



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



# Monitoramento e controle de cultivos de *Scenedesmus sp.* com uso de sensores ópticos

*Autor: Ricardo Laste*

*Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farenzena*

Porto Alegre, julho de 17

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por me apoiarem sempre – em Lajeado, em Limeira, na volta a Lajeado, em Porto Alegre, na Alemanha, de volta ao Brasil, e onde quer que o amanhã se passe. Obrigado por sempre confiarem nas minhas escolhas.

Ao Professor Marcelo Farenzena, pela orientação, abertura e prontidão do momento em que precisava definir o tema deste trabalho até o de correr para finalizá-lo.

A todos os mestres da Universidade, por compartilharem com meus colegas e comigo seus valiosos conhecimentos.

À Bruna e ao Thomás, pela ajuda sem a qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

À Nelzy, à Prof<sup>a</sup> Mariliz, ao Santiago e ao LACOURO por atenderem meus pedidos de socorro.

À minha irmã Carolina e ao Cristiano, pelas jantas cedidas a mim, que tanto me ajudaram a ganhar tempo para escrever este trabalho.

À Gabriela, pelo incentivo, apoio e inspiração.

Aos amigos de faculdade, por durante 6 anos e meio compartilharem comigo a rotina, os anseios, as aspirações, e acima de tudo, o afeto.

Aos colegas de Kimberly-Clark, pelo ambiente de aprendizado e parceria.

À minha terapeuta Vera, por me ajudar a manter uma visão sóbria da minha vida.

À Mulambagem e aos AMIGOS, por criarem o ambiente não-físico onde tenho a sensação de estar em casa.

## Resumo

Apesar do crescente interesse na utilização de microalgas como matéria-prima em processos da indústria, os elevados custos de produção diminuem sua atratividade. Uma oportunidade de melhoria na viabilidade econômica são os métodos analíticos empregados no monitoramento dos cultivos, comumente realizados de maneira *off-line*. No presente estudo, foram desenvolvidos três protótipos de sensores ópticos para monitoramento *online* do crescimento de *Scenedesmus sp.*, utilizando sensores de luminância TSL 2561 da Adafruit e lâmpadas de LED azul como fonte de emissão de luz. A cor da fonte de luz foi selecionada após realizados testes de correlação entre a densidade ótica tomadas em espectrofotômetro a 570 nm e luminância a partir de lâmpadas de LED azul, vermelha, verde e amarela. O primeiro protótipo desenvolvido permaneceu fora do cultivo e uma bomba peristáltica realizou a circulação de meio no seu interior, enquanto os protótipos 2 e 3 foram imersos no meio de cultura. A validação dos sensores foi feita ao correlacionar as medições com medidas de densidade ótica em espectrofotômetro a 570 nm e ao analisar a estabilidade dos mesmos. As correlações para os protótipos 1, 2 e 3 foram  $R^2 = 0,9699$ ,  $R^2 = 0,9362$  e  $R^2 = 0,9141$ , respectivamente. Os protótipos 1 e 2 apresentaram má performance devido a problemas operacionais advindos de falhas no funcionamento da bomba de circulação de meio e na vedação do sensor, respectivamente. O Protótipo 3 foi utilizado para monitorar a turbidez de um cultivo sob regime contínuo com estratégia de controle liga-desliga (turbidostato), apresentando boa estabilidade enquanto a cultura não apresentou sedimentos em suspensão. Após 71 h, a produtividade do cultivo contínuo foi de 0,0289 g/L/dia, 15,2% maior do que o cultivo monitorado pelo Protótipo 1, realizado em batelada. Os protótipos desenvolvidos mostraram-se capazes de monitorar o crescimento de *Scenedesmus sp.*, em especial o Protótipo 3, entretanto, sugere-se que novos testes utilizando o mesmo sejam realizados, uma vez que apresentou problema de estabilidade quando o meio de cultivo continha sedimentos em suspensão.

Palavras-chave: Microalgas, *Scenedesmus sp.*, sensores, sensores ópticos, turbidostato.

## Lista de Figuras

Figura 1: Processo da fotossíntese (Adaptado de: RICHMOND, 2008). .....	3
Figura 2: Representação de uma lagoa <i>raceway</i> (Adaptado de: CHISTI, 2008). .....	6
Figura 3: FBRs tubular (esquerda) e em coluna (direita) (Adaptado de: RICHMOND, 2008). .....	6
Figura 4: Fluxograma de funcionamento do sensor. ....	18
Figura 5: Representação do aparato experimental utilizado no primeiro cultivo. ....	19
Figura 6: Representação do aparato experimental utilizado no segundo cultivo. ....	20
Figura 7: Representação do aparato experimental utilizado no cultivo contínuo. ....	21
Figura 8: Sensor utilizado no cultivo contínuo (Protótipo 3). ....	21
Figura 9: Correlação entre Luminância e Absorbância para os LEDs azul (círculo) e vermelho (quadrado). ....	23
Figura 10: Correlação entre absorbância medida por espectrofotômetro a 570 nm e luminância medida pelo Protótipo 1. ....	24
Figura 11: Comportamento do Protótipo 1 ao longo de 6 dias. ....	25
Figura 12: Correlação entre absorbância e luminância medida pelo Protótipo 2. ....	26
Figura 13: Correlação entre absorbância e luminância medida pelo Protótipo 3. ....	27
Figura 14: Comportamento do Protótipo 3 durante o cultivo contínuo. ....	28
Figura 15: Obstrução da mangueira destinada à saída de ar do sensor. ....	28

---

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Composição geral de diferentes microalgas em percentual mássico (Adaptado de: BECKER, 2007) .....	5
Tabela 2. Comparação quanto a valores nutricionais (em percentual mássico) entre alimentos convencionais e diferentes espécies de microalgas (Adaptado de: BECKER, 1994) .....	10
Tabela 3: Número de indivíduos contados e exatidão correspondente (Adaptado de: LOURENÇO, 2006, apud LUND; KIPLING; CREN, LE, 1958) .....	11
Tabela 4: Meio de Guillard Modificado (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014; STEIN, 1979).....	16
Tabela A: Correspondência entre ABS e luminância para diferentes cores de LED.....	33

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

FBR – Fotobiorreator

LED – *Light Emitting Diode*

PET – Polietileno Tereftalato

NTU – Unidades Nefelométricas de Turbidez

---

## Lista de Símbolos

ABS – Absorbância

ABS<sub>570</sub> – Absorbância medida por espectrofotômetro a 570 nm

ABS<sub>s</sub> – Absorbância medida pelo sensor

c – concentração

D – taxa de diluição

I – Intensidade luminosa

I<sub>0</sub> – Intensidade luminosa emitida pela fonte

P - produtividade

t – tempo

V – volume

V<sub>R</sub> – volume de microalgas coletado

x – concentração de microalgas

## Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Microalgas	3
2.1.1	Composição da biomassa	4
2.1.2	Cultivo	4
2.1.2.1	Sistemas abertos – lagoas raceaway	5
2.1.2.2	Sistemas Fechados – Fotobiorreatores (FBR)	6
2.1.2.2.1	Regime Batelada	7
2.1.2.2.2	Regime Contínuo	7
2.1.3	Aplicações para Microalgas	7
2.1.3.1	Combustíveis	7
2.1.3.1.1	Biodiesel	8
2.1.3.1.2	Etanol	8
2.1.3.1.3	Gás Natural	9
2.1.3.2	Biorremediação	9
2.1.3.3	Outras aplicações	10
2.2	Métodos Tradicionais para Quantificação de Biomassa	
	Microalgácea	11
2.2.1	Contagem por Microscopia	11
2.2.2	Gravimetria (Peso Seco)	11
2.2.3	Densidade Óptica	12
2.3	Monitoramento Online de Processos Microalgáceos	12
2.3.1	Sensores para Microalgas	12
2.3.2	Controle de Processos Microalgáceos	13
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Cultivos de Microalgas	15
3.2	Monitoramento <i>Online</i> dos Cultivos	16
3.2.1	Correlação entre Luminância Medida pelo Sensor e Absorbância	17
3.2.2	Primeiro Cultivo em Batelada e Sensor Utilizado (Protótipo 1)	18



---

3.2.3	Segundo Cultivo em Batelada e Sensor Utilizado (Protótipo 2)	19
3.2.4	Cultivo Contínuo e Sensor Utilizado (Protótipo 3)	20
4	Resultados e Discussão	23
4.1	Correlação entre Luminância Medida pelo Sensor e Absorbância	23
4.2	Protótipo 1	24
4.3	Protótipo 2	26
4.4	Cultivo Contínuo e Protótipo 3	26
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	29
6	Referências	31
	Apêndice A	33



## 1 Introdução

O cenário atual do uso de microalgas é largamente difundido para a alimentação animal, e os favoráveis valores nutricionais frente a alimentos tradicionais impelem um aumento de sua aplicação na alimentação humana. Nas últimas décadas, no entanto, observa-se um interesse crescente no emprego de microalgas como matéria-prima para processos da indústria, e como agente remediador em efluentes líquidos (BRENNAN; OWENDE, 2010; SPOLAORE *et al.*, 2006).

A preocupação com os impactos causados pela intensificação do efeito estufa promoveu o aumento da procura por fontes renováveis de energia. O uso de biomassa microalgácea como matéria-prima na produção de combustíveis vem sendo amplamente estudado, uma vez que sua produção não é limitada pela disponibilidade de terras cultiváveis, nem competem com a produção de alimentos. O biodiesel a partir de microalgas é tido como a principal alternativa renovável para supressão de combustíveis automotivos fósseis, dado à elevada produtividade de lipídeos, maior que em espécies vegetais oleaginosas (CHISTI, 2008).

A produção de biomassa microalgácea, apesar de apresentar alta produtividade, ainda tem custo elevado. Entre os empecilhos de produção encontra-se o monitoramento do desenvolvimento dos cultivos, comumente empregado de forma *off-line*. O tempo de resposta nas análises da cultura acarretam em atraso de intervenções na produção, diminuindo a eficácia do controle do processo. Ainda, a ausência de monitoramento *online* impede a automação do controle do cultivo, dificultando a implementação de regimes contínuos de produção, mais produtivos que regimes em batelada, habitualmente utilizado em cultivos de microalgas.

Sensores para monitoramento *online* de cultivos de microalgas são encontrados no mercado, e apresentam boa performance. Entretanto, seu custo é elevado, e o desenvolvimento de sensores de baixo custo surge como uma necessidade para o monitoramento *online* de cultivos de pequeno e médio porte (BENAVIDES *et al.*, 2015).

