

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

**CONTROLE POLICROMÁTICO DE LUZ APLICADO À PRODUÇÃO DE
MICROALGAS**

VANESSA CAMPOS GUEDES

**SÃO CARLOS- SP
2021**

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

Vanessa Campos Guedes

Controle policromático de luz aplicado à produção de microalgas

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Dr. Antonio Carlos Luperni Horta

Co-orientador: Dr. Marcel Otavio Cerri

Co-orientadora: Dra. Ana Teresa Lombardi

**SÃO CARLOS- SP
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa Campos Guedes, realizada em 08/12/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Prof. Dr. Gilson Campani Júnior (UFLA)

Prof. Dr. José Bonomi Baruffi (UFSC)

Prof. Dr. Fernando Vines Lima (WVU)

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 aos meus pais,
Manuel e Isabel, aos meus irmãos
Luziane e Danilo, e a Nathalia por
todo o amor, suporte e incentivo.

*“A mente que se abre para uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original” (Albert Einstein)*

RESUMO

As microalgas têm chamado a atenção da indústria biotecnológica por serem sintetizadoras naturais de produtos de alto valor agregado como β -caroteno, astaxantina, luteína, ácido docosahexaenóico, proteínas e pigmentos. Contudo sua exploração biotecnológica está muito aquém quando comparada à utilização de leveduras e bactérias. O principal desafio tecnológico que precisa ser superado nos cultivos algais é a atenuação luminosa, que fornece a esses microrganismos um ambiente não homogêneo de luz reduzindo/limitando o crescimento celular. Considerando essas premissas, a presente Tese teve como principal objetivo o desenvolvimento de um controlador automático de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), utilizando a lógica Fuzzy para otimizar a produtividade de biomassa e reduzir os custos do processo de produção. Foi desenvolvido um controlador policromático de luz e, para isso, o estudo foi dividido em cinco etapas: i) a primeira delas foi responsável por fornecer todo o aparato experimental necessário para os cultivos controlados e não controlados utilizados para a validação do sistema proposto, que inclui dois painéis luminosos, o circuito controlador de potência e um condensador especial; ii) a segunda etapa contou com o desenvolvimento de um sensor PAR, que é o sistema indispensável para monitoramento da PAR durante os cultivos e também por guiar o controlador. O sistema desenvolvido foi submetido ao licenciamento de patente (INPI) e apresentou custo dez vezes mais barato do que os sensores comerciais disponíveis no mercado; iii) a terceira etapa contemplou o desenvolvimento do *software* responsável pelo monitoramento e controle das variáveis do fotobiorreator que foi registrado como SUPERSYS_Photo®; iv) a quarta etapa foi imprescindível para a caracterização dos efeitos da qualidade da luz sobre a composição bioquímica da microalga cosmopolita *Scenedesmus obliquus*, sobre a qual não encontramos discussão na literatura). Isso permitiu compreender o comportamento bioquímico da espécie quando submetida a diferentes comprimentos de onda (branco, azul, vermelho e mistura de azul e vermelho). Estes resultados foram primordiais para a definição do comprimento de onda utilizado no controlador de luz, otimizando a produção de proteínas na composição final dos cultivos, que de acordo com resultados apresentados a microalga utilizada sintetiza uma maior fração de proteínas quando cultivada sob luz azul em relação à luz branca convencional; v) a quinta e última etapa contemplou, de fato, o desenvolvimento do controlador policromático de luz baseado em lógica Fuzzy, que foi capaz de aumentar a produtividade celular em mais de 200% em cultivos de *Scenedesmus obliquus* e de reduzir em 30% os custos com energia elétrica. Portanto, de modo geral, esta pesquisa em muito contribuiu com o desenvolvimento de processos,

controle e automação em cultivos microalgais, abrindo caminho para uma ampliação de escala de cultivo com relação custo/benefício favorável.

ABSTRACT

Microalgae have drawn the attention of the biotechnology industry for being natural synthesizers of high added value products such as β -carotene, astaxanthin, lutein, docosahexaenoic acid, proteins, and pigments. However, its biotechnological exploration is far behind when compared to the use of yeasts and bacteria. The main technological challenge that needs to be overcome is light attenuation, which provides these microorganisms with an inhomogeneous light environment, implying non-optimized growth. Considering these premises, the main objective of this Thesis was to develop an automatic control of photosynthetically active radiation (PAR), using Fuzzy logic, in order to optimize productivity and reduce costs in the production process. And for the full development of the polychromatic light controller, the study was divided into five stages: i) the first one was responsible for providing all the necessary experimental apparatus for the controlled and uncontrolled cultures used for the validation of the proposed system, which includes two light panels, the power controller circuit, and a special capacitor. Each luminous panel was made up of white, red, green and blue LEDs. The power circuit, made up of transistors and resistors, allows the individual manipulation of the intensity of each wavelength. The special condenser was developed with a Peltier chip, eliminating the need to use another thermal bath in the process, reducing costs and simplifying the apparatus used; ii) the second stage included the development of a PAR sensor, which is the indispensable system for monitoring the PAR during cultivation and also for guiding the controller. The developed system was patented and was ten times cheaper than commercial sensors available on the market; iii) the third stage included the development of the software responsible for monitoring and controlling the variables of the photobioreactor, which was registered as SUPERSYS_Photo®, being therefore the most important interface during the execution of crops, saving the data, configuring the controller set points such as the ideal PAR, the emission wavelength, the photoperiods, as well as the gas feed rate; iv) the fourth step was essential to characterize the effects of light quality on the biochemical fraction of *Scenedesmus obliquus* (not yet discussed in the literature), which allowed us to understand the biochemical behavior of the species when subjected to different wavelengths (white, blue, red and mixture of blue and red). These results were essential for defining the wavelength used as a setpoint in the light controller, optimizing the production of proteins in the final composition of the cultures, which, according to the results presented, *Scenedesmus obliquus* synthesizes a greater fraction of proteins when cultivated under blue light compared to conventional white light; v) the fifth and final stage actually included the development of the polychromatic light controller based on Fuzzy logic, which was able to increase cell productivity by more than 200% in *Scenedesmus obliquus* cultures and reduce power costs by 30% electrical. Therefore, in general, this research has greatly contributed to the

development of processes, control and automation in microalgal cultures, paving the way for an expansion of the scale of cultivation with a favorable cost/benefit ratio.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Aparato experimental utilizado nos testes para definição do melhor resistor.....	35
Figura 2: Fixação dos LEDs na placa.....	35
Figura 3: Visão traseira do painel luminoso.....	36
Figura 4: Aparato experimental utilizado para a determinação do comprimento de onda emitido pelos LEDs do painel luminoso.	36
Figura 5: Painel luminoso acoplado ao fotobiorreator.....	38
Figura 6: Espectro de radiação eletromagnética.	39
Figura 7: Comprimento de onda emitido pelos conjuntos de LEDs; (A) branco, (B) vermelho, (C) verde e (D) azul.....	39
Figura 8: Circuito elétrico utilizado no controlador dos LEDs para o componente IRFZ46N...	40
Figura 9: Conexão dos transistores para o Arduino e do painel luminoso para a fonte de alimentação	41
Figura 10: Sistema montado para manipular a tensão emitida ao painel luminoso; (A) vista lateral e (B) vista frontal.	42
Figura 11: Comportamento da PAR em função do aumento da potência do painel luminoso em (A) para o branco, (B) para o vermelho, (C) para o verde e em (D) para o azul	43
Figura 12- Esquema da interrupção da agitação em função da perda de volume por arraste	44
Figura 13: Aparato experimental usado no teste de arraste de líquido.....	45
Figura 14: Trocador de calor construído	46
Figura 15: Arraste de água com e sem o uso de condensador.....	47
Figure 16: Conexão do sensor RGB com o Arduino.....	52
Figura 17: Aparato experimental: fotobiorreator airlift de placas planas (A), painel de luz (B), sensor de baixo custo (C), sensor de alto custo comercial (D), aspersor (E), área do riser (F) e área de downcomer (G).....	54

Figura 18: Comportamento dos sensores em função da variação de potência do painel de luz (O eixo y principal mostra os valores de saída da porta analógica do sensor RGB e o secundário as leituras do sensor quântico (LI-250).	56
Figura 19: Teste de estabilidade de acordo com a leitura do sensor de baixo custo sob intensidade de luz constante nos períodos de luz acesa e apagada.....	57
Figura 20: Dados de saída do sensor de baixo custo (Símbolos: B-azul, G-verde, R-vermelho e RGB- soma RGB) em função das medições do sensor Licor PAR.)	58
Figura 21: Medições de PAR usando o sensor de baixo custo durante o cultivo de Scenedesmus oblíquo em um fotobiorreator.	59
Figura 22: Certificado de registro de programa de computador.....	61
Figura 23: Tela inicial do Supersys_PHOTO®	65
Figura 24: Tela de visualização dos parâmetros do cultivo em tempo real.....	66
Figura 25: Terceira guia do programa, onde o usuário pode manipular o set point de luz do fotobiorreator, visualizar as “strings” enviadas e recebidas de dados e o endereço de salvamento do arquivo de dados.	67
Figura 26: Aparato experimental utilizado durante os cultivos de caracterização dos efeitos de diferentes comprimentos de onda sob o crescimento de Scenedesmus obliquus.	69
Figura 27: Aparato experimental utilizado durante o cultivo de Scenedemus obliquus em quatro diferentes comprimentos de onda: branco, azul e vermelho, vermelho e azul.....	71
Figura 28: Curva padrão construída através de dados de concentração de carboidrato e absorbância lida em 315 nm.....	73
Figura 29: Curva padrão construída através de dados de concentração de proteinase m relação a absorbância lida em 595 nm.....	74
Figure 30:Espectro de emissão dos três tipos de LEDs utilizados no painel: A) branco; B) Vermelho e C) Azul.	76

Figura 31: Curva de crescimento para cada tratamento (Branco, Azul, Vermelho e Mix de Vermelho e Azul) em função da absorvância (A) e da concentração de clorofila a (B) durante o cultivo.....	77
Figure 32- Comportamento da viabilidade celular durante cultivos em diferentes tratamentos.	79
Figure 33: Parâmetros fotossintéticos NPQ, qP e rendimento quântico efetivo para <i>Scenedesmus obliquus</i> quando exposta a diferentes cores de luz.....	81
Figure 34: Análise bioquímica da biomassa da <i>Scenedesmus obliquus</i> nos diferentes tratamentos: luz branca, luz combinada (vermelho e azul), luz vermelha e luz azul. O eixo principal y faz referência as colunas de proteínas e carboidratos e o eixo secundário y as colunas de carotenoides.	83
Figura 35: Fotobiorreator em funcionamento durante os cultivos de validação do controlador.	85
Figura 36: Circuito de potência responsável por amplificar a tensão enviada pelo microcontrolador Arduino na faixa de 0-5 volts para as portas PWM (3, 5, 6 e 7) conectadas ao painel de LED que opera na faixa de 0-12 volts. T corresponde aos transistores (IRFZ46), R1 ao resistor de 1 KOhm e R2 ao resistor de 10 KOhm.....	89
Figure 37:Aparato experimental dos cultivos. Sensor 1 instalado na parede frontal e Sensor 2 instalado na parede traseira do fotobiorreator.	90
Figure 38: Visualização gráfica dos conjuntos Fuzzy definidos para a variável de entrada PAR: PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR ótimo ascendente (PAO), PAR ótimo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH).....	92
Figure 39: Monitoramento do PAR durante as triplicatas de culturas submetidas a: A) luz branca (W1, W2 e W3) e B) luz azul (B1, B2 e B3), representada pelas linhas preenchidas e pelo eixo principal da PAR. A potência de emissão do painel durante o cultivo é mostrada por linhas pontilhadas e refere-se ao eixo Potência	95
Figure 40: Monitoramento da PAR durante os cultivos de validação do controlador: A) utilizando luz branca (CW1, CW2 e CW3) representada pela linha preenchida referente ao eixo y principal; e o comportamento da potência elétrica (P1, P2 e P3) emitida pelo painel durante os três cultivos	

para manter o PAR em seu valor ótimo para o eixo y à direita; B) utilizando a luz azul (CB1, CB2 e CB3) representada pela linha preenchida referente ao eixo y esquerdo; e o comportamento da potência elétrica (P1, P2 e P3) emitida pelo painel durante os três cultivos para manter a PAR em seu valor ótimo para o eixo y à direita 96

Figura 41: Curvas de crescimento para culturas não controladas e controladas sob luz branca (A) e luz azul (B). W1, W2 e W3 referem-se a culturas sem uso do controlador e CW1, CW2 e CW3 para aqueles que utilizaram o controlador sob luz branca, para luz azul foram utilizados B1, B2 e B3 para culturas que não utilizaram o controlador e CB1, CB2 e CB3 para as controladas..... 97

Figure 42: Produtividade em relação à concentração celular (Cx) no eixo y esquerdo e em relação à concentração de clorofila a (Cc) no eixo y direito: A) cultivos com luz branca, sem usar o controlador (Cx não controlado e Cc não controlado) e usando o controlador (Cx controlado e Cc controlado); B) cultivos em luz azul, sem utilizar o controlador (Cx não controlado e Cc não controlado) e usando o controlador (Cx controlado e Cc controlado). 99

Figura 43: Perfil de energia utilizada por célula (mWh) para iluminar cada triplicata de: A) luz branca controlada (CW1, CW2 e CW3) e luz branca não controlada (W1, W2 e W3); B) luz azul controlada (CB1, CB2 e CB3) e luz azul não controlada (B1, B2 e B3), por concentração celular (células.ml⁻¹) 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais tendências nos efeitos de intensidades de luz variadas no cultivo de microalgas. Os valores de intensidade da luz são relatados como $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	24
Tabela 2: Resistores testados para o LED branco	37
Tabela 3: Resistores testados para o LED verde	37
Tabela 4: Resistores testados para o LED azul	37
Tabela 5: Resistores testados para o LED vermelho.....	37
Tabela 6: Coeficiente angular das linhas de tend\ecncia e coeficiente de determina\c\c3o	47
Tabela 7: Taxa de crescimento m\axima calculada para os diferentes regimes de qualidade de luz emitida para a esp\ecie com base em dados de absorv\ancia (densidade \f3ptica 684 nm) e dados de concentra\c3o de clorofila a.....	78
Tabela 8: Efeitos na propor\c3o de carboidratos/prote\ecnas em <i>S. obliquus</i> em fun\c3o das diferentes qualidades de luz testadas.	82
Tabela 9: Culturas realizadas em triplicata com pot\ecncia de luz fixa (W e B) e com pot\ecncia de luz controlada (CW e CB). W significa emiss\c3o de luz branca e B emiss\c3o de luz azul. Inicialmente, independente do controle do sistema, o PAR foi ajustado para $200 \mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	92
Tabela 10: Conjuntos difusos do contexto da radia\c3o fotossinteticamente ativa (PAR). PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR \f3timo ascendente (PAO), PAR \f3timo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH), onde a PAR seria a vari\avel controlada.....	93
Tabela 11: Conjunto de regras difusas: PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR \f3timo ascendente (PAO), PAR \f3timo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH)..	93
Tabela 12: Taxa m\axima de crescimento obtida para os diferentes regimes de qualidade de luz emitida para a esp\ecie atrav\es dos dados de concentra\c3o celular.....	98

ÍNDICE

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Microalgas.....	19
2.2 Fotossíntese.....	20
2.3 Luz.....	21
2.3.1 Fontes de Luz	22
2.3.2 Efeitos da intensidade da luz nas microalgas	22
2.3.3 Efeitos de diferentes comprimentos de onda no crescimento de microalgas	24
2.4 Fuzzy	27
2.4.1 Lógica Fuzzy	27
2.4.2 Controle Fuzzy	28
2.5 Controle de luz na produção de microalgas	29
2.5.1 Estratégias de Controle de Luz Não Automatizadas	30
2.5.2 Estratégias de Controle de Luz Automatizado	32
CAPÍTULO 3- DESENVOLVIMENTO DE HARDWARE UTILIZADO NOS CULTIVOS DA PRESENTE TESE.....	34
3.1 Painel luminoso	34
3.1.1 Materiais e métodos	34
3.1.2 Resultados	37
3.2 Sistema que manipula a potência do painel.....	40
3.2.1 Materiais e métodos	40
3.2.2 Resultados	42
3.3 Condensador de baixo custo.....	43
3.3.1 Materiais e métodos	44
3.3.2 Resultados	46
CAPÍTULO 4- DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE AFERIÇÃO DA RADIAÇÃO FOTOSSINTETICAMENTE ATIVA (PAR) EMITIDA POR LEDS	49
4.1 Sensor barato para a mensuração da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) aplicado a culturas de microalgas	49
4.1.1 Resumo.....	49
4.1.2 Introdução.....	50

4.1.3	Materiais e Métodos	51
4.1.4	Resultados e discussões.....	55
4.1.5	Conclusão.....	60
CAPÍTULO 5- DESENVOLVIMENTO DE “SOFTWARE” PARA MONITORAMENTO E CONTROLE DE FOTOBIOREATOR		61
5.1	Introdução	62
5.2	Materiais e métodos	63
5.2.1	Aquisição dos dados.....	63
5.2.2	Comunicação com o “hardware”	63
5.2.3	Suplemento gasoso.....	63
5.2.4	Fotoperíodo	64
5.2.5	Set points de luz	64
5.2.6	Tela de monitoramento.....	64
5.2.7	Salvamento de dados.....	64
5.3	Resultados	65
5.4	Conclusões	68
CAPÍTULO 6- CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA QUALIDADE DA LUZ SOBRE A <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i>		69
6.1	EFEITOS DA QUALIDADE DA LUZ NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i>	69
6.1.1	Introdução.....	69
6.1.2	Materiais e métodos	70
6.1.3	Resultados e discussões.....	77
6.1.4	Conclusão	84
CAPÍTULO 7- DESENVOLVIMENTO DO CONTROLADOR POLICROMÁTICO DE LUZ APLICADO À PRODUÇÃO DE MICROALGAS		85
7.1	Controlador policromatico de radiação fotossinteticamente ativa aplicado a microalgas	86
7.1.1	Resumo.....	86
7.1.2	Introdução.....	86
7.1.3	Materiais e métodos	89
7.1.4	Resultados e discussões.....	94
7.1.5	Conclusão	104
CAPÍTULO 8- CONSIDERAÇÕES FINAIS		105
CAPÍTULO 9- REFERÊNCIAS		108

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

O uso biotecnológico de microalgas tem apresentado grande potencial para a produção de químicos finos, de suplementos alimentares humanos e animais e de biocombustíveis. Dentre as possibilidades, estes microrganismos podem produzir ácidos graxos insaturados, carotenoides, xantofilas, vitaminas, proteínas em geral e minerais. O potencial comercial para a produção de biomassa e metabólitos tem ganhado crescente reconhecimento pelos setores industriais (ANDRADE et al., 2016; BOROWITZKA, 2013; CHENG-YAU et al., 2016; DALLAIRE et al., 2007; ELOKA-EBOKA; INAMBAO, 2017; FERREIRA; GONZÁLEZ; FERNANDES, 2016; GAO et al., 2016; HONDA et al., 2017; LORENZ; CYSEWSKI, 2000a; PRUVOST et al., 2016; TEBBANI et al., 2014; TREDICI et al., 2016; WONG et al., 2016).

