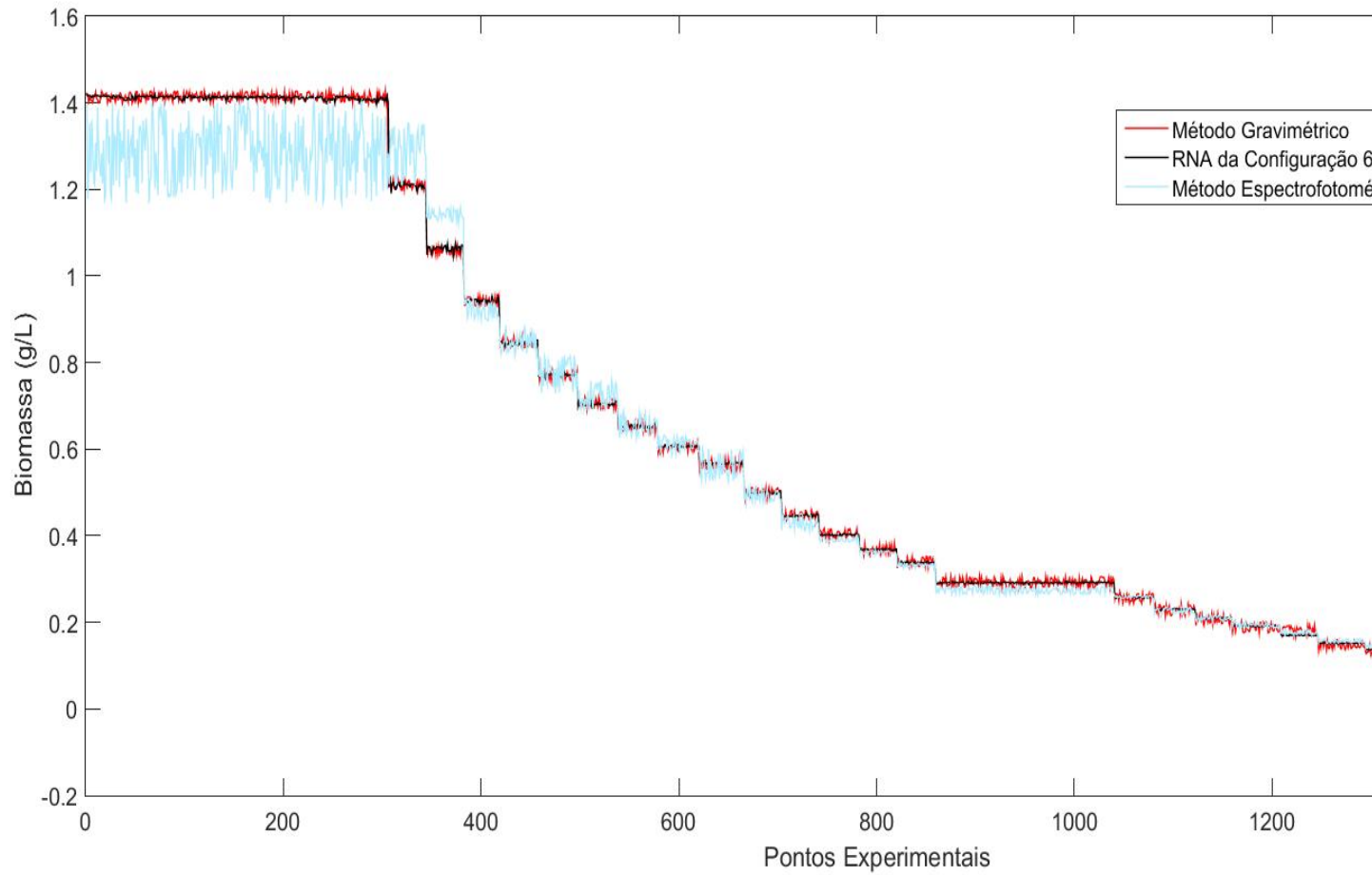


Figura 12: Comparação dos resultados dos métodos gravimétricos, espectrofotométricos e da melhor rede neural treinada.