O presente estudo tem como objetivo geral a implementação de um cultivo contínuo de *Scenedesmus sp.*, utilizando sensores ópticos para monitoramento *online* e controle do cultivo. Os objetivos específicos são: desenvolver sensores ópticos de baixo custo para monitoramento *online* do crescimento de *Scenedesmus sp.* em batelada; Realizar a validação dos sensores através da comparação com um método de análise

consolidado (densidade óptica medida em espectrofotômetro); Utilizar um dos sensores desenvolvidos para monitoramento *online* da concentração do cultivo contínuo de *Scenedesmus sp.*, utilizando-a como variável controlada do sistema de controle; Implementar uma estratégia de controle liga-desliga (turbidostato) para controlar a concentração e realizar a colheita de *Scenedesmus sp.* no cultivo contínuo.

Este trabalho é composto por 5 capítulos, incluindo esta introdução. O Capítulo 2 é uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados neste estudo. Nela, serão revisados tópicos sobre microalgas (conceitos, composição da biomassa, métodos de cultivo, aplicações), técnicas de análise tradicionais de cultivos, monitoramento *online* e controle de cultivos. No Capítulo 3 será descrita a metodologia e os materiais utilizados na elaboração do estudo. O Capítulo 4 será destinado à apresentação dos resultados e discussões a respeito dos mesmos. Por fim, o Capítulo 5 traz as conclusões chegadas ao final do estudo, bem como sugestões para trabalhos futuros.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Microalgas

Microalgas são seres de dimensões microscópicas que juntamente com as macroalgas constitui o grupo taxonômico das algas – indivíduos majoritariamente aquáticos e fotossintetizantes. O processo da fotossíntese ocorre em duas fases – as denominadas clara (com incidência de luz) e escura (ou química), representadas na Figura 1. Na fase clara, energia luminosa e água são utilizados para produção de  $\text{NADPH}_2$ , ATP e  $\text{O}_2$ , enquanto na fase escura, as moléculas de  $\text{NADPH}_2$  e ATP formados na fase clara serão consumidas juntamente com  $\text{CO}_2$  para produção de glicose, utilizada em muitos processos biológicos (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2008).

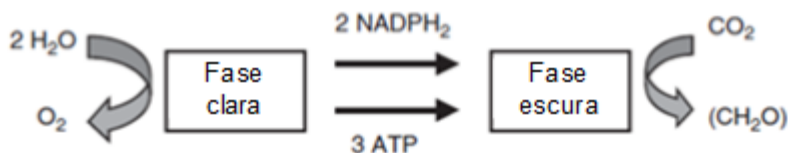


Figura 1: Processo da fotossíntese (Adaptado de: RICHMOND, 2008).

Microalgas são, em sua maioria, organismos unicelulares e fotossintetizantes, que compõem o fitoplâncton – conjunto de micro-organismos oceânicos realizadores de fotossíntese. São consideradas por muitos cientistas seres exclusivamente eucariontes, cujo código genético é organizado e envolto por membrana nuclear, entretanto, muitos autores consideram também seres procariontes fotossintetizantes (cianobactérias, desprovidas de membrana nuclear) como constituintes do fitoplâncton, pois, ao realizarem fotossíntese, possuem função ecológica idêntica a microalgas eucariontes. Segundo LOURENÇO (2006), microalgas são de alta importância na natureza devido à elevada participação que têm no balanço energético global através da fotossíntese, microalgas são responsáveis por mais de 90 % da fotossíntese realizada nos oceanos, tornando-as cruciais para ecossistemas marinhos e para a produção de oxigênio global.

Apesar de a maioria das espécies de microalgas realizarem fotossíntese (espécies autotróficas), algumas espécies, denominadas heterotróficas, utilizam exclusivamente fontes externas de carbono para o seu desenvolvimento. Porém, algumas espécies podem desenvolver-se tanto de maneira autotrófica quanto heterotrófica (mixotróficas) (BRENNAN; OWENDE, 2010).

As espécies que realizam fotossíntese são dotadas de uma grande variedade de pigmentos fotossintetizantes em sua estrutura celular. Os responsáveis diretos pela fotossíntese são as clorofilas, de pigmentação verde, presentes nas organelas denominadas plastos. A clorofila *a* está presente em todas as espécies fotossintetizantes, exercendo função principal no arranjo dos fotossistemas para captação de energia luminosa. A maioria das microalgas, não obstante, dispõe de uma segunda clorofila (*b*, *c* ou *d*), responsável pelo aumento da capacidade de absorção de luz pelo organismo. Além das clorofilas, microalgas apresentam outras duas classes de pigmentos fotossintetizantes: os carotenoides, de coloração variando entre o amarelo, laranja, vermelho e marrom; e as ficobiliproteínas, pigmentos azuis ou vermelhos. Os carotenoides são lipossolúveis, e possuem como funções o aumento da absorção de luz nos fotossistemas (semelhante às clorofilas secundárias) e a proteção dos mesmos em caso de excesso de luz, agindo como uma espécie de filtro. Já as ficobiliproteínas são hidrossolúveis, e são responsáveis pelo aumento do espectro de captação de luz pela fotossíntese e atuam como uma reserva de nitrogênio em situações de carência do nutriente (LOURENÇO, 2006).

#### 2.1.1 *Composição da biomassa*

As variadas espécies de microalgas apresentam composição de biomassa distinta entre si, como pode ser visto na Tabela 1. Ademais, fatores ambientais (luminosidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros) afetam o metabolismo das microalgas, induzindo a uma variação na composição de biomassa. (RICHMOND, 2008)

#### 2.1.2 *Cultivo*

A quase totalidade das aplicações comerciais que utilizam biomassa microalgácea seriam inviáveis se dependessem da coleta de microalgas na natureza. Portanto, vê-se a necessidade de produzir-se microalgas de forma artificial através de cultivos, que podem ser divididos em dois principais modos de produção: sistemas abertos (lagoas *raceaway*) e fechados (fotobiorreatores) (LOU RAES *et al.*, 2014).

Tabela 1: Composição geral de diferentes microalgas em percentual mássico (Adaptado de: BECKER, 2007)

<b>Alga</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídeos</b>
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Spirogyra sp.</i>	6–20	33–64	11–21
<i>Arthrospira maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	8–14	4–9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

#### 2.1.2.1 Sistemas abertos – lagoas raceaway

Segundo BRENNAN e OWENDE (2010), sistemas abertos artificiais são amplamente utilizados para produção de microalgas por serem relativamente baratos e de fácil limpeza e manutenção. Consistem basicamente em corpos hídricos (lagoas) artificiais fechados, com geralmente 20 a 50 cm de profundidade, cuja circulação e homogeneização é realizada por um rotor. O sistema é alimentado com meio de cultivo e cepas de microalga, que será colhida no final do circuito, caracterizando um sistema contínuo. Apesar de ser um sistema barato e simples, a exposição à contaminação, variações de insolação (única fonte de luz) e do clima; e a baixa produtividade de biomassa; podem tornar o cultivo em sistemas fechados mais vantajosos. A Figura 2 traz uma representação de um cultivo em uma lagoa raceaway.

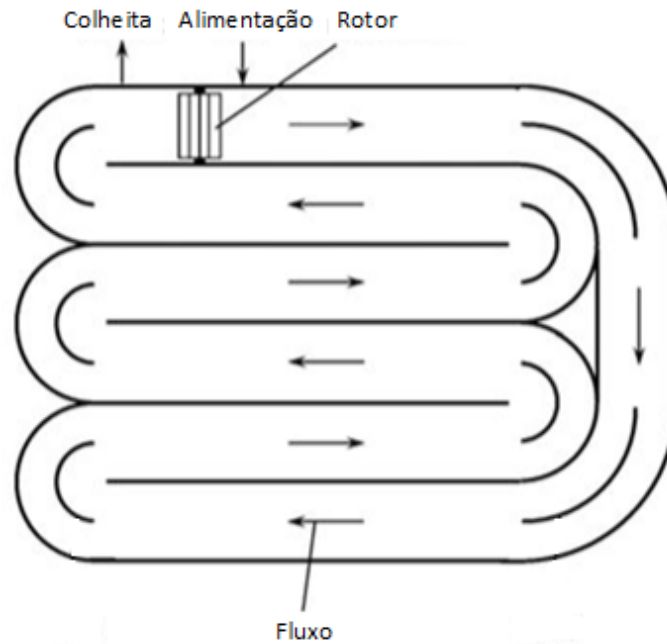


Figura 2: Representação de uma lagoa *raceway* (Adaptado de: CHISTI, 2008).

#### 2.1.2.2 Sistemas Fechados – Fotobiorreatores (FBR)

FBRs são reatores destinados ao cultivo de microalgas. São fechados e translúcidos, permitindo a incidência de luz no seu interior para realização de fotossíntese. Segundo BRENNAN e OWENDE (2010), o cultivo de microalgas em FBRs possibilita melhor controle do processo e maior produtividade, vantagens que podem superar os maiores custos de implementação e manutenção, em comparação com sistemas abertos. FBRs podem operar em 3 regimes distintos: batelada, contínuo e semicontínuo (não abordado nesta revisão). FBRs tubular e em coluna são apresentados na Figura 3.



Figura 3: FBRs tubular (esquerda) e em coluna (direita) (Adaptado de: RICHMOND, 2008).



#### *2.1.2.2.1 Regime Batelada*

É o método de produção mais comumente utilizado, por ser o mais simples. Nesse tipo de cultivo, células são inoculadas no meio de cultura e se desenvolvem ao longo do tempo. Após a inoculação, nenhum componente é adicionado, exceto ar, que é injetado servindo como fonte de CO<sub>2</sub>, no caso de cultivos auto ou mixotróficos. Após transcorrido o tempo de cultivo, todo o conteúdo é removido do reator, podendo parte dele ser utilizado como inóculo para a uma próxima batelada (RICHMOND, 2008).

#### *2.1.2.2.2 Regime Contínuo*

Nesse modo de cultivo, meio de cultura contendo células de microalgas é removido, enquanto meio esterilizado é adicionado, estabelecendo um equilíbrio dinâmico a volume constante. O processo teoricamente pode ter duração tendendo ao infinito, uma vez que sempre há disponibilidade de substrato com a entrada de meio fresco, e que as células podem reproduzir-se interminavelmente. É caracterizado pela maior produtividade e uniformidade de células, em comparação a outros modos de cultivo. É geralmente implementado na forma de quimiostato – quando vazão de entrada de meio define a taxa de crescimento em estado estacionário – ou turbidostato – quando a turbidez do cultivo define a entrada de meio fresco, em um sistema liga-desliga (LOURENÇO, 2006).