Além do interesse econômico, essas fábricas celulares fotoautótrofas possuem um grande apelo ambiental ao contribuir com a regeneração da atmosfera, consumindo o gás carbônico já em excesso e restituindo os níveis de oxigênio. Este meio de produção com sustentabilidade ecológica tem sido cada vez mais valorizado por fóruns globais representados pelo Protocolo de Kyoto (1997), o acordo de Paris (2015), a rio 92 ou a Rio +20.

A maior parte dos bioprocessos da atualidade envolvem o cultivo de microrganismo em um biorreator visando à produção de um metabólito de interesse, e quando esses microrganismos são fotoautotróficos, como as microalgas, esse equipamento requer um detalhe adicional e por esse motivo é chamado fotobiorreator. Um fotobiorreator se difere dos biorreatores pela área de exposição à luz, que é de fundamental importância nesse tipo de produção. Contudo, além de uma boa iluminação, o equipamento deve apresentar condições favoráveis à transferência de massa e de calor (TEBBANI et al., 2014; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

O desafio para aumentar a viabilidade da produção de microalgas está em otimizar o processo de transformação da energia luminosa, a fotossíntese. Uma das maneiras de atingir esse objetivo é garantir a velocidade ótima de crescimento para todas as células microalgais existentes no cultivo (CUARESMA et al., 2009). Através da otimização do fornecimento da luz pode ser possível garantir um cultivo onde o custo/benefício seja favorável e viabilize a comercialização dos produtos advindos desses microrganismos (CUARESMA et al., 2009).

Um problema muito relevante na produção de microalgas relacionado à luz e relatado por diversos autores, como TEBBANI et al. (2014) é quanto à atenuação luminosa nos cultivos. Esse efeito cria um gradiente de intensidade de luz que diminui à partir da fonte e é responsável pela diminuição das velocidades de crescimento de acordo com a profundidade do fotobiorreator e densidade do cultivo. Estando diretamente ligada ao crescimento celular em cultivos batelada ou batelada alimentada: o aumento da biomassa suspensa aumenta a quantidade de partículas absorvedoras de luz, gerando o efeito de auto sombreamento das células. Isso faz com que as microalgas no interior do reator não recebam a quantidade adequada de fótons para a fotossíntese.

Essa problemática foi uma das vertentes que incentivaram o presente trabalho, juntamente aos relatos de outros autores, que reportam efeitos da qualidade da luz sobre a composição bioquímica das microalgas (HAN et al., 2017; HWANG; MAIER, 2019), indicando que cada espécie responde aos estímulos de diferentes comprimentos de onda de forma distinta.

O efeito da qualidade da luz na composição bioquímica das células em conjunto com a problemática da intensidade luminosa sob o crescimento microalgal formam uma estratégia interessante para otimizar e viabilizar a produção de microalgas. Considerando essas premissas, o presente estudo, teve como objetivo central, desenvolver um controlador de luz automático para ajustar a intensidade luminosa durante os cultivos, como também fornecer uma ferramenta antes não abordada pela literatura dentro dos controladores de luz desenvolvidos para a produção de microalgas, que consiste em permitir ao usuário do sistema escolher o comprimento ou a mistura de comprimentos de onda que serão emitidos e controlados pelo controlador. Manipulando assim a composição bioquímica e otimizando a produtividade do cultivo.

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são um dos importantes microrganismos fotossintetizantes que compõem o fitoplâncton, que é uma nomenclatura utilizada para se referir ao conjunto dos microrganismos que efetuam a fotossíntese e vivem flutuantes em ecossistemas aquáticos (REYNOLDS, 2006). Elas pertencem ao grupo de algas microscópicas, que podem ser unicelulares ou formadoras de colônia e recebem esse nome por terem seu tamanho variando na escala dos micrômetros (SUGANYA et al., 2016). O termo “microalgas” pode incluir as algas, que são organismos eucariontes fotoautotróficos (LEE, 2008) e as cianobactérias, que são organismos procariontes com a capacidade de efetuar a fotossíntese oxigênica (MARISCAL; HERRERO; FLORES, 2007). O processo de fotossíntese do fitoplâncton é responsável por 95% da fixação de carbono nos oceanos e em escala global essa fixação representa 40% da incorporação anual de carbono (FALKOWSKI; KOLBER, 1995).

A microalga *Scenedemus obliquus*, espécie utilizada neste estudo, faz parte do conjunto denominado “algas verdes” e foi isolada de ambientes de água doce. Essas algas são constituintes do filo *Chlorophyta* que contemplam as algas unicelulares e multicelulares que possuem clorofila a e b (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006). Um papel ecológico importante das microalgas verdes é serem responsáveis pela produção primária nas cadeias alimentares aquáticas (LELIAERT et al., 2012). Além da importância ecológica das microalgas, existe um grande potencial biotecnológico na sua utilização para produção de químicos finos e suplementos alimentares (SPOLAORE et al., 2006; YING YING TANG et al., 2020). Produtos de alto valor agregado como β -caroteno, astaxantina, luteína, ácido docosahexaenóico e pigmentos como as ficobilinas (BOROWITZKA, 2013) também são uma possibilidade para o uso desses microrganismos, o que chama bastante atenção. Contudo os altos custos de produção, inviabilizam esses processos (BOROWITZKA, 2013).

Os altos custos são derivados do baixo rendimento de biomassa, que na maioria dos casos está atrelado à fonte de energia, a luz (CARVALHO et al., 2011). Problemas como a atenuação luminosa durante os cultivos, são efeitos que proporcionam às células um ambiente não homogêneo em relação a intensidade luminosa, fazendo com que elas experimentem regiões de luz adequada, outras com intensidade insuficiente, como também regiões de escuro total dentro dos sistemas de cultivo.

As microalgas são geralmente cultivadas em dois tipos de sistemas, as lagoas que são os sistemas abertos e os fotobiorreatores que constituem os sistemas fechados. Nos sistemas fechados a luz é distribuída de maneira mais homogênea através de projetos de fotobiorreatores otimizados, como o do fotobiorreator de paredes planas (POSTEN, 2009). Já as lagoas, que

carregam esse nome justamente por serem muito similares às lagoas convencionais, 90% da energia luminosa que é recebida nesse sistema é absorvida logo nos primeiros centímetros da cultura (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013). Isso implica em uma má distribuição de luz, ou em gastos altos para proporcionar grandes áreas com poucos centímetros de profundidade, melhorando assim a disposição da luz, que é absorvida pelas microalgas para executarem a fotossíntese.

2.2 FOTOSSÍNTESE

Um organismo fotossintetizante é definido como sendo aquele em que a maior parte da energia destinada para a síntese celular é derivada da luz (GEST, 2002). Portanto para o completo entendimento dos processos que envolvem a luz nesses organismos, os conceitos fundamentais da fotossíntese devem ser abordados. Em linhas gerais a fotossíntese é a transformação de energia luminosa em energia bioquímica utilizada pela microalga para se desenvolver (NELSON; COX, 2011). Esse processo contempla uma série de reações que são divididas em duas fases, chamadas erroneamente de “fase clara” e de “fase escura”.

A etapa fotoquímica que é o termo comumente utilizado para a fase clara, é a etapa na qual os fótons de luz são absorvidos através das membranas dos tilacoides nos cloroplastos. É nessa etapa que as moléculas de água são quebradas pelo processo de fotólise, liberando O_2 e elétrons que serão transportados por uma cadeia não cíclica. Nela existe também a formação de ATP (adenosina trifosfato) através de ADP (adenosina difosfato) e de Pi (fosfato inorgânico) e a redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato $NADP^+$ em NADPH, compostos que serão utilizados pela etapa seguinte (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; FALKOWSKI; RAVEN, 2007).

A etapa bioquímica, termo normalmente utilizado para a fase escura, é a etapa do conhecido Ciclo de Calvin ou Ciclo das pentoses. Foi amplamente chamada de fase escura justamente porque ela não depende diretamente da luz, o que causou inferências errôneas, pois a fase bioquímica não ocorre apenas na escuridão (ausência da luz). Esta etapa depende do ATP e do NADPH (produtos sintetizados na fase fotoquímica) para assimilar o CO_2 e produzir o gliceraldeído 3-fosfato (G3P), que é o composto fundamental para a formação de todo o arsenal de biomoléculas encontrados nas microalgas, tais como açúcares, amido, aminoácidos e ácidos graxos (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; FALKOWSKI; RAVEN, 2007; MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013).

Visto as duas etapas em que o processo da fotossíntese ocorre, outro ponto indispensável é a compreensão de como a luz é absorvida na etapa fotoquímica. Como dito, os cloroplastos são

as estruturas responsáveis por esse feito, e o fazem através de complexos proteicos de pigmentos que são agregados à sua membrana tilacoidal, conhecidos como fotossistemas (NUGENT; PURTON; EVANS, 2003).

Os fotossistemas podem ser divididos em duas partes, a primeira delas é o complexo que captura a luz, conhecido como complexo antena e a segunda é o centro de reação. O complexo antena tem por função absorver a energia luminosa e é constituído em sua maior parte por clorofila *a* (que absorve intensamente vermelho e azul e reflete o verde, por isso a coloração esverdeada das células) (MADIGAN, MARTINKO, BENDER, 2016) e por outros pigmentos, conhecidos como pigmentos acessórios, que ganham esse nome justamente por auxiliarem o processo de captura de luz. São eles, as clorofilas *b*, *c* e *d* que auxiliam na captação da luz, transferindo a energia luminosa para a clorofila *a* e os carotenoides e xantofilas, que atuam diretamente na proteção do aparato fotossintético, protegendo essa estrutura de danos oxidativos causados pelo excesso de energia luminosa (CAHOON; TIMKO, 2003; LARKUM, 2016). Cada um dos pigmentos fotossintéticos absorvem em uma faixa de comprimento de onda diferente, como por exemplo a clorofila *a* absorve em cerca de 430 e 680 nm, já a clorofila *b* em cerca de 450 e 660 nm (KEELING, 2013; TAKAICHI, 2011). A energia captada pelo complexo antena é transferida por ressonância ao centro de reação, que contém um par de clorofila *a* especial, conhecida por P680 (fotossistema II) e P700 (fotossistema I). O centro de reação, por sua vez, utiliza de reações de óxido redução para separar as cargas, iniciando o processo de transformação da energia luminosa em energia química (KRAUSE; WEIS, 1991). Mas o que de fato é a luz?

2.3 LUZ

A luz, como visto na seção anterior, é uma importante fonte de energia para a fotossíntese das microalgas. Fundamentar seus conceitos básicos se faz necessário para uma compreensão eficiente desse mecanismo. Considerando essas premissas, a seguir serão abordados conceitos fundamentais para entender essa forma de energia.

A “luz” quando assim mencionada, faz referência à energia eletromagnética, que está compreendida dentro da faixa de 400 -700 nm do espectro, também chamada de espectro visível. Apesar da natureza particulada dessa energia ela se comporta em algumas circunstâncias como onda (KIRK, 1994). Portanto cada fóton tem um comprimento de onda e uma frequência, a Equação 1 apresenta como elas estão relacionadas:

$$\lambda = c / \nu \quad \text{Equação 1}$$

Na equação:

λ é o comprimento de onda (m)

c é a velocidade de propagação da luz em um determinado meio (m.s^{-1})

ν é a frequência (s^{-1})

A energia contida em um fóton varia com a frequência de acordo com a Equação 2. Dessa forma é possível notar que existe um comportamento inverso da energia em relação ao comprimento de onda, já que pela Equação 1 a frequência é igual à velocidade de propagação da luz em um determinado meio, dividida pelo comprimento de onda, deixando implícito que quanto maior o comprimento de onda menor será a sua energia (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2014; KIRK, 1994).

$$\varepsilon = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \qquad \text{Equação 2}$$

Na equação:

ε é a energia (J)

h é a constante de Planck (J.s)

2.3.1 Fontes de Luz

A fonte natural e mais conhecida de energia eletromagnética é o Sol, em dias comuns de verão ele emite sob uma superfície horizontal da terra com área de 1 m², cerca de 10²¹ quanta de luz visível por segundo sem nenhum custo (KIRK, 1994). Contudo por mais que o sol seja a fonte de energia mais econômica para a produção de microalgas, sua utilização enfrenta alguns empecilhos. Como exemplo tem-se a grande variação da intensidade luminosa durante o período iluminado, alcançando altos valores próximo ao meio-dia e intensidades baixas próximos ao nascer e ao pôr do sol.

O uso de fontes artificiais como os LEDs (diodo emissor de luz) que permitem a manipulação da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD), do fotoperíodo (que é o período em que a cultura está iluminada e o que está na ausência de luz) e do espectro de emissão (CARVALHO et al., 2011) trazem melhorias na produtividade e na qualidade da biomassa das microalgas. Esse gasto energético é economicamente viável para produtos microalgais de alto valor (BLANKEN et al., 2013). Além das vantagens citadas, eles ainda permitem fornecer à cultura uma luz intermitente através da modulação da largura do pulso, que pode ser uma estratégia responsável por aumentar a produção de biomassa microalgal (GROBBELAAR; NEDBAL; TICHÝ, 1996; LUNKA; BAYLESS, 2013; MATTHIJS et al., 1996).

2.3.2 Efeitos da intensidade da luz nas microalgas

Depois de compreender os mecanismos biológicos básicos da fotossíntese em microalgas, fica claro que a luz é um dos principais fatores para que esse fenômeno ocorra. A literatura tem

mostrado que a intensidade da luz influencia diretamente no crescimento e na composição bioquímica das microalgas. Portanto, a presente seção tem como objetivo apresentar alguns resultados da literatura sobre esses efeitos. Liu et al. (2012), por exemplo, investigaram os efeitos de três níveis de intensidade de luz na produção de lipídios e na composição de ácidos graxos, que são parâmetros fundamentais para a produção de biodiesel. Sendo demonstrado que a relação carotenoide/clorofila foi maior quando a microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 cresceu sob 250 e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do que sob 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mas o conteúdo de proteína foi menor. O maior rendimento de biomassa e concentração de lipídios foram alcançados com intensidade de luz de 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e os principais ácidos graxos de *Scenedesmus* sp foram os ácidos oleico (43–52%), palmítico (24–27%) e linoléico (7–11%). Mais recentemente, Lai et al. (2019) estudaram o crescimento de *Dunaliella viridis* em um fotobiorreator com intensidades de luz iniciais variadas (100, 300, 400 e 600 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e níveis de nitrogênio (9 e 60 gm^{-3}). Eles obtiveram que a produção máxima de lipídios estava na concentração inicial de nitrogênio de 9 gm^{-3} e 300 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz. Além disso, o estudo demonstrou relações lineares entre intensidade de luz e concentração de biomassa, e também entre intensidade de luz e clorofila a. Além disso, os autores mostraram que é possível utilizar dados de luz em tempo real como método de quantificação de biomassa e clorofila a. Gris et al. (2014) estudaram *Scenedesmus obliquus* cultivada sob diferentes intensidades de luz e ciclos de claro-escuro. Eles mediram o crescimento, produtividade, fotossíntese e composição bioquímica da microalga. Os autores verificaram que a taxa máxima de crescimento foi obtida em 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, acima desse valor, apesar do acúmulo de biomassa, a fotoinibição e o estresse oxidativo diminuíram a eficiência fotossintética. Mais informações sobre os efeitos da intensidade da luz no crescimento das microalgas podem ser encontradas nos estudos de Sforza et al. (2012), Iasimone et al. (2018), Huesemann et al. (2013), González-Camejo et al. (2018), Patel et al. (2019), Whitton et al. (2019) e Cuaresma et al. (2009). A Tabela 1 apresenta os principais resultados dos artigos recentes sobre o tema.