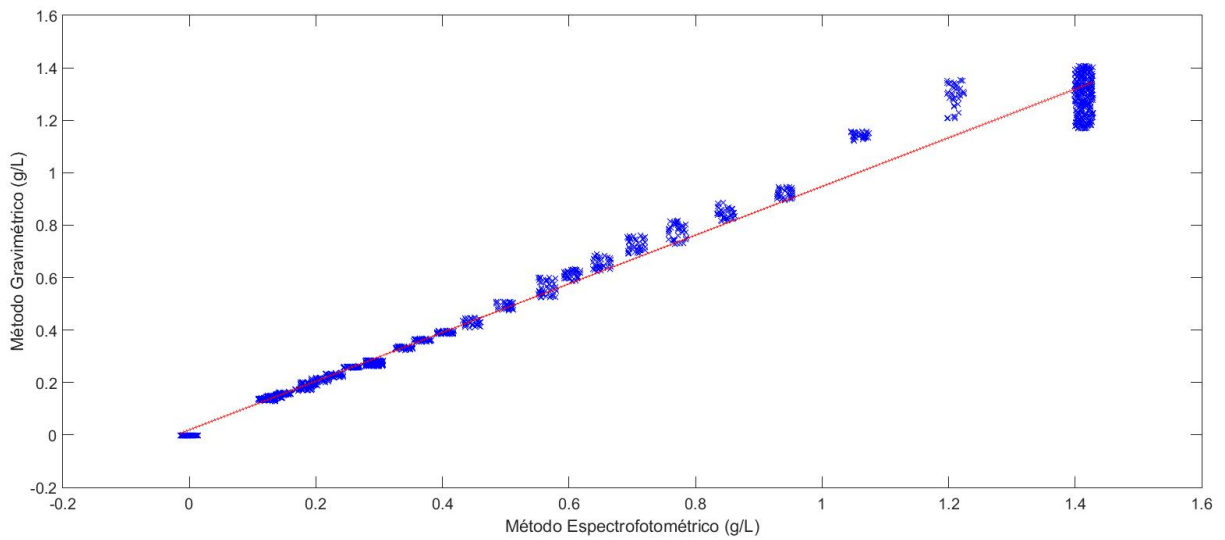


Figura 13: Curva identidade do método espectrofotométrico em relação ao método gravimétrico ($R^2=0,987$ e Erro Quadrático médio=0,0531).

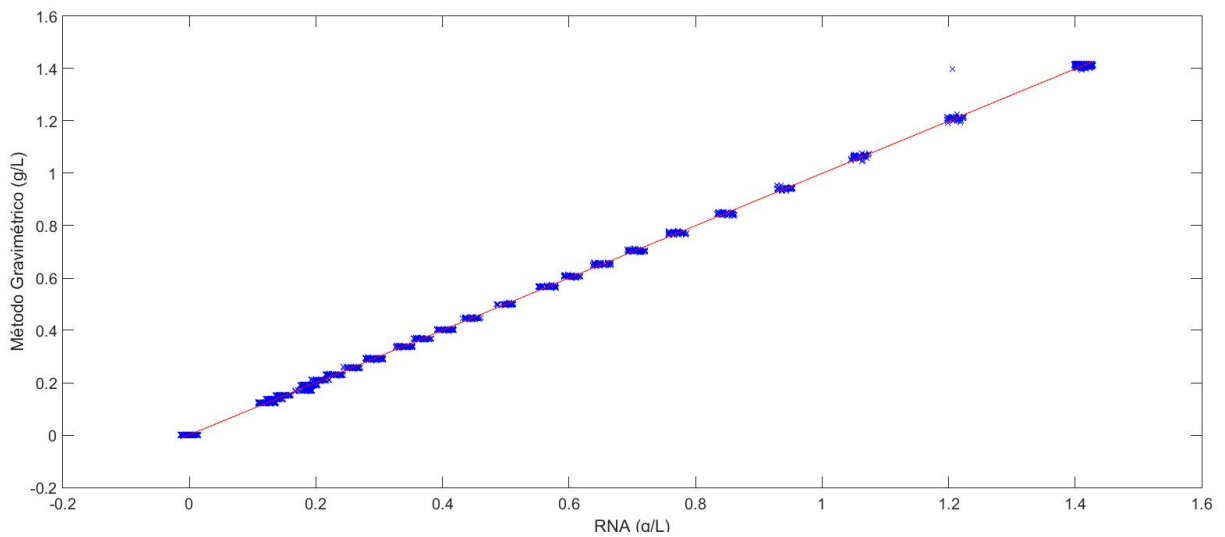


Figura 14: Curva identidade da RNA em relação ao método gravimétrico ($R^2=1$ e Erro Quadrático médio=0,0104).

