

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

GUILHERME MENEGHETTI PALMA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO USO DE REDES NEURAIS ARTIFICIAIS
PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM SOFTSENSOR DE BIOMASSA DE
MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR**

São Carlos

2022

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

GUILHERME MENEGHETTI PALMA

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO USO DE REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS
PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM SOFTSENSOR DE BIOMASSA DE
MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obter o título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta

São Carlos

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Guilherme Meneghetti Palma, realizada em 21/02/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

Prof. Dr. Gilson Campani Júnior (UFLA)

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

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

Dedico este trabalho às minhas avós, Heloísa e Mariucha (*in memoriam*), pelo amor e carinho. Aos meus pais pelo apoio incondicional. Ao meu irmão pela parceria. À minha tia Alexandra e ao meu tio Tiago (*in memoriam*) pela sensibilidade. Aos meus padrinhos pela inspiração e ao meu orientador pela generosidade e compreensão.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo n. 2017/23950-5; e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Daniela Franco Meneghetti Palma e Breno Caleiro Palma, que me apoiaram irrestritamente em todas as fases desta minha breve e contingente vida. Ambos são o motivo ilógico e soberano de meu contentamento essencial e de meu anseio pela busca de ser um homem mais valoroso.

Agradeço também ao meu irmão Alexandre Meneghetti Palma pelos conselhos impecavelmente coerentes e pela motivação a valorizar os escassos deleites significativos da contemporaneidade.

À minha companheira, Raquel Camperlingo, pelo constante amparo e categórico suporte emocional.

Aos familiares que me apoiam e se esforçam para que possamos nos manter próximos e unidos: Alexandra, Caio, Heloísa, Júlia, Lucas, Nathália, Patrícia, Raul, Salim, Suzana, Tonho, Vera e Victória.

Aos meus colegas de trabalho que, gentilmente, me auxiliaram e compartilharam seus conhecimentos: Vanessa Guedes, Douglas Baracho e Jaqueline Carmo.

Aos meus amigos de infância que me ajudam a relativizar os problemas e descontentamentos da vida adulta: Daniel, David, Diogo, Eduardo, Felipe, Fernando, Ivan, Lucas, Luiz Fernando, Paulo Victor, Pedro, Rafael, Rodrigo e Thiago.

Ao meu orientador, Antonio Carlos, pela disponibilidade, compreensão e generosidade em me aconselhar, instruir e compartilhar sua bondade e sabedoria.

“Um pouco de instrução histórica e filológica, somada a um sentido inato de seletividade em relação a questões psicológicas em geral, logo transformou meu problema em outro: sob quais condições o ser humano inventou esses juízos de valor chamados de “bem e mal”? *E qual o valor que possuem em si mesmos?*”

(Friedrich Nietzsche, Genealogia da Moral)

RESUMO

As microalgas são fontes naturais de biomassa, ácidos graxos insaturados, carotenoides, xantofilas, vitaminas, proteínas, minerais e enzimas; compostos de grande importância comercial. Além disso, desde que biocombustíveis se tornaram um produto de grande interesse para a indústria, especialmente no setor de energia, a produção de microalgas passou a ser amplamente explorada por instituições científicas e organizações privadas. Além de ser um dos organismos de maior eficiência fotossintética, requer um espaço de cultivo muito reduzido quando produzido em biorreatores. Dessa forma, a otimização do processo de produção de microalgas em fotobiorreatores é de grande interesse econômico. Atualmente, a medição de valores de biomassa e concentração celular no interior dos reatores é um dos grandes limitadores para a otimização e controle do processo, afinal ocorre de forma não-automatizada por métodos de contagem celular e determinação de massa seca. Assim, o objetivo deste projeto foi a avaliação da viabilidade de utilização de redes neurais artificiais para a criação de um *softsensor* de inferência instantânea da biomassa no interior de um biorreator a partir de dados de intensidade de luz obtidos por sensores de luz verde, vermelha e azul conectados a um microcontrolador. O estudo foi feito a partir do cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* em meio de cultura BG-11 modificado num fotobiorreator do tipo *Airlift* de volume útil de 6L e iluminação proveniente de um painel de LED. O conteúdo presente neste trabalho apresentou redes neurais artificiais com $EQM = 0,0278 \text{ [mg/L]}^2$, $R^2=0,93$ e provisiona informação substancial para a realização de estudos de controle e otimização da produção no interior de biorreatores a partir de dados imediatos de biomassa microalgal baseado apenas em informações de intensidade de luz.

Palavras-chave: *Airlift*, *Scenedesmus obliquus*, cultivo, interpolação, otimização

ABSTRACT

Microalgae are natural sources of biomass, unsaturated fatty acids, carotenoids, xanthophylls, vitamins, proteins, minerals and enzymes; compounds of great commercial importance. Furthermore, since biofuels have become a product of great interest to industry, especially in the energy sector, the production of microalgae has come to be widely explored by scientific institutions and private organizations. In addition to being one of the most photosynthetic efficient organisms, it requires a very small cultivation space when produced in bioreactors. Thus, the optimization of the microalgae production process in photobioreactors is of great economic interest. Currently, the measurement of biomass values and cell concentration inside reactors is one of the major limitations for the optimization and control of the process, after all, it occurs in a non-automated way by cell counting and dry mass determination methods. Therefore, the objective of this project was to evaluate the feasibility of using artificial neural networks to create a biomass instantaneous inference softsensor inside a bioreactor from light intensity data obtained by red, green and blue light sensors connected to a microcontroller. The study was carried out by cultivating the microalgae *Scenedesmus obliquus* in modified BG-11 culture medium in a 6L Airlift-type photobioreactor with illumination provided from a white LED panel. The content presented in this study showed artificial neural networks with $MSE = 0,0278 \text{ [mg/L]}^2$, $R^2=0,93$ and provides substantial information for the accomplishment of the control and optimization of microalgal production inside bioreactors based only on light intensity information.

Keywords: Airlift, *Scenedesmus obliquus*, cultivation, interpolation, optimization

Lista de abreviaturas e siglas

a	Coeficiente de absorção de luz
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de cálcio di-hidratado
Cc	Concentração de clorofila
CO₂	Dióxido de carbono
C_x	Concentração de biomassa
DO	Densidade ótica
EQM	Erro quadrático médio
H⁺	Cátion hidrogênio
i	Amostra específica para o cálculo do erro quadrático médio
I	Intensidade de luz
I(z)	Intensidade de luz local
I₀	Intensidade de luz inicial
k	Declividade da função logística
K₂HPO₄.3H₂O	Fosfato dipotássico tri-hidratado
k_D	Constante de morte celular
K_I	Constante de fotosaturação
K_S	Constante de Monod
L	Valor máximo da função logística
lsqnonlin	Função de resolução de mínimos quadrados não-lineares
m	Parâmetro de forma de Bannister
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
n	Índice de refração da luz

N	Nitrogênio
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaNO₃	Nitrato de sódio
ode45	Função de resolução para equações diferenciais ordinárias
P	Fosfato
P680	Par de clorofilas do fotossistema I
P680⁺	Par de clorofilas oxidado do fotossistema I
P700	Par de clorofilas do fotossistema II
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
\vec{r}	Vetor de posição
RN-	Redes neurais artificiais menos precisas
RN+	Redes neurais artificiais mais precisas
RN5	Rede neural artificial treinada com dados do cultivo 5
RN6	Rede neural artificial treinada com dados do cultivo 6
RNA	Rede neural artificial
RNA56	Rede neural artificial treinada com dados dos cultivos 5 e 6
\vec{s}	Vetor de direção do feixe de luz
\vec{s}'	Vetor da direção da dispersão da luz
s	Comprimento do trajeto da luz
S	Concentração de substrato
SA	Algoritmo de recozimento simulado
T	Temperatura

x	Pontos do eixo das abscissas da função logística
x_0	Valor no ponto médio da curva logística
z	Comprimento do caminho ótico para o cálculo de dispersão de luz

Letras gregas

$\hat{\theta}$	Valor verdadeiro de uma amostra
σ_s	Coefficiente de espalhamento de luz
μ	Velocidade específica de crescimento
μ_{\max}	Parâmetro velocidade máxima específica
ε	Termo independente da função logística
θ	Valor estimado para uma amostra
λ	Comprimento de onda
σ	Constante de Stephan-Boltzmann
Φ	Função de fase
Ω'	Ângulo do feixe de luz

Lista de ilustrações

FIGURA 1 – ESTRUTURAS DO CLOROPLASTO	32
FIGURA 2 - MODELO DE REDE COM UM NEURÔNIO	34
FIGURA 3 - CLASSES DE ARQUITETURAS DE REDE	36
FIGURA 4 - FOTOBIOREATOR AIRLIFT	45
FIGURA 5 - PSEUDOCÓDIGO PARA O DESENVOLVIMENTO DA LÓGICA DE TREINAMENTO E TESTE DAS RNA	51
FIGURA 6 - RESULTADOS DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA PARA OS 6 CULTIVOS REALIZADOS. A) RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO CELULAR; B) RESULTADOS DE DENSIDADE ÓTICA (DO); C) RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA (Cc).....	53
FIGURA 7 - REGRESSÃO POLINOMIAL PARA OS RESULTADOS DE BIOMASSA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6. A) RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO CELULAR; B) RESULTADOS DE DENSIDADE ÓTICA (DO); C) RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA (Cc).	55
FIGURA 8 - AJUSTE POR FUNÇÃO LOGÍSTICA DOS RESULTADOS DE BIOMASSA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6. A) AJUSTES PARA CONCENTRAÇÃO CELULAR; B) AJUSTES PARA DENSIDADE ÓTICA (DO); C) AJUSTES PARA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA (Cc).	56
FIGURA 9 - AJUSTE LAMBERT-BEER LINEARIZADO PARA OS DADOS DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 4; B) CULTIVO 5; C) CULTIVO 6.....	58
FIGURA 10 - TESTE DOS MODELOS DE LAMBERT-BEER LINEARIZADO EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS DE INTERPOLAÇÃO POR FUNÇÃO LOGÍSTICA E AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 4; B) CULTIVO 5; C) CULTIVO 6.....	59
FIGURA 11 - AJUSTE DO MODELO CINÉTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO 4.....	61
FIGURA 12 - AJUSTE DO MODELO CINÉTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO 5.....	62
FIGURA 13 - AJUSTE DO MODELO CINÉTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO 6.....	63
FIGURA 14 - PERFIL DE INTENSIDADE DE LUZ VERMELHA, VERDE E AZUL PARA OS CULTIVOS 4, 5 E 6.....	64
FIGURA 15 - PERFORMANCE DAS RNA <i>FEEDFORWARD</i> COM ENTRADA COMPLETA TREINADAS COM DADOS DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 5; B) CULTIVO 6	66
FIGURA 16 - PERFORMANCE DAS RNA <i>FEEDFORWARD</i> COM ENTRADA REDUZIDA TREINADAS COM DADOS DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 5; B) CULTIVO 6	68
FIGURA 17 - PERFORMANCE DAS RNA RECORRENTES COM ENTRADA COMPLETA TREINADAS COM DADOS DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 5; B) CULTIVO 6	70

FIGURA 18 - PERFORMANCE DAS RNA RECORRENTES COM ENTRADA REDUZIDA TREINADAS COM DADOS DOS CULTIVOS: A) CULTIVO 5; B) CULTIVO 6.....	72
FIGURA 19 – RESULTADOS DE SAÍDA DA RNA56, TREINADA COM ENTRADAS POR LAMBERT-BEER LINEARIZADO, COMPARADAS AOS <i>TARGETS</i> ESPERADOS DO CULTIVO 4	75
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE SAÍDAS DA RNA E <i>TARGETS</i> DO CULTIVO 4.....	76
FIGURA 21 - VALORES EXPERIMENTAIS DE MASSA SECA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6.....	77
FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE MASSA SECA E CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA	77

Lista de tabelas

TABELA 1 – MODELOS POR SUBSTRATO BASEADOS EM MONOD	39
TABELA 2 – MODELOS A PARTIR DA INTENSIDADE DE LUZ	40
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO BG-11 MODIFICADO	43
TABELA 4 - VALORES FINAIS, CHUTES INICIAIS, LIMITES SUPERIORES E INFERIORES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E PARÂMETRO DE MORTE DO BALANÇO DE MASSA	60
TABELA 5 - PERFORMANCES DAS MELHORES E PIORES RN5 E RN6 (FEEDFORWARD COMPLETO) AO PREVER DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6	67
TABELA 6 - PERFORMANCES DAS MELHORES E PIORES RN5 E RN6 (<i>FEEDFORWARD</i> REDUZIDO) AO PREVER DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6	69
TABELA 7 - PERFORMANCES DAS MELHORES E PIORES RN5 E RN6 (RECORRENTE COMPLETO) AO PREVER DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6.....	71
TABELA 8 - PERFORMANCES DAS MELHORES E PIORES RN5 E RN6 (RECORRENTE REDUZIDO) AO PREVER DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA DOS CULTIVOS 4, 5 E 6.....	73
TABELA 9 - COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS DOS 4 DIFERENTES TESTES COM RNA	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Objetivos	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 Microalgas e luz	30
2.1.1 Luz e suas características.....	30
2.1.2 Fotossíntese em cultura de microalgas	31
2.1.3 Comprimentos de onda e intensidade de luz no cultivo de microalgas.....	33
2.2 Redes Neurais Artificiais (RNA)	34
2.2.1 Arquiteturas e treinamento de RNA	35
2.2.2 RNA aplicadas ao cultivo de microalgas.....	37
2.3 Modelagem matemática do crescimento de microalgas.....	38
2.3.1 Modelagem a partir da concentração de substrato.....	38
2.3.2 Modelagem a partir da intensidade de luz	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Microrganismo e estratégia de cultivo	43
3.2 Metodologia analítica.....	45
3.3 Desenvolvimento e aplicação de RNA.....	46
3.3.1 Verificação da qualidade e repetibilidade dos dados dos cultivos	46
3.3.2 Elaboração de <i>targets</i> para as RNA a partir da interpolação dos “Dados Análises”	47
3.3.3 Elaboração de <i>targets</i> para as RNA a partir do modelo de dispersão de luz de Lambert-Beer.....	47
3.3.4 Elaboração de <i>targets</i> para as RNA a partir do modelo cinético de crescimento	48
3.3.5 Elaboração das entradas das RNA, a partir do tratamento dos valores de intensidade de luz RGB (“Dados Sensores”).....	49
3.3.6 Definição das propriedades, treinamento e teste das RNA	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

4.1 Avaliação dos dados experimentais, elaboração de <i>targets</i> e entradas.....	52
4.1.1 Resultados da avaliação dos dados experimentais	52
4.1.2 Resultados da elaboração de <i>targets</i> por interpolação dos dados de biomassa.....	54
4.1.3 Resultados da elaboração de <i>targets</i> pelo modelo de Lambert-Beer	57
4.1.4 Resultados da elaboração de <i>targets</i> pelo modelo cinético e balanço de massa	60
4.1.5 Resultados da elaboração de entradas a partir do tratamento dos valores de intensidade de luz	64
4.2 Definição das propriedades das RNA	65
4.2.1 Redes <i>feedforward</i> com entrada completa	65
4.2.2 Redes <i>feedforward</i> com entrada reduzida	67
4.2.3 Redes recorrentes com entrada completa	69
4.2.4 Redes recorrentes com entrada reduzida	71
4.3 Desempenho da RNA com entradas por Lambert-Beer linearizado.....	74
4.4 Correlação da concentração de clorofila com a massa seca	76
5 CONCLUSÃO.....	78
6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE	79
REFERÊNCIAS	80
Apêndice A – PROGRAMAÇÃO DA LÓGICA DE TREINAMENTO E TESTE DAS RNA	87

1 INTRODUÇÃO

No escopo tradicional de estudo da engenharia química no Brasil, em especial na bioquímica, é habitual a pesquisa com microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Em geral, a exploração dos conceitos e fenômenos referentes a algas e microalgas se limita ao trabalho de biólogos e profissionais de biotecnologia. Este estudo, no entanto, opta por abordar o crescimento de microalgas em biorreatores baseado em conceitos e modelos propostos tradicionalmente pelo campo de estudo da engenharia química, visando a otimização e modelagem de cultivos.

O termo microalga, em ficologia aplicada, se refere a algas microscópicas *sensu stricto* e a bactérias fotossintéticas, como por exemplo as cianobactérias (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013). Assim como para outros microrganismos fotossintéticos, o crescimento de microalgas ocorre na presença de CO₂, um meio de cultivo contendo nutrientes como nitrogênio e fósforo e uma fonte de luz. Esses microrganismos conseguem, entretanto, crescer também em condições heterotróficas e mixotróficas (SCHULZE *et al.*, 2014).

O cultivo de microalgas tem sido amplamente estudado e aprimorado nas últimas décadas por diversos motivos. Além de serem ricas fontes de variados produtos de interesse comercial, como: lipídios, proteínas, pigmentos e compostos bioativos com aplicações nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica (BRENNAN; OWENDE, 2010; GLEMSER *et al.*, 2016), atraem o interesse, sobretudo, do setor energético, que busca fontes alternativas para a substituição dos combustíveis fósseis.

De acordo com o vasto trabalho de inúmeros autores, como Gris *et al.*, 2014; Lee; Jalalzadeh; Zhang, 2015 e Huesemann *et al.*, 2013, os biocombustíveis possuem um valioso potencial como opções renováveis de combustíveis que evitam a excedente deposição de gases do efeito estufa na atmosfera. Nesse cenário, as microalgas se apresentam como uma eficiente fonte de matéria prima para a produção de biodiesel, principalmente por conta do alto conteúdo de lipídios e da necessidade de reduzido espaço de cultivo quando comparado com plantas terrestres (CARVALHO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012).

A viabilização do cultivo em escala de microalgas em espaços reduzidos é possível através da utilização de fotobiorreatores, ou seja, reatores que permitem a entrada de luz para o crescimento e reprodução desses microrganismos fotossintéticos. O desenvolvimento e otimização desses reatores, contudo, não é tarefa simples. Além das inúmeras precauções e complicações relacionadas ao cultivo de microrganismos puramente heterótrofos, nos quais as principais fontes de substrato estão homogeneizadas no seio do meio de cultivo, a produção de

microalgas em reatores requer a análise da dispersão da luz, que é prevalecte para o crescimento do microrganismo, no volume útil do reator. Dessa forma, o estudo da cinética de crescimento das microalgas depende não apenas dos parâmetros cinéticos relativos ao próprio organismo, mas também da ocorrência de dispersão de luz no reator. Diversos estudos, como os de Amini *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2019; Huesemann *et al.*, 2013; Pfaffinger *et al.*, 2016; Ranganathan *et al.*, 2017, entre outros, utilizaram essa abordagem para a investigação e previsão do crescimento de microalgas em fotobiorreatores.

Apesar da ocorrência de um número significativo de estudos relacionados à aplicação de modelos de dispersão de luz e cinética de microalgas para a estimativa do crescimento desses microrganismos, pouco foi explorado sobre a possibilidade da utilização de redes neurais artificiais (RNA) para fazer tais tipos de previsão. Os escassos artigos que discorrem sobre o tema, Sharon mano pappu; Vijayakumar; Ramamurthy, 2013; Supriyanto *et al.*, 2019; Susanna *et al.*, 2019, apresentam ainda exíguas informações sobre a variedade de possibilidades que, certamente, requerem ainda maior investigação científica.

1.1 Objetivos

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a viabilidade da utilização de RNA para o desenvolvimento de um *softsensor* acessível que utiliza dados de intensidade de luz RGB para a inferência da concentração de microalgas em fotobiorreatores.

Os objetivos específicos do trabalho, que possibilitaram atingir o que foi proposto foram:

- a) Definição de uma metodologia para tratamento de dados provenientes dos sensores de luz ligados ao microcontrolador;
- b) Análise de modelos de interpolação, dispersão de luz e cinética de crescimento para definição de *targets* para as RNA;
- c) Desenvolvimento de estratégias de treino de diferentes tipos de RNA que melhor se adequaram aos dados de crescimento de microalgas;
- d) Avaliação das respostas fornecidas pelos diferentes tipos de RNA treinadas;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas e luz

Como já apresentado em seções anteriores, as microalgas são microrganismos autótrofos (podem ser também mixotróficos) que convertem luz e dióxido de carbono em biomassa contendo diversos produtos de valor agregado. Atualmente, as microalgas são foco de importantes esforços de pesquisas em todo o mundo, com o objetivo de avaliar seu potencial como fonte de biocombustíveis (ABIUSI *et al.*, 2014). Em comparação com outras plantas oleaginosas, o uso de microalgas não representa uma ameaça direta aos suprimentos de alimentos devido à sua baixa necessidade de espaço de cultivo e alta produtividade de lipídios (LIU *et al.*, 2012), características muito desejáveis para a produção de biodiesel. Portanto, já evidente a sua relevância, é fundamental entender os fatores que mais influenciam na sua produção.

2.1.1 Luz e suas características

Um dos principais parâmetros que influencia a produção de microalgas é a luz, que provê energia para a manutenção de seu metabolismo (GRIS *et al.*, 2014). De acordo com uma das obras mais expressivas no tópico de fotossíntese aquática, Falkowski e Raven, 2007: “a compreensão das reações de luz [da fotossíntese] requer a compreensão da natureza da própria luz.”. Tendo isso em vista, em primeiro lugar é interessante avaliar do que é constituída a luz para então assimilar a importância de sua influência.