Tabela 1: Principais tendências nos efeitos de intensidades de luz variadas no cultivo de microalgas. Os valores de intensidade da luz são relatados como $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Microrganismo	Fonte de luz	Melhor intensidade de luz	Efeitos Principais	Refer\u00eancia
Policultura microalgal	L\u00e2mpadas fluorescentes	100 (em compara\u00e7\u00e3o com 20 e 50)	Produtividade de biomassa e maior teor de massa lip\u00eddica	(IASIMONE et al., 2018)
<i>Scenedesmus sp.</i>	L\u00e2mpadas tricrom\u00e1ticas (380-780 nm)	400 (em compara\u00e7\u00e3o com 50 e 250)	Maior rela\u00e7\u00e3o de carotenoides e clorofila, conte\u00fado de lip\u00eddios e rendimento de biomassa.	(LIU et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	L\u00e2mpadas fluorescentes de at\u00e9 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e LED para intensidades mais altas	150 (em compara\u00e7\u00e3o com 10, 50, 200, 350 e 1000)	Taxa m\u00e1xima de crescimento	(GRIS et al., 2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	LED	200 (em compara\u00e7\u00e3o com 50, 200 e 1000)	\u00d3tima remedia\u00e7\u00e3o de nutrientes	(WHITTON et al., 2019)
<i>Nannochloropsis salina</i>	LED SL 3500	150 (em compara\u00e7\u00e3o com 5, 50, 120, 150, 250, 350 e 1000)	Maior n\u00famero de c\u00e9lulas e taxa de crescimento. C\u00e9lulas superiores se protegem do excesso de luz	(SFORZA et al., 2012)
Ecosistema complexo contendo microalgas, algas e bact\u00e9rias	L\u00e2mpadas fluorescentes	125 (em compara\u00e7\u00e3o com 40 e 85)	Aumento da produtividade da biomassa	(GONZ\u00c1LEZ-CAMEJO et al., 2018)
<i>Chlorella sp.</i>	LED	35 e 150	A defici\u00eancia de luz foi adequada para um crescimento mixotr\u00f3fico efetivo. Condi\u00e7\u00e3o suficiente de luz necess\u00e1ria para o crescimento mixotr\u00f3fico	(PATEL et al., 2019)

2.3.3 Efeitos de diferentes comprimentos de onda no crescimento de microalgas

A literatura mostra que os efeitos dos distintos comprimentos de onda podem ser sentidos de diferentes formas pelas esp\u00e9cies microalgais, que s\u00e3o de suma import\u00e2ncia para otimizar a composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica da microalga cultivada, proporcionando assim concentra\u00e7\u00f5es maiores do composto de interesse a cada cultivo. A inten\u00e7\u00e3o central dessa se\u00e7\u00e3o \u00e9 apresentar alguns resultados da literatura sobre esses estudos.

Iniciando a temática considerando os estudos que levaram ao uso da luz verde para o cultivo de microalgas, Mohsenpour e Willoughby (2013) divulgaram que essa faixa de comprimento de onda promoveu a produção de clorofilas a e b em uma cepa de *C. vulgaris*. E também mostraram a menor concentração de biomassa para *G. membranacea*, quando cultivadas em fotobiorreatores sob esse comprimento de onda. Das et al., (2010) obtiveram rendimento máximo de ésteres metílicos de ácidos graxos para *Nannochloropsis sp.* quando as culturas foto- e mixotróficas foram expostas ao LED verde. O trabalho de Baba et al., (2012) no entanto, mostrou que no crescimento de *Botryococcus braunii*, a luz verde foi menos eficaz do que a azul e a vermelha para o crescimento, fixação fotossintética de CO₂ e produção de hidrocarbonetos. Mais recentemente, Jung et al., (2019) descobriram que o LED verde promoveu o maior teor de lipídios, atingindo ~ 61% (p/p) do peso celular seco em *Phaeodactylum tricorutum*, *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana*.

Para luz azul, Chen et al., (2010) estudaram a cianobactéria *Spirulina platensis* em frascos com agitação e observaram que esse comprimento de onda rendeu as melhores taxas de produção de pigmentos específicos (clorofila a e ficocianina) em altos níveis de intensidade de luz, 3.000 µmol fótons.m⁻².s⁻¹. Shu et al., (2012) e Pérez-Pazos e Fernández-Izquierdo (2011) cultivaram *Chlorella sp.*, os primeiros autores em um reator coluna de bolhas e os últimos em um fotobiorreator de serpentina. Shu et al. (2012) indicaram que o LED azul a 1000 lux foi o ideal para a formação de óleo, assim como Pérez-Pazos e Fernández-Izquierdo (2011) que também mostraram uma maior produção de lipídios sob luz azul. Izadpanah et al. (2017) também trabalharam com a *Chlorella sp.* investigando o papel do espectro de luz no isolamento e no crescimento de microalgas de águas residuais urbanas. Indicando que as maiores células, as maiores densidades de biomassa e de lipídios também foram encontradas usando a luz azul. Zhao et al. (2018) estudaram a *Chlamydomonas sp.* e obtiveram o conteúdo ideal de luteína sob luz azul. A luteína é frequentemente usada como aditivo alimentar e desempenha um papel crítico na fotossíntese e fotoproteção nas microalgas. No entanto, os melhores resultados de crescimento celular foram encontrados sob luz branca. Fu et al. (2013) cultivaram *Dunaliella salina* em um reator de coluna de bolhas sob a combinação de luz azul e vermelha e mostrou acúmulo de luteína e β-caroteno. Han et al. (2019) teve resultados semelhantes cultivando o mesmo organismo e usando um sistema de deslocamento de comprimento de onda de LED azul-vermelho, obtendo uma maior densidade e produtividade de β-caroteno quando comparado a um único diodo emissor

de comprimento de onda. Bredda et al. (2020) também combinou azul e vermelho e obteve uma maior produtividade de lipídios para *Dunaliella salina*, mas a produtividade ótima de biomassa foi alcançada sob uma mistura de 65% de luz azul e 35% de luz verde. Beltran (2013) e Katsuda et al. (2004) cultivaram *Haematococcus pluvialis* em fotobiorreatores e vasos de vidro, respectivamente. O primeiro descobriu que para comprimentos de onda mais curtos (luz azul) o tamanho da célula, a quantidade de pigmento vermelho e a cinética de crescimento eram maiores do que a cultura iluminada com luz verde. O segundo, por sua vez, mostrou que comprimentos de onda curtos induzem o acúmulo de astaxantina e também, que a luz intermitente de LEDs azuis é um método de iluminação promissor para o cultivo de algas em ambientes fechados. Marchetti et al. (2013) estudaram a *Isochrysis sp* e relataram que o conteúdo relativo de carboidratos foi menor sob luz azul do que sob luz branca, enquanto a clorofila a e a atividade fotossintética foram maiores. Em contraste, a cota de carbono foi menor e o conteúdo de proteína foi maior sob luz azul do que sob luz branca. Yoshioka et al. (2012) estudaram a *Isochrysis galbana* e de acordo com seus experimentos, a densidade celular da amostra cultivada sob luz azul intermitente foi significativamente maior do que nos outros comprimentos de onda. Das et al. (2010) e Kim et al. (2014) cultivaram a *Nannochloropsis sp*, os primeiros autores atingiram a taxa de crescimento específico máximo com LEDs azuis e os segundos indicaram um aumento da evolução fotossintética de oxigênio, fixação de carbono e absorção de nutrientes pela luz azul.

Em relação aos efeitos da luz vermelha no crescimento de microalgas, Kim et al., (2014) afirmaram que mudanças fisiológicas mais significativas foram observadas sob luz vermelha do que sob luz azul para o cultivo de *Nannochloropsis gaditana* e também, que a iluminação vermelha pode ser útil para a produção de lipídios. Shu et al. (2012) obtiveram resultados que indicaram que o comprimento de onda e a intensidade de luz ideais para a formação de biomassa de *Chlorella sp* era o LED vermelho a 1000 lux. Chen et al. (2010) também atestaram que o LED vermelho é o melhor para o crescimento de algas no cultivo de *Spirulina platensis*. Rendón (2013), entretanto, obteve os menores valores de produção de biomassa para *Chlorella vulgaris* utilizando luz vermelha e os maiores valores encontrados foram quando a cultura foi exposta à luz branca. Das et al. (2010) também teve uma taxa mínima de crescimento específico para LEDs vermelhos. Mais resultados sobre o uso de luz verde, azul e vermelha usada para cultivar microalgas estão disponíveis em Okumura et al. (2015), Koc e Anderson (2012), Kwon et al. (2013), Costa et al. (2013), Abiusi et al. (2014), Markou (2014), Kula et al. (2014), Atta et

al. (2013), Teo et al. (2014), Xu et al. (2013), Vejrazka et al. (2012), Deniz et al. (2019), Bernstein et al. (2014).

A fim de utilizar a intensidade e a qualidade da luz como ferramentas de manipulação da composição bioquímica das células e de otimização na produção microalgal, um controlador policromático de luz foi proposto no presente trabalho baseado na lógica Fuzzy.

2.4 FUZZY

2.4.1 Lógica Fuzzy

No Brasil nos referimos à lógica Fuzzy, utilizando as seguintes expressões: lógica difusa ou lógica nebulosa. O entendimento da lógica e do controle nebuloso está baseado nos conceitos fundamentais da teoria difusa que serão apresentados nesta seção.

De maneira geral, a lógica nebulosa é um sistema que se baseia em cima de um raciocínio aproximado. E isso quer dizer que para uma determinada ação, essa lógica se baseia em expressões vagas, ou subjetivas, como é o caso do pensamento humano, em contrapartida à lógica clássica resulta apenas em verdadeiro ou falso. Ou seja, nesse tipo de raciocínio é possível dizer que algo é parcialmente falso, ou parcialmente verdadeiro. Um exemplo disso é quando colocamos um observador humano para responder se um conjunto de 4 taças de vinho, que foram preenchidas de maneira desigual, estão cheias ou vazias. De acordo com a pergunta seria possível responder para uma análise clássica de uma das taças se ela se encontra cheia ou vazia. Mas e se a taça estiver parcialmente cheia? Ou parcialmente vazia? A lógica nebulosa então surgiu para lidar com essas incertezas, transformando as informações aproximadas para um formato numérico que pode ser facilmente manipulado por computadores (PASSINO; YURKOVICH, 1998).

Os conjuntos Fuzzy, ou conjuntos nebulosos, foram desenvolvidos para lidar com conjuntos onde a fronteira não era definida. Ou seja, conjuntos como “Volume alto” ou “Agitação baixa” que não possuem um critério de pertinência definido. Ao definir o conjunto de “Volume alto” dentro da lógica ordinária, que era a ferramenta disponível antes da utilização do conjunto Fuzzy, números eram atribuídos a este conjunto, e o que estivesse fora não era considerado como um alto volume, considerando essas premissas muitas imprecisões eram geradas. O que foi sanado pelos conjuntos nebulosos que atribuíam graus de pertinência ao conjunto em questão, que podiam variar de 0 a 1, sendo 0 quando o elemento não pertencia e 1 quando há a total pertinência (ZADEH, 1965).

A definição do grau de pertinência de cada conjunto é dada através das funções de pertinência, que consideram todos os elementos de um conjunto. Estas funções podem assumir diversas formas (quadradas, retangulares, trapezoidais, triangulares entre outras). E a diferença

entre elas está nas informações que serão geradas. Perdas podem ser sentidas em regiões onde a inclinação é zero e podem ser reduzidas em regiões mais suaves das formas (NELLES, 2001; PASSINO; YURKOVICH, 1998).

As variáveis linguísticas, como o próprio nome já diz, são variáveis em que seus valores não são números e sim expressões. Como por exemplo intensidade da luz, velocidade, pressão etc. Elas são utilizadas dentro da lógica Fuzzy pela facilidade de aplicação junto às regras que são formadas. Contudo, por serem linguísticas elas com certeza são menos específicas que as numéricas normalmente utilizadas. Os valores linguísticos são aplicados às variáveis linguísticas e se apresentam por exemplo da seguinte maneira: alto, baixo, ótimo, muito baixo, muito alto e etc, que são intervalos que permitem a percepção dos dados quando agregados às variáveis linguísticas (PASSINO; YURKOVICH, 1998; SIMÕES; SHAW, 2007).

Dessa forma quando analisamos uma função de pertinência seja ela qual for, que represente por exemplo a intensidade luminosa, ela pode assumir alguns intervalos definidos previamente, como por exemplo: baixa, média e alta. E é através dela que de forma semelhante ao pensamento do ser humano, é possível passar de uma região de intensidade de luz baixa para uma de intensidade de luz média de forma suave e gradual (NELLES, 2001).

Um último conceito fundamental do Fuzzy são os operadores lógicos, que já são bastante difundidos: “SE”, “E”, “ENTÃO” “NÃO” e “OU”. A sua utilização é dada através de uma estrutura dividida em duas partes no mínimo (NELLES, 2001; PASSINO; YURKOVICH, 1998). A antecedente, que vem antes da utilização do operador e a consequente, que vem após. Seguindo o mesmo exemplo da intensidade luminosa, podemos exemplificar essa utilização:

“**SE** intensidade luminosa for baixa **ENTÃO** a luz não é suficiente”

2.4.2 Controle Fuzzy

A diferença do controle Fuzzy com alguns controles clássicos está na modelagem matemática que é desenvolvida para representar o processo. Controles clássicos podem se basear em modelos do processo para serem sintonizados, já o controle Fuzzy, baseia-se no conhecimento do especialista daquele processo. Através de algoritmo capaz de converter as estratégias de controle de natureza “humana” em estratégias de controle automático (PASSINO; YURKOVICH, 1998). Considerando essas premissas quando a modelagem do processo é complexa, mas existe um especialista com plenos conhecimentos sobre as ações de controle da planta, essa abordagem pode ser aplicada.

Um processo controlado por um controlador Fuzzy apresenta uma estrutura comum de “looping” onde o controlador alimenta os atuadores do sistema, que por sua vez aplicam ou não ações no processo, as consequências destas ações são monitoradas por sensores que alimentam o controlador Fuzzy com os dados sobre o processo. A expressão “controlador Fuzzy” se refere a

um conjunto de componentes básicos como a interface de fuzzyficação, a base de conhecimento, a base de dados, o procedimento de inferência e a interface de defuzzyficação (GOMIDE; GUDWIN, 1994).

A interface de fuzzyficação é responsável por receber os dados das variáveis de entrada, advindos dos sensores, efetuar a normalização destes, e aplicar o processo chamado de fuzzyficação, que nada mais é do que a transformação dos números recebidos em conjuntos Fuzzy constituintes das variáveis linguísticas utilizadas neste tipo de abordagem não clássica.

A base de conhecimento é o componente que está implementado com as regras de controle, ou seja, as ações relacionadas ao conhecimento do especialista humano, é onde a estratégia do controlador se encontra. Já a base de dados é o local destinado ao armazenamento das funções de pertinência e das características das regras linguísticas, ou seja, de todas as informações do processo. As regras Fuzzy como mencionadas acima são muito importantes para o controlador Fuzzy, pois são através delas que as ações são inferidas. Como por exemplo:

“SE a intensidade da luz está baixa ENTÃO aumente a potência do painel luminoso”

Neste caso a premissa contida no “SE” representa a condição e o consequente do “ENTÃO” a ação. Dessa forma as regras nebulosas são criadas e o comportamento do sistema será caracterizado por elas.

O procedimento de inferência é um componente muito importante pois é nele em que todas as ações acontecem. Neste “local” os dados de entrada são processados, as regras Fuzzy são avaliadas e a inferência das ações que serão tomadas pelo controlador Fuzzy são obtidas através dos operadores lógicos. Logo após esta etapa, para que as ações de controle sejam recebidas de maneira matemática pelos atuadores, a interface de defuzzyficação é de suma necessidade, essa interface é responsável por transformar as ações de controle Fuzzy, através do mapeamento dos valores de saída fuzzyficados em seus valores correspondentes do universo real das variáveis (GOMIDE; GUDWIN, 1994; PASSINO; YURKOVICH, 1998).

2.5 CONTROLE DE LUZ NA PRODUÇÃO DE MICROALGAS

O controle de processos é uma ferramenta amplamente utilizada, pois otimiza, garante a segurança e reprodutibilidade da operação de sistemas de produção de microalgas. As lógicas de controle mais utilizadas são heurísticas, On / Off e PID. Porém, ao analisar processos que utilizam microrganismos para a fabricação de produtos de interesse, muitos deles ainda não utilizam o controle de processos como aliado para alcançar melhores resultados, o que implica em um amplo campo de aplicação dessa ferramenta, denominado “controle de bioprocessos”.

As técnicas mais utilizadas para controle de bioprocessos são baseadas em sistemas de *feedback*. Esses sistemas manipulam as variáveis apropriadas com base em alguma lógica e na medição ou estimativa da variável controlada. Neste tipo de controle, a variável medida é

comparada com o ponto de ajuste desejado para gerar uma resposta de controle. Existem vários algoritmos de controle disponíveis, dos mais simples aos mais complexos, como On / Off, PID, Controles Avançados, Lógica Fuzzy, Heurísticas e Redes Neurais Artificiais (CASTRUCCI; BITTAR; SALES, 2011; OGATA, 2010).

Assim, nesta seção será fornecido o estado da arte sobre controle de luz na produção de microalgas, devido à importância discutida anteriormente sobre esta variável durante o cultivo de microalgas.

2.5.1 Estratégias de Controle de Luz Não Automatizadas

O controle da luz em microalgas é encontrado de duas maneiras: os controladores manuais e os automatizados. De forma não automatizada, Hwang e Maier (2019) estudaram os efeitos da intensidade da luz e do comprimento de onda na composição lipídica e no crescimento de *Neochloris oleoabundans*, e usaram um controle manual para variar a quantidade e a qualidade da luz. A estratégia utilizada foi ligar ou desligar as lâmpadas individualmente. Essa manipulação levou os autores a constatarem que para essa espécie, a luz vermelha proporcionou a maior taxa de crescimento e favoreceu a produção de ácidos graxos monoinsaturados de acordo com o aumento da intensidade da luz. Os autores relataram ainda que a estratégia de controle do comprimento de onda da luz foi eficaz em aumentar a produção do referido metabólito e poderia melhorar a sustentabilidade econômica de sistemas de produção de microalgas para bioquímicos específicos. Seguindo a linha de controle da qualidade da luz, Han et al. (2017) utilizaram a técnica de controle policromático durante o cultivo da espécie *Nostoc flageliforme*. A intensidade da luz foi manipulada ajustando-se a distância do frasco de cultura em relação às lâmpadas da fonte e sua quantificação foi dada por um sensor de luz solar quântico Light Scout Dual (Spectrum Technologies, EUA). Os resultados do trabalho permitiram aos autores relatarem um aumento de 66% na biomassa e um aumento de 217% na produção de polissacarídeos extracelulares.

O controle da intensidade da luz é frequentemente denominado lumostato, termo utilizado na literatura para caracterizar um sistema que visa prevenir a fotoinibição da cultura em baixas densidades celulares e também não limitar esse processo devido ao autossombreamento quando altas densidades celulares são atingidas (ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996). Os trabalhos que citaram esse termo são apresentados a seguir.