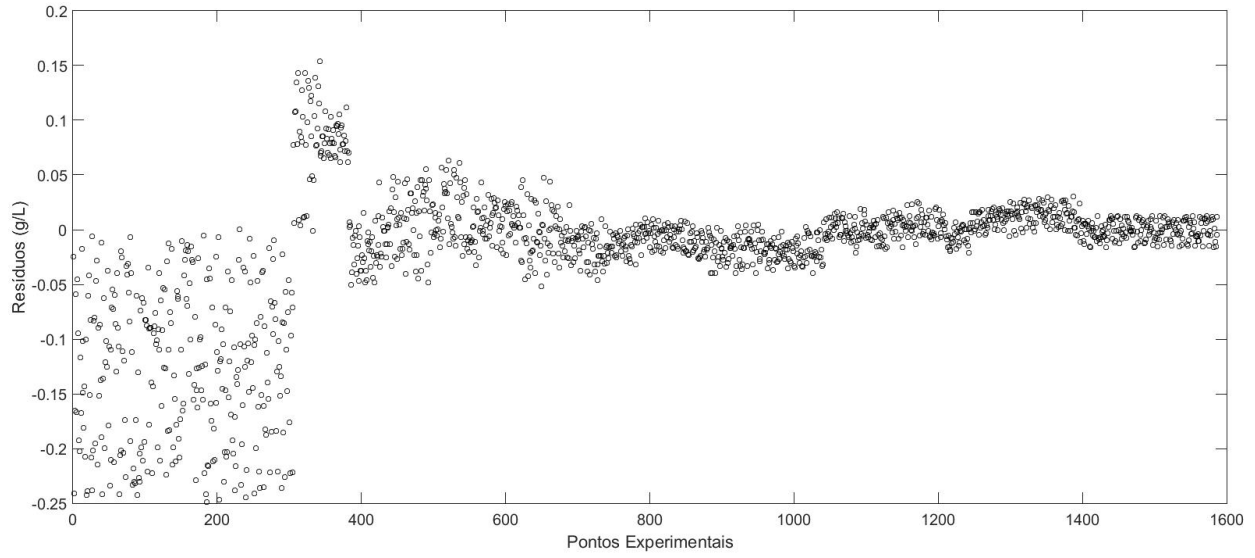


Figura 15: Resíduos entre o método espectrofotométrico e o método gravimétrico.

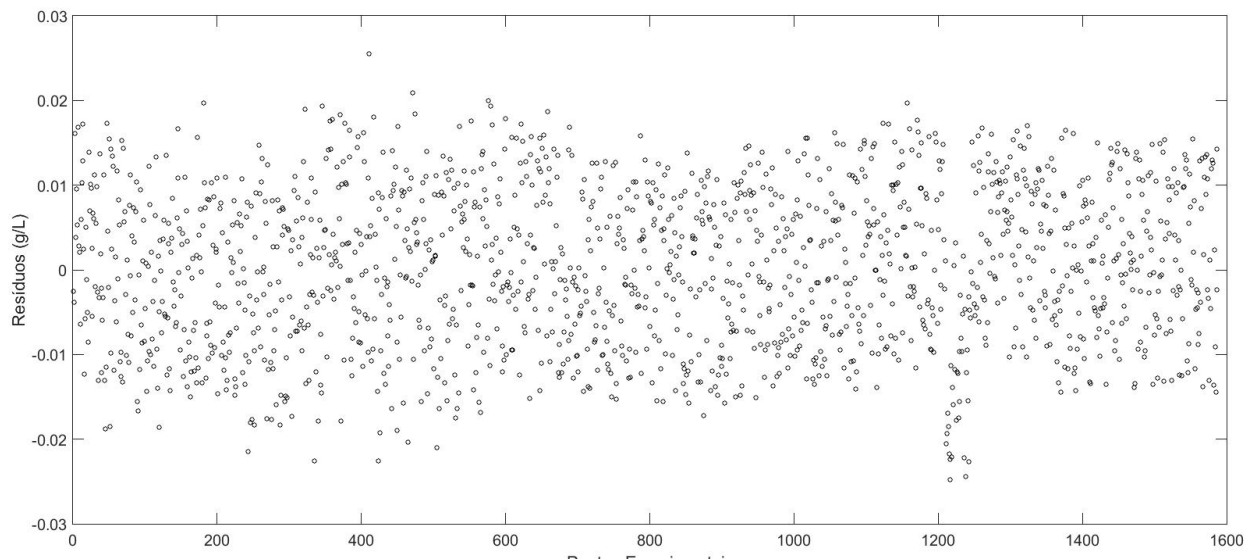


Figura 16: Resíduos entre a resposta da RNA e o método gravimétrico.