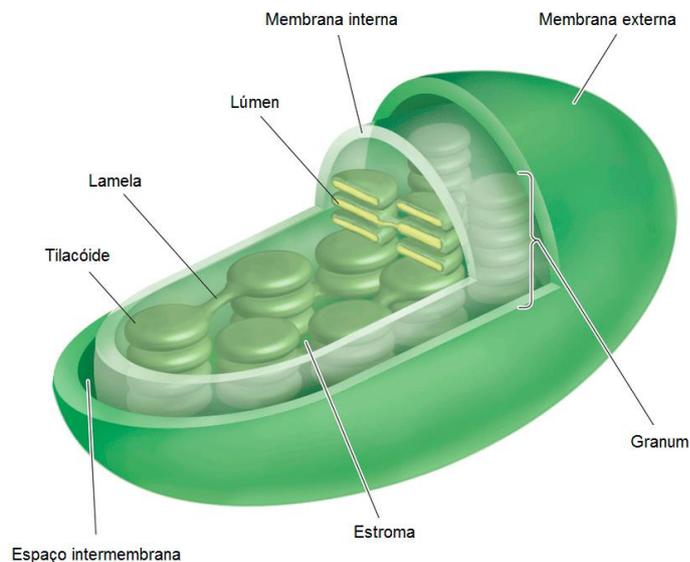
O tema é um dos mais discutidos na história da ciência, sendo alvo de questionamentos desde a antiguidade clássica, sobretudo pela civilização grega, até os dias de hoje. O primeiro capítulo de Zubairy, 2016 apresenta um breve histórico muito interessante sobre pesquisa científica relacionada à luz, para os leitores interessados no tema é uma leitura altamente recomendável. De forma abreviada, ainda no século XVII, Newton se interessou por experimentos relacionados à ótica. Foi o primeiro cientista a revelar que as cores eram propriedade da luz e não do meio. Na época acreditava-se, contudo, que a luz era formada por pequenos corpúsculos, ou seja, partículas. Já no século XIX, os estudos de James Clerk Maxwell permitiram o entendimento da luz como ondas eletromagnéticas. No final do ano de 1900, Max Planck apresentou resultados que revolucionaram a compreensão das leis da

natureza até então. O físico alemão postulou que a energia é proporcional à frequência e que, dada uma frequência, a energia é quantizada (“pacotes” de onda). Tais resultados foram fundamentais para que Albert Einstein postulasse que a luz é constituída de pacotes discretos de energia, quanta, reintroduzindo a natureza de partícula da luz para a discussão científica. De acordo com seu trabalho sobre o efeito fotoelétrico apresentado em 1905: “Se cada quanta de energia absorvido ioniza uma molécula, então a relação entre a quantidade de luz absorvida e o número de moléculas ionizadas é diretamente proporcional.” (EINSTEIN, 1905).

2.1.2 Fotossíntese em cultura de microalgas

A partir dos conceitos apresentados, é possível a compreensão de como a luz interage com as estruturas biológicas das microalgas para dar início ao processo da fotossíntese. Segundo Falkowski e Raven, 2007: “A fotossíntese é a conversão biológica da energia da luz em energia de ligação química que é armazenada na forma de compostos de carbono orgânico”. Este processo ocorre nos cloroplastos, que contém estruturas de membranas internas chamadas tilacoides. Neles estão armazenados os pigmentos fotorreceptores conhecidos como clorofilas. Mais informações podem ser encontradas na Figura 1. O principal fotorreceptor nos cloroplastos da maioria das plantas e algas é a clorofila *a*. Quando um fóton penetra no cloroplasto e atinge uma molécula de clorofila alojada na membrana do tilacoide, ele transfere energia para um elétron. A luz excita o elétron para um nível de energia excitado. Este elétron de alta energia pode retornar ao seu estado fundamental e a energia ser convertida em calor ou, se um aceptor de elétrons estiver próximo, ele pode se mover da molécula inicial para o aceptor. Esse processo resulta na formação de uma carga positiva na molécula inicial e uma carga negativa no aceptor (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Figura 1 – Estruturas do cloroplasto



Fonte: Adaptado de ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021

A excitação da clorofila *a* é considerada a primeira etapa das reações da fotossíntese dependentes da luz. As moléculas de clorofila fazem parte de duas unidades fotossintéticas: Fotossistema I (PSI) e Fotossistema II (PSII), onde ocorrem as reações luminosas (CARVALHO *et al.*, 2011). O PSI é ativado por comprimentos de onda de cerca de 700nm, enquanto o PSII de cerca de 680 nm. O par de moléculas de clorofila *a* que absorve a luz no PSII é denominado P680. Na excitação, o P680 transfere um elétron para um aceptor próximo e então para uma estrutura chamada plastoquinona. P680⁺ é neutralizado pela extração de elétrons da água formando oxigênio e prótons (H⁺) no lúmen (parte interna do tilacóide). A plastoquinona, por sua vez, é reduzida pela retirada de prótons do estroma (parte externa do tilacóide). Esse desequilíbrio de prótons gera um gradiente de pH que conduz a síntese de ATP. Assim como ocorre com o PSII, o PSI contém um par especial de moléculas de clorofila *a*, P700, que também promovem separação de cargas por fotoindução. A cooperação entre os dois fotossistemas gera um fluxo de elétrons que propicia a formação de NADPH (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Após as etapas de reações dependentes da luz, ocorre o Ciclo de Calvin, que independe da presença de fótons. Nesta etapa, são utilizadas a energia contida nas estruturas do ATP e NADPH para produzir moléculas vitais para a sobrevivência e crescimento da planta ou alga. O processo detalhado pode ser encontrado na clássica literatura de Nelson E Cox, 2008.

2.1.3 Comprimentos de onda e intensidade de luz no cultivo de microalgas

Elucidada a suma importância da luz para o desenvolvimento de microalgas, é natural que se encontrem diversos trabalhos científicos sobre o tema na literatura. No período compreendido entre 2004 e 2020, a partir de pesquisa na base de dados *Web of Science* utilizando as palavras-chave “*microalgae light*” e “*light quality microalgae*”, foram encontradas mais de 120 publicações. Já é consenso, por exemplo, o fato de que microalgas têm evidente preferência por comprimentos de onda no espectro azul ($\lambda \sim 420-470$ nm) e vermelho ($\lambda \sim 660$ nm) (GLEMSER *et al.*, 2016; KEELING, 2013; WANG *et al.*, 2014). É interessante, contudo, observar os variados resultados que pesquisadores obtiveram com diferentes microalgas e estratégias de cultivo.

Dentre os diversos trabalhos no tema, vale destacar Das *et al.*, 2010, que obtiveram maior quantidade de ácidos graxos (*fatty acids methyl esters* – FAME) para *Nannochloropsis sp.* utilizando luz verde, máxima velocidade de crescimento específico com luz azul e mínima com luz vermelha. Chen *et al.*, 2010, que cultivaram *Spirulina platensis* e atingiram maior quantidade de pigmentos com luz azul (*clorofila a* e ficocianina) e maior taxa de crescimento com luz vermelha. Os estudos de Bredda *et al.*, 2020 e Han *et al.*, 2017 com *Dunaliella salina* e os trabalhos de Rendón, 2013 e Xu *et al.*, 2013, chegaram a conclusões distintas em relação ao cultivo de *Chlorella vulgaris* com luz vermelha. Para o leitor interessado em se aprofundar no tema, seguem outros artigos que abordam a utilização de diferentes comprimentos de onda no cultivo de microalgas: Abiusi *et al.*, 2014; Bernstein *et al.*, 2014; Koc; Anderson, 2012; Kwon *et al.*, 2013; Okumura *et al.*, 2015; Schellenberger Costa *et al.*, 2013 e Vejrazka *et al.*, 2012.

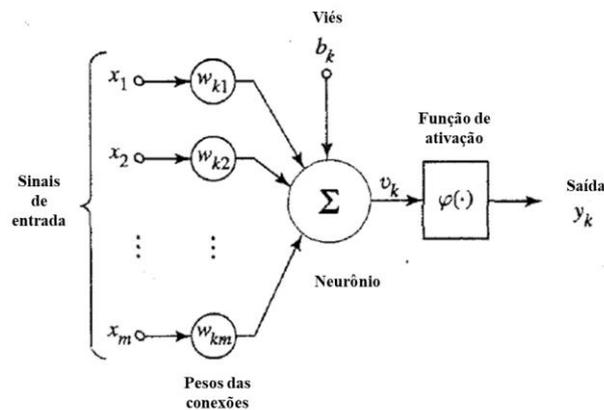
Com relação à influência da intensidade de luz no cultivo de microalgas, observa-se a tendência na concordância pelos autores em valores ótimos entre 100 e 300 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os estudos de Gris *et al.*, 2014 e Whitton *et al.*, 2019, que utilizam a mesma microalga escolhida por este trabalho de dissertação (*Scenedesmus obliquus*) obtiveram valores ótimos de taxa de crescimento e remediação de nutrientes com intensidades de 150 e 200 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. No caso do primeiro trabalho, foi estudado um reator de placa plana de 1,2 cm de coluna de líquido, já o segundo utilizou frascos de 1L com águas residuais. Outros trabalhos de destaque são: Sforza *et al.*, 2012, que obteve maior número de células e pico de taxa de crescimento, para *Nannochloropsis salina* cultivada em reator de placa plana com intensidade de 150 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Gao *et al.*, 2017 com crescimento otimizado e maior

conteúdo de lipídios para *Eustigmatos cf. polyphem* com intensidade de $300 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em reatores de placas planas de 78 e 156L com caminhos óticos de 3 e 6 cm e Iasimone *et al.*, 2018, que cultivou uma policultura de microalgas e obteve maior produtividade de biomassa e lipídios com $100 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em frascos de 500 mL com águas residuais.

2.2 Redes Neurais Artificiais (RNA)

De acordo com o livro de Braga; Ludermir e Carvalho, 2000, a chamada computação neural se constitui em uma alternativa à computação algorítmica tradicional. Segundo a definição proposta pelos autores, as RNA são sistemas paralelos compostos por unidades de processamento simples (nodos/neurônios) que calculam funções matemáticas, em geral não-lineares. Essas unidades são dispostas em camadas e são interligadas por conexões. Na maioria dos modelos, as conexões estão associadas a pesos, que ponderam a entrada recebida por cada neurônio da rede. A Figura 2, a seguir, ilustra um modelo de rede simples, composta por um neurônio.

Figura 2 - Modelo de rede com um neurônio



Fonte: Adaptado de HAYKIN, 1999

De forma similar ao cérebro humano, o processo de aprendizado (ou treinamento) de uma rede neural ocorre a partir de sua exposição a uma grande quantidade de informações. O procedimento utilizado para executar esse processo é chamado de algoritmo de aprendizado, cuja função é modificar os pesos associados às conexões da rede com o propósito de atingir um objetivo de design desejado (HAYKIN, 1999), ou seja, obter uma resposta precisa de acordo com o que se espera da rede.

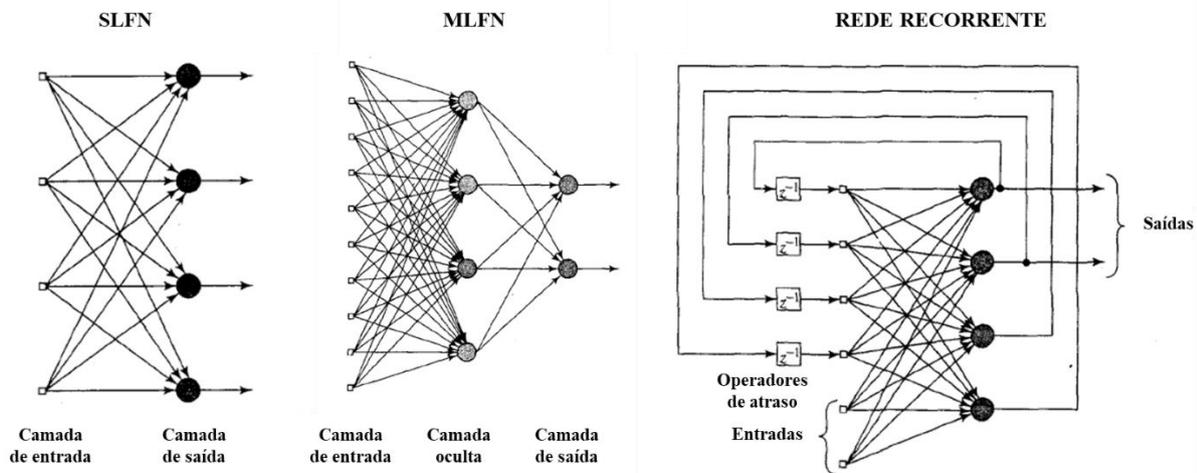
2.2.1 Arquiteturas e treinamento de RNA

Como pode ser observado na Figura 2, uma RNA simplificada constituída apenas por um neurônio é composta de:

- a) Dados de entrada;
- b) Pesos atribuídos às conexões com o neurônio;
- c) Um neurônio que recebe a soma dos valores anteriores a ele, modificados (operação matemática de multiplicação) pelos pesos das conexões;
- d) Um viés atribuído ao neurônio, que altera (operação matemática de soma) o resultado de sua saída;
- e) Uma função de ativação que delimita o valor de saída do neurônio (em geral cerceado entre -1 e 1);
- f) Um valor de saída da rede.

Evidentemente, é possível a utilização de um número maior de neurônios, distribuídos em múltiplas camadas na RNA. Surgem, então, algumas diferentes arquiteturas de rede. Em geral, pode-se identificar três classes de arquiteturas: Redes *feedforward* de camada única (*Single-Layer Feedforward Networks – SLFN*), redes *feedforward* de múltiplas camadas (*Multilayer Feedforward Networks – MLFN*) e redes recorrentes (*Recurrent Networks*). A Figura 3, a seguir, ilustra de forma tangível as três classes, com suas características específicas. Caso o leitor tenha interesse em se aprofundar no tema, é recomendável a leitura das seções 1.6 e 1.7 de Haykin, 1999.

Figura 3 - Classes de arquiteturas de rede



Fonte: Adaptado de HAYKIN, 1999

Esclarecidos os conceitos relativos à estruturação de RNA, é pertinente agora abordar o tema de treinamento e aprendizado. Como citado anteriormente, os pesos e vieses (parâmetros) que definirão os valores de saída dos neurônios e, conseqüentemente, a resposta final da RNA, devem ser gradativamente alterados para que a resposta da rede se aproxime de um valor acurado. Nas palavras de Braga; Ludermir e Carvalho, 2000: “A etapa de aprendizagem consiste em um processo iterativo de ajuste de parâmetros da rede [...] que guardam, ao final do processo, o conhecimento que a rede adquiriu do ambiente em que está operando.”. Ainda segundo os autores, há dois métodos para o treinamento de RNA: aprendizado supervisionado e não-supervisionado. Sendo que o primeiro, no qual as entradas e saídas desejadas são fornecidas para a rede por um supervisor externo, é o método mais comumente utilizado.

No aprendizado supervisionado, a cada etapa a RNA recebe valores de entrada, calcula uma saída a partir dos parâmetros atuais, compara o valor de saída da rede com a saída desejada (fornecida pelo supervisor externo), calcula o desempenho da rede a partir das diferenças entre as saídas e, por fim, é submetida a um processo de *backpropagation* para um ajuste de parâmetros que melhore o desempenho (minimização da função custo). De todos esses processos descritos, dois deles ainda não foram apresentados neste trabalho: o cálculo do desempenho da rede e o algoritmo de *backpropagation*. O primeiro deles é muito simples, normalmente é utilizada a soma dos erros quadráticos de todas as saídas como medida de desempenho e também como função custo a ser minimizada (BRAGA; LUDERMIR; CARVALHO, 2000). Os algoritmos de *backpropagation*, no entanto, envolvem conceitos mais complexos e extensos que alongariam excessivamente as referências deste trabalho. Ao leitor

interessado no maior aprofundamento sobre o tema, é aconselhável a leitura dos trabalhos de Braga; Ludermir; Carvalho, 2000 e Haykin, 1999 para um estudo mais detalhado dos conceitos teóricos e Beale; Hagan; Demuth, 2017 para uma orientação da aplicação do conteúdo em programação no software MATLAB®.R2017a.Massachusetts: The MathWorks, Inc.,2017.

2.2.2 RNA aplicadas ao cultivo de microalgas

Apesar da extensa pesquisa com redes neurais disponibilizada na atualidade e também a vasta quantidade de publicações referentes ao cultivo de microalgas, quando se procuram estudos dos dois temas em conjunto, o número de trabalhos encontrados diminui substancialmente. Em estudos como os de Correa *et al.*, 2017 e Ohnuki *et al.*, 2013 observa-se a aplicação de redes neurais, porém com intuito de classificação a partir da utilização de imagens dos microrganismos. Zenoos *et al.*, 2017, por sua vez, aplicou diferentes arquiteturas de redes neurais para a modelagem de floculação de *Chlorella sp.* Já os trabalhos de Chen *et al.*, 2016 e Guo *et al.*, 2017 buscaram avaliar o conteúdo lipídico de células individuais, com foco na otimização da produção de biodiesel.

Certamente, os trabalhos com abordagem mais próxima ao conteúdo desta dissertação são Pappu; Vijayakumar; Ramamurthy, 2013; Supriyanto *et al.*, 2019 e Susanna *et al.*, 2019. Os dois primeiros aplicaram modelos de RNA para estimar a produção de microalgas em reatores do tipo *open raceway* (ao ar livre), com resultados obtidos de acurácia de previsão de concentração de microalgas de $R^2 = 0,98$ e $R^2 = 0,93$, respectivamente. O terceiro trabalho, por sua vez, realizou cultivos em fotobiorreator de coluna de bolhas. Nesse caso, o resultado obtido pela melhor RNA foi de $R^2 = 0,94$ para previsão com até três dias de antecedência. As principais diferenças entre as abordagens dos trabalhos mencionados com esta dissertação são o tipo de reator, a microalga escolhida, a estratégia de cultivo, a fonte de luz, os parâmetros de treinamento das RNA, a comparação com modelos cinéticos e os instrumentos de medição.

2.3 Modelos cinéticos do crescimento de microalgas

Para os objetivos propostos deste trabalho, foram usados modelos cinéticos como forma de interpolação dos dados de entrada para as RNA. A definição de modelos matemáticos que representem o crescimento de microalgas com precisão e confiabilidade é de grande importância para a otimização e previsibilidade de processos de produção em reatores de larga escala. O trabalho de revisão de Lee; Jalalizadeh; Zhang, 2015, sugere a subdivisão dos modelos em três grupos: aqueles que consideram um substrato único para o crescimento das microalgas (N, P ou CO₂), os que consideram a luz como substrato e os que incluem múltiplos substratos. Em relação aos modelos de crescimento baseados na intensidade de luz, Béchet; Shilton; Guieysse, 2013 propõe a categorização de três tipos de modelos: os que determinam a taxa de crescimento como função da intensidade de luz incidente ou média, os que utilizam a soma das produtividades locais dentro do reator e, por fim, modelos dinâmicos mais complexos que consideram os processos biológicos das células individuais. É interessante, portanto, analisar os principais modelos reunidos nos dois textos de revisão, em conjunto com os trabalhos historicamente mais expressivos sobre o tema, para que se tenha uma concepção mais apurada do estado da arte.

2.3.1 Modelos cinéticos a partir da concentração de substrato

Os modelos referentes ao primeiro grupo definido por Lee; Jalalizadeh; Zhang, 2015 se propõe a determinar o crescimento de microalgas a partir de valores de concentração de substrato. Nota-se que a maior parcela dos trabalhos reunidos aplica o modelo de Monod, descrito pela equação 1, para representar a relação entre crescimento e concentração de substrato.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

Em que μ se refere à velocidade específica de crescimento, μ_{max} é o parâmetro velocidade máxima específica, S a concentração de substrato e K_S a constante de Monod. A Tabela 1 apresenta os artigos que modelam a partir da concentração de CO₂, N e P baseados na equação de MONOD, 1949

Tabela 1 – Modelos por substrato baseados em Monod

Artigo	Substrato	Espécie	Parâmetros Encontrados
GOLDMAN, 1974	CO ₂	<i>S. quadricauda</i>	$\mu_{\max} = 2,29 \text{ d}^{-1}$ $K_s = 0,3 - 0,71 \text{ mg L}^{-1}$
GOLDMAN, 1974		<i>S. carpicornulum</i>	$\mu_{\max} = 2,45 \text{ d}^{-1}$ $K_s = 0,4 - 1,2 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Chlorella</i>	$\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,26 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Anabaena flos aquae</i>	$\mu_{\max} = 0,045 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,17 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Selenastrum capricornutum</i>	$\mu_{\max} = 0,057 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Senedesmus quadricauda</i>	$\mu_{\max} = 0,057 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,17 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Oscillatoria</i>	$\mu_{\max} = 0,028 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,43 \text{ mg L}^{-1}$
NOVAK, 1985		<i>Microcoleus vaginatus</i>	$\mu_{\max} = 0,031 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 3,22 \text{ mg L}^{-1}$
HSUEH <i>et al.</i> , 2009		<i>Thermosynechococcus sp.</i>	$\mu_{\max} = 3,5 \text{ d}^{-1}$ $K_s = 1,9 \text{ mM}$
ASLAN, 2006		N	<i>Chlorella vulgaris</i>
XIN <i>et al.</i> , 2010	<i>Scenedesmus sp.</i>		$\mu_{\max} = 1,78 \times 10^6 \text{ cel (mL d)}^{-1}$ $K_s = 11,8 \text{ mg L}^{-1}$
ASLAN, 2006	P	<i>Chlorella vulgaris</i>	$\mu_{\max}/Y_N = 0,5 \text{ mg mg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ $K_s = 10,5 \text{ mg L}^{-1}$
XIN <i>et al.</i> , 2010		<i>Scenedesmus sp.</i>	$\mu_{\max} = 1,02 \times 10^6 \text{ cel (mL d)}^{-1}$ $K_s = 0,28 \text{ mg L}^{-1}$

Fonte: Adaptado de LEE; JALALIZADEH; ZHANG, 2015

Valores elevados de concentração de substrato no meio de cultivo podem ocasionar o fenômeno de inibição, fenômeno que não é proposto por modelos baseados em Monod. Neste caso, alguns modelos utilizados para descrever o crescimento de microalgas são os modelos propostos por Andrews, 1968, Martínez Sancho; Castillo; El Yousfi, 1997 e Martínez; Jiménez; El Yousfi, 1999.

2.3.2 Modelos cinéticos a partir da intensidade de luz

Nos cultivos em que a concentração de substrato não é um fator limitante para o crescimento das microalgas, é interessante a construção do modelo cinético a partir dos valores

de intensidade de luz. Visto que essa condição se aplica à maior parte dos cultivos com esses microrganismos, nota-se que é a abordagem mais explorada na bibliografia e, similarmente, o tópico definido como objeto de estudo deste trabalho. Neste cenário se encaixam o segundo grupo definido por Lee; Jalalizadeh; Zhang, 2015 e os modelos reunidos por Béchet; Shilton; Guieysse, 2013.