Imaizumi et al. (2016) submeteram uma cultura de *Chlorella zofingiensis* à ação lumostática, o que implicou em aumentar a intensidade luminosa do cultivo em relação ao aumento da biomassa microalgal. A luminosidade foi medida com sensor quântico (QSPL-2101, Biospherical Instruments, EUA) e a densidade da cultura foi obtida pelo procedimento de biomassa seca. Esta abordagem permitiu a maior densidade celular ($13,5 \pm 0,35 \text{ g. L}^{-1}$) e taxa de

produção de biomassa volumétrica ($2,41 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) já relatada em qualquer cultura fotoautotrófica anterior desta espécie de acordo com os autores.

Choi et al. (2003) também desenvolveram uma ação lumostática sobre um fotobiorreator de coluna de bolhas para o cultivo da espécie *Haematococcus pluvialis*. O parâmetro de controle foi a taxa específica de captura de luz (q_e), que é a quantidade total de energia luminosa absorvida pela cultura dividida pela biomassa total presente. A manipulação da energia luminosa foi feita através do número de lâmpadas e sua distância do fotobiorreator. Essa intensidade de luz foi medida com um sensor quântico LI-COR (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, EUA). O trabalho demonstrou a superioridade da ação lumostática quando comparada aos resultados sob brilho constante.

Trabalho semelhante ao de Choi et al. (2003) foi desenvolvido por Chen et al. (2011). Eles propuseram um lumostato que foi testado usando a espécie *Chlorella* sp. A luz era fornecida por dois painéis, cada um compreendendo 30 lâmpadas fluorescentes (Philips 8 W) cuja intensidade era variada ajustando-se o número de lâmpadas e a distância entre os painéis e o fotobiorreator. A intensidade da luz incidente foi medida na superfície interna do fotobiorreator na ausência de meio de cultura usando um sensor quântico (LI-190SL da LI-COR Inc., EUA). A intensidade média específica da luz, definida como a quantidade de energia luminosa recebida por célula por unidade de tempo no fotobiorreator, foi selecionada como um dos parâmetros de controle da luz neste estudo, que concluiu que a estratégia lumostática melhorou o crescimento das microalgas.

No estudo de Lee et al. (2006a), a intensidade luminosa oferecida à cultura foi dada por meio de lâmpadas fluorescentes (FL 18D, OSRAM, Coréia) e o ajuste também foi feito pelo número de lâmpadas e pela distância ao fotobiorreator. A intensidade foi medida com um sensor quântico LI-COR (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, EUA) e o parâmetro utilizado na operação lumostática foi a taxa específica de captura de luz (q_e). O trabalho concluiu que as operações lumostáticas baseadas na taxa de captação de luz específica de $3,5 \times 10^{-8} \mu\text{E}.\text{cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$ foi considerada a melhor maneira de obter culturas de *H. rainfall* com alta densidade celular, relatando também que esta estratégia pode ser aplicada a outros sistemas de produção em biotecnologia de microalgas.

Operações lumostáticas usando a taxa específica de captura de luz como um parâmetro de controle não são apenas uma maneira eficiente de obter altas densidades celulares na cultura, mas também são uma forma econômica de reduzir o tempo de cultivo e economizar energia, independentemente da escala (LEE et al., 2006b). Os autores relatam que a taxa de captação de luz específica é um dos melhores parâmetros para aumentar a escala dos fotobiorreatores. O aparato experimental utilizado pelos autores, era composto por um sensor quântico LI-COR (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, EUA) para medir a intensidade luminosa, que era fornecida através

de uma fonte construída por lâmpadas fluorescentes (FL18D, OSRAM, Coréia) distribuídas em painéis circulares posicionados ao redor dos fotobiorreatores, a intensidade também foi ajustada pelo número e distância das lâmpadas fluorescentes ao fotobiorreator.

Em seguida, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que manipulam a intensidade luminosa de forma mais refinada, por meio da variação da potência da radiação incidente, e não apenas alterando a distância da fonte de luz em relação à cultura.

2.5.2 Estratégias de Controle de Luz Automatizado

Os primeiros autores a abordar esse tipo de manipulação foram Eriksen et al. (1996), que iluminaram a cultura de *Synechococcus* sp por meio de gabinetes de lâmpadas revestidos de espelhos para excluir a interferência da luz externa. Doze lâmpadas fluorescentes (Philips TLD 18W / 33) foram controladas por variação de tensão na faixa de 30 V e 200 V por um dimer (EL1 x 36/2 x 18FD, Helvar, Finlândia) regulado por um potenciômetro digitalmente controlado (X9MME, Xicor Inc., Califórnia). A intensidade luminosa dos tubos fluorescentes foi medida por um medidor Macam Q101 Quantum. Os autores relataram que a ação lumostática permite o uso ideal da luz em processos fotoautotróficos.

Os segundos e últimos autores a usar um sistema automatizado foram Ifrim et al. (2013), que implementaram uma técnica de controle de feedback (FLC) para regular a intensidade média da luz incidente, por meio da manipulação do gerador de tensão do painel de diodos emissores de luz (LED). A intensidade luminosa foi medida por um sensor quântico LI-COR fotômetro LI-1400. A validação deste sistema foi feita utilizando a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* e demonstrou por simulação que o controle da luz incidente pode produzir pelo menos 10% a mais de biomassa por mol de fóton fornecido à cultura quando comparado a sistemas com intensidade luminosa constante.

Leis de controle também foram relatadas pelo trabalho de Mairet et al. (2015), que propuseram duas abordagens não lineares que regulam o fator de atenuação de luz na cultura de microalgas. Os autores demonstraram por meio de simulações numéricas que o controlador adaptativo apresentou desempenho satisfatório para regulação sob luz constante. O processo se apresenta como um modo de operação interessante para otimizar a produção de biomassa em condições externas.

Alguns trabalhos também usaram o controle sobre o cultivo de microalgas, mas não necessariamente usando a luminosidade como uma variável controlada para manter a luz em seu estado ideal. Liu et al. (2018), propuseram uma melhoria na produção de microrganismos por meio do modo de cultivo denominado pré-colheita contínua, onde através do transbordamento da cultura ele consegue retirar parte da biomassa produzida. Essa abordagem garantiu uma

distribuição e intensidade luminosa ótima para o cultivo da *Spirulina platensis* administrada em sistema fechado (fotobiorreator), direcionando o controle da concentração de biomassa que minimizasse o efeito negativo da atenuação da luz.

CAPÍTULO 3- DESENVOLVIMENTO DE HARDWARE UTILIZADO NOS CULTIVOS DA PRESENTE TESE

Neste capítulo será apresentado todo o aparato experimental desenvolvido como pré-requisito para o desenvolvimento do controlador policromático de luz, objetivo central desta tese. Portanto na seção 3.1 encontram-se os detalhes sobre o desenvolvimento do painel luminoso. Na seção 3.2 é apresentado o sistema que manipula a potência luminosa e qualidade da luz do painel. E na seção 3.3 está descrito todo o desenvolvimento e avaliação do condensador utilizado junto ao fotobiorreator desenvolvido por Guedes (2017) que será utilizado nesta tese.

3.1 PAINEL LUMINOSO

A luz oferecida para as culturas de microalgas é de suma importância como já discutido, portanto, esta seção apresenta todo o desenvolvimento do painel luminoso que foi utilizado durante os cultivos da *Scenedemus obliquus* nesta tese. A fonte artificial escolhida para ser a responsável por essa emissão foi o LED em função de todas as vantagens discutidas no Capítulo 2.

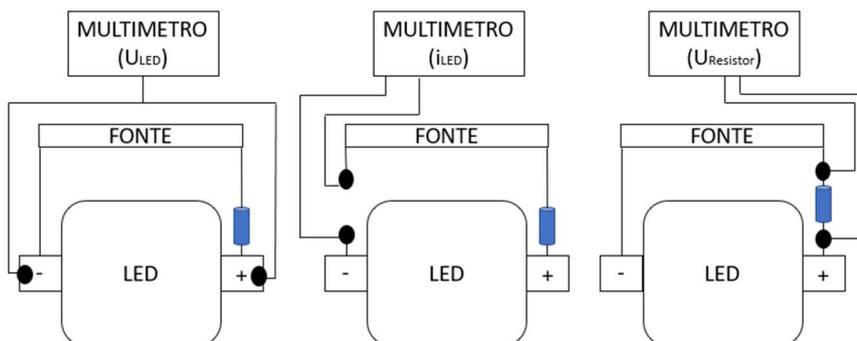
3.1.1 Materiais e métodos

3.1.1.1 Construção do painel

Foi desenvolvido um painel policromático com 72 LEDs de 10 W, sendo 20 desses brancos, 21 azuis, 21 vermelhos e 10 verdes. E a fim de aumentar a vida útil desses componentes, a tensão e a corrente elétrica utilizadas nos diodos emissores de luz é crucial, já que LEDs deixam passar qualquer corrente acima da corrente inicial pré-estabelecida pelo fabricante. Dessa forma utilizamos um multímetro da marca Minipa, modelo ET1002 para estabelecer esses valores em função de diversos resistores testados de 2 W de potência em série com o LED utilizado para compor o painel. O aparato experimental utilizado está descrito na Figura 1.

Figura 1: Aparato experimental utilizado nos testes para definição do melhor resistor para o LED.

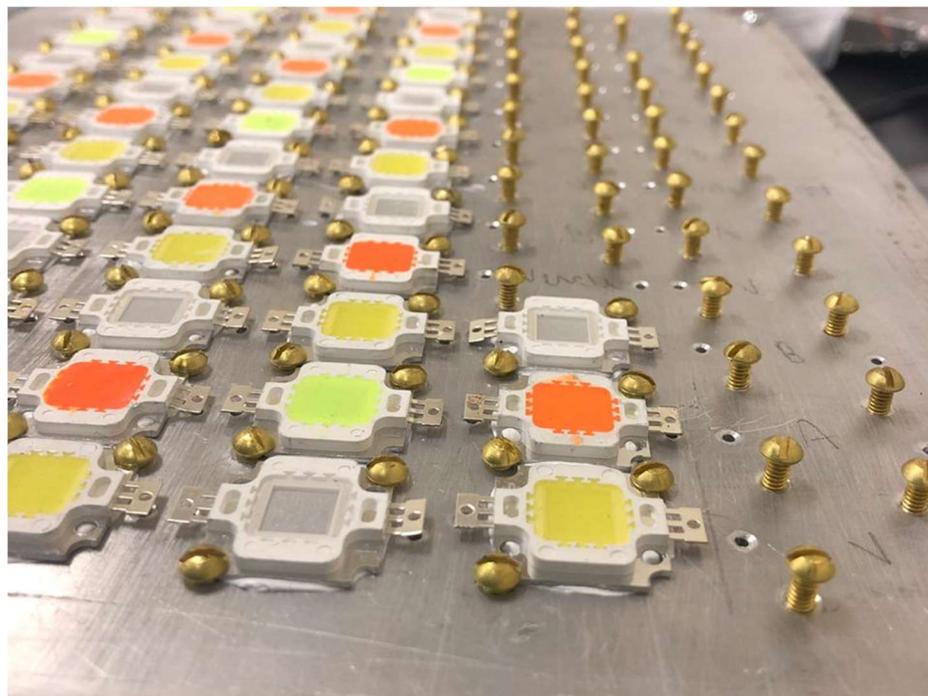
Fonte: Do autor (2021).



O painel contou com uma placa de alumínio, que foi furada previamente em 288 pontos, necessários para a implementação da parte elétrica do painel e para a fixação dos componentes. Os LEDs foram dispostos na superfície dessa placa entre as furações e a área de contato LED + placa foi otimizada com pasta térmica. Parafusos de latão foram utilizados nas extremidades do LED para sua total fixação na placa, como apresenta a Figura 2.

Figura 2: Fixação dos LEDs na placa

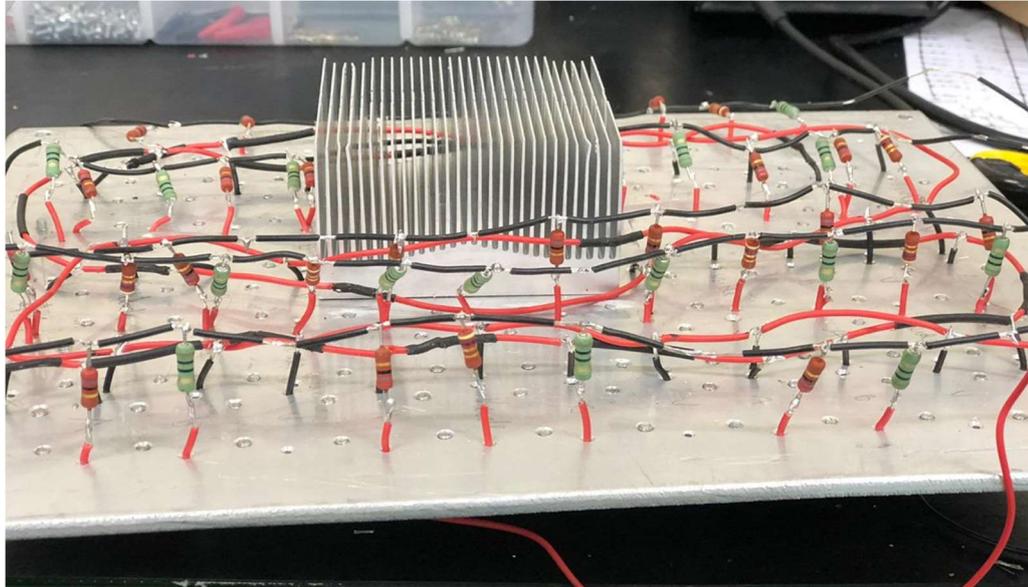
Fonte: Do autor (2021).



Após a fixação dos LEDs foi disposto um circuito em paralelo para alimentar os diodos emissores de luz da mesma cor, através de uma fonte 12 v e 20 A. Na extremidade positiva desses componentes foram também adicionados os resistores de valores determinados anteriormente, sendo utilizado nesse processo aproximadamente 216 soldas. Como parte complementar e

indispensável foi instalado um dissipador de calor no centro da superfície traseira, possuindo 30 aletas resfriadas por um cooler. Todo esse sistema pode ser visualizado pela Figura 3.

Figura 3: Visão traseira do painel luminoso
Fonte: Do autor (2021).

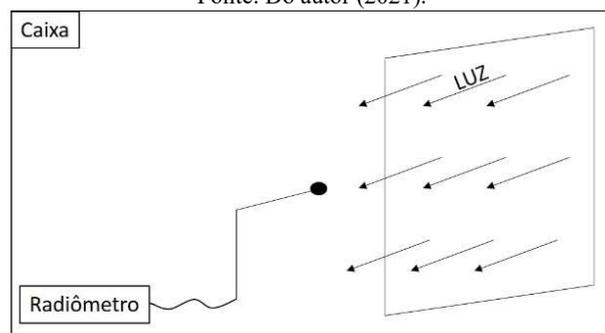


3.1.1.2 Caracterização dos comprimentos de onda emitidos pelo painel

Os LEDs utilizados para a composição do painel são diodos emissores de luz disponíveis no mercado, o que não permite identificar o fabricante e assim ter acesso ao “datasheet” do componente elétrico, dessa forma para detalhar os comprimentos de onda emitidos pelos LEDs que constituem o painel desenvolvido no presente trabalho, testes foram realizados utilizando um aparato experimental como descrito pela Figura 4. Nela é possível notar o painel aqui desenvolvido emitindo energia luminosa, que por sua vez é absorvida por um radiômetro da marca StellarNet Inc, modelo Fiber Optic Spectrometer responsável por fornecer os espectros eletromagnéticos e todo esse sistema isolado de luz externa através de caixas opacas.

Figura 4: Aparato experimental utilizado para a determinação do comprimento de onda emitido pelos LEDs do painel luminoso

Fonte: Do autor (2021).



3.1.2 Resultados

3.1.2.1 Desenvolvimento da fonte luminosa do trabalho

Resistores foram testados em conjunto com os diferentes LEDs que contemplam o painel luminoso do presente trabalho, com a finalidade de limitar a corrente elétrica que passa por esse sistema a fim de favorecer a vida útil desse componente. Portanto os dados obtidos de tensão e de corrente elétrica desse sistema em função de diferentes resistores são apresentados na Tabela 2 para o LED branco, na Tabela 3 para o verde, na Tabela 4 para o azul e na Tabela 5 para o vermelho.

Tabela 2: Resistores testados para o LED branco

Resistor (Ohm)	U_{resistor} (volt)	U_{LED} (volt)	i_{sistema} (A)
10,4	2,18	9,40	0,20
8,3	2,03	9,54	0,22
6,8	1,89	9,68	0,26
5,6	1,73	9,80	0,29
4,7	1,55	9,87	0,33
3,3	1,42	9,82	0,33

Fonte: Do autor (2021)

Tabela 3: Resistores testados para o LED verde

Resistor (Ohm)	U_{resistor} (volt)	U_{LED} (volt)	i_{sistema} (A)
18	2,80	8,68	0,14
10,4	2,56	8,8	-
8,30	2,3	9,06	-
6,8	2,1	9,05	-

Fonte: Do autor (2021)

Tabela 4: Resistores testados para o LED azul

Resistor (Ohm)	U_{resistor} (volt)	U_{LED} (volt)	i_{sistema} (A)
27,0	2,18	9,41	0,07
21,7	2,03	9,66	0,08
18,0	1,90	9,78	0,09

Fonte: Do autor (2021)

Tabela 5: Resistores testados para o LED vermelho

Resistor (Ohm)	U_{resistor} (volt)	U_{LED} (volt)	i_{sistema} (A)
27	2,64	8,96	0,09
21,9	2,57	9,06	0,10
18,1	2,41	9,20	0,12
15,0	2,32	9,23	-
12	1,93	9,42	0,15
10,4	2,04	9,60	0,18

Fonte: Do autor (2021)

A tensão apresentada pelo LED sem a utilização de resistor foi de 11,38 volts para o branco; 11,37 volts para o verde; 11,38 volts para o azul e 11,35 volts para o vermelho. E visando

uma potência no LED menor que 10 W os resistores escolhidos para contemplar o circuito elétrico do painel foram o de 10,4 Ohm para os LEDs brancos (destacado em cinza na Tabela), de 4,7 Ohm para os verdes, de 27 Ohm para os azuis e o de 12 Ohm para os vermelhos.