4 Conclusão

Como pôde ser verificado em todas as configurações de entradas escolhidas para as redes neurais, é possível a medição de concentração de biomassa microalgal por absorbância ótica, utilizando LEDs e fotodiodos junto a um sistema microcontrolado. Esta medição pode ser feita utilizando-se um número menor de comprimentos de onda com LEDs, permitindo concluir que redes neurais mais simples e mais fáceis de se treinar podem ser utilizadas, exigindo menos recursos do microcontrolador e do processo de treinamento. Especificamente, pode-se afirmar que o uso conjunto dos comprimentos de onda infravermelho (vale absortivo) e ultravioleta (pico absortivo) são os mais recomendados, uma vez que utilizando esses comprimentos como entrada, pode-se treinar a melhor rede e obter os melhores resultados, quando dados inéditos são apresentados na fase de teste da rede. Não só a rede treinada nessa configuração apresenta o melhor desempenho, como também é relativamente simples, possuindo apenas seis neurônios na camada oculta.

As medidas de concentração de biomassa utilizando comprimentos de onda do LED RGB são fortemente afetadas pelos pigmentos fotossintetizantes da microalga *Scenedesmus obliquus*. Os teores desses pigmentos em microalgas variam com a fase do cultivo (adaptação, exponencial e estacionária), condição e nutrição da microalga. Sugere-se, portanto, que uma análise mais detalhada seja realizada em estudos futuros para investigar as influências desses pigmentos na quantificação da concentração de biomassa por absorbância.

Foi possível verificar a influência de outros parâmetros na resposta do sistema proposto, como temperatura ambiente, pH do cultivo, presença de bolhas, grumos de microalgas e possível acúmulo de material biológico nas paredes do tubo onde a leitura é realizada. A influência referente às bolhas e grumos, podem ser neutralizadas aplicando-se filtros apropriados na entrada do tubo onde é feita a medição e dispositivos que permitam a remoção prévia de bolhas. Em relação à temperatura, pode ser feita a mudança do circuito que controla a alimentação dos LEDs, de tal forma que este compense a variação na luminosidade decorrente da variação da temperatura, ou então, que a temperatura se torne um parâmetro de entrada para a rede. Alguns circuitos integrados atuais são capazes de fazer o controle fino do LED por um preço razoável.

Quanto à variação causada pelo pH do cultivo, sugere-se usar esse parâmetro como outra possível entrada de uma rede neural.