### *2.1.3 Aplicações para Microalgas*

Microalgas são utilizadas há muito tempo para nutrição animal e do homem, entretanto, o avanço de tecnologias associadas à caracterização e produção de microalgas propiciou um aumento de sua aplicabilidade. Além da aplicação nutricional, microalgas podem ser utilizadas para produção de combustíveis, químicos de alto valor agregado, cosméticos e para tratamento de águas residuais (BRENNAN; OWENDE, 2010; LOURENÇO, 2006).

#### *2.1.3.1 Combustíveis*

Os dados alarmantes sobre aumento do aquecimento global e seu impacto sobre o planeta e a humanidade sugerem a substituição de combustíveis de origem fóssil por

combustíveis obtidos a partir de fontes renováveis. Ademais, a produção de combustíveis renováveis que não compitam com a produção de alimentos também é desejada. Por se adequar a essas exigências, e por apresentar alta produtividade, o uso de microalgas como matéria-prima para produção de combustíveis tem crescido em interesse. A capacidade de acumularem alta composição de lipídeos e carboidratos fazem das microalgas fonte potencial para produção de biodiesel e etanol, respectivamente. Ainda, biomassa microalgácea pode ser digerida anaerobicamente para produção de biogás (gás natural) (ISHIKA; MOHEIMANI, N.; BAHRI, 2017).

#### 2.1.3.1.1 *Biodiesel*

Atualmente, o biodiesel é produzido principalmente a partir de óleo extraído de oleaginosas. Entretanto, em um cenário em que combustíveis fósseis fossem substituídos por combustíveis sustentáveis, a produção de oleaginosas não conseguiria suprir a demanda por biodiesel. A possibilidade de obter altos índices de lipídios e óleos de boa qualidade através de biomassa microalgácea torna sua utilização a melhor opção para matéria-prima na produção de biodiesel. A supressão do cultivo de oleaginosas, que competem com outras culturas alimentícias, tornam o biodiesel de origem microalgácea interessante também do ponto de vista social (CHISTI, 2008; WYMAN; GOODMAN, 1993).

Para obtenção de biodiesel de qualidade a partir de microalgas, é necessário obter óleo com um perfil de ácidos-graxos satisfatório. Cada espécie de microalga possui um perfil lipídico diferente, portanto, além da produtividade, NASCIMENTO et al. (2013) sugerem que a composição de ácidos graxos deve ser prioridade na seleção de espécies de cultivo. Além disso, os autores sugerem misturar óleos de diferentes cepas para obter-se um biodiesel de qualidade ótima.

#### 2.1.3.1.2 *Etanol*

A produção de etanol também pode ser uma motivação para cultivo de microalgas, devido ao fato das microalgas produzirem carboidratos que podem ser hidrolisados e convertidos a açúcares fermentáveis, utilizados como substrato por leveduras que produzem etanol em seu metabolismo. (SANCHEZ RIZZA et al., 2017)

---

Para viabilizar a utilização de microalgas como fonte de açúcares, é necessário que a composição de carboidratos na biomassa seja a mais alta possível. Para tanto, além da escolha acertada da espécie a ser cultivada, é necessário criar distúrbios metabólicos na microalga, que passa a produzir mais carboidrato. Tais distúrbios são atingidos quando o cultivo é realizado em meio com deficiência dos nutrientes nitrogênio ou fósforo (SANCHEZ RIZZA et al., 2017).

#### 2.1.3.1.3 *Gás Natural*

Como qualquer matéria orgânica, microalgas são potenciais produtores de gás natural, uma vez que podem ser digeridas anaerobicamente. A aplicação da técnica enfrenta empecilhos, como alto custo de implementação e manutenção; baixa produtividade de biomassa; e rendimento limitado de produção de metano devido à estrutura específica da parede celular microalgácea. Entretanto, a técnica mostra-se interessante quando incorporada à produção de outros produtos – químicos, combustíveis (biodiesel, etanol), entre outros – agindo como um co-processo (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2016).

#### 2.1.3.2 *Biorremediação*

A capacidade das microalgas se desenvolverem de maneira heterotrófica e mista torna possível seu crescimento em meios de cultivo composto parcial ou totalmente por efluentes domésticos ou industriais, que servem como suplemento de carbono ou nutrientes, e são removidos do meio ao serem utilizados pelas microalgas no seu crescimento. O crescimento de biomassa induz à diminuição dos níveis DQO, nitrogênio, fósforo e metais, que dependendo do efluente e da espécie de microalga utilizada podem ser diminuídos a níveis considerados toleráveis. A técnica é especialmente interessante quando associada à produção, através da biomassa microalgácea, de matérias-primas para processos de interesse econômico, como produção de combustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2010; CABANELAS et al., 2013; MAITY et al., 2014; RAMIREZ, 2013).

### 2.1.3.3 Outras aplicações

Por apresentarem composição interessante do ponto de vista nutricional (representado na Tabela 2) – altos níveis de proteínas, gorduras insaturadas, clorofila, carotenoides, entre outros – microalgas são utilizadas tanto na alimentação humana, na forma de suplementos alimentares, quanto na nutrição animal, especialmente na aquicultura (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Tabela 2. Comparação quanto a valores nutricionais (em percentual mássico) entre alimentos convencionais e diferentes espécies de microalgas (Adaptado de: BECKER, 1994)

Fonte nutricional	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
Fermento	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Óleos de microalgas vem sendo utilizados pela indústria de cosméticos, especialmente em produtos de cuidado com a pele. Em 2015 a Natura anunciou um acordo realizado com a Solazyme para a compra da AlgaPur<sup>®</sup>, óleo a base de microalgas utilizado em hidratantes para a pele (BRAZILIAN BEAUTY NEWS, 2015).

A utilização de microalgas para obtenção de químicos de alto valor, como por exemplo ácidos graxos específicos, pigmentos (clorofila, carotenoides) e químicos de isótopo estável também foi revisada por SPOLAORE *et al.* (2006).

## 2.2 Métodos Tradicionais para Quantificação de Biomassa Microalgácea

Diversos processos metabólicos ocorrem ao longo do desenvolvimento das microalgas. Visto que tais processos podem acarretar em mudanças na composição química da biomassa, vê-se fundamental realizar o acompanhamento do crescimento da cultura, tornando possível o estabelecimento de um momento ótimo para a colheita e utilização da biomassa (LOURENÇO, 2006).

### 2.2.1 Contagem por Microscopia

Utilizando um microscópio óptico, realiza-se a contagem de células de microalgas por uma unidade de volume. Considera-se que a concentração de algas no reator é igual à concentração de algas no volume colhido, possibilitando estimar a quantidade de células microalgáceas no reator. Apesar de simples, o atingimento de uma exatidão satisfatória torna a técnica muito onerosa, como mostrado na Tabela 3 (RICHMOND, 2008).

Tabela 3: Número de indivíduos contados e exatidão correspondente (Adaptado de: LOURENÇO, 2006, apud LUND; KIPLING; CREN, LE, 1958)

Número de organismos contados	Erro tipicamente associado à contagem	Intervalo real de variação da contagem
4	100%	0-8
16	50%	8-24
100	20%	80-120
400	10%	360-440
1.600	5%	1.520-1.680
10.000	2%	9.800-10.200
40.000	1%	39.600-40.400

### 2.2.2 Gravimetria (Peso Seco)

Através da técnica, estima-se a concentração mássica de microalgas em um cultivo ao medir a massa algácea após separação, lavagem, secagem e pesagem de uma amostra de volume conhecido. Segundo GÜNERKEN *et al.* (2017), é a forma mais direta de se obter a concentração mássica de um cultivo, entretanto, a técnica demanda muito tempo, pois retorna o resultado apenas quando a amostra estiver completamente seca. Ademais, o

valor mássico obtido será afetado pelo acúmulo de sais na suspensão, que pode acarretar em superestimação da concentração.

### 2.2.3 Densidade Óptica

Ao longo do desenvolvimento da cultura, observa-se elevação na turbidez, relacionada diretamente ao aumento da concentração de células microalgáceas no meio de cultivo. Visto que baseiam-se no princípio da obstrução da luz pelas células, medidas de densidade óptica tomadas em espectrofotômetro podem ser utilizadas para monitorar o crescimento de cultivos de microalgas. Para eliminar o efeito da coloração da amostra nos valores de absorbância, utiliza-se um comprimento de onda que esteja distante dos picos de absorção dos pigmentos fotossintetizantes. A técnica é prática, sensível e precisa, entretanto, não tem a capacidade de distinguir microalgas de contaminantes biológicos, e é necessário correlacionar os valores de absorbância com outras técnicas de quantificação, tais como contagem de células ou gravimetria. (GÜNERKEN *et al.*, 2017; LOURENÇO, 2006)

## 2.3 Monitoramento Online de Processos Microalgáceos

Técnicas tradicionais para acompanhamento do crescimento de culturas microalgáceas podem consumir muito tempo, ser trabalhosas, destrutivas para a amostra e caras, além de não permitirem o acompanhamento em tempo real (*online*) do processo. A utilização de sensores para monitoramento *online* de processos microalgáceos é uma alternativa muito interessante, principalmente por diminuir o tempo da obtenção de informações, possibilitando um melhor controle do processo (BENAVIDES *et al.*, 2015; HAVLIK; SCHEPER; REARDON, 2016).

### 2.3.1 Sensores para Microalgas

BENAVIDES *et al.* (2015) desenvolveram em seu estudo um sensor óptico de baixo custo, baseado no princípio da obstrução da luz por células, para monitoramento online do crescimento de microalgas em um reator FBR. A espécie utilizada foi *Dunaliella tertiolecta*, e a calibração do sensor foi realizada utilizando valores de densidade óptica de 680 nm medidos em um espectrofotômetro, correlacionados a medidas de gravimetria. A correlação entre a absorbância medida pelo sensor e a concentração de biomassa foi de

0,9981. A performance do sensor desenvolvido foi comparada à de um sensor comercial (Optek), e a conclusão do estudo foi a de que o sensor proposto foi uma solução eficaz e econômica para medições de concentração de biomassa.