O painel luminoso depois de construído foi acoplado ao fotobiorreator como é apresentado pela Figura 5.

*Figura 5: Painel luminoso acoplado ao fotobiorreator.
Fonte: Do autor (2021).*



3.1.2.2 Caracterização dos comprimentos de onda emitidos pelos LEDs

As leituras dos quatro conjuntos de LEDs analisados pelo radiômetro estão apresentadas na Figura 7. O conjunto de LEDs brancos apontaram uma emissão na faixa de 400 a 700 nm correspondente ao espectro visível (Figura 6), mas também emitiu na região de 300-400 nm e na região acima de 750 nm, contudo essas emissões fora do espectro visível apontaram uma potência de iluminação quase nula. Já para o LED vermelho a faixa de emissão foi de aproximadamente 580-750 nm o que compreende a faixa do amarelo até o vermelho, também apresentou emissões acima de 750 nm, região de infravermelho, na mesma grandeza observada no LED branco. O verde emitiu de 490-590 nm o que corresponde à faixa do verde no espectro e teve baixa potência

de iluminação abaixo de 490 nm, região do ultravioleta e acima de 590 nm. Para o azul a emissão iniciou em 440 nm e foi até 495 nm, correspondendo a faixa de azul, mas também emitiu 300-440 nm em baixa potência de iluminação.

Figura 6: Espectro de radiação eletromagnética.

Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2011)

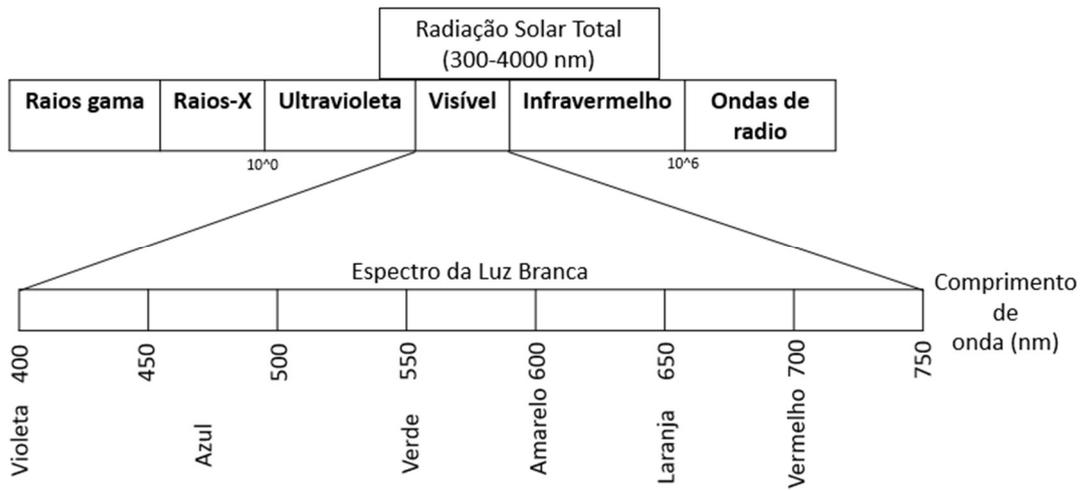
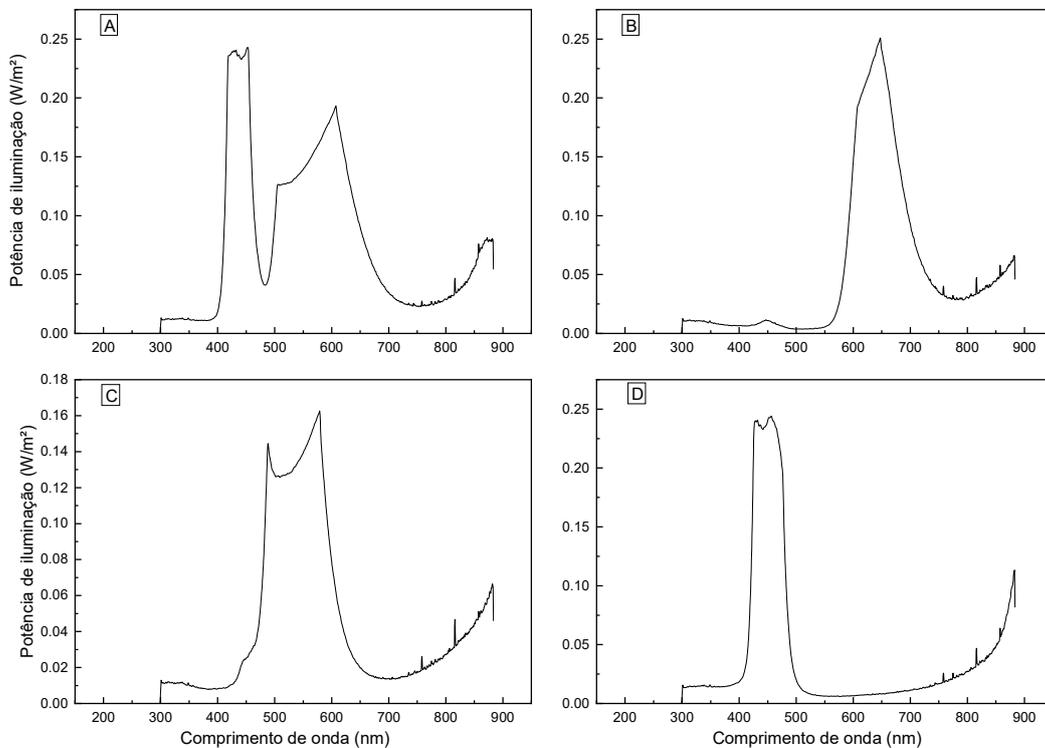


Figura 7: Comprimento de onda emitido pelos conjuntos de LEDs; (A) branco, (B) vermelho, (C) verde e (D) azul
Fonte: Do autor (2021)



3.2 SISTEMA QUE MANIPULA A POTÊNCIA DO PAINEL

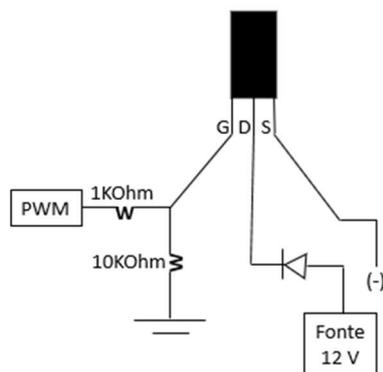
O sistema que manipula a tensão elétrica utilizada pelo painel e que conseqüentemente manipula a intensidade emitida pelo painel, é de suma importância para a conclusão desta tese, pois é através deste que o controlador policromático desenvolvido aqui conseguiu manipular a potência elétrica dos conjuntos de LEDs para manter a variável controlada no *setpoint* desejado, variável medida pelos sensores de luz. Dessa forma nessa seção está descrito como esse sistema foi elaborado.

3.2.1 Materiais e métodos

3.2.1.1 Desenvolvimento do sistema de manipulação do painel

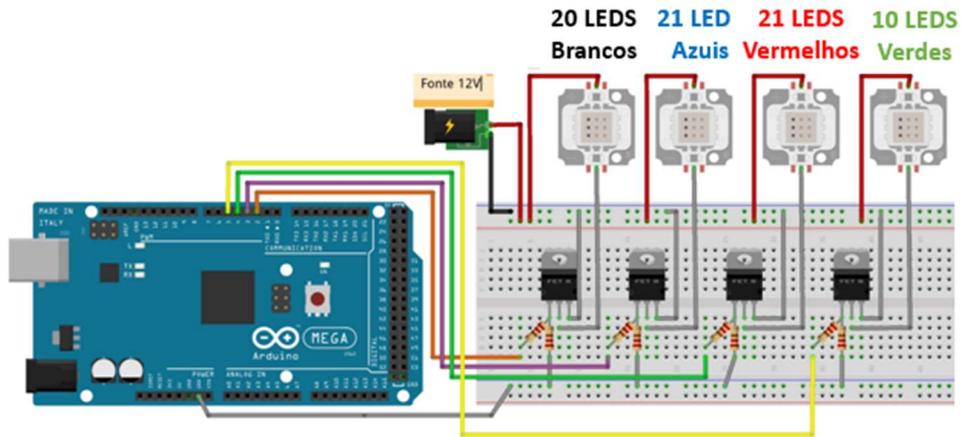
O sistema de manipulação da potência do painel utilizou como principal componente eletrônico um transistor, modelo IRFZ46, que por sua vez necessitou para completar o seu circuito elétrico de um resistor de 1k Ohm e um resistor de 10k Ohm (Figura 8), de um Arduino mega responsável por emitir os sinais elétricos e de uma fonte de corrente contínua de 12 V, com 20 W de potência, como apresenta a Figura 9. A principal função do transistor é a de amplificar a tensão enviada pelo Arduino mega que trabalha em uma faixa de tensão de 0-5 V, para tensões reais de operação do painel luminoso de 0 a 12 V. Considerando essas premissas quatro transistores foram requeridos, cada um recebendo sinais de uma porta PWM do Arduino que manipula a tensão enviada aos transistores e assim comandando os conjuntos de LEDs

Figura 8: Circuito elétrico utilizado no controlador dos LEDs para o componente IRFZ46N
Fonte: Do autor (2021)



O processo de conexão das saídas dos transistores com o Arduino e da placa luminosa com a fonte de alimentação estão apresentados pela Figura 9. E o pseudocódigo utilizado para comandar o controlador está descrito pelo Quadro 1.

Figura 9: Conexão dos transistores para o Arduino e do painel luminoso para a fonte de alimentação
 Fonte: Do autor (2021).



Quadro 1- Pseudocódigo utilizado no controlador de luminosidade. RGBW corresponde às cores vermelho, verde, azul e branco, respectivamente.

Inclusão de bibliotecas
Declaração de variáveis
Configuração da comunicação com o computador
Repetição infinita:
Leituras das instruções enviadas pelo computador (Atualização do set point)
Conversão dos valores lidos do computador em números para o controle de potência
Cria efeito “AMANHECER” quando o painel é ligado ou cria efeito “ESCURECER” quando o painel é desligado
Leitura dos sensores de luz
Conversão dos dados elétricos dos sensores em PAR
A Cada um minuto:
Calcula a potência de cada painel usando a lógica de controle escolhida
Envia os respectivos valores de potência (RGBW) para as respectivas portas PWM
Aguardar dez segundos
Fim

Fonte: Do autor (2021)

3.2.1.2 Caracterização da variação da tensão em relação aos sinais PWM

A potência luminosa utilizada pelos conjuntos de LEDs é a variável essencial para o sistema do controlador policromático de luz, portanto seu comportamento em função dos sinais PWM foram caracterizados. E para tal feito um sensor quântico, modelo LI-250 da Li-Cor Inc foi utilizado, responsável por mensurar a radiação fotossinteticamente ativa emitida por cada um dos conjuntos de LEDs.

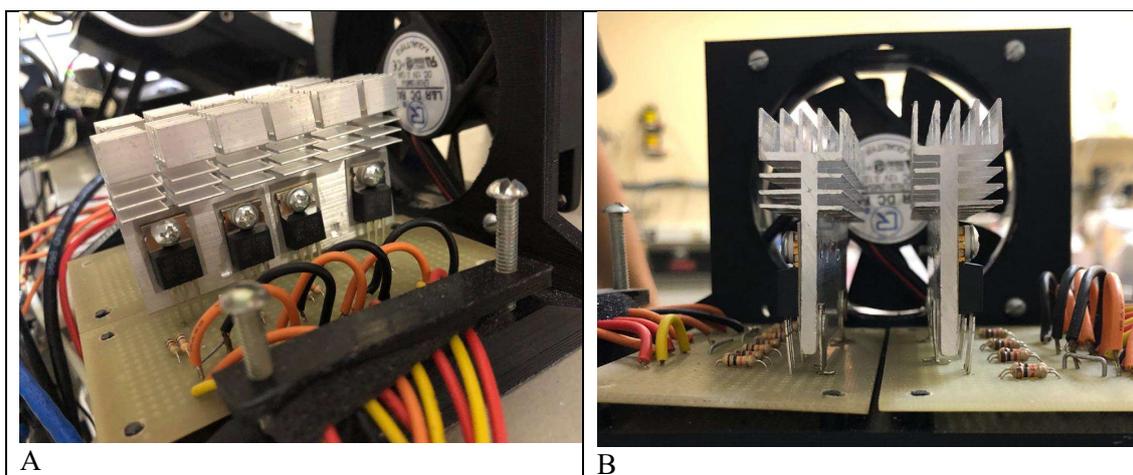
3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Sistema de manipulação da tensão do painel

O sistema que manipula a tensão do painel que utiliza o transistor, pode ser visualizado pela Figura 10, como também o seu sistema de dissipação de calor e os cabamentos que vão tanto para o Arduino quanto para o painel luminoso.

Figura 10: Sistema montado para manipular a tensão emitida ao painel luminoso; (A) vista lateral e (B) vista frontal.

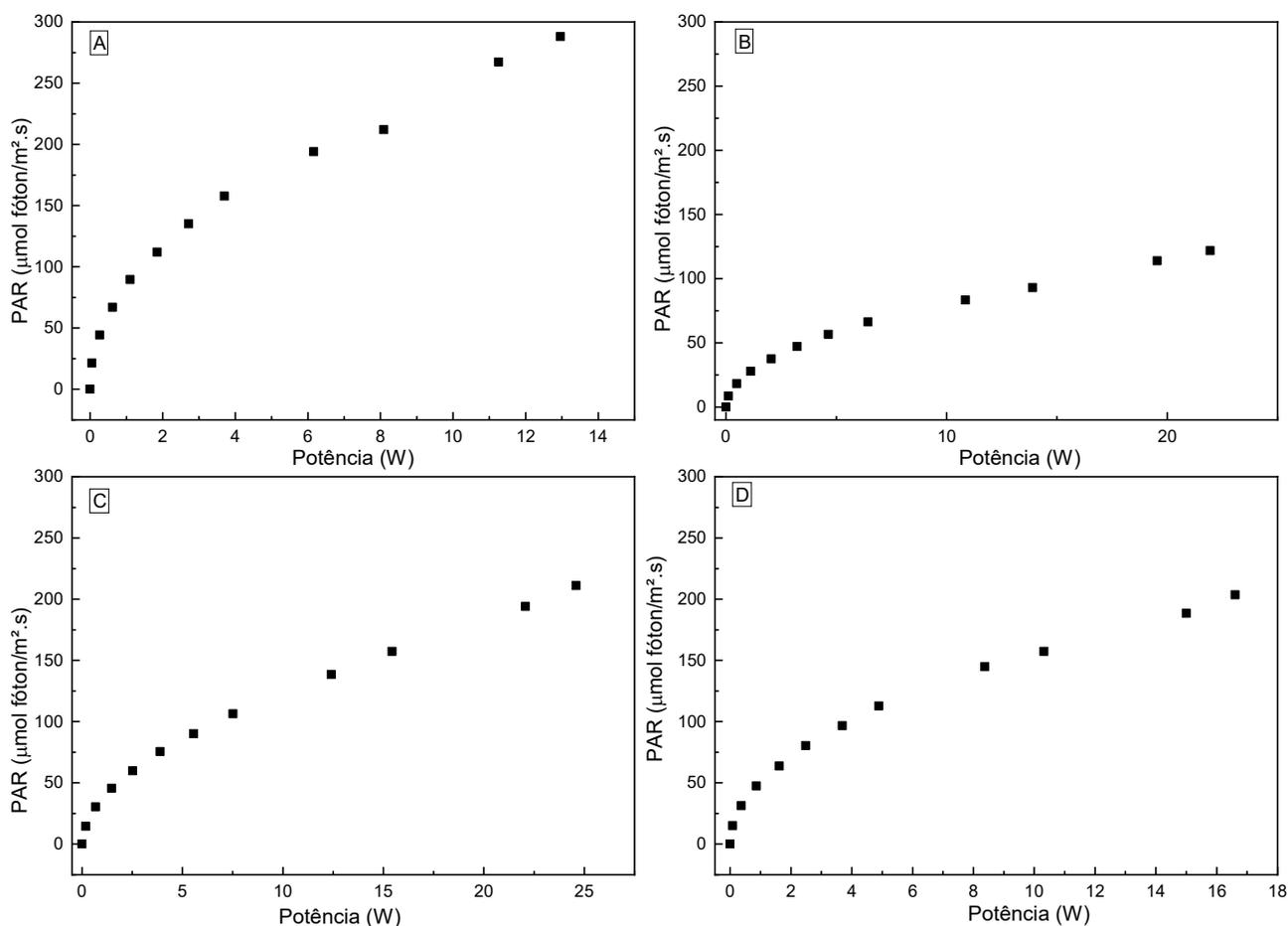
Fonte: Do autor (2021)



3.2.2.2 Caracterização da tensão elétrica utilizada pelo painel em relação aos sinais PWM

Os resultados da radiação fotossinteticamente ativa em função da potência emitida por um dos painéis luminosos para cada conjunto de LEDs está apresentado pela Figura 11, onde a maior potência luminosa é contemplada pelo comprimento de onda branco, contudo esse não é o valor máximo atingido pelo sistema, já que apenas um dos painéis foi acionado, o dobro desse valor pode ser alcançado quando o sistema trabalhar com os dois painéis ligados ao mesmo tempo.