Apêndice A

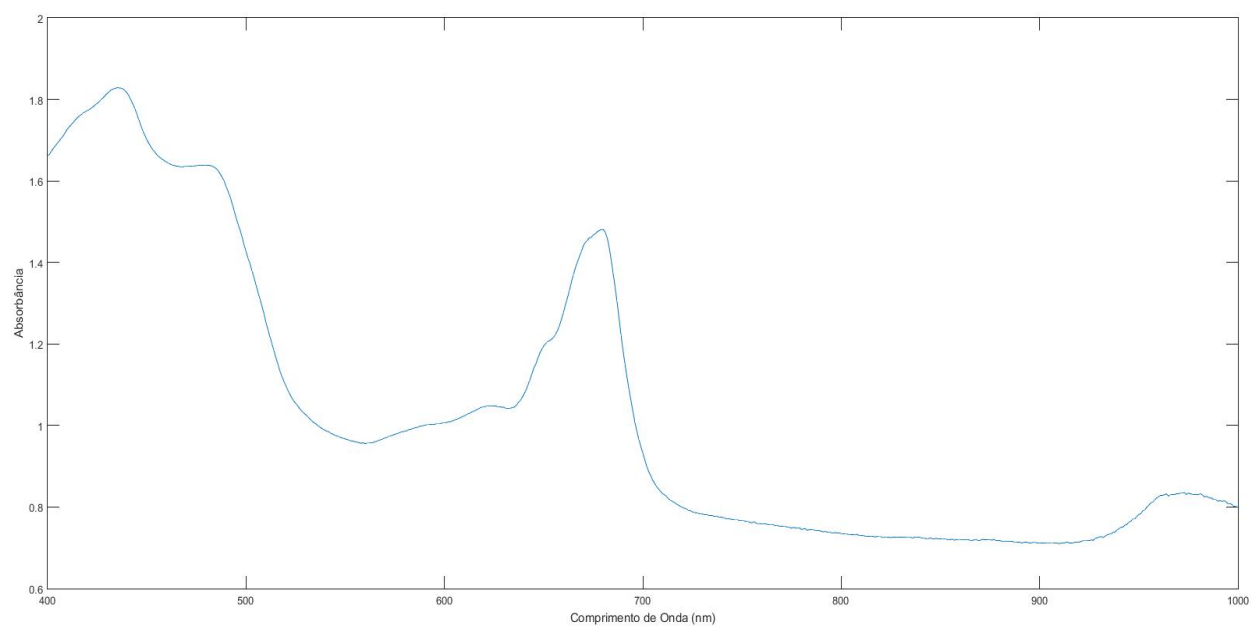


Figura 17: Espectro de absorção de uma amostra da microalga *Scenedemus obliquus* na concentração de 1,4133 g L⁻¹ para o intervalo de comprimento de onda de 400 a 1000 nm.

Tabela 11: Concentração de biomassa microalgal e volume total da amostra durante as diluições.

Diluições	Concentração de Biomassa (gL ⁻¹)	Volume Total (L)
0	1.41333	0.30
1	1.21142	0.35
2	1.05999	0.40
3	0.94222	0.45
4	0.84799	0.50
5	0.77090	0.55
6	0.70666	0.60
7	0.65230	0.65
8	0.60571	0.70
9	0.56533	0.75
10	0.49882	0.85
11	0.44631	0.95
12	0.40380	1.05
13	0.36869	1.15
14	0.33919	1.25
15	0.29241	1.45
16	0.25696	1.65
17	0.22918	1.85
18	0.20682	2.05
19	0.18844	2.25
20	0.18042	2.35
21	0.14877	2.85
22	0.13460	3.15
23	0.12289	3.45

Tabela 12: Média da resposta em tensão (V) de cada patamar para cada comprimento de onda.

Patamar	Infravermelho 950 nm (V)	Infravermelho 850 nm (V)	Vermelho 625 nm (V)	Verde 525 nm (V)	Azul 470 nm (V)	Ultravioleta 400 nm (V)
0	1.50	1.69	0.36	0.16	0.03	0.06
1	1.63	1.83	0.45	0.19	0.04	0.08
2	1.76	1.97	0.56	0.23	0.05	0.11
3	1.86	2.08	0.66	0.27	0.07	0.15
4	1.96	2.19	0.75	0.30	0.08	0.20

5	2.04	2.28	0.85	0.34	0.10	0.25
6	2.12	2.38	0.94	0.37	0.13	0.31
7	2.20	2.45	1.03	0.41	0.15	0.38
8	2.26	2.53	1.11	0.44	0.18	0.45
9	2.32	2.59	1.18	0.46	0.20	0.51
10	2.42	2.72	1.33	0.53	0.26	0.67
11	2.51	2.81	1.46	0.58	0.31	0.83
12	2.59	2.90	1.58	0.63	0.36	0.98
13	2.65	2.97	1.68	0.66	0.41	1.13
14	2.71	3.03	1.78	0.71	0.46	1.29
15	2.80	3.14	1.95	0.78	0.56	1.59
16	2.86	3.21	2.07	0.83	0.64	1.85
17	2.91	3.27	2.19	0.87	0.72	2.11
18	2.96	3.32	2.28	0.91	0.78	2.33
19	2.99	3.36	2.36	0.94	0.84	2.54
20	3.04	3.42	2.46	0.99	0.93	2.82
21	3.07	3.46	2.54	1.03	1.00	3.06
22	3.09	3.49	2.61	1.06	1.06	3.28
23	3.12	3.52	2.67	1.08	1.11	3.47