O destaque para a modelagem a partir da intensidade de luz se inicia com o estudo do crescimento de *Chlorella* realizado por Tamiya *et al.*, 1953. A contribuição apresentada no capítulo 16 do livro ALGAL CULTURE FROM LABORATORY TO PILOT PLANT utilizou um modelo muito similar ao de Monod, 1949, porém com a substituição da concentração de substrato pela intensidade de luz. A modelagem proposta se tornou amplamente conhecida e foi, posteriormente, aplicada por demais pesquisadores no cultivo de novas espécies (CHAE; HWANG; SHIN, 2006, HUANG; CHEN, 1986, entre outros). Outros modelos empíricos também foram desenvolvidos e estão apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Modelos a partir da intensidade de luz

Autor	Modelo
TAMIYA <i>et al.</i> , 1953	$\mu = \mu_{max} \frac{I}{K_I + I}$
OORSCHOT, 1955	$\mu = \mu_{max} (1 - e^{-I/K_I})$
BANNISTER, 1979	$\mu = \mu_{max} \frac{I}{(K_I^m + I^m)^{1/m}}$
CHALKER, 1980	$\mu = \mu_{max} \tanh \frac{I}{K_I}$

Fonte: Adaptado de LEE; JALALIZADEH; ZHANG, 2015

A principal peculiaridade da modelagem a partir da luz quando comparada com a modelagem por substrato é a heterogeneidade dos valores de intensidade no seio do reator, por conta de efeitos de reflexão, absorção, emissão e espalhamento. Dessa forma, é possível definir a intensidade de luz do modelo a partir de diferentes níveis de complexidade. Béchet; Shilton; Guieysse, 2013 estabelecem uma boa demarcação entre as diferentes abordagens.

O primeiro tipo abrange os modelos que utilizam valores de intensidade de luz incidente ou um valor médio, sem considerar um perfil determinado de intensidades dentro do reator. Sem dúvidas são modelos fáceis de implementar, por conta da simplicidade de medição da

intensidade incidente e absorvida, porém se limitam às condições de operação e geometria do reator, que estarão implicitamente contidas nos valores dos parâmetros ajustados.

O segundo tipo de abordagem é mais universal por considerar as intensidades locais em toda extensão do reator. Assim, atrelado ao modelo biológico que descreve o crescimento do microrganismo (Monod por exemplo) é incluído um perfil de distribuição de intensidade de luz. A equação mais utilizada para descrever esse perfil é a de Lambert-Beer, equação 2, que atribui uma queda exponencial aos valores de intensidade pela extensão do reator de acordo com a concentração de biomassa no meio.

$$I(z) = I_0 e^{-\sigma C_x z} \quad (2)$$

Em que $I(z)$ representa a intensidade de luz local, I_0 a intensidade de luz incidente, σ o coeficiente de absorção, C_x a concentração de células e z o comprimento do caminho óptico. Apesar de amplamente utilizada, a equação de Lambert-Beer está atrelada à hipótese simplificadora de que ocorre apenas o fenômeno de absorção da luz pelas células no reator, o que não é a realidade para o cultivo de microalgas. A contemplação dos fenômenos de emissão, absorção, reflexão e espalhamento pode ser observada nas equações diferenciais provenientes do balanço de radiação RTE (*radiative transfer equation*). A equação vetorial resultante (3) é apresentada a seguir:

$$\frac{dI(\vec{r}, \vec{s})}{ds} + (a + \sigma_s)I(\vec{r}, \vec{s}) = an^2 \frac{\sigma T^4}{\pi} + \frac{\sigma_s}{4\pi} \int_0^{4\pi} I(\vec{r}, \vec{s}') \Phi(\vec{s} \cdot \vec{s}') d\Omega' \quad (3)$$

Na qual \vec{r} é o vetor de posição; \vec{s} é o vetor de direção do feixe de luz; \vec{s}' é o vetor da direção da dispersão da luz; s é o comprimento do trajeto; a é o coeficiente de absorção; n é o índice de refração; σ_s é o coeficiente de espalhamento; σ é a constante de Stephan-Boltzmann; I é a intensidade da radiação, função dos vetores posição e direção do feixe de luz; T é a temperatura local; Φ é a função de fase e Ω' é o ângulo.

Primeiramente, é interessante notar que a variável intensidade não depende apenas de coordenadas espaciais, mas também de um vetor de direção do feixe de luz, o que naturalmente aumenta a quantidade de cálculos durante a resolução de forma considerável. Como se trata de uma equação extensa, é pertinente a análise do significado de cada um dos termos para melhor compreensão do modelo. O primeiro termo se refere à taxa de variação de intensidade no espaço, ou seja, representa por exemplo a redução da intensidade conforme se afasta a posição da fonte de radiação. O segundo termo é relativo à absorção de luz pelo meio. O terceiro termo,

já à direita da igualdade, computa a emissão de radiação (por conta da temperatura por exemplo). Por fim, o último termo representa o fenômeno de espalhamento, caracterizado pela mudança de direção do feixe ao passar pelo volume de controle.

Devido à complexidade do sistema de equações obtido pelo balanço de radiação, costuma-se utilizar duas estratégias de simplificação para a resolução do modelo: dois fluxos e ordenadas discretas. A simplificação dois fluxos assume que o espalhamento só ocorre em uma direção, seja positiva ou negativa, e pode ser observada nos trabalhos de Cornet *et al.*, 1995, Cornet; Dussap, 2009, Li; Yang, 2013 e Singh Khichi; Anis; Ghosh, 2018. A simplificação por ordenadas discretas, por sua vez, define uma quantidade limitada de direções para o feixe de luz, sendo que as equações diferenciais serão resolvidas para cada uma dessas direções. É uma abordagem muito acurada e que pode ser encontrada em alguns trabalhos que fizeram uso de fluidodinâmica computacional (CFD) para o cálculo do perfil de intensidade de luz em reatores, como Amini *et al.*, 2016 e Guo *et al.*, 2019.

Modelos de maior complexidade, como os de múltiplos substratos referentes ao terceiro grupo de Lee; Jalalizadeh; Zhang, 2015 e os modelos dinâmicos pertencentes ao tipo 3 de Béchet; Shilton; Guieysse, 2013 foram avaliados pelos autores como muito específicos e de complexidade excessiva para a previsão do crescimento de microalgas. Sendo assim, os modelos que optam pelo cálculo local da taxa de crescimento a partir de um perfil de distribuição de luz se mostraram os mais efetivos e apropriados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo e estratégia de cultivo

Para este trabalho a cepa cultivada foi a *Scenedesmus obliquus*, cedida pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar) através do Laboratório de Biotecnologia de Algas. O meio de cultura empregado foi BG-11 modificado (ALLEN; STANIER, 1968; ALLEN, 1968; RIPPKA *et al.*, 1979) sendo sua composição apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição BG-11 modificado

Componente	Solução estoque (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantidade
Solução de citrato de Fe	-	1 mL
Ácido cítrico	6	1 mL
Citrato de amônio férrico	6	1 mL
NaNO ₃	-	1,5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 mL
Na ₂ CO ₃	20	1 mL
MgNaEDTA.H ₂ O	1	1 mL
Solução traço de metais	-	1 mL

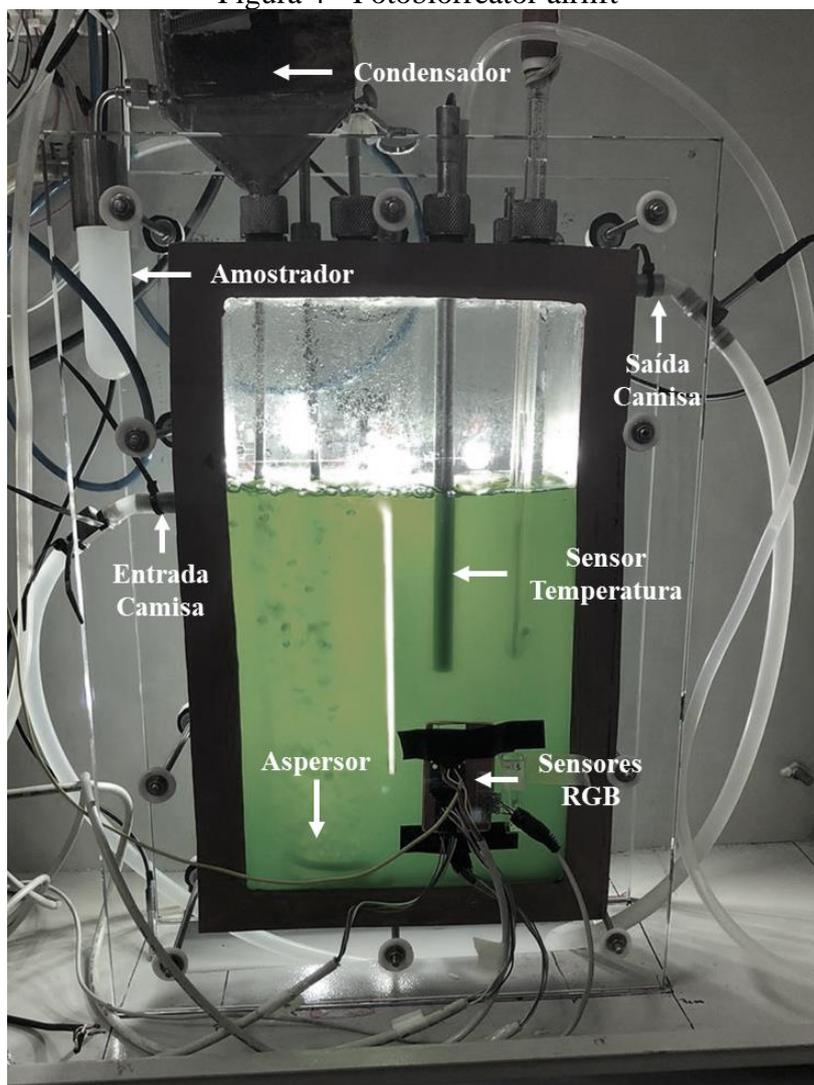
Fonte: ALLEN, 1968; ALLEN; STANIER, 1968; RIPPKA *et al.*, 1979

Para garantir que as células estivessem saudáveis e com características fisiológicas adequadas para seu desenvolvimento no biorreator, foram necessários diversos repiques em erlenmeyers com gradual aumento de escala até chegar ao volume desejado. A esterilização dos frascos era realizada por autoclavagem (121 °C, 20 min, 1 bar, AV 163 Phoenix Lufenco, Brasil) e o pH ajustado para 7,0 antes do processo. As culturas eram mantidas em condições de luz controladas (180 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), temperatura constante (25 °C \pm 2 °C), ciclo luz/escuro de 12:12 h, padrão predominante nos estudos com microalgas, e as manipulações eram realizadas em cabine de fluxo laminar (Veco, modelo VLFS 12, Brasil). A concentração e rendimento das células eram amostrados diariamente e, assim que atingissem crescimento exponencial dentro do frasco, eram repicados para um novo recipiente. Iniciou-se com o volume de 300 mL, com escalamentos para 500 mL, 1 L, 2 L e finalmente 6 L para inoculação no reator. A concentração do inóculo foi de 10⁵ células/ml para todos os cultivos.

Os cultivos foram realizados em batelada em fotobiorreator *airlift split* com volume útil de 7L (6L utilizados neste trabalho) encamisado (GUEDES; HORTA; CERRI, 2016). Foram realizados 6 cultivos com duração de 8 dias cada, período suficiente para cessação do crescimento das microalgas, sendo os 3 primeiros conduzidos pela doutoranda Vanessa Campos Guedes no segundo semestre de 2019 e os últimos 3 realizados no segundo semestre de 2020 por mim em conjunto com a doutoranda Vanessa Campos Guedes.

A vazão de ar usada para agitação e aeração foi de 1,5 L/min e o painel de iluminação posicionado paralelamente à parede do reator, na parte traseira a uma distância de 11 cm. O painel luminoso era composto de LEDs brancos, azuis, verdes e vermelhos (Tower 10W) intercalados e foi criteriosamente desenvolvido por Vanessa Campos Guedes no Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Os experimentos deste estudo utilizaram apenas a luz branca, com intensidade incidente de $180 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, para o crescimento das microalgas. Os sensores RGB (Tcs3475) para inferência da intensidade de luz foram posicionados na parte dianteira do reator (lado oposto ao painel luminoso) no canto inferior direito a 5 cm das bordas. O treinamento das RNA foi realizado utilizando a média dos valores obtidos pelos sensores de intensidade de luz RGB. A temperatura dos cultivos foi mantida em 25 °C, sensor DS18B20, e o pH monitorado diariamente em pHmetro de bancada. O reator e os aparatos descritos podem ser observados na Figura 4 a seguir.

Figura 4 - Fotobiorreator airlift



Fonte: Acervo pessoal

3.2 Metodologia analítica

Os dados dos cultivos foram obtidos de duas maneiras: valores de temperatura e intensidade de luz eram aferidos automaticamente a cada 10 s por microcontroladores Arduinos MEGA e salvos a cada minuto em formato de texto pelo software SUPERSYS_photo construído em plataforma LabView (este conjunto de dados foi denominado “Dados Sensores”); já as amostras do conteúdo do meio eram retiradas pela manhã, a cada 24h, para análises de concentração celular, pH, densidade ótica (DO), concentração de clorofila (Cc), viabilidade, rendimento máximo e massa seca (este conjunto de dados foi denominado “Dados Análises”).

A concentração celular foi determinada a partir da contagem de células em câmaras de contagem Fuchs-Rosenthal com auxílio de microscópio ótico (Nikon Eclipse E200, Japão). O pH foi medido em pHmetro de bancada calibrado antes do uso. A densidade ótica foi aferida por um espectrofotômetro digital (NANOCOLOR, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemanha) em 3 comprimentos de onda: 570, 684 e 750 nm. Concentração de clorofila foi obtida por fluorescência *in vivo* (Turner Designs, Trilogy, EUA), sendo que sua curva de calibração foi construída após inserir em gráfico a concentração de clorofila *a* em crescimento exponencial por fluorescência de clorofila *a in vivo*. Viabilidade celular foi determinada utilizando um citômetro de fluxo (MUSE CELL 224 ANALYZER; Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Rendimento máximo foi calculado a partir da fluorescência de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha) sendo que as alíquotas de 3 mL eram previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos para a oxidação completa dos centros de reação do PSII. Por fim, a massa seca foi medida a partir da secagem de filtros de massa seca (UNIFIL, AC 025 mm, 0,22 μ), em estufa a 40 °C por 48 h.

3.3 Desenvolvimento e aplicação de RNA

Para a construção das RNA deste trabalho, foram utilizados dados de intensidade de luz RGB (“Dados Sensores”) como entrada das redes e valores de concentração de biomassa (“Dados Análises”) como *targets* e saídas. Dentre as inúmeras possibilidades e após uma série de testes e avaliações de desempenho, a estratégia adotada para o desenvolvimento das RNA foi a descrita a seguir.

3.3.1 Verificação da qualidade e repetibilidade dos dados dos cultivos

Para garantir que as RNA treinadas pudessem estimar com precisão resultados de cultivos distintos, foi necessário avaliar se as condições e respostas de cada um dos cultivos realizados foram de fato consistentes e semelhantes. Avaliou-se, portanto, a duração real de cada cultivo, a representatividade das amostragens e a expectativa nas tendências de crescimento de biomassa das microalgas. Os cultivos receberam numerações de 1 a 6, sendo que foram escolhidos para treinamento das RNA apenas os dados dos cultivos 4, 5 e 6.

3.3.2 Elaboração de *targets* para as RNA a partir da interpolação dos “Dados Análises”

Tendo em vista que os intervalos de amostragem dos “Dados Sensores” e “Dados Análises” são fundamentalmente muito distintos, observa-se que o número de pontos experimentais relativos a este último é muito limitado para se treinar uma RNA acurada. Dessa forma, a primeira estratégia escolhida para que a quantidade de dados fornecidos como *targets* pudesse ter a mesma quantidade de valores de entrada das redes, foi a realização de interpolações dos dados de biomassa.

A primeira alternativa explorada foi a adequação de polinômios de terceiro e quarto grau que apresentassem os menores valores de R^2 . Para isso foi utilizada a ferramenta de interpolação polinomial do MS Excel *Home and Student* 2016. Washington: Microsoft, 2016. Contudo, a subjetividade inerente à escolha dos graus dos polinômios e o comportamento equivocado das interpolações nos dias iniciais de cultivo incitaram a avaliação de uma segunda alternativa, a aplicação da função logística, equação 4, para tentar descrever com mais precisão a tendência dos dados experimentais.

$$f(x) = \frac{L}{1+e^{-k(x-x_0)}} + \varepsilon \quad (4)$$

Em que L representa o valor máximo da curva, ε o termo independente, k a declividade e x_0 o valor de x no ponto médio da curva. Neste caso, o ajuste foi realizado com a utilização da ferramenta *solver* do MS Excel *Home and Student* 2016. Washington: Microsoft, 2016.

3.3.3 Elaboração de *targets* para as RNA a partir do modelo de dispersão de luz de Lambert-Beer

Em busca de um perfil ainda mais preciso que pudesse descrever o crescimento das microalgas, a segunda estratégia escolhida para o desenvolvimento dos *targets* de treinamento das RNA foi a utilização da equação de Lambert-Beer, equação 2 apresentada no Capítulo 2 deste trabalho. Visto que estão disponíveis os dados de intensidade de luz local, intensidade de luz incidente, comprimento do caminho ótico e concentração de biomassa (obtida da interpolação anterior), é possível utilizar a equação de Lambert-Beer linearizada (equação 5) e

ajustá-la aos dados dos cultivos para se obter modelos e, conseqüentemente, novos perfis de crescimento de biomassa.

$$\ln \frac{I(z)}{I_0} = -\sigma C_x z \quad (5)$$

Em que $I(z)$ representa a intensidade de luz local, I_0 a intensidade de luz incidente, σ o coeficiente de absorção, C_x a concentração de células e z o comprimento do caminho ótico. Foram ajustados modelos para os comprimentos de onda vermelho, verde e azul para cada um dos cultivos analisados. Os novos valores de biomassa foram calculados através da média dos modelos de cada cor.

3.3.4 Elaboração de *targets* para as RNA a partir do modelo cinético de crescimento

A última estratégia avaliada para elaboração de *targets* foi a utilização do modelo cinético de intensidade de luz proposto por Tamiya *et al.*, 1953 em conjunto com o balanço de massa do reator. Assim como apresentado previamente na Tabela 2, o modelo cinético em questão é descrito pela equação 6 a seguir:

$$\mu(I) = \mu_{max} \frac{I}{K_I + I} \quad (6)$$

Em que μ se refere à velocidade específica de crescimento, μ_{max} é o parâmetro velocidade máxima específica, I é a intensidade de luz local e K_I a constante de saturação.

De forma a generalizar o modelo, para que os parâmetros cinéticos não fossem dependentes das condições de operação e características geométricas do reator, a intensidade de luz (I) foi especificada pela equação de Lambert-Beer, gerando a equação 7:

$$\mu(C_x, z) = \frac{\mu_{max} \cdot I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot C_x \cdot z}}{K_I + I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot C_x \cdot z}} \quad (7)$$

Em seqüência, equações 8 e 9, fez-se a integração pela extensão total L do reator e se calculou um valor médio de velocidade de crescimento específico:

$$\mu(C_x, L) = \frac{1}{L} \int_0^L \mu(C_x, z) dz \quad (8)$$

$$\mu(C_x) = \frac{\mu_{max}}{L \cdot \sigma \cdot C_x} \cdot \ln \frac{K_I + I_0}{K_I + I_0 \cdot e^{-L \cdot \sigma \cdot C_x}} \quad (9)$$

Por fim, aplicou-se o termo de velocidade de crescimento ao balanço de massa de biomassa do reator batelada (equação 10) e foram ajustados os parâmetros para os dados experimentais.

$$\frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m}{L \cdot \sigma \cdot C_x} \cdot \ln \frac{K_I + I_0}{K_I + I_0 \cdot e^{-L \cdot \sigma \cdot C_x}} - k_D \quad (10)$$

Em que t se refere ao tempo e k_d a constante de morte. Ajustados os parâmetros dos modelos, foi possível testá-los para cada um dos diferentes cultivos.

3.3.5 Elaboração das entradas das RNA, a partir do tratamento dos valores de intensidade de luz RGB (“Dados Sensores”)

Diferentemente dos valores de biomassa, os dados de intensidade de luz RGB inferidos dos cultivos possuem abundância suficiente para o treinamento das RNA. Medições a cada minuto pelo decorrer de todo período de operação resultaram em mais de 11.000 valores de intensidade de luz RGB por cultivo. Todavia, é natural que em informações mensuradas por sensores de baixo custo estejam presentes ruídos. Por conta disso foi aplicada a ferramenta de média móvel a cada 50 pontos.

Devido ao ciclo 12:12h de iluminação e escuro necessário para o ideal desenvolvimento fisiológico das microalgas, também foi realizada a retirada de valores nulos de intensidade de luz característicos dos períodos escuros. Tal operação é importante pois, neste caso, para uma mesma informação de intensidade de luz (zero) a concentração de biomassa varia.

3.3.6 Definição das propriedades, treinamento e teste das RNA

Definidas as entradas e *targets* das redes foram avaliadas, então, diferentes condições e arquiteturas para definição da RNA que apresentasse melhores resultados. Os códigos de treinamento e testes foram desenvolvidos no software Matlab®.R2018b.Massachusetts: The MathWorks, Inc.,2018. Nesta etapa de definição de arquitetura de redes utilizou-se os *targets* obtidos pela interpolação dos dados por função logística. Foram realizados 4 testes: i) Redes *feedforward* com entrada completa; ii) Redes *feedforward* com entrada reduzida; iii) Redes recorrentes com entrada completa e iv) Redes recorrentes com entrada reduzida.

A estratégia foi definida para avaliar se uma simples rede *feedforward* seria suficiente para descrever o comportamento de crescimento das microalgas ou se a rede recorrente seria mais precisa. Também se variou a quantidade de dados fornecidos às RNA para aferir a possibilidade das redes estarem submetidas a um sobre ajuste (*overfitting*). Para o caso das entradas completas, o número de linhas de valores de intensidade de luz RGB contida no vetor de entrada foi: 5475 linhas para o cultivo 4, 4397 linhas para o cultivo 5 e 5329 linhas para o cultivo 6. Já a quantidade de linhas dos vetores das entradas reduzidas foi: 344 linhas para o cultivo 4, 275 linhas para o cultivo 5 e 334 linhas para o cultivo 6. Evidentemente a quantidade de valores foi reduzida de forma a manter o comportamento dos dados, apenas aumentando o espaçamento entre eles.