Outro sensor óptico foi desenvolvido por JIA, KACIRA e OGDEN (2015), que teve como princípio de funcionamento tomadas de densidade óptica em três comprimentos de onda diferentes (650 nm, 685 nm e 785 nm) emitidos por diodos de laser. O sensor foi calibrado utilizando medidas colhidas por um espectrofotômetro, nos mesmos comprimentos de onda emitidos pelos lasers do sensor. Por sua vez, os valores medidos pelo espectrofotômetro estavam correlacionados a medidas de contagem por microscopia e gravimetria. O sensor foi testado no monitoramento do crescimento de *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus obliquus*, cultivadas em sistema fechado e aberto, respectivamente. O sensor mostrou-se capaz de monitorar mudanças na dinâmica e na fisiologia do cultivo para ambos sistemas de cultivo, em tempo real, dispensando a necessidade de diluições de amostras.

SHIN et al. (2015) desenvolveram um sensor de fluorescência, in situ e de baixo custo, para medir a concentração de *Chlorella vulgaris* em pequenas amostras (<10 µl), coletadas automaticamente por uma bomba de vácuo em um chip microfluídico. Emissores de luz (LED) a 448 nm foram utilizados com intuito de excitar as clorofilas a. para essas emitirem sinais fluorescentes a serem captados por um fotodetector. Para que apenas os sinais fluorescentes chegassem ao detector, filtros dicróicos e de cor foram adicionados. Valores de fotocorrente foram correlacionados com medidas de contagem de células ( $R^2 = 0,9613$ ), permitindo medir a concentração de microalgas a partir de sinais de fluorescências recebidos pelo fotodetector. Amostras de mesma concentração de microalgas, mas com diferentes valores de turbidez, foram testadas para verificar a influência da turbidez nos resultados. Os autores mostraram que o sensor foi capaz de medir concentrações de biomassa, não sofrendo interferência da turbidez. Entretanto, algumas melhorias foram sugeridas para diminuir efeitos de ruídos causados pela proximidade dos emissores com o detector de luz.

### 2.3.2 Controle de Processos Microalgáceos

KIM e JEONG (2017) propuseram uma método de colheita automática de culturas microalgáceas combinando um sistema de controle liga-desliga (turbidostato) para cultivo

contínuo em FBR e dispositivos ultrassônicos de separação. Um sensor de turbidez foi utilizado para monitorar a presença de células dentro do reator. O cultivo contínuo teve duração de 45 h, e a taxa de crescimento específica considerada foi de  $1,0 \text{ dia}^{-1}$ . Quando a turbidez da cultura excedia 135 NTU, meio de cultivo fresco era bombeado por uma bomba peristáltica para o reator até que a turbidez atingisse 125 NTU. O estudo conclui que a implementação da estratégia de controle foi um sucesso, embora maiores eficiências na produção de biomassa possam ser alcançadas.

MCGINN et al. (2017) cultivaram *Scenedesmus AMDD* em um FBR comercial de 300 L, em regime contínuo. O controle da concentração de microalgas no reator foi feita utilizando um algoritmo de fluxo ótimo, e a variável manipulada foi a taxa de diluição. Para monitorar a concentração de microalgas, foi utilizado um sensor de fluorescência – de funcionamento semelhante ao de SHIN et al. (2015). Utilizando um modelo simples de crescimento de cultura, e resolvendo o problema de otimização, o cultivo apresentou produtividade média de biomassa de  $0,11 \text{ g/L/dia}$  em um período de 25 dias, sendo que o algoritmo de controle passou a operar a partir do oitavo dia. A produtividade de biomassa foi 70% maior se comparada ao mesmo FBR operando como um turbidostato.

O desenvolvimento de um controlador lumostático, visando otimizar o cultivo de microalgas, foi estudado por IFRIM et al. (2013) para cultivo em batelada de *C. reinhardtii*. A razão entre a intensidade de luz incidente e a concentração de biomassa no reator foi considerada como variável de saída, enquanto seu controle foi realizado manipulando a potência da fonte de luz artificial, e, conseqüentemente, a intensidade de incidência de luz. Resultados de simulação mostraram que a estratégia poderia aferir ganho de 10% de produtividade, quando comparado a bateladas com incidência de luz constante. O aparato instrumental utilizou sensores de turbidez correlacionados a medidas de gravimetria para estimar *online* a concentração de biomassa no reator. Embora os resultados de ganho de produtividade não tenham sido tão expressivos quanto previsto pela simulação, o estudo conclui que o controlador lumostático foi validado com bons resultados.



### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Cultivos de Microalgas

No presente estudo, dois cultivos de *Scenedesmus sp.* foram realizados. As cepas utilizadas foram cedidas pelo LACIP/DEQUI/UFRGS, que as manteve armazenadas a  $25 \pm 1$  °C e luminância controlada de 10.000 lux.

Para a dosagem de cepas e reagentes, foram utilizadas pipetas analíticas (Eppendorf Research® plus) de 1 e 10 mL, cujas aplicações se restringem a experimentos com *Scenedesmus sp.*, diminuindo o risco de contaminação. O uso de ponteiros esterilizados em autoclave (20 min, a 2 atm) também foi realizado para evitar a contaminação.

Uma garrafa PET translúcida de 5 L foi utilizada como FBR, sendo que os cultivos tiveram 4,5 L em volume. Lâmpadas fluorescentes brancas (frias), mantidas acesas 24 h/dia a 10.000 lux de luminância, serviram de fonte de luz. A alimentação de ar foi feita através de pedras difusoras em formato cilíndrico, conectadas a um compressor de ar através de mangueiras de silicone. Além de fornecer CO<sub>2</sub> para o processo de fotossíntese, a aplicação do ar teve como objetivo homogeneizar o meio, evitando com que as microalgas decantassem. Mesmo assim, quando foi observada decantação de biomassa, o FBR era homogeneizado manualmente.

Para evitar contaminação pelo aparato experimental, inicialmente uma desinfecção do FBR foi realizada dosando 4,5 mL de água sanitária comercial em 4,5 L de água, mantido no FBR por 15 minutos. Após transcorrido o tempo, 4,5 mL de tiosulfato foram adicionados à solução e mantidos por 15 min, de modo a neutralizar o princípio ativo da água sanitária.

Assim que realizada a esterilização, o inóculo de *Scenedesmus sp.* teve a absorbância medida no espectrofotômetro UV-1600 da Pró-Análise, a 570 nm. Deste modo, através de uma simples regra de três, calculou-se o volume de inóculo a ser adicionado no FBR de forma que a densidade óptica do cultivo fosse de 0,1. O restante do volume do cultivo foi preenchido com meio de cultura (Meio de Guillard Modificado, apresentado na Tabela 4) previamente esterilizado em autoclave (20 min, a 2 atm).

Tabela 4: Meio de Guillard Modificado (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014; STEIN, 1979)

Reagente	Concentração (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	36,7600
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	36,9700
NaHCO <sub>3</sub>	12,6000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7100
NaNO <sub>3</sub>	85,0100
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	21,2165
Na <sub>2</sub> EDTA	4,3600
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3,1500
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0100
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0220
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,0100
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,1800
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0060

O crescimento dos cultivos foi acompanhado utilizando medidas, em duplicata, de densidade ótica realizadas pelo espectrofotômetro. O comprimento de onda escolhido deve-se a esse estar distante dos picos de absorção da luz pelas clorofilas *a* e *b*. Deste modo, a medida de densidade ótica é influenciada quase que exclusivamente pela turbidez causada pela presença de células de microalgas no meio (LOURENÇO, 2006). Quando a absorbância medida excedia 1,0, a amostra era diluída em 1:6 e tinha sua densidade ótica medida novamente – tal critério fora seguido em todos os experimentos que tiveram uso do espectrofotômetro. A equação utilizada ( $R^2 = 0,91$ ) para correlacionar a absorbância medida em concentração de *Scenedesmus sp.* (por medidas de gravimetria) nas condições de cultivo utilizadas neste estudo foi desenvolvida no LACIP em estudos anteriores, ainda não publicados:

$$x = 0,406 * ABS_{570} - 0,0114 \quad (1)$$

onde  $x$  é a concentração de *Scenedesmus sp.* em mg/L, e  $ABS_{570}$  a absorbância medida pelo espectrofotômetro, a 570 nm.

### 3.2 Monitoramento *Online* dos Cultivos

Para o desenvolvimento dos sensores ópticos para *Scenedesmus sp.*, foram empregados sensores de luminosidade TSL 2561 da Adafruit associados a

microcontroladores por comunicação em interface I2C. Os dois sensores desenvolvidos tiveram a obstrução da luz pelas células microalgáceas como princípio de funcionamento. O aumento de concentração de microalgas em um cultivo acarreta em aumento na turbidez do meio, obstruindo a passagem de luz.

A absorvância do meio pode ser estimada pela Lei de Beer-Lambert:

$$ABS = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

onde  $ABS$  é a absorvância do meio,  $I$  é a intensidade luminosa após atravessar o meio, e  $I_0$  a intensidade luminosa da luz incidente.

A absorvância do meio pode ser correlacionada empiricamente à concentração.

$$c = ABS * a + b \quad (3)$$

onde  $c$  é a concentração no meio (em g/L),  $ABS$  é a absorvância do meio, e  $a$  e  $b$  são os fatores angular e linear obtidos em calibração, respectivamente.

Visto que o sensor TSL 2561 tem a capacidade de medir valores de luminância, um experimento foi realizado para correlacionar medidas de absorvância pelo espectrofotômetro (570 nm) e medidas de luminância pelo sensor TSL 2561.

### 3.2.1 Correlação entre Luminância Medida pelo Sensor e Absorvância

Para obter uma correlação entre valores de luminância medidos pelo sensor e absorvância medida em espectrofotômetro a 570 nm, uma câmara negra foi montada com peças de LEGO® de cor preta com a finalidade de abrigar da influência da luz externa o sensor, composto por lâmpadas de LED, uma cubeta de vidro e o TSL 2561. A escolha por peças de LEGO® para a montagem da estrutura teve como motivação a praticidade de sua montagem e desmontagem, caso alterações fossem necessárias. Uma a uma, 19 amostras de diferentes concentrações de *Scenedesmus sp.* tiveram sua absorvância medida no espectrofotômetro, e em seguida as amostras eram dispostas na cubeta de vidro de dentro da câmara negra. Lâmpadas de LED azul (450 – 495 nm), vermelha (620 – 750 nm), verde (495 – 570 nm) e amarela (570 – 590 nm), posicionadas em uma das faces translúcidas da cubeta, serviram como fonte de luminância. O TSL 2561 foi posicionado a 180 ° das lâmpadas de LED, de modo que a cubeta ficasse entre o sensor e fonte de luminância. A rotina implementada pelo microcontrolador (Arduino® Uno) fazia com que cada LED fosse acionado separadamente, e para cada acionamento, o TSL 2561 lia um valor de luminância,

mostrados na tela de um computador. Todos os sensores desenvolvidos neste estudo seguiram a mesma lógica de funcionamento, representado na Figura 4.