Referências Bibliográficas

- CONSELHO MUNDIAL DA ENERGIA. World Energy Resources 2016. 24. ed. [s.i.], 2016. 1028 p. Disponível em: <<https://www.worldenergy.org/publications/2016/world-energy-resources-2016/>>. Acesso em: 25 maio 2017.
- DU, Wei et al. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. Applied Microbiology And Biotechnology, [s.l.], v. 79, n. 3, p.331-337, 5 abr. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1448-8>.
- RULLI, Maria Cristina et al. The water-land-food nexus of first-generation biofuels. Scientific Reports, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 3 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22521>.
- PARAWIRA, Wilson. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. Critical Reviews In Biotechnology, [s.l.], v. 29, n. 2, p.82-93, jun. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07388550902823674>.
- GAO, Yan et al. Global analysis of deforestation due to biofuel development. Bogor: Center For International Forestry Research, 2011. 100 p. (CIFOR Working Paper).
- NORAINI, M.y. et al. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. Renewable And Sustainable Energy Reviews, [s.l.], v. 39, p.24-34, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.089>.
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- MAITY, Jyoti Prakash et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives –

- A mini review. *Energy*, [s.l.], v. 78, p.104-113, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>.
- LEE, R. A.; LAVOIE, J. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, [s.l.], v. 3, n. 2, p.6-11, 27 mar. 2013. American Society of Animal Science (ASAS). <http://dx.doi.org/10.2527/af.2013-0010>.
- BENEMANN, John. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. *Energies*, [s.l.], v. 6, n. 11, p.5869-5886, 11 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6115869>.
- MEIRELES, L.a. et al. On-Line Determination of Biomass in a Microalga Bioreactor Using a Novel Computerized Flow Injection Analysis System. *Biotechnology Progress*, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1387-1391, 6 dez. 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1021/bp020283u>.
- SANDNES, J.m. et al. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 122, n. 2, p.209-215, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.034>.
- MARXEN, Kai et al. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal Of Applied Phycology*, [s.l.], v. 17, n. 6, p.535-549, dez. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-005-9004-8>
- NEDBAL, Ladislav et al. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. *Biotechnology And Bioengineering*, [s.l.], v. 100, n. 5, p.902-910, 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21833>.
- BRIASSOULIS, D. et al. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 101, n. 17, p.6768-6777, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.103>.

- JIA, Fei; KACIRA, Murat; OGDEN, Kimberly. Multi-Wavelength Based Optical Density Sensor for Autonomous Monitoring of Microalgae. *Sensors*, [s.l.], v. 15, n. 9, p.22234-22248, 2 set. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s150922234>.
- FAN, Rong et al. An Innovative Optical Sensor for the Online Monitoring and Control of Biomass Concentration in a Membrane Bioreactor System for Lactic Acid Production. *Sensors*, [s.l.], v. 16, n. 3, p.411-423, 21 mar. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s16030411>.
- LARKUM, Anthony W.d.; KÜHL, Michael. Chlorophyll d: the puzzle resolved. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 10, n. 8, p.355-357, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.005>.
- SANTOS-BALLARDO, David U. et al. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquacu. *Aquaculture*, [s.l.], v. 448, p.87-92, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>.
- BOYLESTAD, Robert L.; NASHELSKY, Louis. *Electronic Devices and Circuit Theory*. 11. ed. [s.i.]: Pearson Education, Inc, 2013. 927 p.
- HAMAMATSU PHOTONICS. *Hamamatsu Opto-Semiconductor Handbook*. Disponível em: <https://www.hamamatsu-news.de/hamamatsu_optosemiconductor_handbook/#1>. Acesso em: 31 maio 2017.
- THEODORIDIS, Sergios; KOUTROUMBAS, Konstantinos. *Pattern Recognition*. 4. ed. [s.i.]: Elsevier, 2009.
- KASAP, Safa; SINHA, Ravindra Kumar. *Optoelectronics and Photonics: Principles and Practices*. 2. ed. [s.i.]: Pearson Education, Inc, 2013.
- HEATON, Jeff. *Artificial Intelligence for Humans: Volume 3: Deep Learning and Neural Networks*. 3. ed. [s.i.]: Heaton Research, 2015.
- ADAMS, Curtis et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 131, p.188-194, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>.