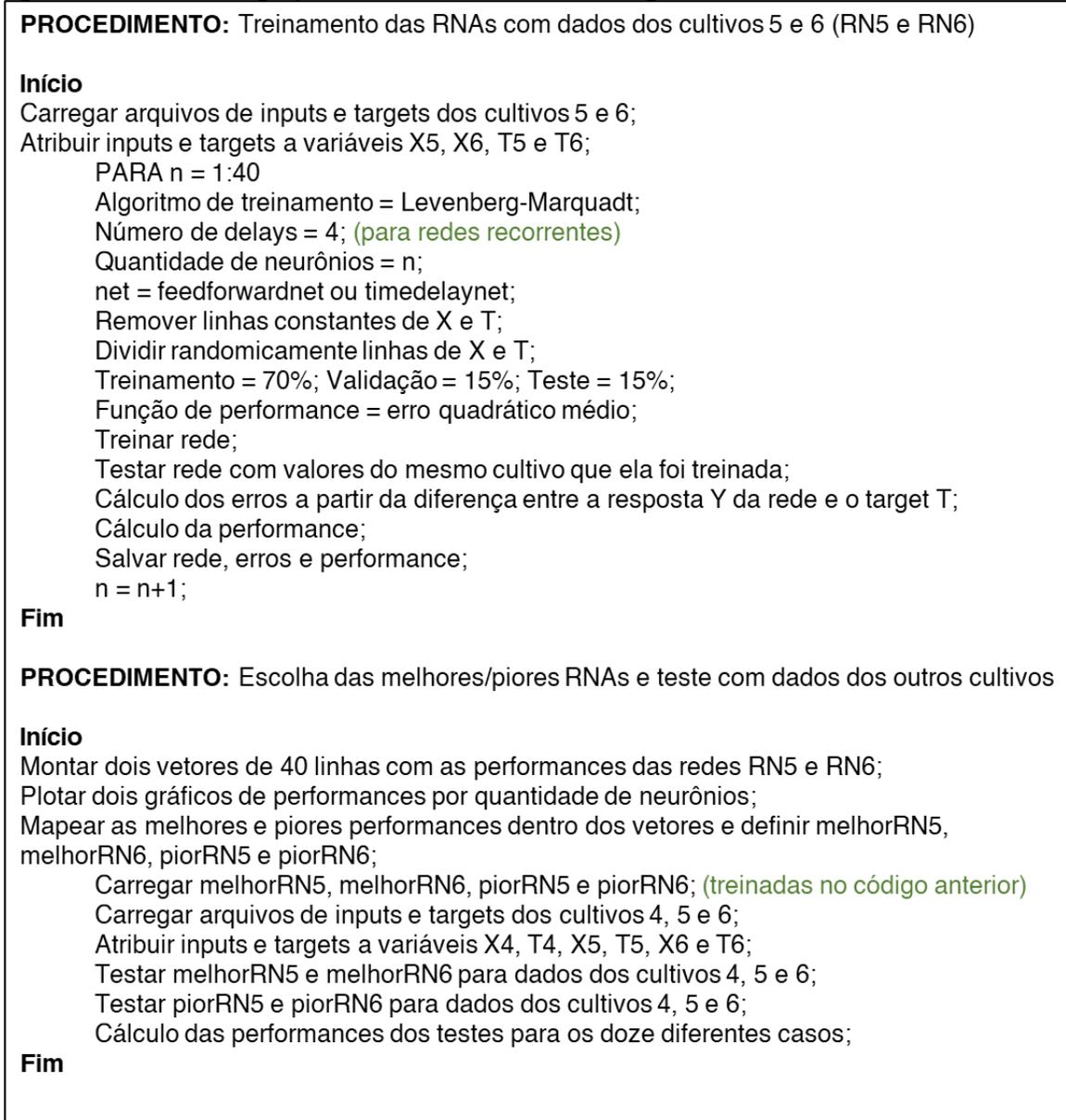
No desenvolvimento das RNA, as entradas forneciam dados de intensidade de luz RGB. Os *targets*, por sua vez, eram compostos de dados de concentração de clorofila (proporcionais a biomassa). O algoritmo de treinamento escolhido foi de Levenberg-Marquardt, função de ativação sigmoide e função de saída linear, as redes possuíam apenas uma camada oculta, o número de *delays* das redes recorrentes foi de 4 passos e os dados foram randomicamente divididos na proporção 70% treinamento, 15% validação e 15% teste. A função para determinar a performance das redes foi o erro quadrático médio, equação 11.

$$EQM = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{\theta}_i - \theta_i)^2 \quad (11)$$

Em que N é o número total de amostras, i é uma amostra específica, $\hat{\theta}$ é o valor verdadeiro e θ o valor estimado.

Para cada um dos 4 testes citados anteriormente foram criadas RNA com quantidade de neurônios variando de 1 a 40. Escolheu-se treinar as redes com informações dos cultivos 5 e 6 e então utilizá-las para tentar prever valores dos cultivos 4, 5 e 6. Optou-se por excluir o cultivo 4 do treinamento das redes por conta do ruído excessivo que se apresentou nos dados de intensidade de luz desse cultivo. As redes com as melhores e piores performances, dentre aquelas com números de neurônio de 1 a 40, eram escolhidas e testadas em dados dos outros cultivos (dados que, evidentemente, não foram utilizados para treiná-las). Dessa forma foi possível comparar o desempenho de redes mais precisas (RN+) e redes menos precisas (RN-). Na Figura 5, a seguir, é possível verificar o pseudocódigo utilizado para desenvolver toda lógica descrita acima. Os códigos verdadeiros podem ser encontrados no Apêndice A ao final.

Figura 5 - Pseudocódigo para o desenvolvimento da lógica de treinamento e teste das RNA



Fonte: Acervo pessoal

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

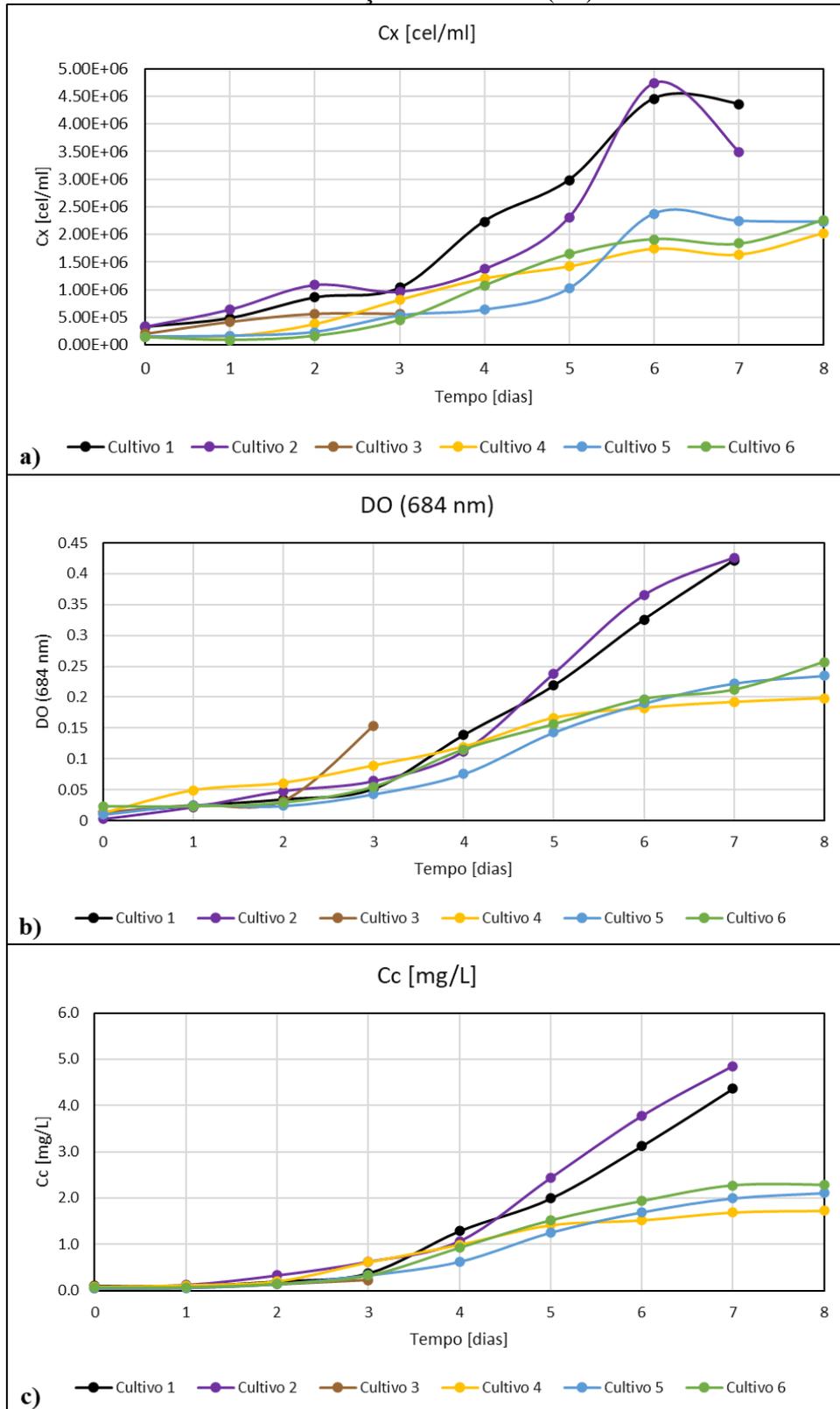
4.1 Avaliação dos dados experimentais, elaboração de *targets* e entradas

Nesta seção, serão apresentados os resultados da avaliação dos dados de cultivo, da elaboração de *targets* pelos três métodos descritos na metodologia e da definição de entradas para as redes neurais.

4.1.1 Resultados da avaliação dos dados experimentais

Como se observa na Figura 6, a seguir, os 3 primeiros cultivos obtiveram resultados de biomassa (representados por concentração celular, DO e Cc) com tendências de crescimento distintas quando comparadas com os resultados dos últimos 3 cultivos.

Figura 6 - Resultados de crescimento de biomassa para os 6 cultivos realizados. a) Resultados de concentração celular; b) Resultados de densidade ótica (DO); c) Resultados de concentração de clorofila (Cc)



Fonte: Acervo pessoal

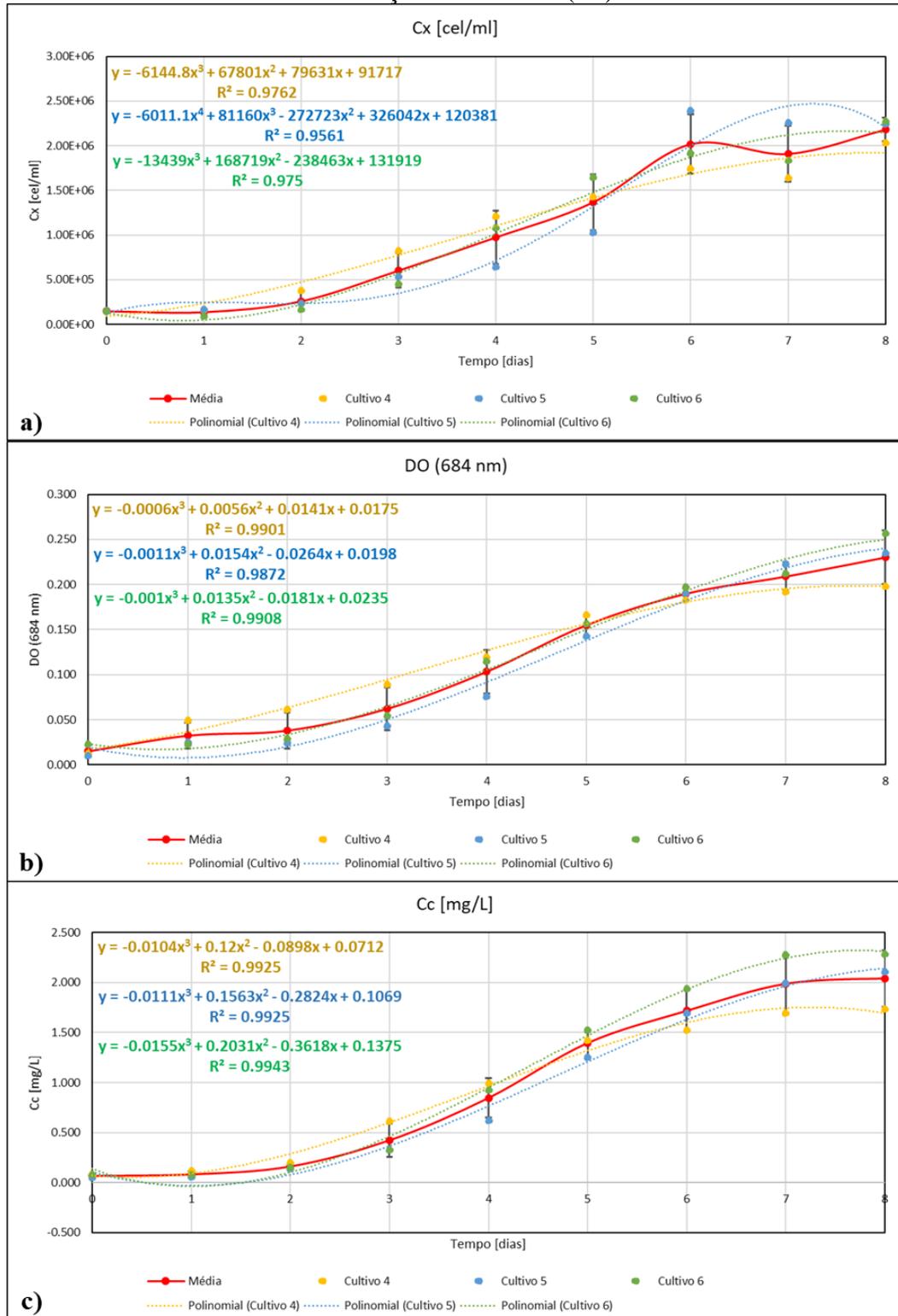
Primeiramente, é notável que o cultivo 3 teve uma duração menor de apenas 3 dias, por motivo de falta de energia no prédio. Os cultivos 1 e 2, por sua vez, não apresentam a tendência esperada de redução de crescimento nos dias finais de operação. Tal comportamento foi observado por conta da metodologia de amostragem utilizada no fotobiorreator. Todas as amostragens foram realizadas com o auxílio de uma pipetadora de borracha, também conhecida como pera de sucção. Caso a pressão de sucção aplicada pelo operador fosse muito elevada, acabava ocorrendo a suspensão do corpo de fundo e, portanto, uma concentração no frasco de amostragem superior à concentração real no seio do fluido contido no reator. Com isso em vista, as amostragens dos cultivos subsequentes foram realizadas com sucção inferior, de modo a representar a concentração real. Por conseguinte, nota-se que os resultados dos cultivos 4, 5 e 6 apresentam o comportamento previsto de redução de velocidade de crescimento e, portanto, foram escolhidos para o treinamento das RNA.

4.1.2 Resultados da elaboração de *targets* por interpolação dos dados de biomassa

Os resultados das interpolações polinomiais aplicadas aos dados experimentais de biomassa podem ser observados a seguir na Figura 7. Além dos polinômios de interpolação, apresentados em linha pontilhada, também pode-se observar em vermelho a média dos dados experimentais para uma visualização mais clara da tendência dos dados de cultivo.

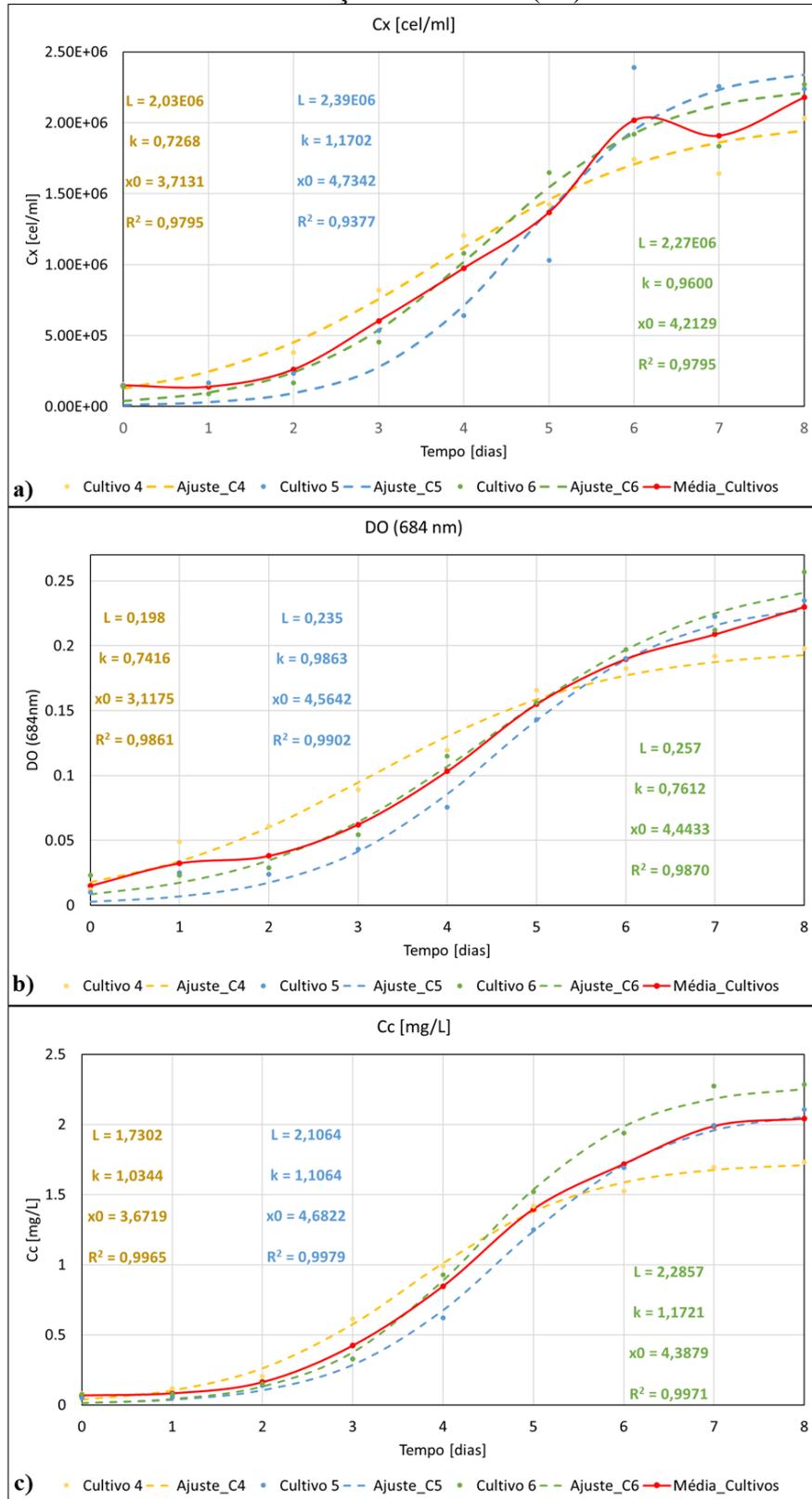
Ao avaliar os gráficos da Figura 7, é evidente que os valores de concentração de clorofila apresentam comportamento mais previsível, portanto regressões polinomiais que se ajustam melhor aos dados experimentais. Contudo, apesar de altos valores de R^2 , percebe-se que nos 3 gráficos a tendência dos dias iniciais não representa o comportamento real do crescimento de microalgas. Além disso, o critério quase subjetivo na escolha da ordem dos polinômios a serem aplicados torna a opção pela regressão polinomial questionável. Por conta desses fatores, foi avaliada a aplicação da função logística, equação 4 apresentada anteriormente, para tentar descrever com mais precisão a tendência dos dados experimentais. Esses ajustes estão apresentados na Figura 8.

Figura 7 - Regressão polinomial para os resultados de biomassa dos cultivos 4, 5 e 6. a) Resultados de concentração celular; b) Resultados de densidade ótica (DO); c) Resultados de concentração de clorofila (Cc).



Fonte: Acervo pessoal

Figura 8 - Ajuste por função logística dos resultados de biomassa dos cultivos 4, 5 e 6. a) Ajustes para concentração celular; b) Ajustes para densidade ótica (DO); c) Ajustes para concentração de clorofila (Cc).



Fonte: Acervo pessoal

É evidente que a representatividade da função logística é muito mais fiel às características do crescimento das microalgas e, novamente, observa-se resultados de R^2 extremamente elevados, sobretudo para os valores de concentração de clorofila. Portanto, após análise das duas diferentes abordagens, optou-se pela utilização da função logística aplicada aos dados de concentração de clorofila para compor os *targets* de interpolação.