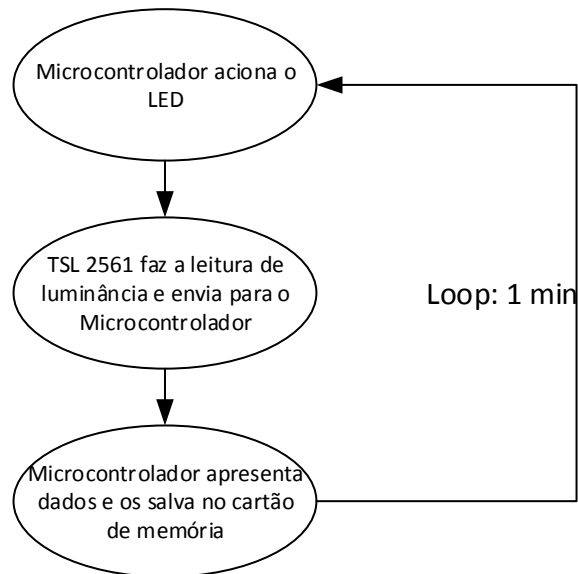


Figura 4: Fluxograma de funcionamento do sensor.

### 3.2.2 Primeiro Cultivo em Batelada e Sensor Utilizado (Protótipo 1)

O primeiro cultivo, realizado em batelada pelo período de 28 dias, tem o aparato experimental demonstrado na Figura 5, onde a) é um compressor de ar, compartilhado com outras plantas do LACIP; b) é o FBR; c) é um bomba peristáltica 9 V; d) é o sensor utilizado no monitoramento do cultivo (Protótipo 1), formado por uma câmara negra contendo uma cubeta plástica, uma lâmpada de LED (à esquerda) e um sensor TSL 2561 (à direita); e) é o microcontrolador utilizado – Arduino® Uno; f) é uma tela LCD.

A câmara negra abrigou uma cubeta plástica adaptada em suas extremidades para possibilitar a passagem de fluxo líquido, uma lâmpada de LED azul e o sensor TSL 2561. O LED e o sensor foram dispostos a 180 ° entre si, com a cubeta situada entre os dois. Uma bomba peristáltica de 9 V realizava a circulação do cultivo, passando pelo sensor. O sensor TSL 2561, as lâmpadas de LED, a bomba peristáltica e uma tela LCD foram conectados, através de uma protoboard, ao microcontrolador Arduino® Uno. Os valores de absorvância, calculados através da correlação obtida em 3.2.1, eram medidos minuto a minuto e enviados pelo microcontrolador à tela LCD e a um módulo de armazenamento (cartão de memória SD).

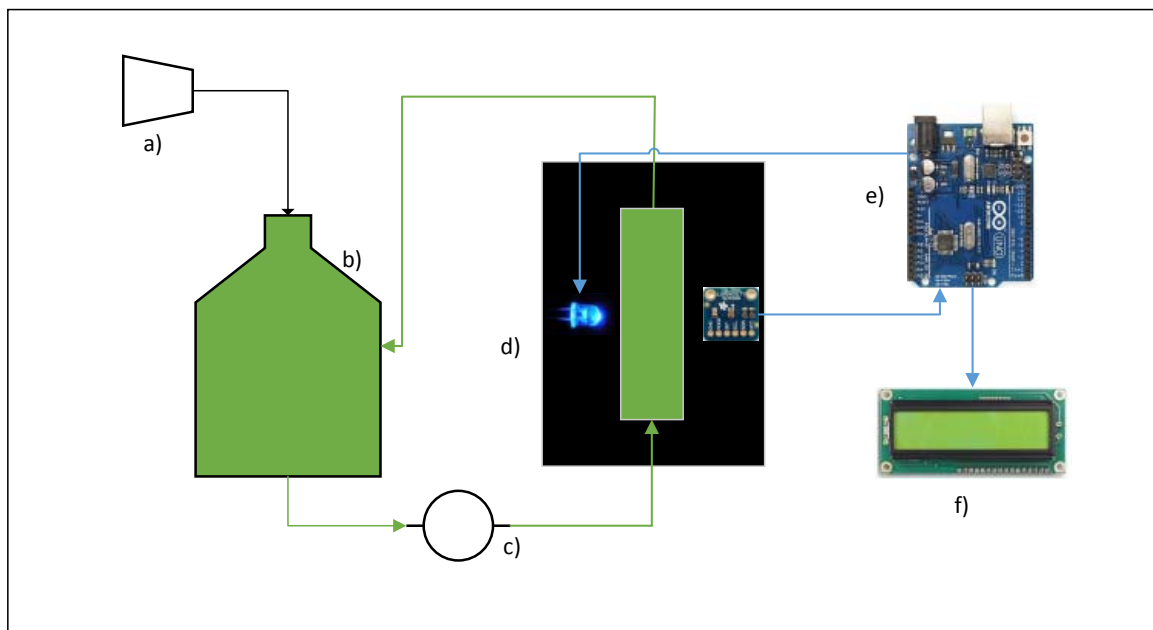


Figura 5: Representação do aparato experimental utilizado no primeiro cultivo.

### 3.2.3 Segundo Cultivo em Batelada e Sensor Utilizado (Protótipo 2)

O segundo cultivo ocorreu sob regime batelada durante 28 dias, e tem aparato experimental representado na Figura 6, onde a) é um compressor de ar eletromagnético da BOYU®; b) é o FBR; c) é o sensor utilizado (Protótipo 2); d) é um microcontrolador Arduino® Nano; e) é a tela LCD.

Um sensor imerso (Protótipo 2) foi desenvolvido para acompanhar a turbidez do cultivo. Um conjunto formado por um sensor TSL 2561, uma cubeta plástica e uma lâmpada de LED azul, posicionados de maneira semelhante a como fora feito para o Protótipo 1, foi inserido dentro de uma luva de redução de PVC e vedado, de modo que a parte aberta da cubeta recebia a entrada do meio de cultura assim que o sensor era imerso. A luva de redução foi conectada a uma das extremidades de um tubo de PVC de 40 mm de diâmetro, enquanto a outra extremidade do tubo recebia um *cap*, perfurado para passagem da fiação. Para evitar acúmulo de ar dentro da cubeta, que impediria a entrada de líquido, a parte fechada foi perfurada e conectada a uma mangueira de silicone, permitindo a saída de ar para fora do sensor através do orifício feito no *cap*. O conjunto LED/TSL era ligado a um microcontrolador (Arduino® Nano), que recebia medidas de luminância emitidas pelo TSL 2561, e transcrevia os valores em uma tela LCD.

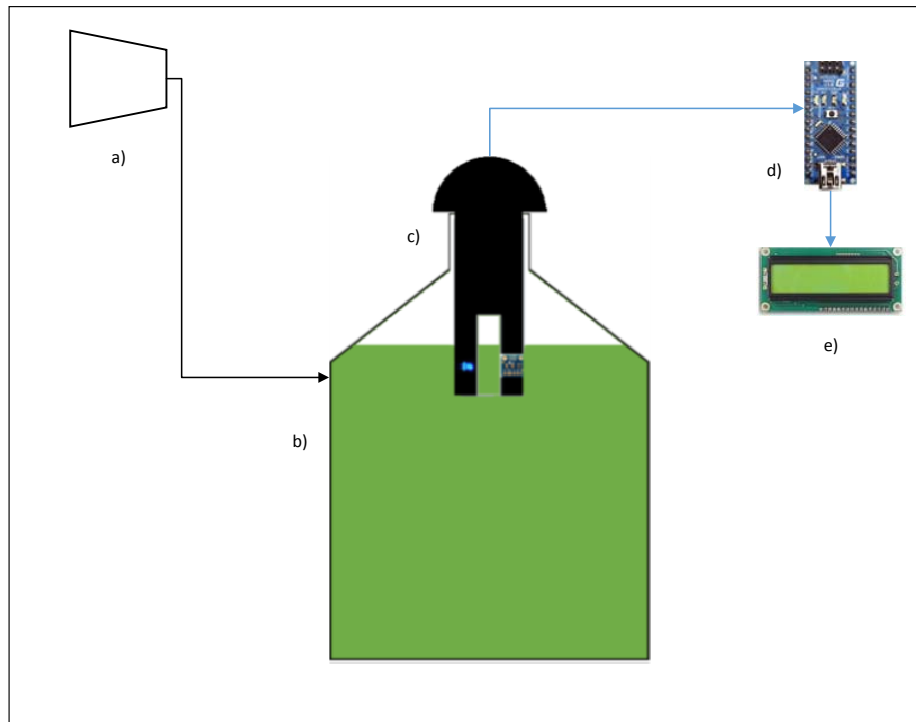


Figura 6: Representação do aparato experimental utilizado no segundo cultivo.

### 3.2.4 Cultivo Contínuo e Sensor Utilizado (Protótipo 3)

O cultivo contínuo de *Scenedesmus sp.* tem o aparato experimental apresentado pela Figura 7, onde a) é um compressor de ar eletromagnético da BOYU®; b) é o reservatório de meio de cultivo fresco e esterilizado; c) é a bomba peristáltica 9 V; d) é o FBR; e) é o sensor utilizado; f) é o microcontrolador Arduino® Nano; g) é a tela LCD; h) é a colheita por transborde de cultura.

Após transcorridos 28 dias do segundo cultivo, iniciou-se o cultivo sob regime contínuo por 71 horas. Para acompanhar a turbidez da cultura minuto a minuto, foi desenvolvido um terceiro protótipo de sensor (apresentado na Figura 8), divergindo do segundo apenas pela substituição da luva de diminuição de diâmetro por uma luva rosqueável acoplada a um cano de PVC (40 mm) e a um *plug* adaptado que recebia uma cubeta plástica, de maneira semelhante ao Protótipo 2. Ao final de toda medição, os dados eram enviados pelo microcontrolador a um módulo de armazenamento, idêntico ao utilizado para o Protótipo 1. À direita da Figura 8 vê-se o *plug* adaptado recebendo a cubeta (com abertura para saída de ar), o LED azul e o sensor TSL 2561.