Figura 11: Comportamento da PAR em função do aumento da potência do painel luminoso em (A) para o branco, (B) para o vermelho, (C) para o verde e em (D) para o azul
 Fonte: Do autor (2021)



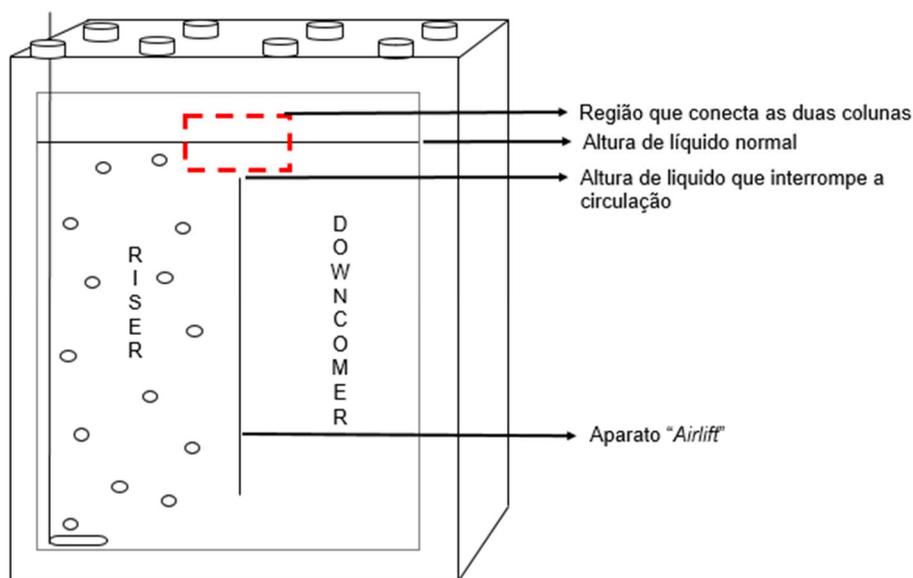
3.3 CONDENSADOR DE BAIXO CUSTO

O fotobiorreator “Airlift” desenvolvido por Guedes (2017) força a circulação interna do meio, e conseqüentemente sua homogeneização, através da força motriz ocasionada pela introdução de um gás no sistema, geralmente ar. Contudo, essa introdução de ar pelo aspersor desencadeia um arraste da fase líquida aumentando a perda de massa do sistema. Dessa forma fica indispensável a utilização de um condensador acoplado ao fotobiorreator para evitar que o volume perdido por arraste gasoso não interrompa a agitação desse equipamento, já que se o volume atingir a altura do aparato “Airlift” a conexão da coluna do “riser” com o “downcomer” fica interrompida (Figura 12).

A refrigeração de condensadores comumente utilizados é dada através de banhos termostáticos que além de ocupar muito espaço, também agregam custo ao processo. Dessa forma a alternativa encontrada na presente tese foi propor um sistema de refrigeração mais barato para

ser utilizado junto ao condensador, utilizando pastilha Peltier. O desenvolvimento do condensador refrigerado pela pastilha Peltier está detalhado nesta seção.

Figura 12- Esquema da interrupção da agitação em função da perda de volume por arraste
Fonte: Do autor (2021)



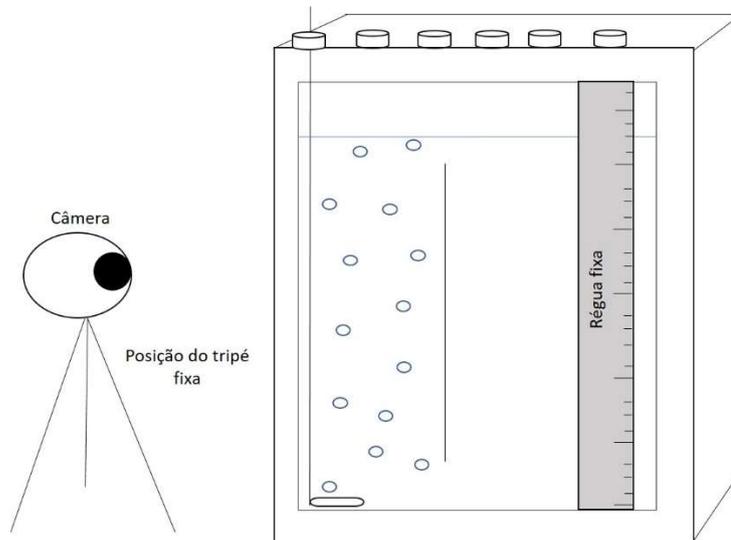
3.3.1 Materiais e métodos

3.3.1.1 Comportamento da variação do volume sem a utilização do condensador

Um experimento para avaliar o comportamento do arraste de líquido durante o uso do equipamento nos cultivos foi proposto, considerando essa premissa todas as condições de um cultivo real foram simuladas: 6 litros de volume inicial (utilizou-se água destilada), vazão de alimentação de ar em $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, iluminação de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, e temperatura do meio líquido de 25°C .

As amostragens da altura do líquido foram feitas a cada 24 horas e durante esse momento a alimentação de ar foi interrompida. Para isso foi utilizada uma régua milimetrada fixada na parede do fotobiorreator. A incerteza dos valores medidos é de metade da menor escala da régua, ou seja, $\pm 0,05 \text{ cm}$. O efeito de paralaxe desse experimento foi minimizado com o auxílio de uma câmera, responsável por efetuar todas as amostragens, ela foi previamente fixada de maneira a capturar fotos frontais da régua que media a altura do meio. A posição da câmera mais especificamente foi de sete centímetros de distância da superfície do reator e a quinze centímetros de altura da base do equipamento, como apresenta a Figura 13.

Figura 13: Aparato experimental usado no teste de arraste de líquido
 Fonte: Do autor (2021)



As medidas da largura e da profundidade do fotobiorreator contidas em Guedes (2017) foram utilizadas para calcular o volume aferido a cada amostragem, proporcionando a avaliação da variação de líquido perdido por arraste gasoso através da Equação $3L \times P \times \Delta h_t = \Delta V_t$.

$$L \times P \times \Delta h_t = \Delta V_t \quad \text{Equação 3}$$

Na equação: L= 20,0 cm e P= 10,0 cm.

3.3.1.2 Construção do condensador

Um condensador foi construído para ser anexado à saída de gases do fotobiorreator, utilizando chapas de aço inox soldadas em formato hexagonal e com as extremidades verticais em formato tubular. Este formato de condensador não usual foi escolhido para obter uma superfície lateral larga, retangular e plana, e assim permitir o máximo contato da pastilha Peltier, responsável pelo resfriamento, com as paredes do condensador, enquanto as extremidades mantiveram o formato que possibilitou o encaixe do sistema ao fotobiorreator. A Figura 14 apresenta o trocador de calor construído, assim chamado por ainda não apresentar o sistema de resfriamento acoplado.

Figura 14: Trocador de calor construído
Fonte: Do autor (2021)



O sistema de resfriamento do condensador foi montado utilizando uma pastilha Peltier da marca Latina, com dimensões 40x 40x 4 mm e temperatura de operação nominal entre -55°C e 83°C. A extremidade fria da pastilha foi conectada à chapa de cobre do equipamento e a outra extremidade que libera calor foi posta em contato com um dissipador de calor, com aletas metálicas, acoplado a uma ventoinha para maximizar a perda de energia térmica. O conjunto com todos os componentes descritos acima será chamado de condensador no restante desta seção.

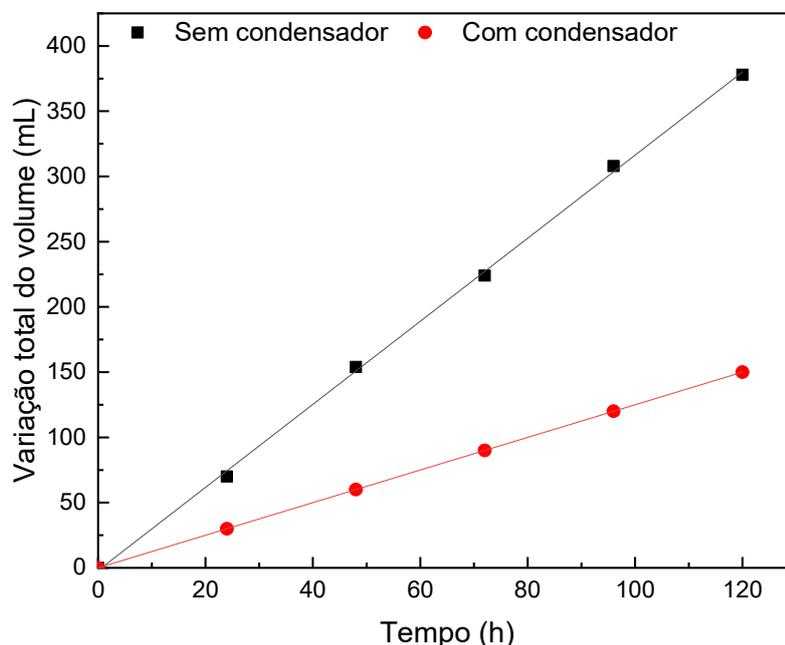
3.3.1.3 Comportamento da variação do volume com a utilização do condensador

Após o desenvolvimento do condensador, um experimento exatamente igual ao experimento que determinou o arraste de líquido no fotobiorreator foi proposto, diferindo apenas no uso do condensador construído neste trabalho e no tempo de amostragem que foi de 24 horas, para que o comportamento do condensador atuando em cima da perda de meio por arraste gasoso fosse aferida.

3.3.2 Resultados

Os dois experimentos que levaram em conta o arraste gasoso de meio no fotobiorreator foram comparados, como apresenta a Figura 15. Sendo notória a otimização causada pelo uso do condensador.

Figura 15: Arraste de água com e sem o uso de condensador
 Fonte: Do autor (2021)



Como os resultados apresentados seguiram uma tendência linear, ajustes foram propostos e os valores do coeficiente angular e do coeficiente de determinação são mostrados na Tabela 6. A incerteza nos valores medidos é de metade da menor escala da régua, ou seja, $\pm 0,05$ cm.

Tabela 6: Coeficiente angular das linhas de tendência e coeficiente de determinação

Experimento	α	R^2
Sem condensador	3,18 ($\pm 0,04$)	0,9985
Com condensador	1,25 ($\pm 0,01$)	0,9997

Fonte: Acervo pessoal

A perda do volume de líquido do reator foi linear em ambos os casos e demonstrou-se coerente, considerando que as condições do ambiente interno e externo do reator foram mantidas constantes. A razão entre o coeficiente angular da reta correspondente aos experimentos foi de 0,56. Portanto, o uso de condensador na saída de gás do fotobiorreator resultou em uma redução de 44% de perda de massa por arraste gasoso. Sendo essencial a utilização desse sistema para reduzir a perda de massa por arraste, já que foi perdido apenas metade do líquido que seria perdido sem o condensador. O sistema também deve chamar atenção para o seu baixo custo em relação aos banhos termostáticos que são geralmente utilizados nesse tipo de aplicação.

As peças principais utilizadas no condensador do trabalho contemplam placas de aço inox, Arduino, pastilha Peltier e uma ventoinha, que no total tem custo de ~ R\$ 290,00, enquanto um banho termostático pode variar segundo o seu modelo de R\$1000,00 a R\$ 16.650,00, representando uma diferença significativa de custo entre os dois sistemas e comprovando que o sistema utilizado é muito econômico estruturalmente. E sua eficiência pode ser aumentada com o controle da temperatura do condensador, alcançando-se valores otimizados que potencializem a redução do arraste gasoso e, simultaneamente, impeça algum desperdício de energia elétrica.

CAPÍTULO 4- DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE AFERIÇÃO DA RADIAÇÃO FOTOSSINTETICAMENTE ATIVA (PAR) EMITIDA POR LEDS

Neste capítulo será abordado um sistema de aferição da radiação fotossinteticamente ativa comumente utilizado nos cultivos de microrganismos fotossintetizantes. Devido ao alto custo destes sensores a presente tese teve como objetivo propor um novo sistema que fosse de baixo custo e capaz de mensurar essa grandeza tão importante e de extrema necessidade para guiar o controlador policromático de luz desenvolvido neste estudo. Como informações adicionais reportamos que esse sistema gerou um depósito de patente que possui o número de identificação: BR 10 2021 011501 7.

4.1 SENSOR BARATO PARA A MENSURAÇÃO DA RADIAÇÃO FOTOSSINTETICAMENTE ATIVA (PAR) APLICADO A CULTURAS DE MICROALGAS

4.1.1 Resumo

A produção de microalgas está diretamente ligada à qualidade e a quantidade de luz oferecida ao fotobiorreator. Se a luz for excessiva, ocorre fotoinibição e, se estiver abaixo do valor ideal, seu crescimento é limitado. Portanto, para obter um bioprocessamento otimizado, a radiação fotossintética ativa (PAR) deve ser monitorada. No entanto, acompanhar a luz em processos fotossintéticos pode ser uma tarefa muito cara, pois os sensores disponíveis no mercado possuem um alto valor. Assim, o presente estudo apresenta uma tecnologia de baixo custo para a medição da PAR, a partir de um sensor RGB comum que utiliza correlações matemáticas para calibrar a sua leitura elétrica em leituras de PAR. Este sistema de medição é de fácil montagem, o que o torna acessível a profissionais de todas as áreas, além de possuir leituras estáveis. Esta nova abordagem de medição da PAR possibilita sua aplicação em cultivos de microalgas devido ao seu baixo custo, permitindo a utilização de mais de um sistema de aquisição por cultura, permitindo que iluminação seja manipulada e assim se torne homogênea, além de ser facilmente implementada junto a sistemas de controle de luz responsáveis pela otimização da produção.

Palavras-chave: sensor PAR, Radiação Ativa Fotossintética, sensor de luz, microalgas, fotobiorreator, *Scenedesmus obliquus*

4.1.2 Introdução

O uso biotecnológico de microalgas tem mostrado grande potencial para a produção de químicos finos, suplementos alimentares (humano e animais) e biocombustíveis (SPOLAORE et al., 2006; YING YING TANG et al., 2020). Dentre as possibilidades, esses microrganismos podem produzir produtos de alto valor agregado como β -caroteno, astaxantina, ácido docosaheptaenóico, ácido eicosaheptaenóico e pigmentos como a ficobilina (BOROWITZKA, 2013). O potencial comercial para a produção industrial de sua biomassa e metabólitos vem ganhando cada vez mais reconhecimento nos setores industriais (BOROWITZKA, 1999; LORENZ; CYSEWSKI, 2000b; RAJA et al., 2014; STEPHENS et al., 2010; SUGANYA et al., 2016; WIJFFELS; BARBOSA, 2010). No entanto, o grande gargalo na produção desses microrganismos é como produzi-los de forma eficiente e acessível.

O desafio para aumentar a viabilidade da produção é otimizar a energia luminosa para a fotossíntese; uma das maneiras de atingir esse objetivo é garantir a intensidade ideal da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) para todas as células de microalgas presentes na cultura (CUARESMA et al., 2009). As microalgas são organismos autotróficos (Embley and Martin, 2006; Ying Ying Tang et al., 2020) que transformam energia luminosa em energia bioquímica. Assim, a otimização da qualidade luminosa alcançada no processo pode contribuir para diminuir o custo de cultivo e aumentar a biomassa possibilitando sua comercialização (CUARESMA et al., 2009).

No entanto, calcular a luminosidade em culturas em tempo real não é simples. Os equipamentos disponíveis no mercado que medem a radiação fotossinteticamente ativa são de alto valor, dificultando sua popularização. Uma das características mais interessantes dos sistemas de medição da PAR que propomos é o uso ininterrupto durante todo o cultivo de microalgas, bem como a utilização deste sensor em diferentes pontos da cultura, a fim de monitorar a distribuição de luz adequada. Isso é importante porque a intensidade e a qualidade da luminosidade determinam o desenvolvimento e as propriedades de crescimento das microalgas (HWANG; MAIER, 2019), bem como sua composição química (Choi et al., 2003; Ifrim et al., 2013; Liu et al., 2018; Cheng-Wu et al., 2001).

O estudo de Hwang e Maier (2019b) mostrou os efeitos do comprimento de onda na composição lipídica e no crescimento de *Neochloris oleoabundans*, observando que para esta espécie a luz vermelha favoreceu a produção de ácidos graxos monoinsaturados. A investigação de Han et al., (2017) confirmou a importância da qualidade da luz oferecida às culturas da Cyanobacteria *Nostoc flageliforme*, relatando um aumento significativo de polissacarídeos extracelulares quando submetidos à luz azul ou vermelha em comparação com a luz branca. Em

geral, a maioria das investigações concorda que o controle do brilho aplicado à produção autotrófica é fundamental.

O monitoramento da PAR de formas alternativas pode ser encontrado na literatura. O estudo de Ögren e Sjöström (1990) relatou a estimativa do efeito da fotoinibição no ganho de carbono em folhas de um dossel de salgueiro. Eles usaram medições do fotodiodo de fosforeto de arseneto de gálio (5 mm de diâmetro; modelo G1125-02; Hamamatsu Photonics KK, Japão) calibrado usando um sensor quântico PAR (Modelo Li-190SB, Li-Cor Inc., Lincoln, Neb., EUA). Outros autores têm utilizado este tipo de fotodiodo para diminuir os custos de monitoramento da copa das plantas, como foi o caso do estudo de Aaslyng et al. (1999) que modificou o material difusor do sensor descrito por Ögren e Sjöström (1990) para um padrão espectral melhor definido. Eles também desenvolveram a parte eletrônica deste sensor, afirmando que o desempenho do novo fotodiodo atende aos requisitos de um sensor PAR através de uma excelente correlação com o sensor PAR comercial. Para avaliar a precisão dos sensores PAR comercializados, Akitsu et al. (2017) estudaram nove desses sensores, através dos erros causados pela resposta espectral não ideal, que foram causados por uma combinação não complexa da resposta espectral, bem como observaram a degradação da sensibilidade nos sensores utilizados a longo prazo entre outras análises e recomendaram dois sensores quânticos com erros mínimos, LI-COR (LI-190) e PREDE PAR (o2D).

Neste trabalho apresentamos uma ferramenta acessível para a inferência em tempo real da PAR aplicada a culturas de microalgas. O sistema desenvolvido permite que todo público interessado possa reproduzir o sensor, utilizando pouco conhecimento de eletrônica e baixo investimento, como também possibilita que vários sensores sejam utilizados em uma mesma cultura durante todo o cultivo em tempo real.