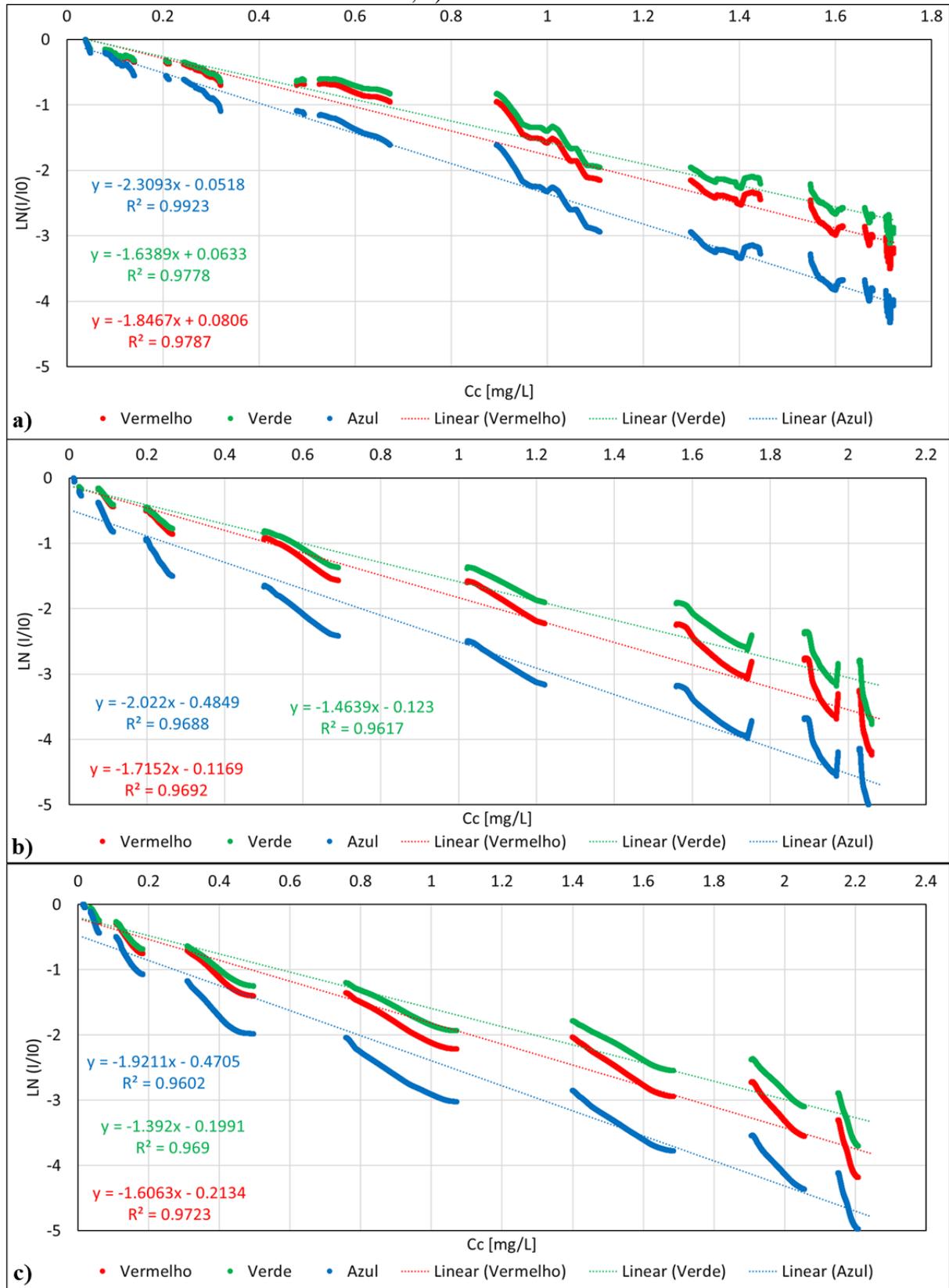
4.1.3 Resultados da elaboração de *targets* pelo modelo de Lambert-Beer

Apesar dos altos valores de R^2 obtidos pela interpolação dos pontos de biomassa, foi realizado o ajuste do modelo de Lambert-Beer aos dados para avaliação da tendência de crescimento quando acrescido o modelo de dispersão de luz. Os ajustes do modelo linearizado para as cores vermelha, verde e azul nos cultivos 4, 5 e 6 são observados na Figura 9.

Encontrados os parâmetros das retas referentes a cada uma das regressões lineares, foi possível então utilizá-las para o cálculo das concentrações de clorofila relativas aos outros cultivos. Como há a possibilidade de utilizar os modelos da luz vermelha, verde e azul, foi realizado o cálculo de concentração de clorofila para cada um deles e então tirado a média para obtenção do valor final. Enfim, foram testados os modelos de cada um dos cultivos (média dos ajustes do vermelho, verde e azul) para inferir a concentração de clorofila dos outros cultivos. Esses resultados estão apresentados na Figura 10, em que são comparados os três modelos com os pontos experimentais (em preto) e ajuste por interpolação da função logística (em cinza).

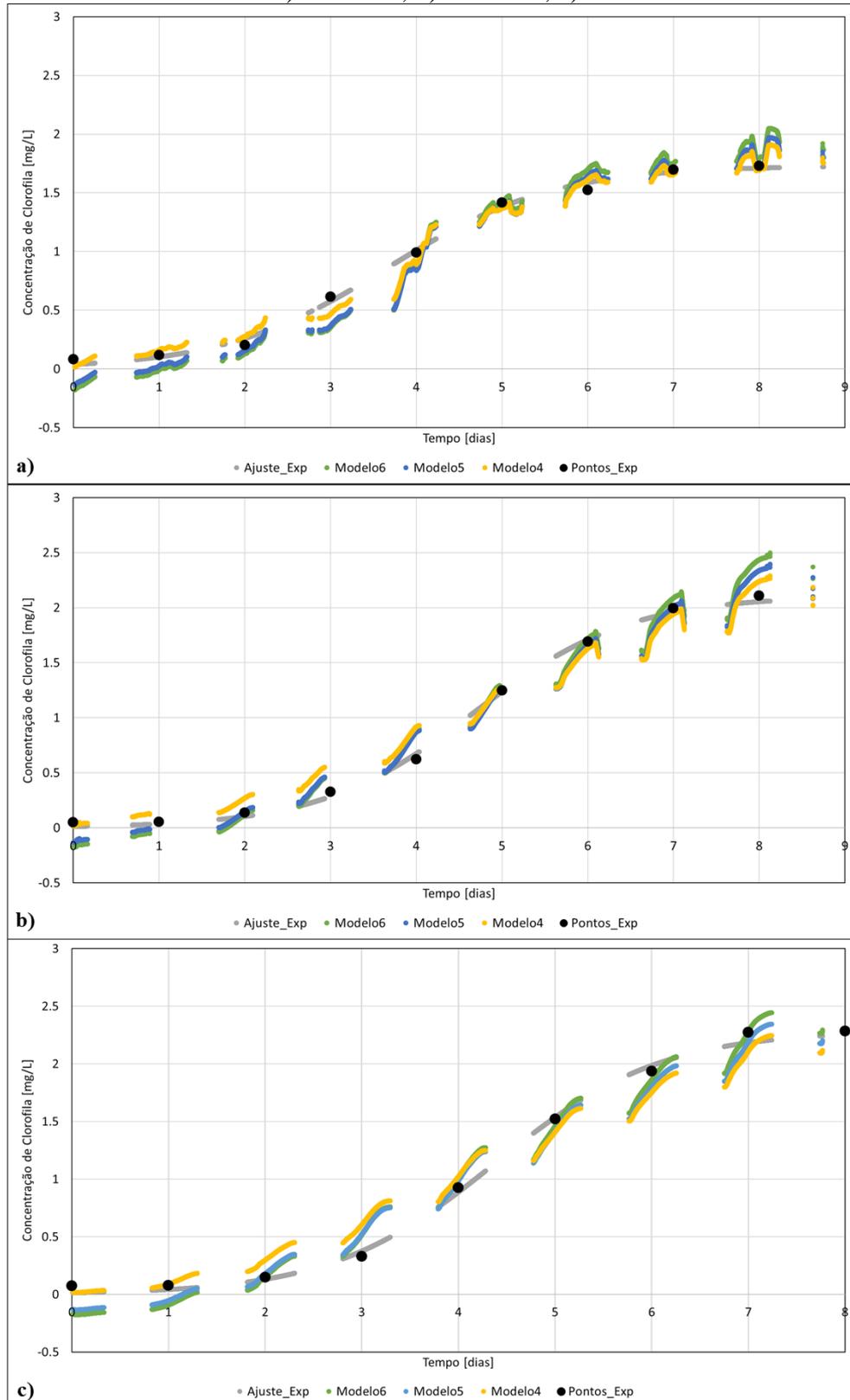
É possível verificar que o modelo apresenta de forma mais representativa os valores de crescimento de biomassa das microalgas de acordo com os diferentes períodos e condições do cultivo, portanto deve resultar em *targets* mais adequados às RNA.

Figura 9 - Ajuste Lambert-Beer linearizado para os dados dos cultivos: a) cultivo 4; b) cultivo 5; c) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

Figura 10 - Teste dos modelos de Lambert-Beer linearizado em relação aos resultados de interpolação por função logística e aos dados experimentais de concentração de clorofila dos cultivos: a) cultivo 4; b) cultivo 5; c) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

4.1.4 Resultados da elaboração de *targets* pelo modelo cinético e balanço de massa

Em congruência ao que foi previamente exposto na seção 3.3.4 deste trabalho, o modelo cinético avaliado foi desenvolvido a partir da inserção da equação de atenuação de luz de Lambert-Beer ao modelo cinético de Tamiya *et al.*, 1953 (similar a MONOD, 1949) em conjunto com o balanço diferencial de massa de biomassa para o reator batelada.

Em primeiro lugar, foi necessário o ajuste dos parâmetros μ_{\max} , σ , K_I e k_d (equações 6 a 10) aos dados experimentais de cada cultivo. Para isso foi utilizado um algoritmo de busca global, o recozimento simulado, ou “simulated annealing” (SA), estocástico desenvolvido pelo prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta no software Matlab®, seguido do algoritmo determinístico utilizado na função *lsqnonlin*. A resolução da equação diferencial proveniente do balanço de massa foi realizada através da função *ode45*, também inclusa no pacote do software.

Visto que já é sabido uma boa aproximação de σ (coeficiente angular das retas da Figura 9 divididos pelo comprimento do reator) optou-se por restringir sua variação no ajuste dos parâmetros para que a convergência do modelo fosse mais simples e para garantir que os parâmetros tivessem valores de acordo com a representação física que lhes cabe. Os valores dos parâmetros encontrados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores finais, chutes iniciais, limites superiores e inferiores dos parâmetros cinéticos e parâmetro de morte do balanço de massa

	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 6	inferior/chute/superior
μ_{\max} [d ⁻¹]	2,88	2,96	2,74	0,50/2,00/5,00
σ [L/mg.m]	17,57	17,60	17,22	17,00/17,26/18,00
K_I [lux]	910,89	394,64	294,78	50,00/2000,00/5000,00
k_d [d ⁻¹]	1,92	2,17	2,03	0,01/1,00/5,00

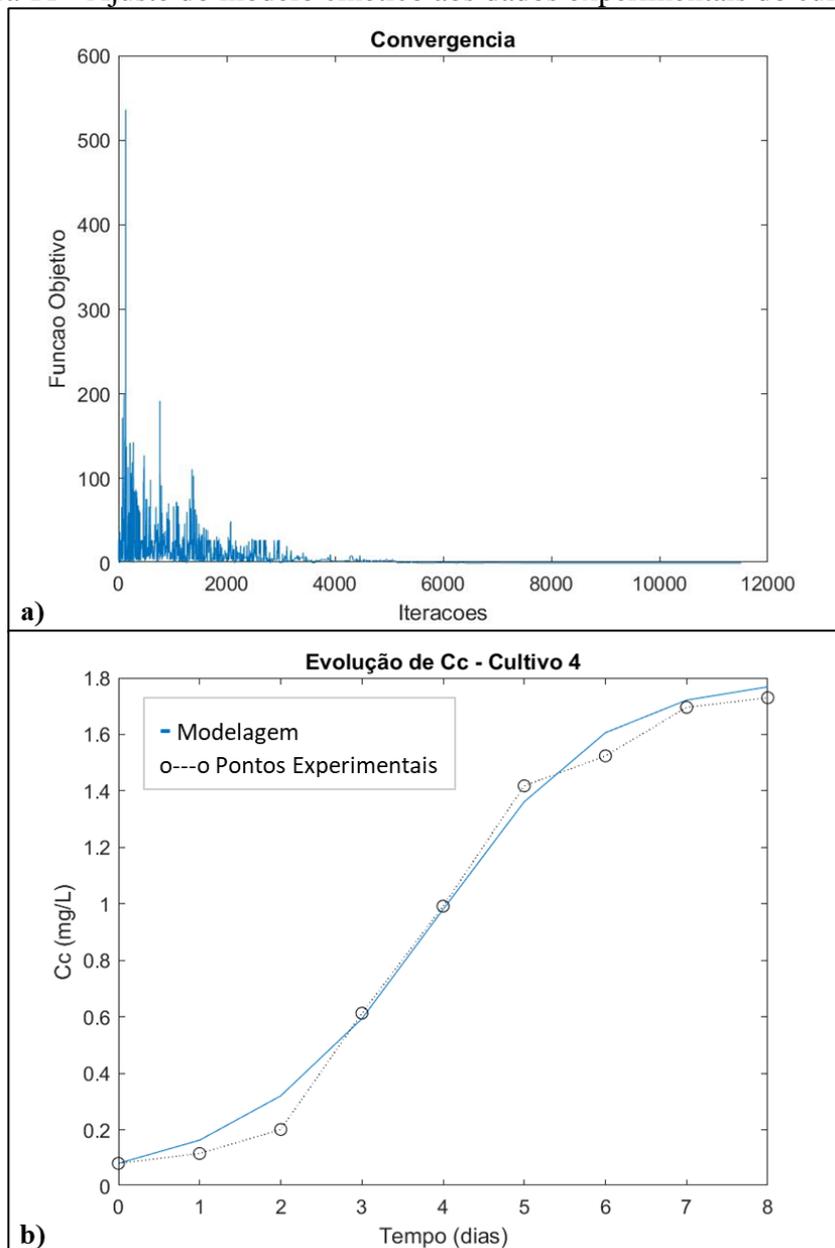
Fonte: Acervo pessoal

Ao avaliar os valores de parâmetros encontrados na literatura, de fato se nota que os valores de μ_{\max} são próximos dos encontrados por Dermoun *et al.*, 1992; Huang; Chen, 1986 e Kurano; Miyachi, 2005: $\mu_{\max}=2,00$ d⁻¹ para a microalga *Spirulina platensis*; $\mu_{\max}=2,48$ d⁻¹ para *Chlorococcum littorale* e $\mu_{\max}=1,06$ d⁻¹ para *Porphyridium cruentum*, respectivamente. Valores

de K_I em lux, por sua vez, foram descritos por Martínez Sancho; Castillo; El Yousfi, 1997 como: $K_I=1011$ lux para *Chlorella pyrenoidosa* e $K_I=708$ lux para *Chlorococcum littorale*.

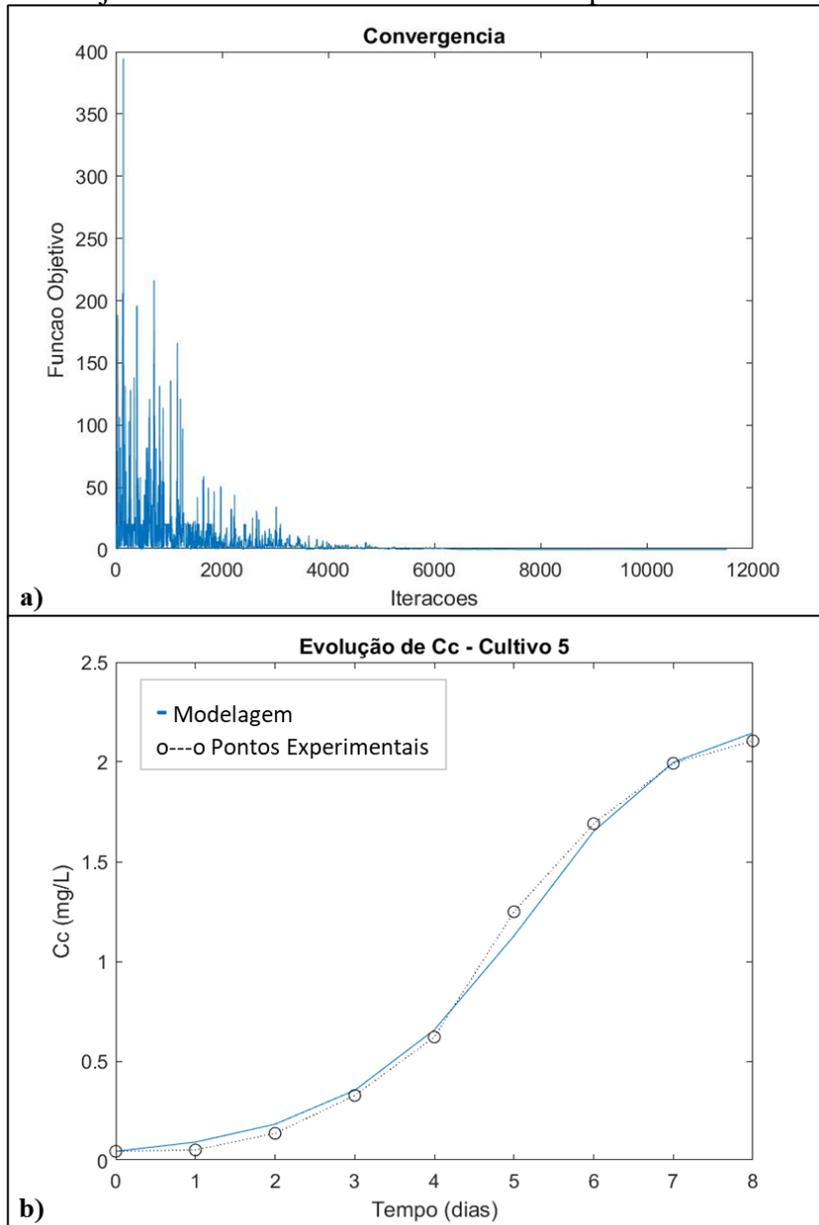
Nas Figuras 11, 12 e 13 é possível observar a tendência de redução da função objetivo (que, neste caso, corresponde à diferença entre os valores de concentração estimada e experimental sobre o desvio padrão) e também os perfis de concentração de clorofila estimado e experimental para os cultivos 4, 5 e 6.

Figura 11 - Ajuste do modelo cinético aos dados experimentais do cultivo 4



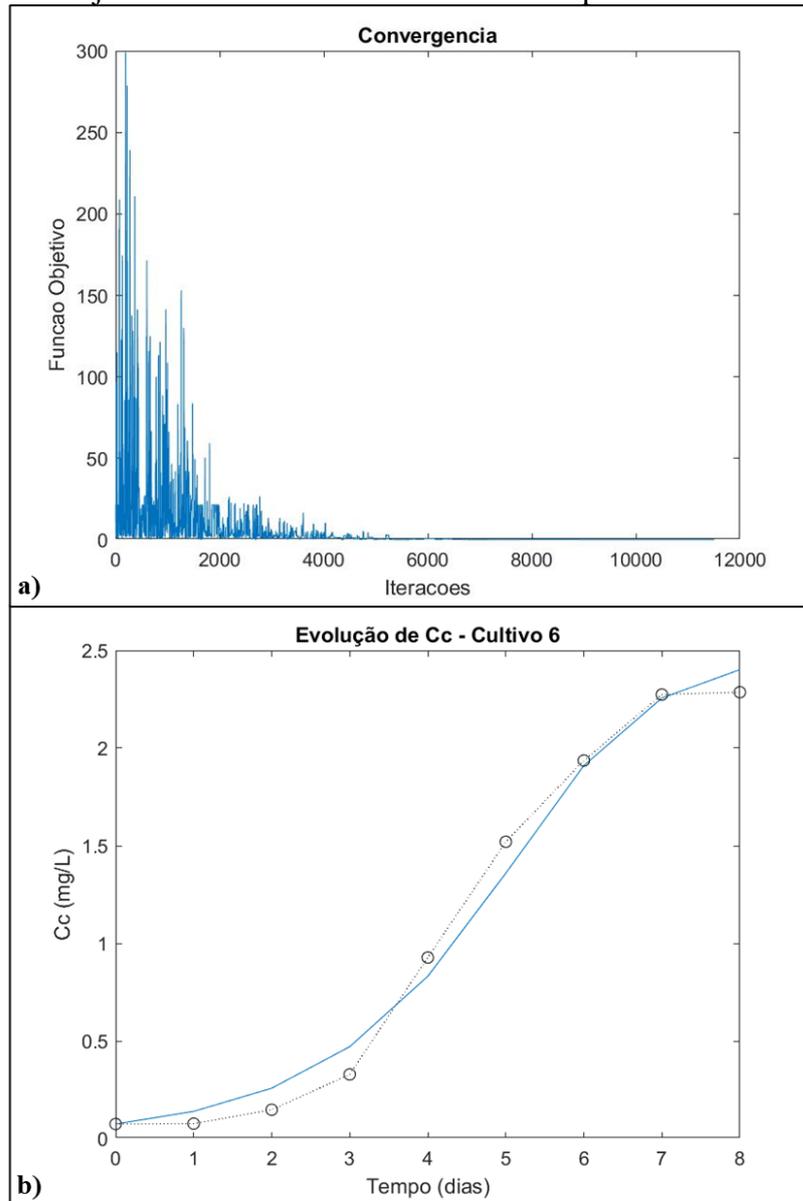
Fonte: Acervo pessoal

Figura 12 - Ajuste do modelo cinético aos dados experimentais do cultivo 5



Fonte: Acervo pessoal

Figura 13 - Ajuste do modelo cinético aos dados experimentais do cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

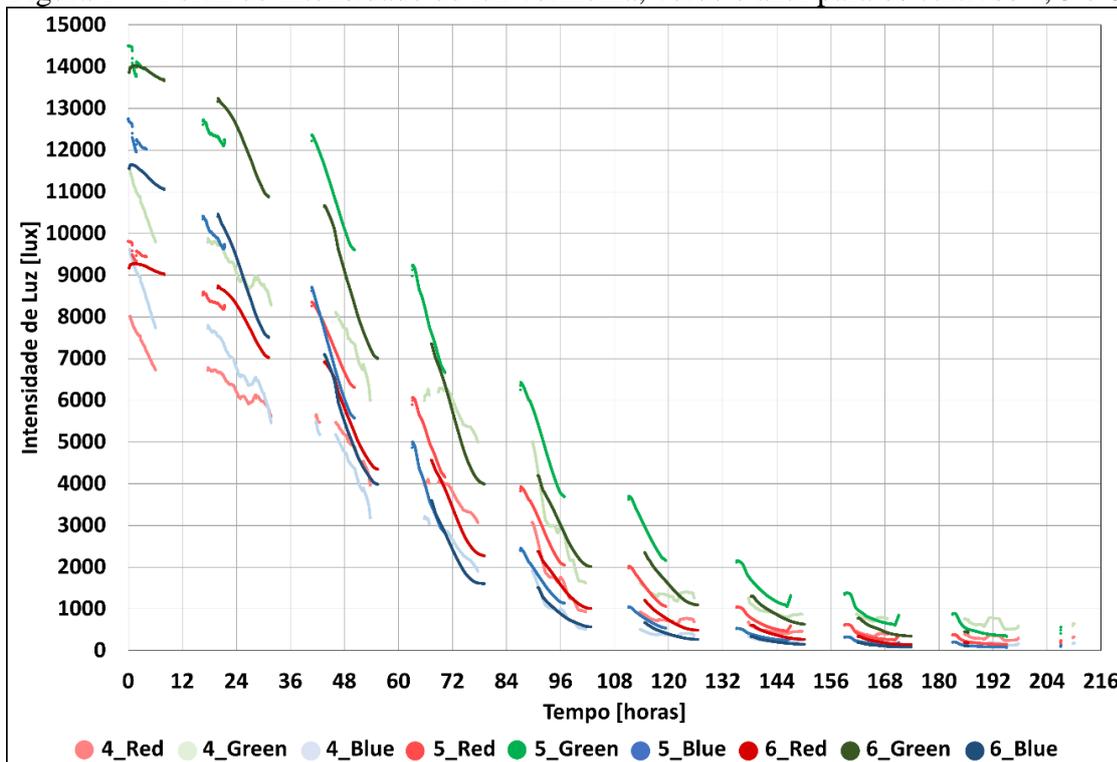
Apesar dos perfis de concentração obtidos através da modelagem se ajustarem muito bem aos pontos experimentais, assim como no caso da interpolação por função logística é evidente que o perfil descrito pela curva não representa exatamente o que é esperado do crescimento de microalgas. Esse fato se dá por conta da condição imposta à intensidade de luz incidente I_0 , contida na equação 10, que, na verdade, não é constante. Para se obter um perfil mais condizente com a realidade, seria necessário impor uma condição de I_0 variando a cada 12h. Várias tentativas e abordagens para solucionar tal problema foram testados, porém não se obteve sucesso no ajuste do modelo com tais condições. Tendo isso em vista, não serão utilizados os

resultados da modelagem para treinamento das RNA e sugere-se que trabalhos futuros sobre o tema busquem a realização da aplicação desse modelo.