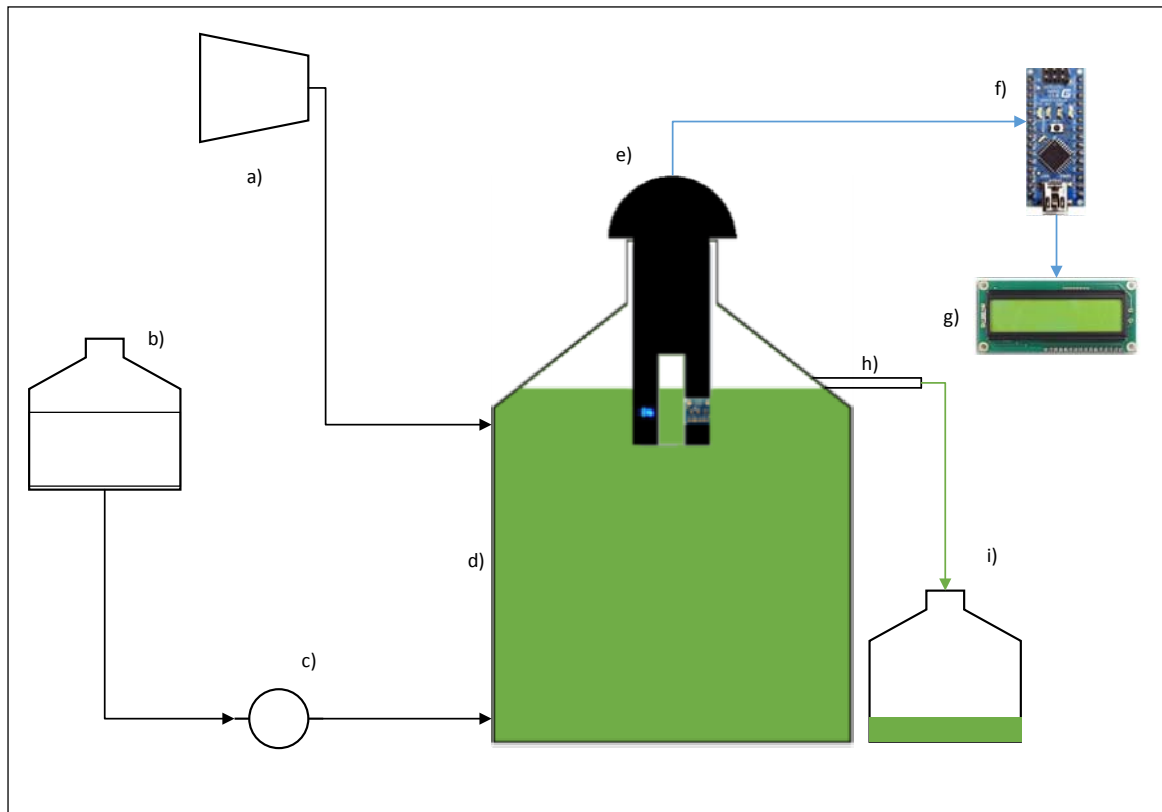


Figura 7: Representação do aparato experimental utilizado no cultivo contínuo.



Figura 8: Sensor utilizado no cultivo contínuo (Protótipo 3).

O controle da concentração de microalgas no FBR e foi realizada em uma estratégia liga-desliga, em que a luminância medida pelo sensor era a variável controlada, e o acionamento da bomba de injeção de meio de cultivo fresco era a variável manipulada. Toda vez que a luminância diminuía em até 10 lux do valor de *setpoint* (medida tomada visando diminuir o efeito de *outliers* no controle da concentração), o controlador acionava a bomba e a desligava após 5 s, injetando aproximadamente 3,67 mL de meio de cultivo fresco no FBR. A colheita de biomassa era realizada através de transborde do cultivo por

uma mangueira de silicone inserida em um orifício feito logo acima do nível inicial de líquido, mantendo o cultivo em volume constante de aproximadamente 4,5 L.

Ao final do cultivo contínuo, o volume de cultura coletado foi medido e duas amostras tiveram a densidade óptica medida em espectrofotômetro, de modo a estimar a concentração (Equação 3) do volume de *Scenedesmus sp.* colhido. A taxa de diluição foi estimada ao dividir-se o volume coletado pelo volume do reator e pelo tempo de cultivo.

$$D = \frac{V}{V_R \times t} \quad (4)$$

onde D é a taxa de diluição em dia<sup>-1</sup>, V é o volume coletado em L, V<sub>R</sub> o volume do cultivo em L, e t é o tempo do cultivo em dias. Multiplicando-se a taxa de diluição pela concentração do volume coletado, tem-se a produtividade.

$$P = D * x \quad (5)$$

onde P é a produtividade do cultivo em g/L/dia, x é a concentração de *Scenedesmus sp.* em g/L.



## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Correlação entre Luminância Medida pelo Sensor e Absorbância

Os testes de correlação entre absorbância e luminância medida pelo sensor descrito em 3.2.1 tiveram como resultado altos índices de correlação para as lâmpadas de LED azul e vermelha, utilizando interpolações logarítmicas, como apresentado na Figura 9.

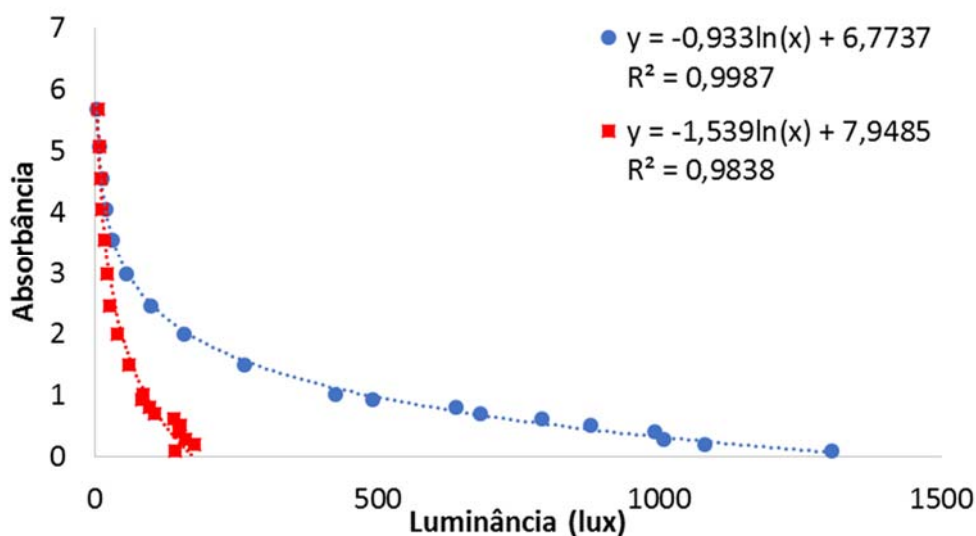


Figura 9: Correlação entre Luminância e Absorbância para os LEDs azul (círculo) e vermelho (quadrado).

Os resultados demonstram que ambas as cores de luz podem ser utilizadas para medir a absorbância de um meio contendo *Scenedesmus sp.* Além da vantagem de possibilitar o monitoramento *online* do desenvolvimento do cultivo, a utilização do sensor testado permite medir diretamente a absorbância de meios de cultura concentrados (ABS > 1), como mostra a Figura 9. Essa característica representa um ganho em relação a boa parte dos espectrofotômetros comerciais (incluindo o utilizado neste estudo), que requerem diluição de amostras concentradas para uma medida precisa de absorbância. Apesar da boa correlação apresentada para o LED vermelho, constata-se pela Figura 9 que o mesmo é menos apropriado para medir valores baixos de ABS, conseqüentemente, nos protótipos desenvolvidos utilizou-se o LED azul.

O uso dos LEDs de cor amarela e verde não foram satisfatórios, pois apresentaram baixa variação de luminância captada pelo sensor, frente à variação de absorbância. A

Tabela A, encontrada no Apêndice A, contém os resultados de correlação para todos os LEDs testados.

#### 4.2 Protótipo 1

A luminância medida pelo sensor utilizado no cultivo de *Scenedesmus sp.* em batelada apresentou correlação logarítmica ( $R^2 = 0,9699$ ) com relação a valores de absorbância medidos por espectrofotômetro a 570 nm, como mostra a Figura 10.

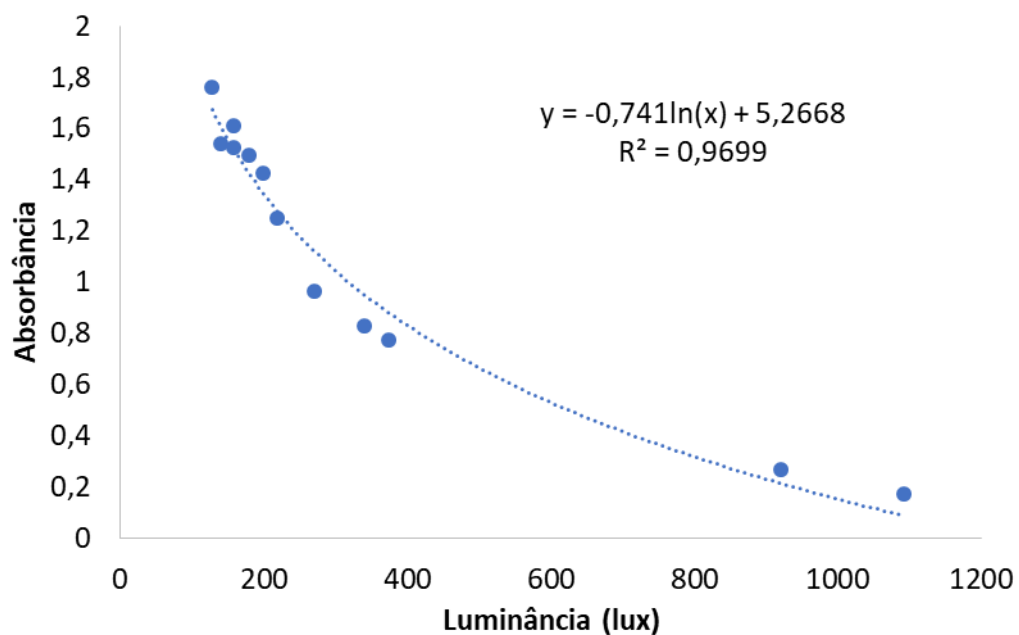


Figura 10: Correlação entre absorbância medida por espectrofotômetro a 570 nm e luminância medida pelo Protótipo 1.