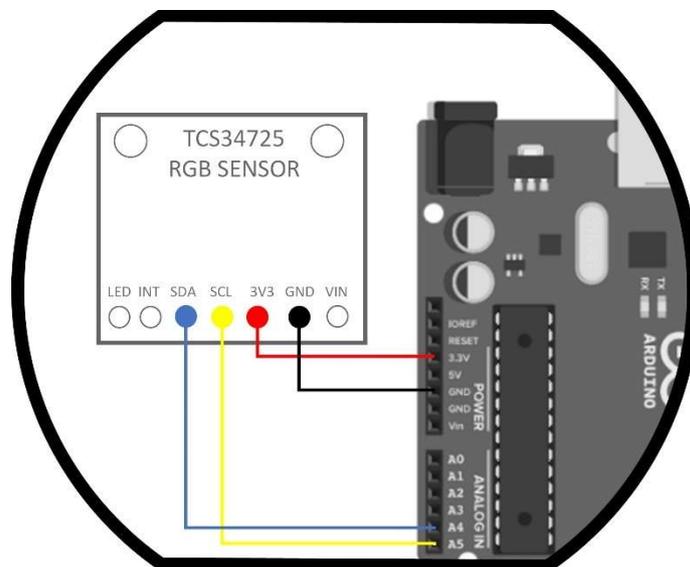
4.1.3 Materiais e Métodos

4.1.3.1 Sensores

4.1.3.1.1 Sensor de baixo custo

Um sensor de baixo custo do mercado (US\$ 7), modelo TCS34725, denominado RGB, foi utilizado neste trabalho. Seu sinal pode ser manipulado usando a biblioteca “Adafruit_TCS34725.h” para fornecer um sinal digital filtrado dos valores de intensidade e brilho de vermelho (R), verde (G) e azul (B). O chip TCS34725 foi conectado a um Arduino Mega 2560, conforme mostrado no diagrama da Figure 16.

Figure 16: Conexão do sensor RGB com o Arduino
Fonte: Do autor (2021).



O controlador (Arduino) foi responsável por adquirir, em tempo real, os valores fornecidos pelo sensor utilizando a biblioteca Adafruit para este fim (Adafruit, 2013). O pseudocódigo é apresentado no Quadro 2, com a leitura elétrica do sensor feita a cada segundo.

Quadro 2: Pseudocódigo usado no controlador Arduino. “R” refere-se a leituras em vermelho, “G” em verde, “B” em azul e “RGB” à soma das anteriores.

```
Inclusão de biblioteca: Wire.h

Inclusão de biblioteca: Adafruit_TCS34725.h

Inicialização da biblioteca Adafruit;

Configuração da biblioteca Adafruit(Integrationtime_700MS, TCS34725_GAIN_1X);

Configuração da comunicação Serial;

Loop:

R= calculo_R(usando Adafruit);

G= calculo_G(usando Adafruit);

B= calculo_B(usando Adafruit);

RGB=R+G+B;

Transmissão para o computador através da comunicação Serial: (RGB, R, G, B);

Aguarda 1 s e repete o loop
```

Fonte: Do autor (2021)

O software Supersys-photo foi usado para salvar os dados de luz a cada minuto para análises posteriores. Todas as medidas automáticas utilizadas nas correlações com o sensor comercial são uma médias de vinte pontos de aquisição. A comunicação entre o computador e o Arduino ocorreu através da porta serial.

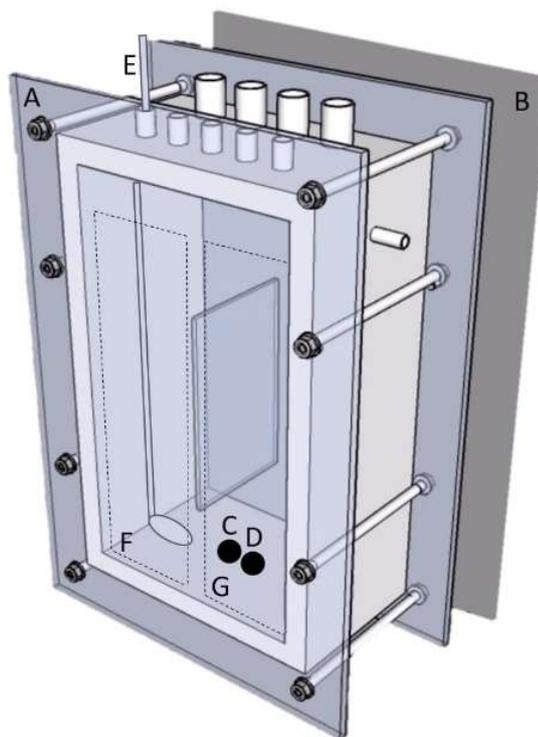
4.1.3.1.2 Sensor de alto custo comercial

O sensor quântico, modelo LI-250 da Li-Cor Inc (~US\$900) já consolidado no mercado foi utilizado para a comparação com os dados do sensor de baixo custo e para validar as medições do sensor proposto. As medidas de PAR foram feitas em diferentes intensidades de luz para comparação com o sensor RGB. Cada medição feita com o sensor quântico corresponde à média de quinze pontos de aquisição, de acordo com a função padrão do equipamento.

4.1.3.2 Testes

Após a montagem de todo o sistema de aquisição de dados, os sensores foram dispostos no fotobiorreator conforme Figura 17 e então submetidos aos seguintes procedimentos experimentais. Os sensores foram fixados externamente à parede de vidro do fotobiorreator orientados para medir a luz que passa por ele. O painel de LED foi posicionado do lado oposto para emitir luz que passará pelo reator, será absorvida pelas microalgas e sensibilizará os sensores. O painel luminoso foi construído com 20 LEDs brancos com as seguintes especificações nominais: tensão 9 – 12 V; corrente 900 mA; fluxo luminoso 90 – 120 lm/w; ângulo de feixe 120°; temperatura de operação - 20°C a 60°C; temperatura de cor 6000 k – 6500 k. Esse tipo de biorreator possui duas regiões principais: uma de alta densidade (downcomer) e outra de baixa densidade (riser) causada pela pulverização de gás (Cerri e Badino, 2010). Os sensores foram instalados no downcomer porque a região é homogênea e livre de bolhas de ar.

Figura 17: Aparato experimental: fotobiorreator airlift de placas planas (A), painel de luz (B), sensor de baixo custo (C), sensor de alto custo comercial (D), aspersor (E), área do riser (F) e área de downcomer (G).
Fonte: Do autor (2021).



4.1.3.2.1 Sensibilidade

O primeiro teste foi submeter o sensor TCS34725 a uma variação de energia luminosa dada pela variação da potência do painel de LED, a fim de medir sua escala de variação e sensibilidade.

4.1.3.2.2 Estabilidade

O sensor TCS34725 foi submetido a um teste de estabilidade realizado por mais de 60 horas, alternando períodos de claro e escuro; durante o período iluminado a intensidade da potência luminosa foi mantida constante.

4.1.3.2.3 Comportamento da aquisição da PAR

O sensor de alto custo e o sensor de baixo custo foram submetidos a uma variação luminosa de 0 a 300 $\mu\text{mol f\u00f3ton/m}^2.\text{s}$ com passos de 20 $\mu\text{mol f\u00f3ton/m}^2.\text{s}$. Os resultados adquiridos do sensor de baixo custo permitiram obter a porção pretendida de cada comprimento de onda registrado na medida do respectivo PAR calculado pelo sensor comercial.

4.1.3.3 *Cultivo microalgal para a validação do sensor*

O cultivo microalgal para validação do sensor foi dado utilizando a microalga verde de água doce *Scenedesmus obliquus* em meio BG-11 (Rippka et al., 1979). O cultivo foi dado em um fotobiorreator airlift de placas, sistema fechado, com fluxo de ar de 1,5 L/min, temperatura de 26°C e iluminação constante de 200 $\mu\text{mol f\u00f3ton/m}^2.\text{s}$ fornecida por painel de LED branco, e fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro. As células foram quantificadas usando a câmara de contagem de células em um hemocitômetro (Fuchs-Rosenthal) sob um microscópio óptico (Nikon Eclipse modelo E200, Japão).

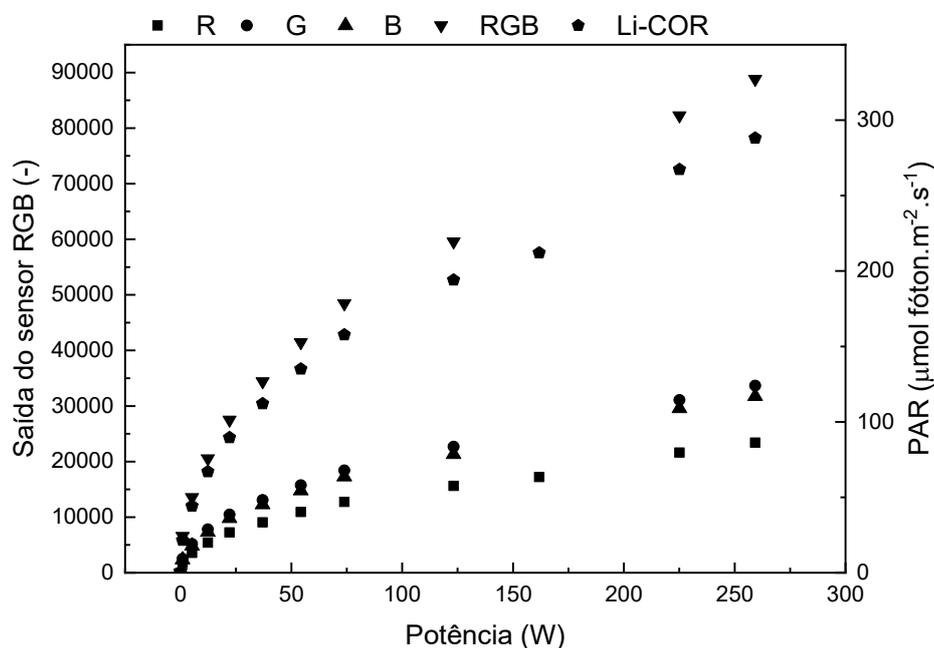
4.1.4 Resultados e discussões

4.1.4.1 *Mensuração da variação da intensidade luminosa*

Ambos os sensores, de baixo custo e alto custo, foram submetidos a diferentes intensidades de luz, para que seus sinais pudessem ser avaliados e comparados. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 18 e apresentam um comportamento semelhante entre os sensores testados. Este primeiro experimento indicou que o componente eletrônico de baixo custo é sensível para medir variações da radiação fotossinteticamente ativa devido ao aumento da potência do painel luminoso. Deve-se notar que a emissão de PAR não é linearmente proporcional à potência elétrica fornecida ao painel de LED.

Figura 18: Comportamento dos sensores em função da variação de potência do painel de luz (O eixo y principal mostra os valores de saída da porta analógica do sensor RGB e o secundário as leituras do sensor quântico (LI-250))

Fonte: Do autor (2021).

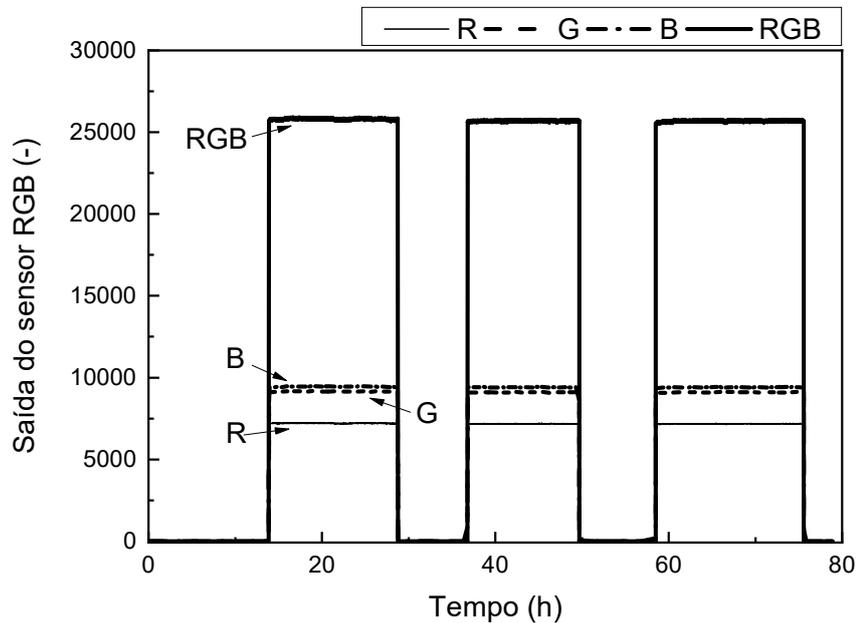


4.1.4.2 Estabilidade

Como o sistema apresentou sensibilidade compatível, sua estabilidade em longas horas de uso precisava ser determinada. A Figura 19 mostra os dados do sensor em um experimento com mais de 60 horas de uso, alternando períodos de claro e escuro. Os dois primeiros períodos de iluminação duraram doze horas e o terceiro 24 horas. Analisando a Figura 19, percebe-se que os sinais do sensor permaneceram estáveis mesmo após longos períodos no claro e no escuro.

Figura 19: Teste de estabilidade de acordo com a leitura do sensor de baixo custo sob intensidade de luz constante nos períodos de luz acesa e apagada.

Fonte: Do autor (2021)

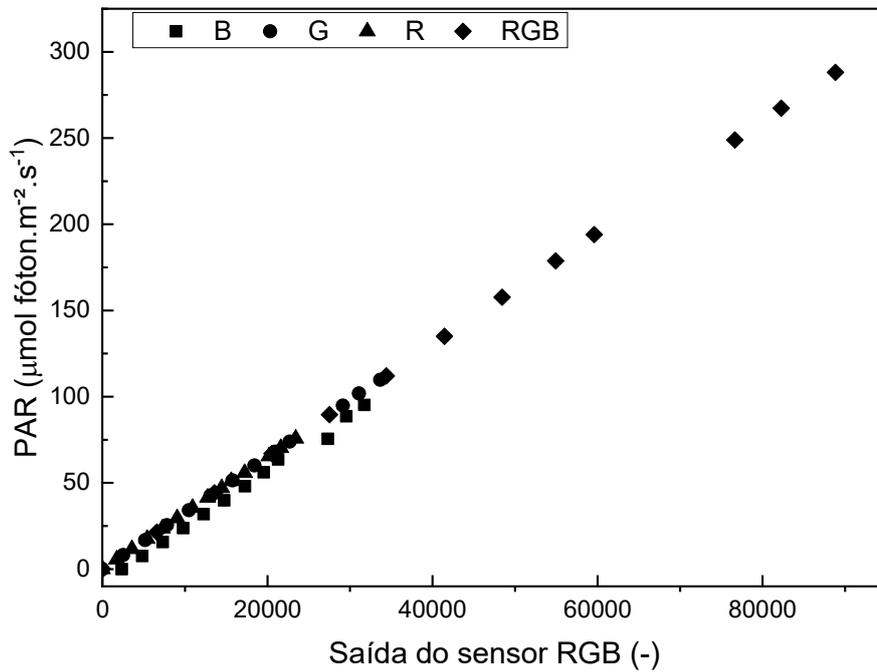


4.1.4.3 Potencial do sensor PAR com sensor de baixo custo para aferição da PAR.

A maioria dos sensores de luz de baixo custo atualmente são capazes de detectar a variação na luminosidade, mas podem não quantificar a radiação fotossinteticamente ativa, que é expressa como o número de fótons na faixa de comprimento de onda de 400 a 700 nm por unidade de área e tempo (JONES, 1992). Para analisar este item, o sensor estudado neste trabalho (TCS34725) foi avaliado por comparação com o sensor comercial LI-250. A aquisição de dados com os sensores mostrou que o painel de LED branco utilizado sempre emitiu a mesma relação de potência para todos os comprimentos de onda: 26,3% para vermelho (580-720 nm), 38,1% para verde (475-600 nm) e 35,6% para azul (410-495 nm). Desta forma o PAR total foi fragmentado em seus respectivos componentes vermelho (R), verde (G) e azul (B) para construir a correlação linear com o sinal do LI-250. A Figura 20 mostra os dados que foram utilizados nas correlações lineares entre o sensor de baixo custo e o comercial.

Figura 20: Dados de saída do sensor de baixo custo (Símbolos: B-azul, G-verde, R-vermelho e RGB- soma RGB) em função das medições do sensor Licor PAR.

Fonte: Do autor (2021)



O comportamento linear dos dados permitiu a construção de uma equação de calibração para cada saída do sensor de baixo custo, Equações 4 a 7, que apresentaram um excelente coeficiente de determinação de correlação (R^2), validando aqui o uso do sensor de baixo custo proposto para a medição da intensidade luminosa em bioprocessos.

$$PAR_R (\mu\text{mol fóton} / \text{m}^2.\text{s}) = 0.0032 \times \text{Saída R} + 0.0547; R^2=1 \quad \text{Equação 4}$$

$$PAR_G (\mu\text{mol fóton} / \text{m}^2.\text{s}) = 0.0033 \times \text{Saída G} - 0.0379; R^2=1 \quad \text{Equação 5}$$

$$PAR_B (\mu\text{mol fóton} / \text{m}^2.\text{s}) = 0.0032 \times \text{Saída B} + 0.2259; R^2=1 \quad \text{Equação 6}$$

$$PAR_{RGB} (\mu\text{mol fóton} / \text{m}^2.\text{s}) = 0.0032 \times \text{Saída RGB} + 0.2379; R^2=1 \quad \text{Equação 7}$$

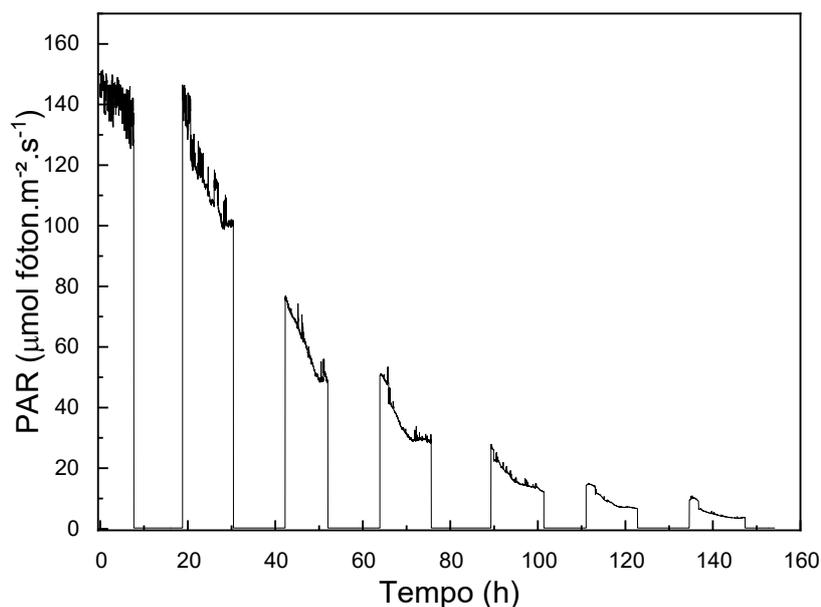
Licor. Analisando a Figura 20, podemos observar valores de PAR_{RGB} que correspondem à soma de PAR_R , PAR_G e PAR_B . Podemos extrair informações muito importantes desse fenômeno: qual comprimento de onda fotossinteticamente ativo está sendo mais ou menos absorvido pelo microrganismo. Esta informação não é fornecida pelo sensor comercial Licor.