4.1.5 Resultados da elaboração de entradas a partir do tratamento dos valores de intensidade de luz

Os dados tratados de intensidade de luz para as cores vermelha, verde e azul nos cultivos 4, 5 e 6, que forneceram as entradas para o treinamento das RNA podem ser observados na Figura 14 a seguir. Como já mencionado anteriormente, nota-se que os ruídos observados no cultivo 4, sobretudo nos dias iniciais, mesmo após abrandamento pela média móvel fizeram com que o perfil de intensidade se distanciasse um pouco dos perfis relativos aos cultivos 5 e 6, que são mais similares entre si. Tal fenômeno indica que redes treinadas com dados dos cultivos 5 e 6 provavelmente terão mais facilidade de prever respostas destes cultivos em detrimento do cultivo 4. Visto que a ideia do desenvolvimento de um *softsensor* é a capacidade de previsão de novos cultivos, diferentes dos previamente realizados, a distinção do cultivo 4 é benéfica para testes das RNA.

Figura 14 - Perfil de intensidade de luz vermelha, verde e azul para os cultivos 4, 5 e 6



Fonte: Acervo pessoal

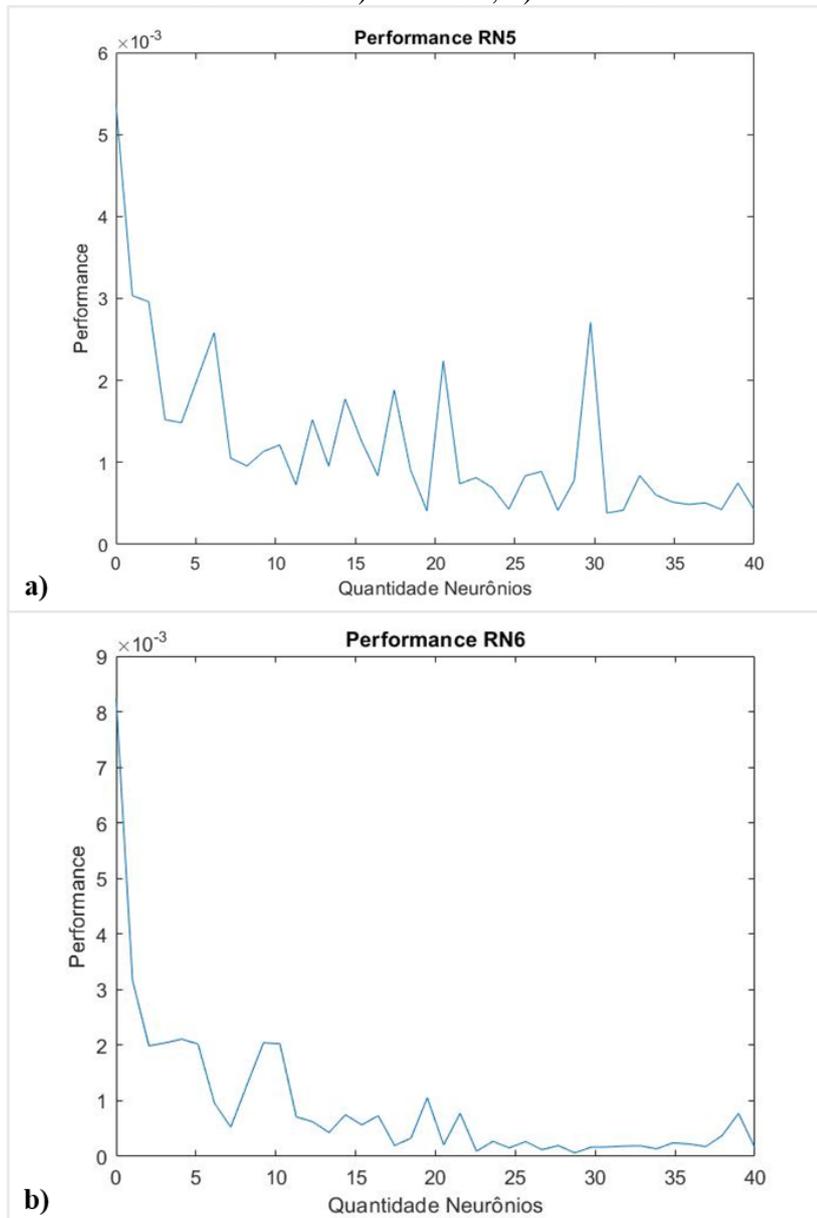
4.2 Definição das propriedades das RNA

Definidos os *targets* e entradas para treinamento das redes neurais, foram realizados os diferentes testes para escolha do melhor tipo, arquitetura e condições de treinamento das RNA. Os resultados dos quatro testes realizados estão apresentados nas subseções seguintes, a partir deles foram definidos o tipo de rede a ser utilizada, melhores características de dados de entrada, número de neurônios na camada oculta e quais cultivos utilizar para treinar e testar a rede escolhida.

4.2.1 Redes *feedforward* com entrada completa

Em primeiro lugar, observa-se na Figura 15 os valores de performance (erro quadrático médio) para as redes *feedforward* treinadas com entrada completa e número de neurônios de 1 a 40. O gráfico superior se refere às redes treinadas com dados do cultivo 5 (RN5) e o gráfico inferior às redes treinadas com dados do cultivo 6 (RN6):

Figura 15 - Performance das RNA *feedforward* com entrada completa treinadas com dados dos cultivos: a) cultivo 5; b) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

É evidente que há uma tendência na redução dos erros entre as saídas das redes e as respostas esperadas conforme o número de neurônios da camada oculta é aumentado, sendo que a queda é mais acentuada no acréscimo até 10 neurônios. Essa tendência é observada sobretudo nas redes treinadas com dados do cultivo 6. É importante notar, contudo, que mesmo as redes mais simples, compostas de apenas um neurônio na camada oculta, apresentam performance muito boa ao prever os valores de concentração de clorofila no reator (erro na faixa de 10^{-3}). Erros pequenos como os que foram observados na Figura 15 eram esperados, visto que essas

RNA estavam prevendo o comportamento do próprio cultivo cujas informações foram usadas para treiná-las. É fundamental agora verificar se essas redes são aptas a descrever de forma precisa o comportamento dos outros cultivos. Para isso, foram escolhidas as redes RN5 e RN6 mais e menos precisas, ou seja: RN5+ é a rede com 31 neurônios; RN6+ é a rede com 29 neurônios; RN5- é a rede com 1 neurônio e a RN6- também é a rede com 1 neurônio.

Escolhidas as RNA a serem testadas, observa-se na Tabela 5 a seguir as performances (erro quadrático médio) de cada uma das redes quando utilizadas para prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6:

Tabela 5 - Performances das melhores e piores RN5 e RN6 (feedforward completo) ao prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6

	RN5+	RN5-	RN6+	RN6-
Cultivo 4	4,4767	0,0326	17,7542	0,0711
Cultivo 5	$3,83 \times 10^{-4}$	0,0054	1,1721	0,0172
Cultivo 6	4,7638	0,0195	$6,43 \times 10^{-5}$	0,0082

Fonte: Acervo pessoal

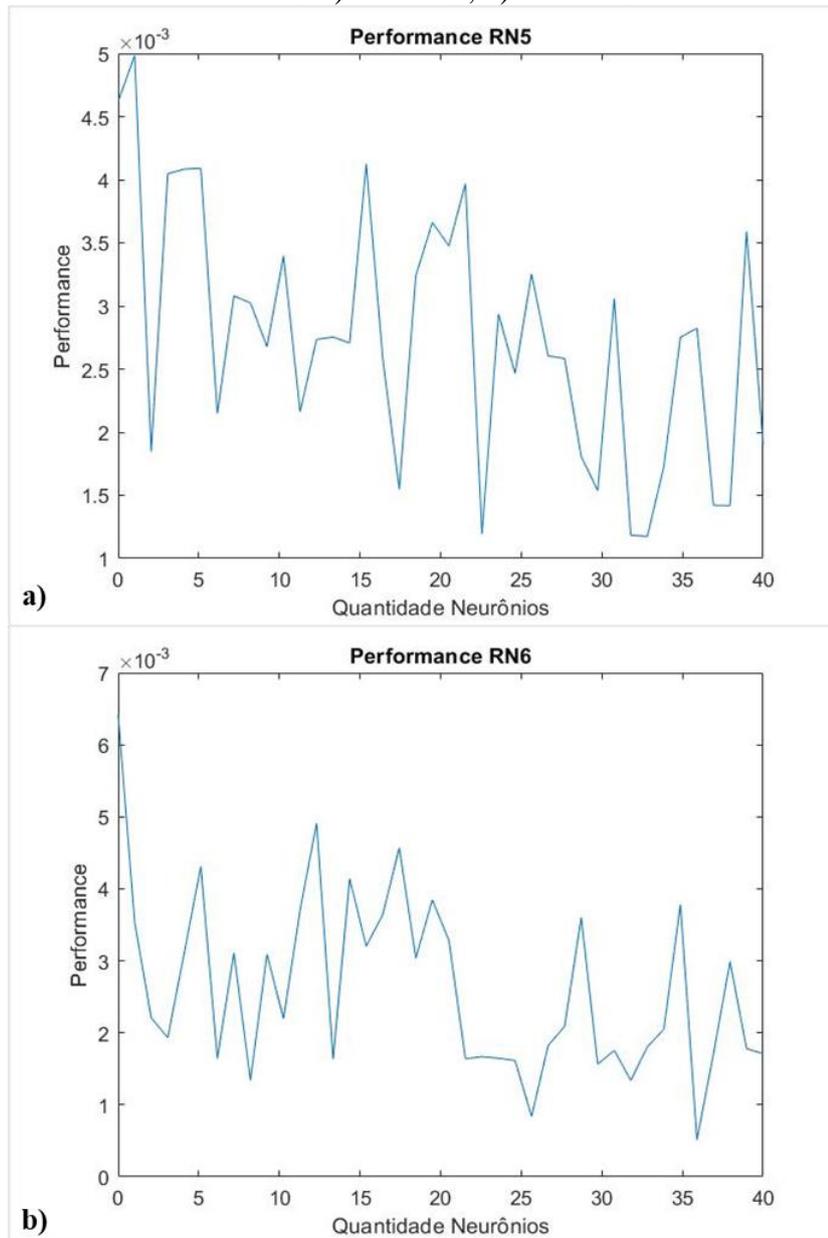
Os resultados obtidos indicam explicitamente que as redes RN+ não obtêm bons resultados ao serem aplicadas a cultivos diferentes. Isso ocorre pois, apesar de serem mais precisas, não foram treinadas com uma quantidade de dados suficiente para que possam prever comportamentos mais generalistas, além daquele que foi apresentado pelos seus dados de treinamento.

Em vista das respostas observadas, já há um indicativo de que redes mais complexas (com grande quantidade de neurônios) não acrescentam grandes melhorias de performance e que possivelmente devem ser treinadas com dados de diferentes cultivos para apresentar generalização mais efetiva.

4.2.2 Redes *feedforward* com entrada reduzida

São apresentadas nesta seção os resultados das RNA do tipo *feedforward* alimentadas por entradas com quantidade de dados reduzida. As performances das RN5 e RN6 com diferentes quantidades de neurônios podem ser observadas na Figura 16 a seguir:

Figura 16 - Performance das RNA *feedforward* com entrada reduzida treinadas com dados dos cultivos: a) cultivo 5; b) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

Diferentemente do tópico anterior, neste caso não é observada uma tendência na redução dos erros conforme o aumento do número de neurônios. Ainda assim, novamente todas as redes apresentaram altas performances ao preverem os valores de concentração de clorofila (erro na faixa de 10^{-3}). As redes RN+ e RN- determinadas foram: RN5+ com 33 neurônios; RN6+ com 36 neurônios; RN5- com 2 neurônios e RN6- com 1 neurônio. A Tabela 6, a seguir, apresenta as performances de cada uma dessas redes quando utilizadas para prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6:

Tabela 6 - Performances das melhores e piores RN5 e RN6 (*feedforward* reduzido) ao prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6

	RN5+	RN5-	RN6+	RN6-
Cultivo 4	2,3057	0,0471	18,5589	0,0619
Cultivo 5	0,0012	0,0050	13,6833	0,0172
Cultivo 6	1,2941	0,0180	$5,15 \times 10^{-4}$	0,0064

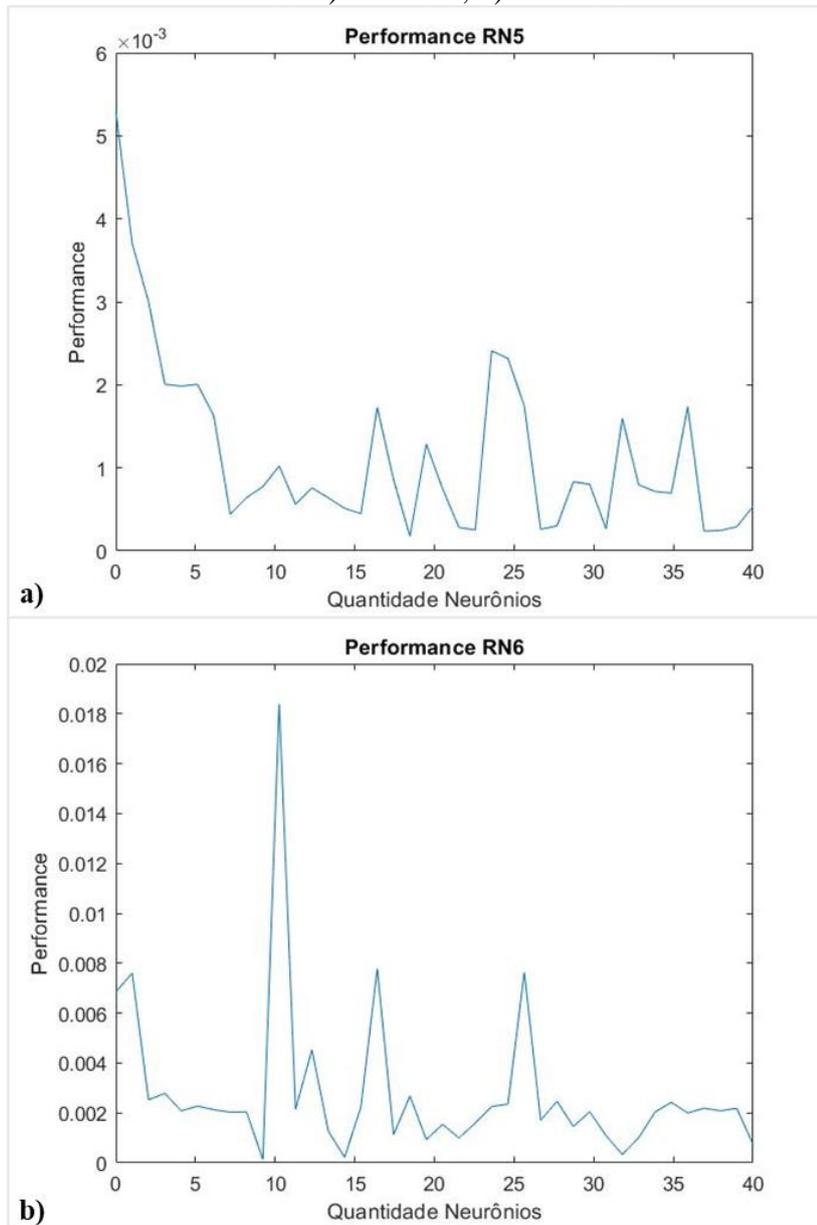
Fonte: Acervo pessoal

Quando comparados aos resultados anteriores, os valores da Tabela 6 indicam que não houve uma melhora significativa na performance da RNA quando alimentadas com quantidades de dados reduzidas. Até então, ao que parece de acordo com a investigação realizada, as redes *feedforward* não estão conseguindo melhorar as generalizações a partir dos dados de treinamento e a quantidade de valores de entrada não influencia significativamente na qualidade das respostas das redes.

4.2.3 Redes recorrentes com entrada completa

Serão apresentados agora os resultados obtidos com a utilização de RNA recorrentes alimentadas com a quantidade completa de dados na entrada. As performances das redes com diferentes quantidades de neurônios são apresentadas na Figura 17 a seguir:

Figura 17 - Performance das RNA recorrentes com entrada completa treinadas com dados dos cultivos: a) cultivo 5; b) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

Novamente para redes com camadas ocultas com menos de 10 neurônios observa-se a redução mais acentuada do erro quadrático médio (assim como no caso das redes *feedforward* com entrada completa). Redes com quantidades maiores de neurônios, por sua vez, apresentam performances sem tendência observável. As redes RN+ e RN- determinadas foram: RN5+ com 19 neurônios; RN6+ com 10 neurônios; RN5- com 1 neurônio e RN6- com 11 neurônios. As performances dessas redes na inferência de valores para os diferentes cultivos estão contidas na Tabela 7:

Tabela 7 - Performances das melhores e piores RN5 e RN6 (recorrente completo) ao prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6

	RN5+	RN5-	RN6+	RN6-
Cultivo 4	1,4161	0,0321	39,2197	5,2376
Cultivo 5	$1,76 \times 10^{-4}$	0,0053	0,4453	0,1071
Cultivo 6	1,7753	0,0194	$1,28 \times 10^{-4}$	0,0184

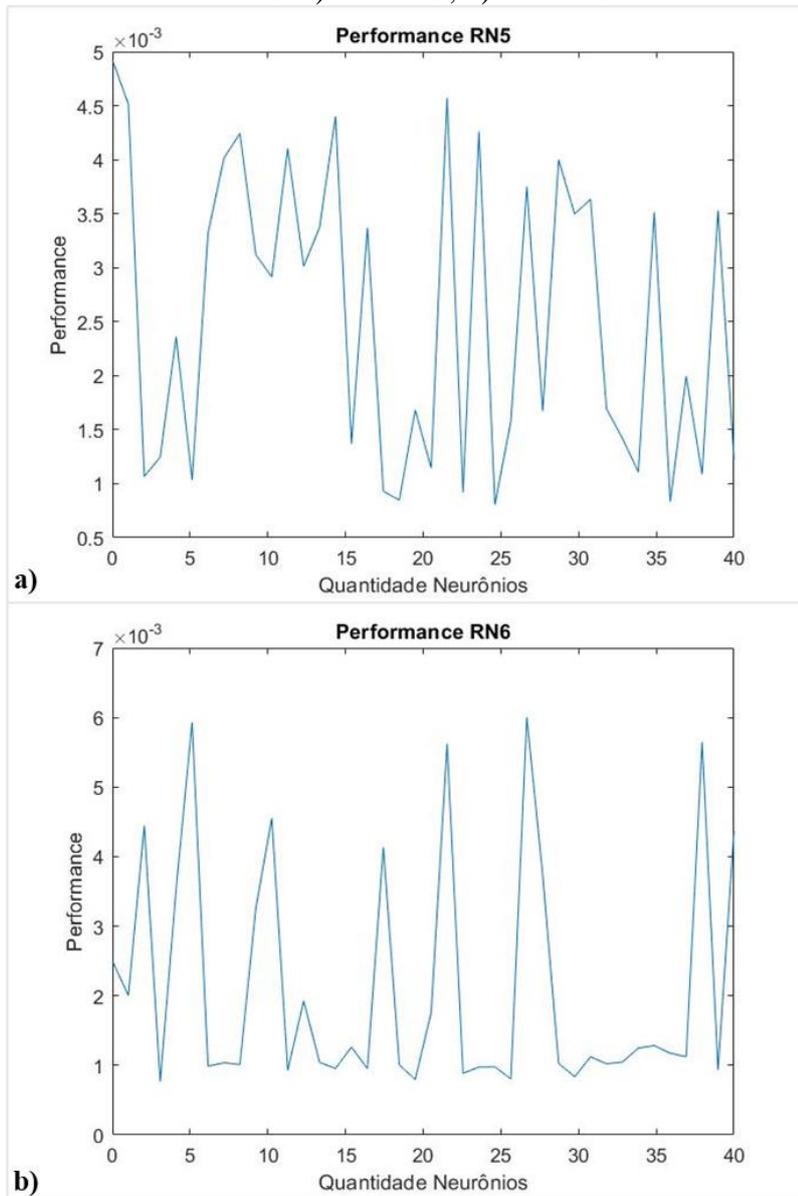
Fonte: Acervo pessoal

Avaliando as informações da tabela, é perceptível que a mudança do tipo de RNA não interferiu substancialmente no perfil dos resultados. Novamente as redes mais precisas não conseguiram apresentar generalizações aceitáveis e seguem menos efetivas que as redes simples RN-.