O comportamento do Protótipo 1 ao longo do tempo foi registrado no módulo de armazenamento do microcontrolador durante um período de 6 dias e é apresentado na Figura 11. A análise permite afirmar que o sensor não apresentou comportamento estável durante período de amostragem, exceto nas primeiras 20 h, em que turbidez aumentou continuamente com o avanço do tempo, como esperado.

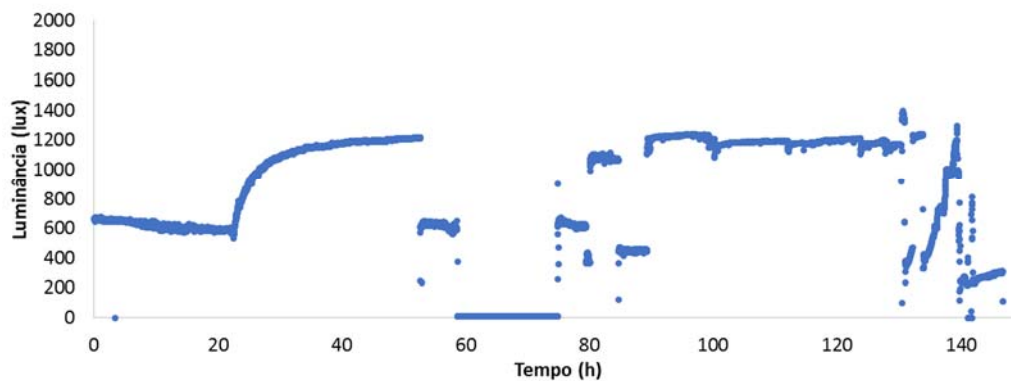


Figura 11: Comportamento do Protótipo 1 ao longo de 6 dias.

Por vezes a bomba peristáltica fora encontrada desligada, podendo ter sido ocasionado por falta de corrente elétrica recebida do Arduino®, uma vez que voltava a funcionar normalmente quando era ligada a uma fonte de energia externa. O desligamento repentino da bomba pode explicar o decaimento da turbidez (aumento da luminância), como pode ser observado a partir de 20 h, visto que a interrupção do fluxo de meio de cultivo dentro da cubeta acarreta em sedimentação, tornando a amostra analisada pelo sensor mais límpida. Ademais, a vazão da bomba peristáltica não fora grande o suficiente para impedir a sedimentação de microalgas no interior da cubeta, demandando homogeneizações periódicas que implicavam em mexer na estrutura do sensor. Algumas dessas intervenções resultavam em variação da posição do sensor TSL 2561, que pode ter afetado os valores de absorvância medidos pelo sensor.

Outro problema operacional que pode ter impactado na estabilidade das medidas foi a utilização de um compressor de ar compartilhado com outras plantas do LACIP, tendo a corrente de ar estado sujeita a grandes variações na vazão. Baixas vazões de ar associados a concentrações elevadas de microalgas acarretam em aumento na sedimentação de biomassa, e viu-se necessário homogeneizar o meio de cultivo toda vez que amostras fossem colhidas do FBR, fazendo com que a absorvância medida pelo sensor aumentasse instantaneamente.

Os problemas operacionais relatados motivaram a elaboração de um sensor que dispensasse o uso de uma bomba para promover a circulação de cultivo no seu interior; e a utilização de um compressor exclusivo para o cultivo, eliminando as variações de vazão de ar oriundas da utilização de um compressor compartilhado.

### 4.3 Protótipo 2

A correlação entre a luminância medida pelo Protótipo 2 e  $ABS_{570}$  é apresentada na Figura 12. Observa-se que a boa correlação ( $R^2=0,9362$ ) é, no entanto, inferior à obtida em 4.2 ( $R^2=0,9699$ , Figura 10). É provável que a presença de bolhas de ar no interior da cubeta e o menor abrigo da luz externa no caso do Protótipo 2 tenham influenciado na diminuição da correlação.

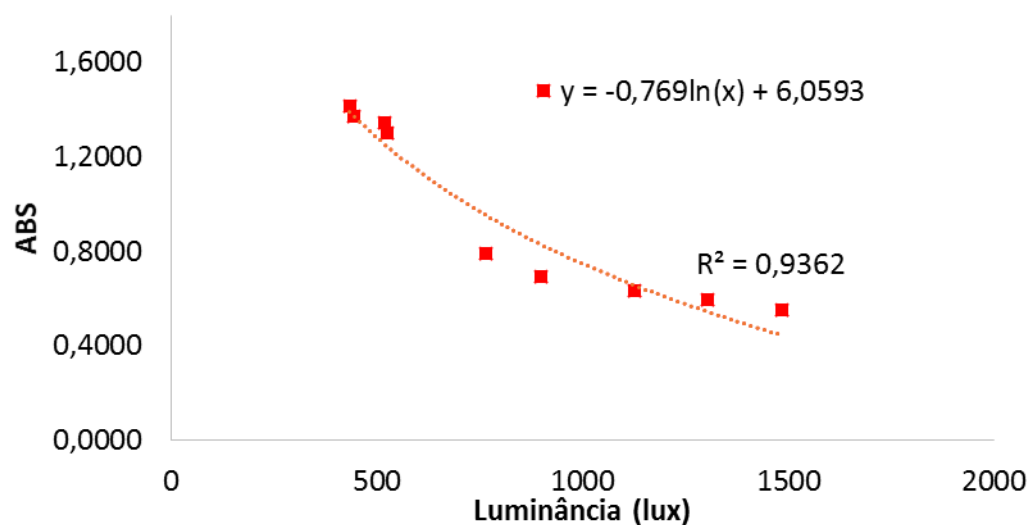


Figura 12: Correlação entre absorvância e luminância medida pelo Protótipo 2.

Embora o Protótipo 2 apresente uma estrutura simples, ela se mostrou custosa de ser vedada. O sensor foi introduzido no cultivo apenas após transcorrido o quarto dia, pois até então ocorria entrada de meio de cultivo no interior do mesmo, seguida de falhas na leitura pelo TSL 2561, evidenciadas através da leitura da tela LCD. Após 20 dias funcionando corretamente, o sensor apresentou novamente problemas oriundos da entrada de líquido no seu interior. Mudou-se então o vedante utilizado até o momento (cola quente) para cola de silicone, entretanto a vedação continuava ineficaz. O problema motivou o desenvolvimento do Protótipo 3.

### 4.4 Cultivo Contínuo e Protótipo 3

A correlação entre a luminância medida pelo Protótipo 3 e  $ABS_{570}$  é apresentada na Figura 13. Observa-se uma correlação ( $R^2 = 0,9141$ ) semelhante à encontrada para o Protótipo 2 ( $R^2 = 0,9362$ ), o que é razoável, visto que os protótipos são semelhantes.

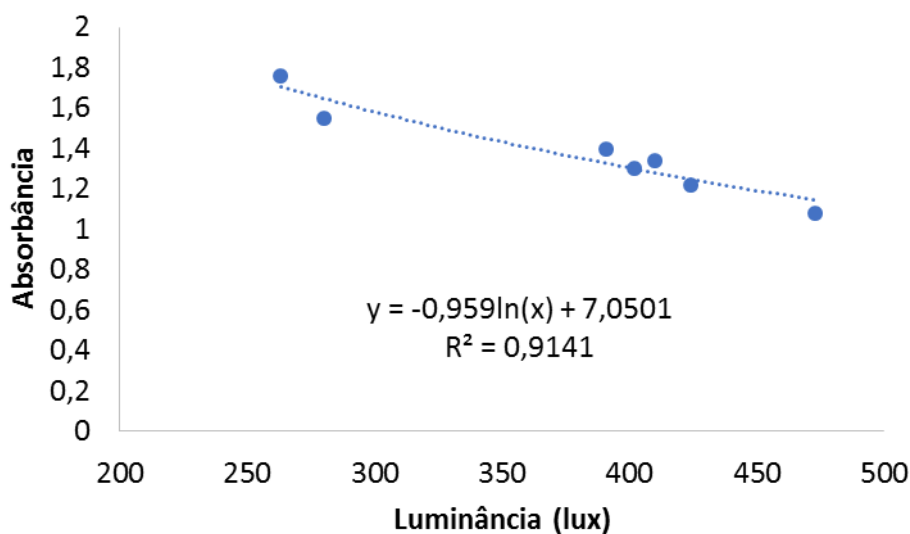


Figura 13: Correlação entre absorbância e luminância medida pelo Protótipo 3.

O comportamento do Protótipo 3 durante o cultivo contínuo é apresentado na Figura 14. Nela, observa-se, apesar da visível presença de ruídos, em geral uma boa acurácia, exceto nas primeiras horas de cultivo. Nesse período, o sensor apresentou comportamento instável, possivelmente causado pela entrada de ar no interior da cubeta, seguida de arraste de sedimentos, acarretando em, respectivamente, maiores e menores valores de luminância captados pelo sensor. A partir de 27 h, vê-se um degrau positivo seguido de uma tendência no aumento de luminância medida pelo sensor até 47 h.

Ao fim do período de 47 h, observou-se quantidade significativa de sedimentação de microalgas no FBR, o que explica o aumento na luminância medida pelo sensor durante o período. Em seguida, o cultivo foi manualmente homogeneizado e teve a vazão de ar aumentada, visando inibir a sedimentação de biomassa. Observa-se, então, uma diminuição súbita na luminância medida, muito inferior ao *setpoint* inicial (400 lux). Visto que uma nova condição havia sido estabelecida no cultivo, o *setpoint* foi alterado para 284 lux.

Nas horas de cultivo que seguiram, observa-se na Figura 14 um aumento da presença de ruídos, embora uma boa acurácia tenha sido mantida até 57 h. A partir de então, vê-se um aumento na instabilidade até que em 62 h o sensor passa a medir valores de luminância próximos aos valores de branco. O aumento do ruído e a instabilidade do sensor é explicada pela presença de sedimentos e bolhas de ar dentro da região de medição, uma vez que o cultivo fora manualmente homogeneizado após evidenciada

sedimentação, e teve a vazão de ar aumentada. A maior entrada de ar associada ao aumento de sólidos no meio acarretou em entupimento da mangueira destinada à saída de ar de dentro do sensor, visto que ao final do cultivo a mangueira estava obstruída com microalgas (demonstrado na Figura 15). Assim que desobstruída, o sensor passou a ler valores inferiores de luminância, como é visto nos últimos pontos da Figura 14.

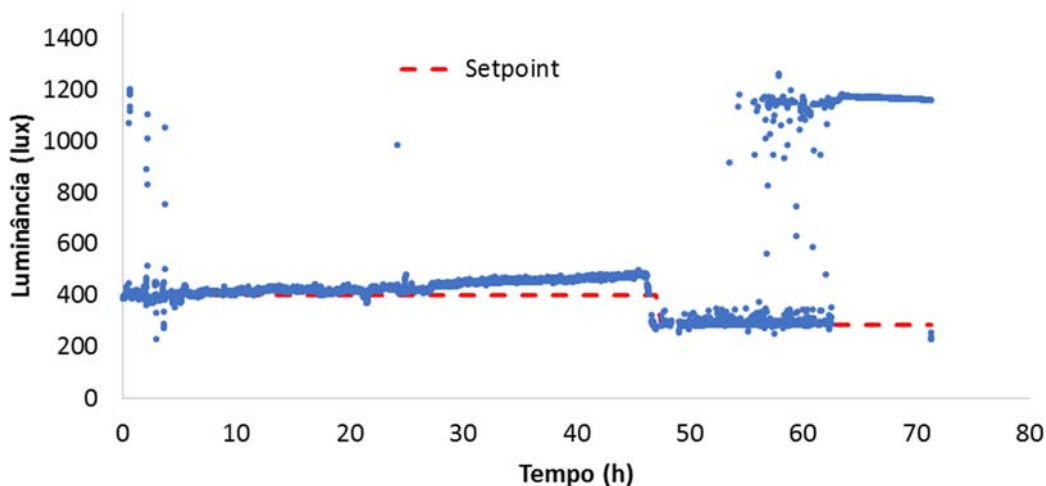


Figura 14: Comportamento do Protótipo 3 durante o cultivo contínuo.

Ao final de 71 h de cultivo sob regime contínuo, coletou-se 500 mL de cultura com concentração estimada de 0,771 g/L. A produtividade do período foi de 0,0289 g/L/dia, 15,2 % maior do que o primeiro cultivo (monitorado pelo Protótipo 1), realizado sob regime batelada. A produtividade do cultivo contínuo, no entanto, foi 51,8 % menor do que a alcançada por MCGINN *et al.* (2017) em um turbidostato, o que pode ser explicado pelos problemas operacionais ocorridos, mencionados anteriormente.



Figura 15: Obstrução da mangueira destinada à saída de ar do sensor.

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste estudo foram desenvolvidos 3 protótipos de sensores ópticos de baixo custo para monitoramento do crescimento de *Scenedesmus sp.*, após ter sido verificada a correlação entre medidas de densidade ótica e luminância medida por um sensor TSL 2561 para 4 diferentes cores de emissão de luz. Um dos protótipos foi utilizado para realizar um cultivo sob regime contínuo (turbidostato) de produção.

Os LEDs de cores vermelha e azul apresentaram boa correlação ( $R^2 = 0,9838$  e  $0,9987$ , respectivamente) para medidas de luminância e densidade ótica, entretanto, a baixa sensibilidade para valores de baixa absorvância, apresentada pela cor vermelha, sugeriu a utilização da luz azul para o desenvolvimento dos protótipos. O Protótipo 1 foi desenvolvido para monitorar a turbidez de em um cultivo em batelada, e apresentou correlação de  $R^2 = 0,9699$  com a absorvância tomada em espectrofotômetro a 570 nm, no entanto, devido a problemas operacionais, o protótipo mostrou-se instável. O Protótipo 2, desenvolvido para ser imerso no cultivo, dispensando a necessidade de agentes externos para promover a entrada de meio de cultura no interior da unidade sensorial, apresentou correlação entre densidade ótica e luminância de  $R^2 = 0,9362$ . Problemas na vedação do sensor motivaram o desenvolvimento de um terceiro protótipo, de funcionamento similar ao Protótipo 2. O Protótipo 3 apresentou  $R^2 = 0,9141$  para correlação entre luminância e densidade ótica, e foi utilizado na implementação do regime contínuo de cultivo de *Scenedesmus sp.* na forma de um turbidostato, que teve duração de 71 horas. O monitoramento do cultivo pelo Protótipo 3 mostrou boa acurácia enquanto a cultura não apresentava quantidade significativa de sedimentos suspensos, uma vez que captou o comportamento de aumento da densidade ótica do cultivo nas primeiras 47 horas de cultivo. Quando o cultivo passou a ter mais sedimentos suspensos e uma maior vazão de ar, o sensor tornou-se menos estável, chegando à total perda de acurácia quando a saída de ar daquele foi obstruída por sedimentos. A produtividade do cultivo contínuo foi de  $0,0289$  g/L/dia,  $15,2\%$  superior à do primeiro cultivo, realizado em batelada.

Os resultados mostram que os sensores desenvolvidos apresentaram boa capacidade de monitorar *online* a concentração de *Scenedesmus sp.*, uma vez que apresentaram boa correlação com a absorvância do cultivo. O Protótipo 3 apresentou boa performance e mostrou-se operacionalmente mais estável do que os outros protótipos para a condição de ausência de sedimentos suspensos. No entanto, vê-se necessário realizar mais testes com uso do Protótipo 3, dado os problemas ocorridos durante este

estudo, oriundos da sedimentação de biomassa no FBR. O cultivo contínuo de *Scenedesmus sp.* utilizando o Protótipo 3 para monitoramento do crescimento do cultivo e estratégia de controle liga-desliga mostrou-se promissor, visto que apresentou produtividade maior que o cultivo em batelada, apesar das adversidades operacionais.

Ao final deste estudo, sugere-se para trabalhos futuros:

- Utilização de sensores imersos para monitoramento de cultivos de microalgas de outras espécies;
- Desenvolvimento de sensores imersos utilizando como fonte de emissão LEDs com comprimento de onda de 570 nm e no espectro do infravermelho;
- Avaliação do impacto da vazão de ar sobre a performance de sensores ópticos imersos;
- Adição de um filtro eficiente na lógica de operação do sensor, de modo que fique menos suscetível a ruídos;
- Implementação de uma estratégia de controle PID para um controle mais eficiente do cultivo contínuo.



## 6 Referências

BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. [S.l.]: Cambridge University Press, 1994.

\_\_\_\_\_. Micro algae as a source of protein. **Biotechnol Adv**, 2007. v. 25, p. 207–210.

BENAVIDES, M. *et al.* Design and test of a low-cost RGB sensor for online measurement of microalgae concentration within a photo-bioreactor. **Sensors (Switzerland)**, 2015. v. 15, n. 3, p. 4766–4780.

BRAZILIAN BEAUTY NEWS. Natura usará óleo de microalgas produzido pela Solazyme em suas linhas de cosméticos. [S.l.], 2015. Disponível em: <<http://www.brazilbeautynews.com/natura-usara-oleo-de-microalgas-produzido-pela,769>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2010. v. 14, n. 2, p. 557–577.

CABANELAS, I. T. D. *et al.* From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. **Applied Energy**, 2013. v. 109, p. 283–290. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.023>>.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Trends in Biotechnology**, 2008. v. 26, n. 3, p. 126–131.

GÜNERKEN, E. *et al.* Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling. **Algal Research**, 2017. v. 25, n. November 2016, p. 25–31.

HAVLIK, I.; SCHEPER, T.; REARDON, K. F. **Monitoring of microalgal processes**. [S.l.]: [s.n.], 2016. V. 153.

IFRIM, G. A. *et al.* **Feedback linearizing control of light-to-microalgae ratio in artificially lighted photobioreactors**. [S.l.]: IFAC, 2013. V. 12.

ISHIKA, T.; MOHEIMANI, N.; BAHRI, P. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2017. v. 78, n. April, p. 356–368. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110>>.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016. v. 75, n. September 2016, p. 692–709. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>>.

JIA, F.; KACIRA, M.; OGDEN, K. L. Multi-wavelength based optical density sensor for autonomous monitoring of microalgae. **Sensors (Switzerland)**, 2015. v. 15, n. 9, p. 22234–22248.

KIM, J. H.; JEONG, S. H. A study on the automatic harvest by on-off control for a combined

system of continuous culture of microalgae and ultrasonic separation devices. **Journal of Mechanical Science and Technology**, 2017. v. 31, n. 4, p. 1581–1586. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12206-017-0305-z>>.

LOURENÇO, S. De O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. [S.l.]: RiMa, 2006.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; CREN, E. D. LE. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**, 1958. v. 11, n. 2, p. 143–170.

MAITY, J. P. *et al.* The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae. **Energy**, 2014. v. 78, p. 94–103. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.06.023>>.

MCGINN, P. J. *et al.* Maximizing the productivity of the microalgae *Scenedesmus* AMDD cultivated in a continuous photobioreactor using an online flow rate control. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2017. v. 40, n. 1, p. 63–71.

NASCIMENTO, I. A. *et al.* Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. **Bioenergy Research**, 2013. v. 6, n. 1, p. 1–13.

RAES, E. J. *et al.* Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. **Journal of Applied Phycology**, 2014. v. 26, n. 1, p. 247–255.

RAMIREZ, N. N. V. Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça. 2013.

\_\_\_\_\_; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp in Ethanol Vinasse. 2014. v. 57, n. October, p. 630–635.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.

SANCHEZ RIZZA, L. *et al.* Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, 2017. v. 22, p. 140–147. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926416308268>>.

SHIN, Y. H. *et al.* A portable fluorescent sensor for on-site detection of microalgae. **Microelectronic Engineering**, 2015. v. 144, p. 6–11. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2015.01.005>>.

SPOLAORE, P. *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2006. v. 101, n. 2, p. 87–96.

STEIN, J. R. **Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements**. [S.l.]: Cambridge University Press, 1979.

WYMAN, C. E.; GOODMAN, B. J. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1993. v. 39–40, n. 1, p. 41–59.

## Apêndice A

Tabela A: Correspondência entre ABS e luminância para diferentes cores de LED.

ABS (570 nm)	Luminância (lux) dos LEDs testados			
	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho
0,1014	1306	43	72	143
0,2029	1081	32	66	177
0,299	1009	34	60	160
0,4058	993	34	54	148
0,5165	879	31	51	152
0,631	791	30	45	139
0,71	683	26	49	105
0,8117	639	26	41	96
0,947	491	25	38	82
1,014	426	23	31	86
1,5	264	19	29	61
2	157	13	24	40
2,47	98	10	14	25
2,99	55	9	13	22
3,55	30	7	9	17
4,05	19	6	7	13
4,54	12	4	5	10
5,07	7	3	5	8
5,682	3	3	3	5