4.2.4 Redes recorrentes com entrada reduzida

Por fim, são apresentados os resultados das RNA recorrentes com entrada reduzida. A influência da variação da quantidade de neurônios na camada oculta das redes é mostrada a seguir na Figura 18:

Figura 18 - Performance das RNA recorrentes com entrada reduzida treinadas com dados dos cultivos: a) cultivo 5; b) cultivo 6



Fonte: Acervo pessoal

Similarmente às RNA *feedforward* com entrada reduzida, os gráficos da Figura 18 também não apresentam uma tendência de redução dos erros com o aumento de neurônios. Neste caso as redes selecionadas foram: RN5+ com 25 neurônios; RN6+ com 4 neurônios; RN5- com 1 neurônio e RN6- com 27 neurônios. As performances quando aplicadas aos três diferentes cultivos estão exibidas na Tabela 8:

Tabela 8 - Performances das melhores e piores RN5 e RN6 (recorrente reduzido) ao prever dados de concentração de clorofila dos cultivos 4, 5 e 6

	RN5+	RN5-	RN6+	RN6-
Cultivo 4	1,0412	0,0500	2,7305	0,0616
Cultivo 5	$8,07 \times 10^{-4}$	0,0049	0,1217	0,0190
Cultivo 6	0,8976	0,0191	$7,68 \times 10^{-4}$	0,0060

Fonte: Acervo pessoal

Como era esperado, novamente as redes mais precisas só obtiveram resultados satisfatórios ao serem avaliadas com dados do próprio cultivo e se mostraram pouco efetivas quando submetidas a novos conjuntos de dados provenientes de outros cultivos. Para que seja possível uma melhor visualização e comparação entre os resultados dos 4 diferentes testes, a Tabela 9 expõe um compilado das informações.

Tabela 9 - Comparativo entre os resultados dos 4 diferentes testes com RNA

Teste RNA	Cultivo	RN5+	RN5-	RN6+	RN6-
<i>Feedforward</i> Completo	Cultivo 4	4,4767	0,0326	17,7542	0,0711
	Cultivo 5	$3,83 \times 10^{-4}$	0,0054	1,1721	0,0172
	Cultivo 6	4,7638	0,0195	$6,43 \times 10^{-5}$	0,0082
<i>Feedforward</i> Reduzido	Cultivo 4	2,3057	0,0471	18,5589	0,0619
	Cultivo 5	0,0012	0,0050	13,6833	0,0172
	Cultivo 6	1,2941	0,0180	$5,15 \times 10^{-4}$	0,0064
Recorrente Completo	Cultivo 4	1,4161	0,0321	39,2197	5,2376
	Cultivo 5	$1,76 \times 10^{-4}$	0,0053	0,4453	0,1071
	Cultivo 6	1,7753	0,0194	$1,28 \times 10^{-4}$	0,0184
Recorrente Reduzido	Cultivo 4	1,0412	0,0500	2,7305	0,0616
	Cultivo 5	$8,07 \times 10^{-4}$	0,0049	0,1217	0,0190
	Cultivo 6	0,8976	0,0191	$7,68 \times 10^{-4}$	0,0060

Fonte: Acervo pessoal

A partir das informações apresentadas na Tabela 9 é perceptível que as redes mais precisas não são adequadas para a inferência de dados de cultivos diferentes daqueles utilizados para treiná-las. Também é evidente que a alteração do tipo de rede neural, *feedforward* ou recorrente, não traz melhora significativa aos resultados. Nota-se, por exemplo, que os melhores

resultados (destacados em vermelho) são obtidos por diferentes tipos de rede para cada um dos cultivos. A melhor previsão para os dados do cultivo 4 foi feita pela RN5 recorrente com entrada completa; a melhor previsão para o cultivo 5 foi realizada pela RN6 recorrente com entrada reduzida e, por fim, a melhor previsão para os dados do cultivo 6 foi obtida pela RN5 *feedforward* com entrada reduzida. Obviamente que não estão sendo levados em conta os resultados das redes treinadas e testada com dados do mesmo cultivo.

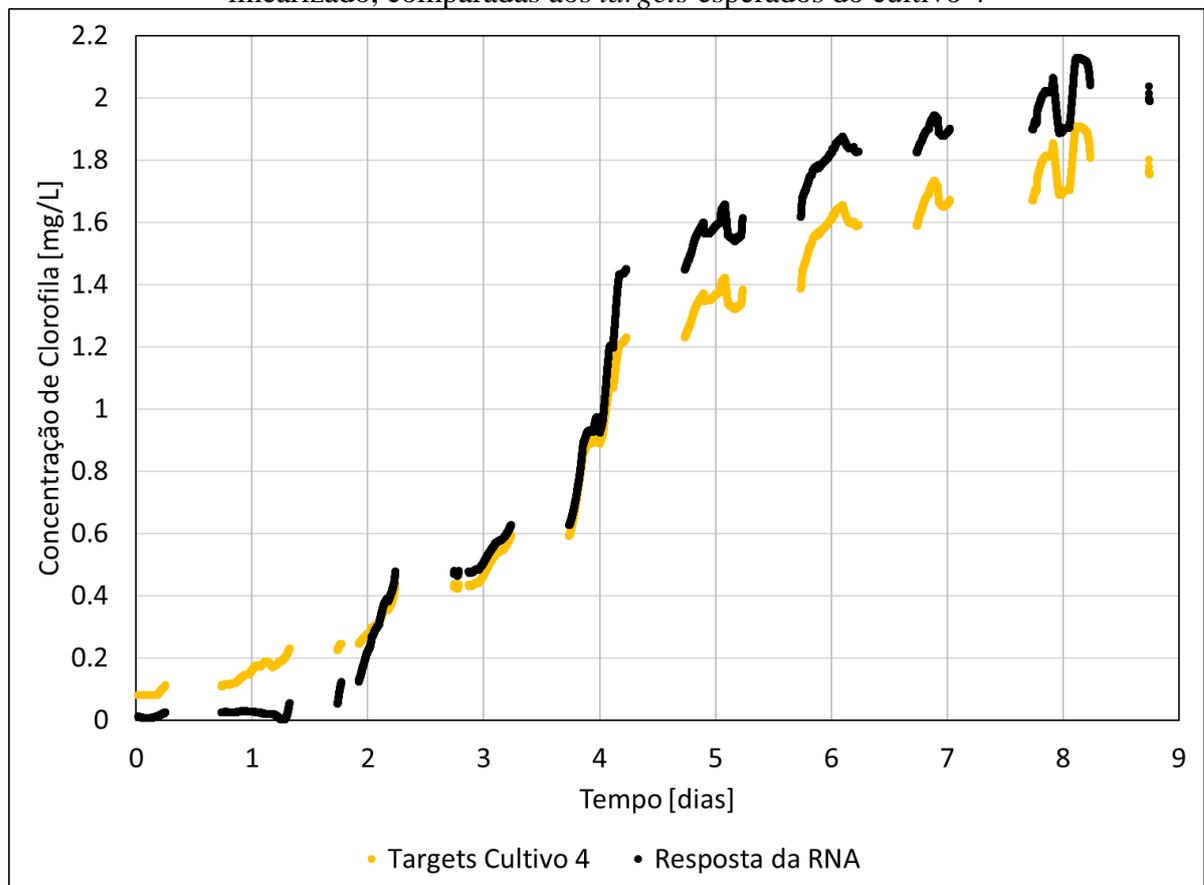
A tendência mais notável ao se observar os resultados é o melhor desempenho obtido pelas redes mais simples (RN-) quando utilizadas para prever valores de cultivos distintos. Em geral são redes de poucos neurônios, 1 por exemplo, que fazem generalizações razoáveis. Avaliando os resultados de forma quantitativa, apesar das respostas das melhores RNA parecerem adequadas por conta de seus valores próximos a zero, é preciso se atentar aos pontos iniciais dos cultivos. Nos primeiros dias de cultivo a concentração de microalgas é muito baixa, portanto, pequenas variações de aferição podem representar erros percentuais significativos. Além disso, surge também a necessidade da reflexão se essas redes treinadas com tão poucos neurônios e valores de entrada de fato são adequadas e acuradas. A resposta é que não, elas não receberam a quantidade de informações suficientes para apresentarem resultados de saída robustos e representativos de uma gama de possibilidades de cultivos. A melhor opção, portanto, é treinar redes com entradas completas e informações de mais de um cultivo (RN56, treinada com entradas dos cultivos 5 e 6) para avaliar se a inferência para os dados do cultivo remanescente, cultivo 4, se mostra adequada. É natural que quanto mais cultivos forem realizados, mais informações podem ser utilizadas para o treinamento da RNA e melhor deve ser a sua resposta. Neste momento foram utilizados os dados de dois cultivos para treinamento, quantidade de neurônios igual a 8 (baseado nas tendências observadas nas Figuras 15 e 17) e tipo de rede *feedforward*.

4.3 Desempenho da RNA *feedforward*, com 8 neurônios, treinada com dados dos cultivos 5 e 6 para previsão dos valores do cultivo 4

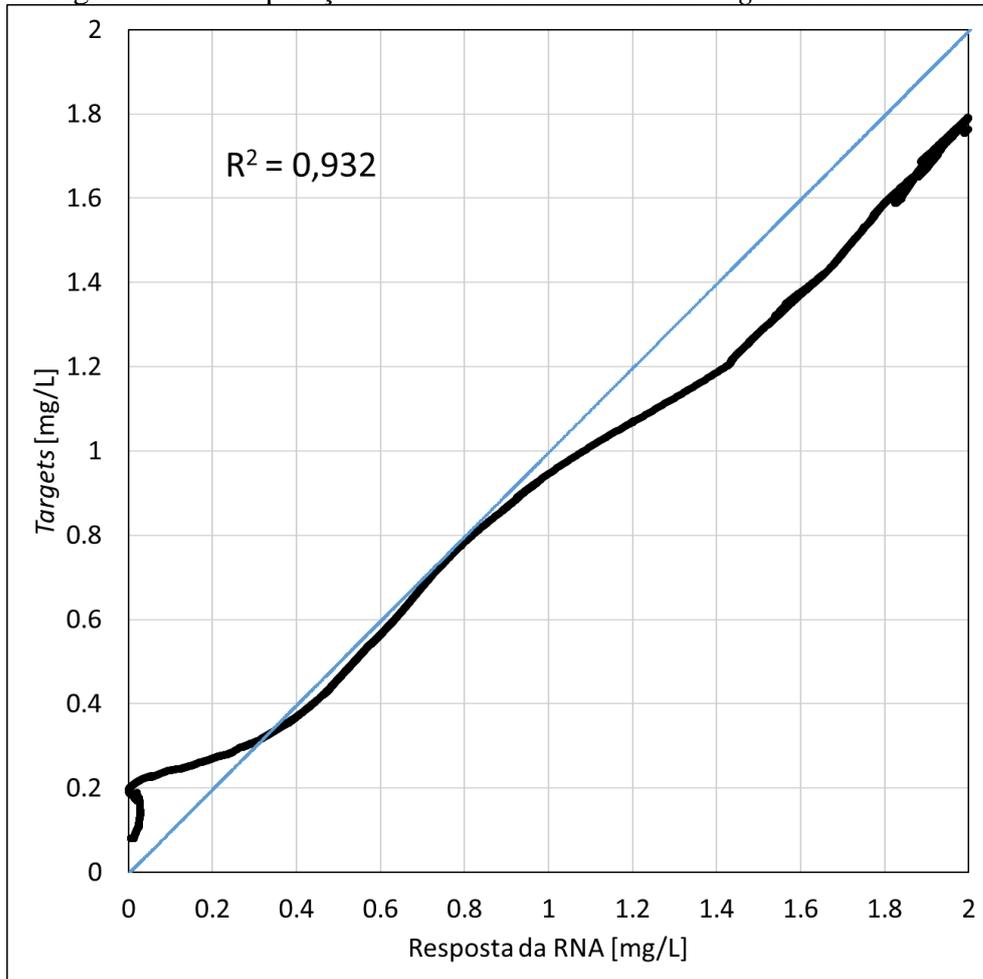
Definidas as características e arquitetura da RNA a ser testada, foi possível a realização de seu treinamento e testes de performance. Como descrito anteriormente, a rede foi treinada com dados dos cultivos 5 e 6 e sua performance final testada com dados do cultivo 4. As respostas da rede, em comparação aos *targets* esperados podem ser observados nas Figuras 19 e 20 a seguir. Nota-se que o perfil de saídas da RNA está de acordo com a tendência dos valores

apresentados pelo cultivo 4. Além disso, o EQM calculado neste caso foi de 0,0278, o que indica que a rede foi mais precisa do que as que haviam sido testadas para o cultivo 4 até então. Já o valor de R^2 , apresentado na Figura 20, está congruente com os trabalhos de Sharon Mano Pappu; Vijayakumar; Ramamurthy, 2013; Supriyanto *et al.*, 2019; Susanna *et al.*, 2019 citados previamente na seção 2.2.2 deste estudo.

Figura 19 – Resultados de saída da RNA56, treinada com entradas por Lambert-Beer linearizado, comparadas aos *targets* esperados do cultivo 4



Fonte: Acervo pessoal

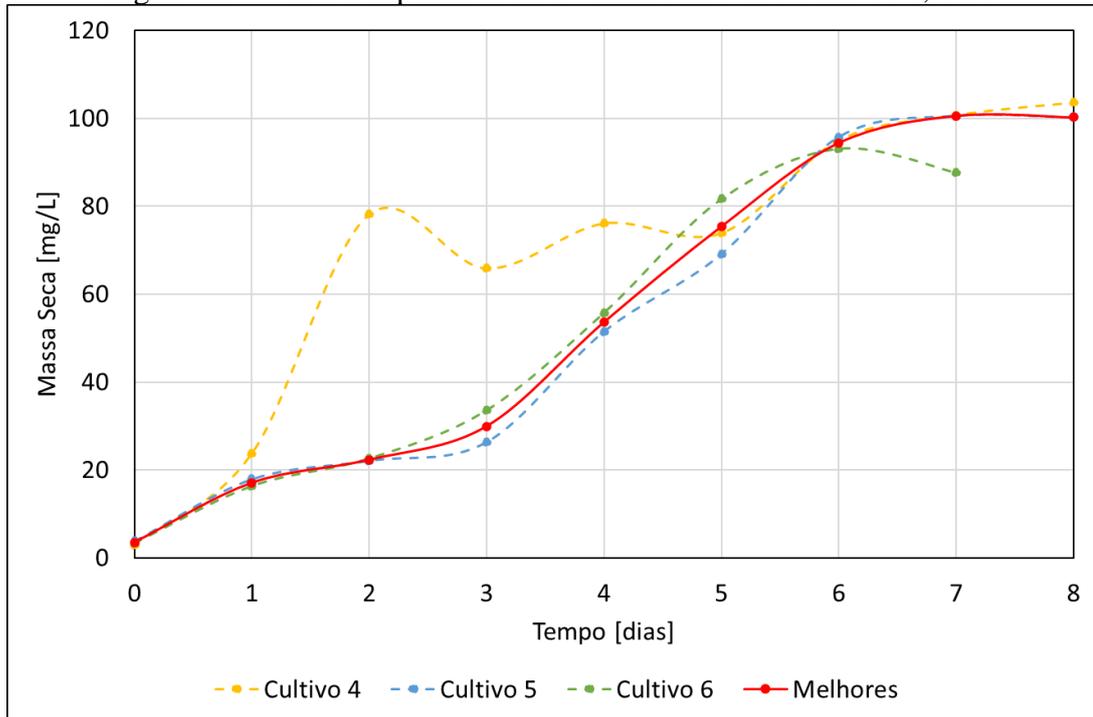
Figura 20 – Comparação entre saídas da RNA56 e *targets* do cultivo 4

Fonte: Acervo pessoal

4.4 Correlação da concentração de clorofila com a massa seca

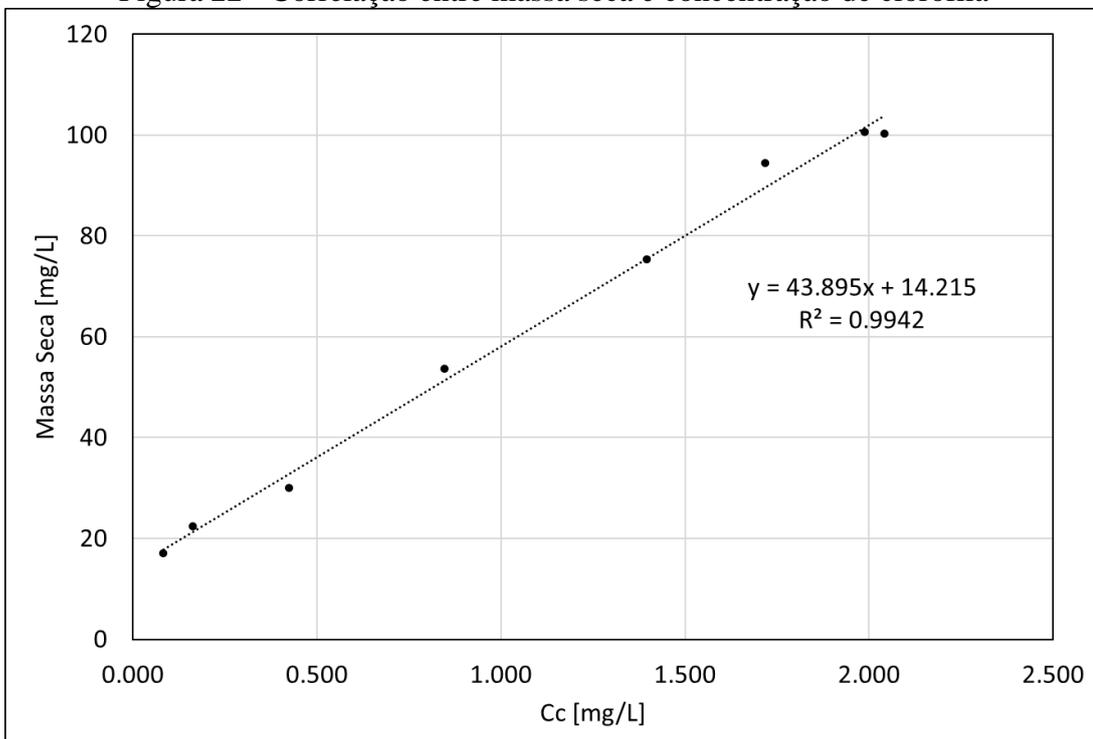
Por fim, ao leitor que possa estar interessado na conversão dos valores de concentração de clorofila para massa seca de microalgas, na Figura 21 estão os resultados de massa seca dos cultivos 4, 5 e 6 (com determinação dos pontos experimentais mais confiáveis, denominados “melhores”) e na Figura 22 a correlação entre a massa seca e a concentração de clorofila.

Figura 21 - Valores experimentais de massa seca dos cultivos 4, 5 e 6



Fonte: Acervo pessoal

Figura 22 - Correlação entre massa seca e concentração de clorofila



Fonte: Acervo pessoal

5 CONCLUSÃO

Ao final deste estudo é possível reunir uma série de conclusões pautadas nos objetivos inicialmente propostos. Primeiramente, é fundamental reforçar que as amostragens devem ser feitas com extrema cautela para que não haja desvios nos valores reais de concentração de microalgas. Em relação à metodologia para o tratamento dos dados experimentais, a utilização da concentração de clorofila como registro do crescimento das microalgas se mostrou mais controlada e regular que o emprego das informações de DO e concentração de células. Além disso, ficou evidente a superioridade da aplicação da função logística quando comparada às interpolações polinomiais para a representação de dados de crescimento de microalgas, com valores encontrados de $R^2=0,9965$ para o cultivo 4, $R^2=0,9979$ para o cultivo 5 e $R^2=0,9971$ para o cultivo 6.

Apesar dos ajustes precisos obtidos através da interpolação por função logística, observou-se que a utilização da lei de Lambert-Beer proporcionou um perfil de crescimento de biomassa mais realista e representativo, o que motivou a sua utilização para a criação dos *targets* das RNA deste projeto. Já os resultados obtidos através da modelagem cinética em conjunto com o balanço de massa diferencial apresentaram parâmetros congruentes aos descritos na literatura e perfis de crescimento bem ajustados aos pontos experimentais, porém, assim como a função logística, com pouca representatividade da realidade. Certamente esse fato se deu por conta da simplificação da intensidade de luz incidente por um valor constante. Modelos não simplificados certamente devem atingir resultados mais promissores.

Com relação à definição de propriedades e arquitetura das RNA, verificou-se que a variação na quantidade de neurônios (de 1 a 40) da camada oculta das redes é mais impactante na redução do erro quadrático médio até 10 neurônios, a partir desse valor não há grandes ganhos de performance. Além disso, ficou evidente que redes treinadas apenas com dados de um único cultivo não conseguem inferir com precisão valores de cultivos novos, é fundamental a agregação de dados do máximo de cultivos possível para resultados mais robustos. Com relação aos tipos de RNA, não foram observadas vantagens significativas entre a utilização de redes *feedforward* e recorrentes. Por fim, definiu-se a utilização de uma rede *feedforward*, com entrada completa e 8 neurônios na camada oculta.

Finalmente, o desempenho da RNA treinada com dados dos cultivos 5 e 6, com *targets* obtidos através da lei de Lambert-Beer linearizada, para dedução de valores de concentração de clorofila relativos ao cultivo 4 se mostrou eficaz e promissor. Além de apresentar um erro

quadrático médio inferior aos testes prévios com diferentes configurações de RNA para inferência de dados do cultivo 4 (EQM = 0,0278), também demonstrou exatidão quando comparada a valores de R^2 presentes na literatura ($R^2 = 0,93$) e, portanto, se revela uma ferramenta apropriada para o desenvolvimento de um *softsensor* de aferição instantânea de biomassa no interior de biorreatores.

6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE

Como sequência deste trabalho, é proposto que seja desenvolvido um *softsensor* que utilize os métodos de estimativa de biomassa de microalgas aqui examinados e indique possíveis lógicas de programação adequadas para se obter resultados precisos e instantâneos de biomassa em reatores. Após a proposição de lógicas de desenvolvimento da resposta do sensor, é fundamental a realização de novos cultivos para aperfeiçoamento das saídas das RNA e validação de dados.

Após o desenvolvimento de um sensor robusto de biomassa baseado em dados de intensidade de luz instantâneos em fotobiorreator, é possível aplicar suas respostas na investigação de diferentes estratégias de controle para maximização da produção de microalgas ou possíveis produtos de interesse que estejam associados ao crescimento.

Também é interessante uma exploração mais aprofundada da viabilidade da utilização da intensidade de luz incidente como função não constante na modelagem cinética do crescimento das microalgas. É interessante também a avaliação de modelos de dispersão de luz mais complexos e outras equações que possam representar a cinética de crescimento.

Por último, além das sugestões mencionadas, ainda há a possibilidade do estudo das relações matemáticas e biológicas entre a variação na quantidade de clorofila total em comparação com o aumento do número de células durante o tempo de cultivo no fotobiorreator.

REFERÊNCIAS

ABIUSI, Fabian *et al.* Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 956–964, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.25014>. Acesso em: 5 abr. 2020.

ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. **Journal of general microbiology**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 199–202, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-51-2-199>

ALLEN, Mary Mennes. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–4, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1968.tb04667.x>

AMINI, Hossein *et al.* Numerical and experimental investigation of hydrodynamics and light transfer in open raceway ponds at various algal cell concentrations and medium depths. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 156, p. 11–23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.09.003>

ANDREWS, John F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 707–723, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260100602>. Acesso em: 10 jun. 2021.

ASLAN, Sebnem; KAPDAN, Ilgi Karapinar. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 64–70, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>

BANNISTER, T. T. Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 76–96, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.1.0076>. Acesso em: 10 jun. 2021.

BEALE, Mark Hudson; HAGAN, Martin T.; DEMUTH, Howard B. **Neural Network Toolbox - User's Guide**. Natick, MA: The MathWorks, Inc., 2017.

BÉCHET, Quentin; SHILTON, Andy; GUIEYSSE, Benoit. **Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation**. [S. l.]: Elsevier, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>

BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. **Biochemistry**. Fifth ed. New York: [s. n.], 2002. *E-book*.

BERNSTEIN, Hans C. *et al.* Effect of mono- and dichromatic light quality on growth rates and photosynthetic performance of *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. SEP, p. 488, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00488>. Acesso em: 5 abr. 2020.

BRAGA, Antônio de Praga; LUDERMIR, Teresa Bernarda; CARVALHO, André Carlos Ponce. **Redes Neurais Artificiais Teoria e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC - LIVROS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS EDITORA S.A, 2000. *E-book*.

BREDDA, Eduardo Henrique *et al.* Mixture design as a potential tool in modeling the effect of light wavelength on *Dunaliella salina* cultivation: an alternative solution to increase microalgae lipid productivity for biodiesel production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 379–389, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1697936>. Acesso em: 30 abr. 2020.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. **Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. [S. l.]: Pergamon, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

CARVALHO, Ana P. *et al.* **Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects**. [S. l.]: Springer, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>

CHAE, S. R.; HWANG, E. J.; SHIN, H. S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 322–329, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.037>

CHALKER, Bruce E. Modeling light saturation curves for photosynthesis: An exponential function. **Journal of Theoretical Biology**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 205–215, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(80\)80004-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(80)80004-X)

CHEN, Claire Lifan *et al.* Deep Learning in Label-free Cell Classification. **Scientific Reports 2016 6:1**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep21471>. Acesso em: 2 set. 2021.

CHEN, Hua-Bing *et al.* Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 53, p. 52–56, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.004>

CORNET, J. F. *et al.* A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 50, n. 9, p. 1489–1500, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(95\)00022-W](https://doi.org/10.1016/0009-2509(95)00022-W)

CORNET, Jean François; DUSSAP, Claude Gilles. A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 424–435, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.138>. Acesso em: 10 jun. 2021.

CORREA, Iago *et al.* Deep learning for microalgae classification. **Proceedings - 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications, ICMLA 2017**, [S. l.], v. 2017- December, p. 20–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/ICMLA.2017.0-183>

DAS, Probir *et al.* Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under

blue light. [S. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>. Acesso em: 5 abr. 2020.

DERMOUN, Djamilia *et al.* Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: Light and temperature. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 113–117, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90069-A](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90069-A)

EINSTEIN, A. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. **Annalen der Physik**, [S. l.], v. 322, n. 6, p. 132–148, 1905. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/andp.19053220607>. Acesso em: 1 abr. 2020.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. **Britannica, The Editors of Encyclopaedia. “Chloroplast”**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/chloroplast>.

FALKOWSKI, Paul G.; RAVEN, John A. **Aquatic Photosynthesis**. Second ed. [S. l.]: Princeton University Press, 2007. *E-book*.

GAO, Baoyan *et al.* Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos* cf. *polyphem*. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1180-9>

GLEMSER, M. *et al.* Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 1077–1088, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7144-6>

GOLDMAN, Joel C.; OSWALD, William J.; JENKINS, David. The Kinetics of Inorganic Carbon Limited Algal Growth. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 554–574, 1974. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/25038157>

GRIS, Barbara *et al.* Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 172, n. 5, p. 2377–2389, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0679-z>

GUEDES, Vanessa Campos; HORTA, Antônio Carlos Luperni; CERRI, Marcel Otavio. **FOTOBIORREATOR TIPO TANQUE ESTREITO BASEADO EM AIRLIFT PARA O CULTIVO DE MICROALGAS**. Fortaleza - CE: Galoá, 2016. Disponível em: <https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/fotobiorreator-tipo-tanque-estreiro-baseado-em-airlift-para-o-cultivo-de-microalgas>

GUO, Baoshan *et al.* High-throughput, label-free, single-cell, microalgal lipid screening by machine-learning-equipped optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy. **Cytometry Part A**, [S. l.], v. 91, n. 5, p. 494–502, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.23084>. Acesso em: 2 set. 2021.

GUO, Wangbiao *et al.* Three-dimensional numerical simulation of light penetration in an optimized flow field composed of microalgae cells, carbon dioxide bubbles and culture medium. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 292, p. 121979, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121979>

HAN, Pei pei *et al.* Applying the strategy of light environment control to improve the biomass and polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 55–65, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0963-8>

HAYKIN, Simon. **Neural Networks - A Comprehensive Foundation**. 2. ed. Ontario, Canadá: Pearson Education, 1999. *E-book*.

HSUEH, H. T. *et al.* Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 33–39, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.010>

HUANG, Shih Yow; CHEN, Chao Peng. Growth kinetics and cultivation of *spirulina platensis*. **Journal of the Chinese Institute of Engineers, Transactions of the Chinese Institute of Engineers, Series A/Chung-kuo Kung Ch'eng Hsueh K'an**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 355–363, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02533839.1986.9676900>. Acesso em: 10 jun. 2021.

HUESEMANN, M. H. *et al.* A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 110, n. 6, p. 1583–1594, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.24814>. Acesso em: 5 abr. 2020.

IASIMONE, F. *et al.* Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.024>. Acesso em: 30 abr. 2020.

KEELING, Patrick J. The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 583–607, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144>

KOC, Caner; ANDERSON, Gary. Use of Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED) and Fluorescent Lamps to Grow Microalgae in a Photobioreactor. **The Israeli Journal of Aquaculture**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.13031/2013.36277>. Acesso em: 5 abr. 2020.

KURANO, Norihide; MIYACHI, Shigetoh. Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 403–408, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/JBB.100.403>

KWON, Hyeong Kyu *et al.* **Laboratory Study for the Phytoremediation of Eutrophic Coastal Sediment Using Benthic Microalgae and Light Emitting Diode (LED)**. [S. l.: s. n.]

LEE, Eunyong; JALALIZADEH, Mehregan; ZHANG, Qiong. **Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review**. [S. l.]: Elsevier, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>

LI, Xuemei; YANG, Ning. Modeling the light distribution in airlift photobioreactors under simultaneous external and internal illumination using the two-flux model. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 88, p. 16–22, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.11.015>

LIU, Junhan *et al.* Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 166, n. 8, p. 2127–2137, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9639-2>

MARTÍNEZ, M. E.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 67, n. 3, p. 233–240, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00120-5)

MARTÍNEZ SANCHO, Ma E.; CASTILLO, J. M. Jiménez.; EL YOUSFI, Farida. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 657–664, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00017-4)

MASOJÍDEK, Jirí; TORZILLO, Giuseppe; KOBLÍZEK, Michal. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, Amos; HU, Qiang (org.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second ed. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2013. *E-book*.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 371–394, 1949. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
NELSON, David Lee; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Fifth ed. New York: [s. n.], 2008. *E-book*.

NOVAK, John T.; BRUNE, David E. Inorganic carbon limited growth kinetics of some freshwater algae. **Water Research**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 215–225, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(85\)90203-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90203-9)

OHNUKI, Shinsuke *et al.* Image-Based Monitoring System for Green Algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Cells during Culture. **Plant and Cell Physiology**, [S. l.], v. 54, n. 11, p. 1917–1929, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/PCP/PCT126>. Acesso em: 2 set. 2021.

OKUMURA, Chikako *et al.* Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for biofuel production. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 269–275, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ep.11951>. Acesso em: 5 abr. 2020.

OORSCHOT, J. L. P. van. **Conversion of light energy in algal culture**. Wageningen: Wageningen University, 1955. *E-book*.

PFAFFINGER, Christina Evi *et al.* Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors. **Algal Research**, [S. l.], v. 20, p. 153–163, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.10.002>

RANGANATHAN, Panneerselvam *et al.* Experimental and modelling of *Arthrospira platensis* cultivation in open raceway ponds. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 242, p. 197–205, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.150>

RENDÓN. Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth Response of *Chlorella vulgaris* Under Four Different Led Illumination. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2013.02.03.3>

RIPPKA, R. *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>

SHELLENBERGER COSTA, Benjamin *et al.* Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of experimental botany**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 483–493, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers340>. Acesso em: 5 abr. 2020.

SCHULZE, Peter S. C. *et al.* Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>

SFORZA, E. *et al.* Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 38975, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975>. Acesso em: 5 abr. 2020.

SHARON MANO PAPPU, J.; VIJAYAKUMAR, G. Karthik; RAMAMURTHY, V. Artificial neural network model for predicting production of *Spirulina platensis* in outdoor culture. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 130, p. 224–230, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.12.082>

SINGH KHICHI, Shailendra; ANIS, Afifa; GHOSH, Sanjoy. Mathematical modeling of light energy flux balance in flat panel photobioreactor for *Botryococcus braunii* growth, CO₂ biofixation and lipid production under varying light regimes. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 134, p. 44–56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.001>

SUPRIYANTO *et al.* Artificial neural networks model for estimating growth of polyculture microalgae in an open raceway pond. **Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 177, p. 122–129, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMSENG.2018.10.002>

SUSANNA, Deepti *et al.* Increasing productivity of *Spirulina platensis* in photobioreactors using artificial neural network modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 116, n. 11, p. 2960–2970, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/BIT.27128>. Acesso em: 17 ago. 2021.

TAMIYA, H. *et al.* Kinetics of Growth of *Chlorella*, with Special Reference to Its Dependence

on Quantity of Available Light and on Temperature. *In: Algal Culture - From Laboratory to Pilot Plant*. Washington D.C: CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON PUBLICATION, 1953. *E-book*.

VEJRAZKA, Carsten *et al.* Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in attenuated, flashing light. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 109, n. 10, p. 2567–2574, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.24525>. Acesso em: 5 abr. 2020.

WANG, Shi Kai *et al.* Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 550–559, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elsc.201300170>

WHITTON, Rachel *et al.* Influence of light regime on the performance of an immobilised microalgae reactor for wastewater nutrient removal. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101648>. Acesso em: 30 abr. 2020.

XIN, Li *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>

XU, Bing *et al.* The effect of varying LED light sources and influent carbon/nitrogen ratios on treatment of synthetic sanitary sewage using *Chlorella vulgaris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1289–1300, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1292-6>

ZENOOZ, Alireza Moosavi *et al.* Comparison of different artificial neural network architectures in modeling of *Chlorella* sp. flocculation. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275013>, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 570–577, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275013>. Acesso em: 2 set. 2021.

ZUBAIRY, M. Suhail. A Very Brief History of Light. *In: AL-AMRI, Mohammad D.; EL-GOMATI, Mohamed; ZUBAIRY, M. Suhail (org.). Optics in Our Time*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 3–24. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-31903-2_1

Apêndice A – PROGRAMAÇÃO DA LÓGICA DE TREINAMENTO E TESTE DAS RNA

Código de treinamento das RNA:

```
clearvars

load C5_Input_RGB.mat, load C6_Input_RGB.mat, load C5_Target_CC.mat, load
C6_Target_CC.mat;

%INPUTS E TARGETS
X5 = tonndata(C5_Input_RGB,false,false);
T5 = tonndata(C5_Target_CC,false,false);
X6 = tonndata(C6_Input_RGB,false,false);
T6 = tonndata(C6_Target_CC,false,false);

%REDE NEURAL ESPECIALISTA 5
for n = 1:40

%DEFINIR PARAMETROS DA REDE 5
trainFcn5 = 'trainlm';
inputDelays5 = 1:4;
hiddenLayerSize5 = n;
net5 = timedelaynet(inputDelays5,hiddenLayerSize5,trainFcn5);
net5.input.processFcns = {'removeconstantrows','mapminmax'};
net5.output.processFcns = {'removeconstantrows','mapminmax'};
[x5,x5i,a5i,t5] = preparets(net5,X5,T5);
net5.divideFcn = 'dividerand';
net5.divideMode = 'time';
net5.divideParam.trainRatio = 70/100;
net5.divideParam.valRatio = 15/100;
net5.divideParam.testRatio = 15/100;
net5.performFcn = 'mse';
net5.trainParam.showWindow = false;
%net5.trainParam.max_fail = 6
net5.plotFcns = {'plotperform','plotregression'};

%TREINAR REDE 5
[net5,tr5] = train(net5,x5,t5,x5i,a5i);

%TESTAR REDE 5
y5 = net5(x5,x5i,a5i);
e5 = gsubtract(t5,y5);
performance5 = perform(net5,t5,y5);

%SALVAR REDE 5
rede = strcat('RN5_',num2str(n),'.mat');
save (rede,'net5');

erro = strcat('5erro_',num2str(n),'.mat');
save (erro,'e5');

perf = strcat('5performance_',num2str(n),'.mat');
save (perf,'performance5');

%DEFINIR E SALVAR FIGURAS 5
perform5 = figure; plotperform(tr5);
```

```

f1 = strcat('5perform_',num2str(n),'.fig');
savefig(f1);

%trainstate5 = figure; plottrainstate(tr5);
%f2 = strcat('5trainstate_',num2str(n),'.fig');
%savefig(f2);

%hist5 = figure; ploterrhist(e5);
%f3 = strcat('5hist_',num2str(n),'.fig');
%savefig(f3);

regression5 = figure; plotregression(t5,y5);
f4 = strcat('5regression_',num2str(n),'.fig');
savefig(f4);

%fit5 = figure; plotfit(net5,x5,t5);
%f5 = strcat('5fit_',num2str(n),'.fig');
%savefig(f5);

n = n+1
end

%REDE NEURAL ESPECIALISTA 6
for n = 1:40

%DEFINIR PARAMETROS DA REDE 6
trainFcn6 = 'trainlm';
inputDelays6 = 1:4;
hiddenLayerSize6 = n;
net6 = timedelaynet(inputDelays6,hiddenLayerSize6,trainFcn6);
net6.input.processFcns = {'removeconstantrows','mapminmax'};
net6.output.processFcns = {'removeconstantrows','mapminmax'};
[x6,x6i,a6i,t6] = preparets(net6,X6,T6);
net6.divideFcn = 'dividerand';
net6.divideMode = 'time';
net6.divideParam.trainRatio = 70/100;
net6.divideParam.valRatio = 15/100;
net6.divideParam.testRatio = 15/100;
net6.performFcn = 'mse';
net6.trainParam.showWindow = false;
%net6.trainParam.max_fail = 6
net6.plotFcns = {'plotperform','plotregression'};

%TREINAR REDE 6
[net6,tr6] = train(net6,x6,t6,x6i,a6i);

%TESTAR REDE 6
y6 = net6(x6,x6i,a6i);
e6 = gsubtract(t6,y6);
performance6 = perform(net6,t6,y6);

%SALVAR REDE 6
rede = strcat('RN6_',num2str(n),'.mat');
save(rede,'net6');

erro = strcat('6erro_',num2str(n),'.mat');
save(erro,'e6');

perf = strcat('6performance_',num2str(n),'.mat');
save(perf,'performance6');

```

```

%DEFINIR E SALVAR FIGURAS 6
perform6 = figure; plotperform(tr6);
f1 = strcat('6perform_', num2str(n), '.fig');
savefig(f1);

%trainstate6 = figure; plottrainstate(tr6);
%f2 = strcat('6trainstate_', num2str(n), '.fig');
%savefig(f2);

%hist6 = figure; ploterrhist(e6);
%f3 = strcat('6hist_', num2str(n), '.fig');
%savefig(f3);

regression6 = figure; plotregression(t6, y6);
f4 = strcat('6regression_', num2str(n), '.fig');
savefig(f4);

%fit6 = figure; plotfit(net6, x6, t6);
%f5 = strcat('6fit_', num2str(n), '.fig');
%savefig(f5);

n = n+1
end

```

Código de escolha das melhores/piores redes e teste:

```

clearvars

%MONTAR VETOR COM PERFORMANCES DAS RN
for n = 1:40
    perf5 = strcat('5performance_', num2str(n), '.mat');
    load(perf5)
    performancesRN5(n) = performance5;
    n=n+1;
end
for n = 1:40
    perf6 = strcat('6performance_', num2str(n), '.mat');
    load(perf6)
    performancesRN6(n) = performance6;
    n=n+1;
end

%GRAFICOS DE PERFORMANCE COM VARIACAO DE n
n = n-1;
eixox = linspace(0, n, n);
plot5 = figure; plot(eixox, performancesRN5);
title('Performance RN5'); xlabel('Quantidade Neurônios');
ylabel('Performance');
savefig('plot5.fig');
plot6 = figure; plot(eixox, performancesRN6);
title('Performance RN6'); xlabel('Quantidade Neurônios');
ylabel('Performance');
savefig('plot6.fig');

%ENCONTRAR MELHORES RN
minRN5 = min(performancesRN5);
minRN6 = min(performancesRN6);
maxRN5 = max(performancesRN5);

```

```

maxRN6 = max(performancesRN6);
bestRN5 = find(performancesRN5 == minRN5);
bestRN6 = find(performancesRN6 == minRN6);
worstRN5 = find(performancesRN5 == maxRN5);
worstRN6 = find(performancesRN6 == maxRN6);
chamabestRN5 = strcat('RN5_', num2str(bestRN5), '.mat');
chamabestRN6 = strcat('RN6_', num2str(bestRN6), '.mat');
chamaworstRN5 = strcat('RN5_', num2str(worstRN5), '.mat');
chamaworstRN6 = strcat('RN6_', num2str(worstRN6), '.mat');

```

```
%CARREGAR MELHORES RN
```

```

load(chamabestRN5); load(chamabestRN6)
net5best = net5;
net6best = net6;
load(chamaworstRN5); load(chamaworstRN6)
net5worst = net5;
net6worst = net6;

```

```
%INPUTS E TARGETS PARA TESTE DAS REDES
```

```

load C4_Input_RGB.mat, load C4_Target_CC.mat
load C5_Input_RGB.mat, load C5_Target_CC.mat
load C6_Input_RGB.mat, load C6_Target_CC.mat

```

```
%MELHORES REDES
```

```

X4 = tonndata(C4_Input_RGB, false, false);
X5 = tonndata(C5_Input_RGB, false, false);
X6 = tonndata(C6_Input_RGB, false, false);
T4 = tonndata(C4_Target_CC, false, false);
T5 = tonndata(C5_Target_CC, false, false);
T6 = tonndata(C6_Target_CC, false, false);

[x45, x45i, a45i, t45] = preparets(net5best, X4, T4);
[x55, x55i, a55i, t55] = preparets(net5best, X5, T5);
[x65, x65i, a65i, t65] = preparets(net5best, X6, T6);
[x46, x46i, a46i, t46] = preparets(net6best, X4, T4);
[x56, x56i, a56i, t56] = preparets(net6best, X5, T5);
[x66, x66i, a66i, t66] = preparets(net6best, X6, T6);

y45best = net5best(x45, x45i, a45i);
y46best = net6best(x46, x46i, a46i);
y55best = net5best(x55, x55i, a55i);
y56best = net6best(x56, x56i, a56i);
y65best = net5best(x65, x65i, a65i);
y66best = net6best(x66, x66i, a66i);

e45best = gsubtract(t45, y45best);
e46best = gsubtract(t46, y46best);
e55best = gsubtract(t55, y55best);
e56best = gsubtract(t56, y56best);
e65best = gsubtract(t65, y65best);
e66best = gsubtract(t66, y66best);

perffinal45best = perform(net5best, t45, y45best);
perffinal46best = perform(net6best, t46, y46best);
perffinal55best = perform(net5best, t55, y55best);
perffinal56best = perform(net6best, t56, y56best);
perffinal65best = perform(net5best, t65, y65best);
perffinal66best = perform(net6best, t66, y66best);

```

%PIORES REDES

```

[x45,x45i,a45i,t45] = preparets(net5worst,X4,T4);
[x55,x55i,a55i,t55] = preparets(net5worst,X5,T5);
[x65,x65i,a65i,t65] = preparets(net5worst,X6,T6);
[x46,x46i,a46i,t46] = preparets(net6worst,X4,T4);
[x56,x56i,a56i,t56] = preparets(net6worst,X5,T5);
[x66,x66i,a66i,t66] = preparets(net6worst,X6,T6);

y45worst = net5worst(x45,x45i,a45i);
y46worst = net6worst(x46,x46i,a46i);
y55worst = net5worst(x55,x55i,a55i);
y56worst = net6worst(x56,x56i,a56i);
y65worst = net5worst(x65,x65i,a65i);
y66worst = net6worst(x66,x66i,a66i);

e45worst = gsubtract(t45,y45worst);
e46worst = gsubtract(t46,y46worst);
e55worst = gsubtract(t55,y55worst);
e56worst = gsubtract(t56,y56worst);
e65worst = gsubtract(t65,y65worst);
e66worst = gsubtract(t66,y66worst);

perffinal45worst = perform(net5worst,t45,y45worst);
perffinal46worst = perform(net6worst,t46,y46worst);
perffinal55worst = perform(net5worst,t55,y55worst);
perffinal56worst = perform(net6worst,t56,y56worst);
perffinal65worst = perform(net5worst,t65,y65worst);
perffinal66worst = perform(net6worst,t66,y66worst);

```