4.1.4.4 Avaliação do sensor em processo biológico

Para validação em bioprocessos, o sensor de baixo custo proposto foi utilizado em um cultivo real. Para o cultivo de microalgas fotoautotróficas em fotobiorreatores, é desejável que a luz seja avaliada em tempo real, pois é um dos fatores limitantes do seu crescimento (YOSHIMURA; OKADA; HONDA, 2013). Apesar de sua importância, isso raramente é realizado pelos sensores disponíveis no mercado. A Figura 21 apresenta os valores de PAR calculados usando os dados online do sensor TCS34725 e as equações 4 a 7, em cultivo de *Scenedesmus obliquus*. Analisando a Figura 21, é possível observar uma tendência decrescente da intensidade da luz que passa pelo fotobiorreator, atenuação da luz causada pelo autosombreamento da alta densidade populacional. Este é um problema muito relevante relatado por vários autores como Tebbani et al. (2014) como fator limitante para o crescimento, sendo então um resultado esperado.

Figura 21: Medições de PAR usando o sensor de baixo custo durante o cultivo de *Scenedesmus obliquus* em um fotobiorreator.

Fonte: Do autor (2021)



Como esperado, o aumento da concentração celular que ocorreu ao longo do tempo ($1,15 \cdot 10^5$ células/mL no primeiro dia para $2,26 \cdot 10^6$ células/mL no último dia após 155 horas) e a absorção das células da radiação fotossinteticamente ativa para a fotossíntese, resultou no conhecido efeito de auto-sombreamento. Isso foi detectado pela diminuição da intensidade da luz que passou pelo fotobiorreator e também pela diminuição da velocidade de crescimento populacional. Esta informação pode ser utilizada em sistemas de controle automático usando os

dados do sensor aqui estabelecidos, e para manter um valor controlado otimizado pode ser implementada uma correção na potência de luz fornecida. Um pequeno aumento no PAR também é observado na Figura 21, seguido de uma diminuição logo após o início de cada período de luz. Este fenômeno está relacionado ao assentamento das células durante o período escuro, quando não há borbulhamento. Isso foi confirmado por observação visual na parte inferior do fotobiorreator (dados não mostrados). Outra observação que pode ser feita a partir da Figura 21 é em relação ao período de operação do sistema, acima de cem horas, o que torna a tecnologia proposta aplicável a microalgas ou outros processos que exijam medição on-line de intensidade luminosa por períodos tão prolongados.

O atual sistema proposto para bioprocessos difere dos sensores renomados no mercado pela praticidade da aquisição de dados em tempo real, através de uma plataforma que combina utilidade, disponibilidade e custo. Além disso, este sistema abre horizontes no campo do controle de bioprocessos, uma vez que a medição manual normalmente utilizada nos sensores disponíveis no mercado não apresenta integração trivial com sistemas de controle automático de luz, diferente do sensor apresentado neste trabalho, que pode fornecer dados ao sistema de correção de intensidade de luz, além de contribuir para a otimização do crescimento de microalgas ou a produção de qualquer metabólito de interesse, uma vez que utiliza hardware e software livre.

4.1.5 Conclusão

O sistema de inferência PAR desenvolvido por este trabalho apresentou excelentes resultados quando comparado ao sistema comercial, com correlações lineares quadráticas acima de 0,999, estabilidade de mais de 140 horas de uso contínuo em medições online e com custo estimado de implantação na ordem de US\$ 50, aproximadamente 10 vezes menor que o custo dos sensores tradicionais. Além de oferecer dados de intensidade luminosa em tempo real durante os processos de produção de microalgas, este sistema permite que o controle lógico seja facilmente implementado, pois um único controlador Arduino também pode manipular a intensidade luminosa emitida por meio de um painel controlável. Outra vantagem deste sistema é a facilidade de acesso aos dados, por meio de software livre do próprio Arduino, que permite a integração quase automática com outro software como o LabVIEW, amplamente utilizado para implementação de programas de controle industrial.

CAPÍTULO 5- DESENVOLVIMENTO DE “SOFTWARE” PARA MONITORAMENTO E CONTROLE DE FOTOBIORREATOR

Neste capítulo será abordada de maneira simplista o desenvolvimento de um software implementado em LABview responsável por monitorar variáveis do processo e controlar a luz automaticamente, já que este está protegido. O “*software*” gerou um registro de programa de computador no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, tendo como número de processo: BR 512021002065 e nome SUPERSYS_Photo, seu certificado está apresentado pela Figura 22.

Figura 22: Certificado de registro de programa de computador
Fonte: Do autor (2021).



The image shows a certificate from the Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) of Brazil. It features the national coat of arms at the top center, a barcode on the right, and the INPI logo. The text is in Portuguese and provides details for the registration of a computer program named 'SUPERSYS Photo'. The certificate includes the process number BR512021002065-0, the creation date of 01/08/2017, the holder 'FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS', and the authors 'ANTONIO CARLOS LUPERNI HORTA; VANESSA CAMPOS GUEDES'. It also lists the application field (AG-12, BL-07, BT-01, FQ-12, IN-02), program type (AT-01, AT-06, GI-01, GI-06, SO-07), and the digital hash algorithm (SHA-512). A large watermark of the Brazilian coat of arms is visible in the background. At the bottom, it is signed by Carlos Alexandre Fernandes Silva, Chief of the DIPTO.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512021002065-0**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 01/08/2017, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: SUPERSYS Photo

Data de criação: 01/08/2017

Títular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Autor(es): ANTONIO CARLOS LUPERNI HORTA; VANESSA CAMPOS GUEDES

Linguagem: LABVIEW

Campo de aplicação: AG-12; BL-07; BT-01; FQ-12; IN-02

Tipo de programa: AT-01; AT-06; GI-01; GI-06; SO-07

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:
18a9077828d172513b964dd7832b9891ac32f855694df4dc351472be7c819388672b9ba57f1b73bba3a57668ac9862f08d
d9f831702d9c15696269656fb91a47

Expedido em: 31/08/2021

Aprovado por:
Carlos Alexandre Fernandes Silva
Chefe da DIPTO

5.1 INTRODUÇÃO

A indústria biotecnológica no passado era constituída majoritariamente por práticas artesanais, contudo os avanços da pesquisa e desenvolvimento desse setor proporcionaram e proporcionam cada vez mais tecnologia, permitindo que novos bioprocessos sejam viabilizados e que antigos sejam otimizados.

A maior parte das práticas biotecnológicas implicam no cultivo de microrganismos, que por sua vez possuem necessidades específicas para seu desenvolvimento como pH, oxigênio dissolvido, composição nutricional, temperatura, pressão, dentre outros. Devendo, portanto, os cultivos serem conduzidos dentro de uma faixa ótima desses valores, visando a um crescimento saudável que garantirá valores altos de produtividade. Ficando completamente explícito a importância de manter as variáveis dos bioprocessos nos valores estabelecidos durante todo o período de cultivo, pois qualquer variação ambiental ou nutricional pode ocasionar diminuição da produtividade ou até mesmo a morte dos microrganismos e com isso condições não lucrativas. Portanto monitorar as variáveis dos bioprocessos para então controlá-las, proporcionam um ambiente ideal para as culturas se desenvolverem o que otimiza a produção, como também aumenta a replicabilidade do seu produto final (FREITAS; ANDRADE, 2016).

Em tese, entender o que ocorre durante o bioprocessos é o passo primordial para a melhoria, sendo as ferramentas de monitoramento vitais nesta etapa. O monitoramento intensivo de quantas variáveis forem possíveis agrega muito valor à implementação de controladores, que utilizam essas informações para tomarem ações corretivas que manterão o ambiente de cultivo o mais próximo do ideal possível. Mas tudo o que foi dito anteriormente só é possível com a utilização de sensores, que fornecem dados na velocidade de aquisição necessária, ou seja, para microrganismos com velocidade de crescimento baixa, aquisição a cada hora é interessante, para as células que crescem de maneira mais rápida a aquisição a cada minuto pode ser adequada (GLINDKAMP et al., 2009). Contudo muitos são os trabalhos que indicam as vantagens de um monitoramento on-line das variáveis do processo (DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, 2013; GLINDKAMP et al., 2009; HARMS; KOSTOV; RAO, 2002; HAVLIK et al., 2013; VOJINOVIĆ; CABRAL; FONSECA, 2006)

As tecnologias de sensoriamento espectroscópicas e óticas por não serem invasivas e carregarem muitas informações, em relação aos outros sensores, vem ganhando destaque nos bioprocessos (JENZSCH et al., 2006). E por este motivo foram selecionadas para fornecerem informações sobre a produção de microalgas neste estudo. Além também de fornecerem valores de suma importância para os processos fotossintéticos fotoautotróficos, que possuem como variável crítica a luz (HAVLIK et al., 2013).

As amostragens dos sensores estão divididas em duas categorias a online que é quando essas amostragens e análises são automáticas, ou seja, sem o conceito manual dessas tarefas e

offline quando o contrário é válido. Os sensores também podem ser classificados em físicos (temperatura, pressão, velocidade de agitação...), químicos (pH, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono dissolvido...) e também como “softsensors” que pela definição é um sensor associado a um algoritmo de estimativa que resulta em uma medida de interesse (FREITAS; ANDRADE, 2016).

Dessa forma os sistemas responsáveis por receberem as informações dos sensores, supervisionarem os bioprocessos e controlá-los são uma ferramenta indispensável para os bioprocessos, sendo o objetivo central deste capítulo que apresenta o desenvolvimento do software Supersys_PHOTO® responsável pelo monitoramento e controle das variáveis mais importantes do fotobiorreator utilizado durante esta tese.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Aquisição dos dados

O Supersys_PHOTO® recebe os dados enviados através de uma “string” que constitui dados de três sensores de luz diferentes: LDR, BH1750 e TCS34725 e de três sensores de temperatura DS18B20, advindos de um Arduino Mega. O programa de computador desmembra essa “string” e analisa separadamente os dados recebidos, efetuando antes do processamento destes dados um filtro de média móvel responsável por suavizar os ruídos e dissolver erros de aquisição, como por exemplo um valor zero de luz, durante o período claro, completamente discrepante do valor anterior recebido.

5.2.2 Comunicação com o “hardware”

A comunicação entre o Arduino que fornece valores dos sensores com o software é dada através da comunicação Ethernet através do bloco de programação que traz a função “TCP read”, portanto é indispensável a indexação do endereço de IP configurado previamente no Arduino e da taxa de comunicação.

5.2.3 Suplemento gasoso

O programa permite ao usuário adicionar duas vazões de gases ao cultivo (ar e/ou dióxido de carbono), manipulando controladores de fluxo de massa, modelo: GFC da marca Aalborg para esta função, através de sinais de corrente que correspondem a variação do fluxo gasoso dentro da faixa de valores de 1 a 5 L/min. O Supersys_PHOTO® desempenha essa função quando o usuário seleciona na tela inicial de configuração quais são os gases que serão suplementados ao fotobiorreator e em qual vazão, o que ativa a subVI responsável por essa tarefa, que contém em seu interior estruturas como leitura e escrita, responsáveis pelo envio e recebimento de dados para

a CompactDAQ onde os GFC estão conectados. Ela é uma plataforma de aquisição de dados da National Instruments, que possui diferentes módulos, sendo um destes um módulo analógico que envia os sinais elétricos para os controladores de fluxo de massa, que por sua vez controlam considerando essas premissas a vazão de gás oferecida aos cultivos.

5.2.4 Fotoperíodo

Os fotoperíodos são abordados pelo Supersys_PHOTO® através de um bloco de programação intitulado “*Elapsed Time*” que é iniciado sempre que o botão “Iniciar tempo claro” é ativado, o que permite uma certa flexibilidade para as ações adversas aos cultivos. Os períodos em horas, para quando existe luz e para os momentos de ausência, é estabelecido pelo usuário, através da entrada de uma variável numérica que é processada e comanda o “*Elapsed Time*”.

5.2.5 Set points de luz

Os set points da radiação fotossinteticamente ativa declarados pelo usuário para o painel de interesse em função dos quatro comprimentos de onda permitidos: vermelho, verde, azul e branco, são processados pelo software que os transformam em uma única “*string*”, enviada ao Arduino Mega apto a recebê-la neste formato, através da comunicação Ethernet já discutida anteriormente, contudo agora utilizando o bloco “*TCP write*”. Os primeiros caracteres indicam quais painéis serão utilizados e assim controlados, se apenas um estará em funcionamento ou se nenhum deles estará ligado, funcionalidade também utilizada pelo “*Elapsed Time*” para desligar/ligar a luz quando o fotoperíodo é completado.

5.2.6 Tela de monitoramento

Os dados podem ser visualizados em tempo real, através da guia de visualizações, onde o usuário seleciona os dados que deseja acompanhar, enviando comandos ao programa de computador para executar o gráfico de monitoramento daquela variável em tempo real. Utilizando para tanto as variáveis convertidas em numéricas, após o desmembramento da “*string*” enviada pelo Arduino com os valores dos sensores e que foi recebida pelo Supersys_PHOTO®, elas são organizadas em uma estrutura chamada “*Array*”.

5.2.7 Salvamento de dados

O Supersys_PHOTO®, permite salvar todas as informações obtidas durante o cultivo, como todas as medidas de luz, de temperatura, de vazão de gás e do fotoperíodo, através da estrutura “*bundle*” que agrupa todas as informações em “*clusters*”, que serão direcionados às colunas devidamente nomeadas para receber essas informações. Outro bloco de programação

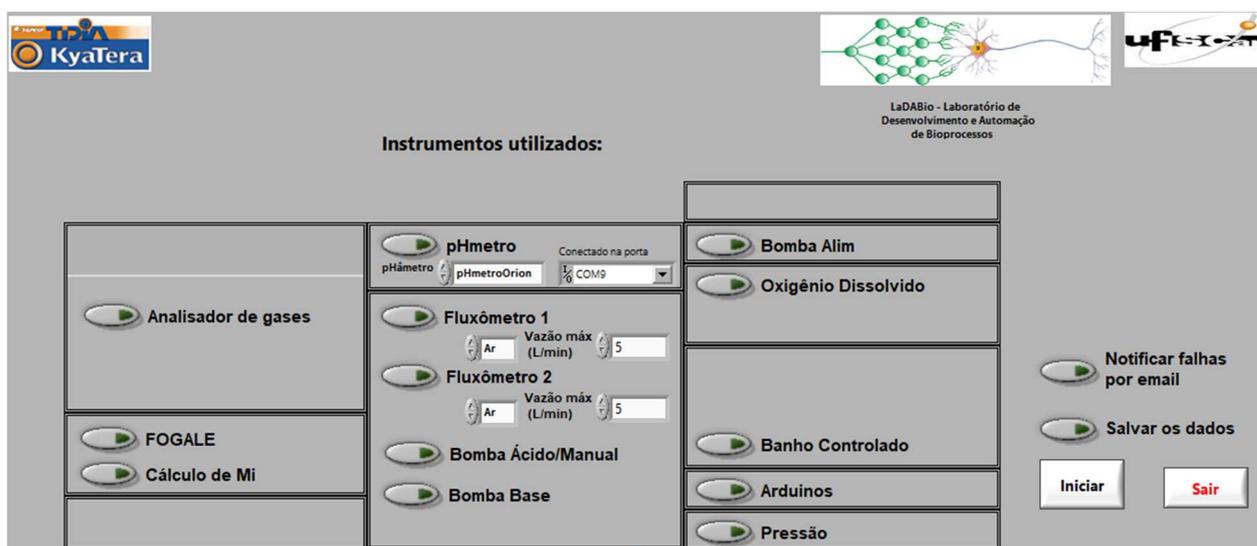
utilizado é o “Write to text file”, junto com estruturas de tempo que finalizam o salvamento dos dados no disco rígido do computador.

O tempo de salvamento é definido pelo usuário na tela inicial de configuração, onde todas as funções que estarão ativas durante a utilização do software são acionadas, permitindo neste âmbito então que o usuário indique qual a frequência do salvamento, se será a cada segundo, minuto ou horas, e qual o local de destino do arquivo de dados.

5.3 RESULTADOS

O único resultado previsto para este capítulo é o funcionamento do Supersys_PHOTO® com todas as suas funcionalidades, o que implica em um monitoramento completo do cultivo de microalgas fotoautotróficas e o controle de sua variável mais importante a luz. Considerando essas premissas podemos visualizar a tela inicial do software (Figura 23) responsável por fazer as configurações de quais instrumentos serão utilizados durante o cultivo, como também indicar se o salvamento dos dados será requerido, e em caso afirmativo, qual o endereço de destino do arquivo de dados e da frequência do salvamento, além de permitir a seleção do gás utilizado nos fluxômetros e suas vazões máximas.

Figura 23: Tela inicial do Supersys_PHOTO®
Fonte: Do autor (2021)



Assim que o software é iniciado duas são as opções de janelas para o usuário, sendo a primeira delas mais voltada para a visualização dos dados (Figura 24) e a segunda para configuração dos parâmetros do cultivo (Figura 25).

Figura 24: Tela de visualização dos parâmetros do cultivo em tempo real.
 Fonte: Do autor (2021)

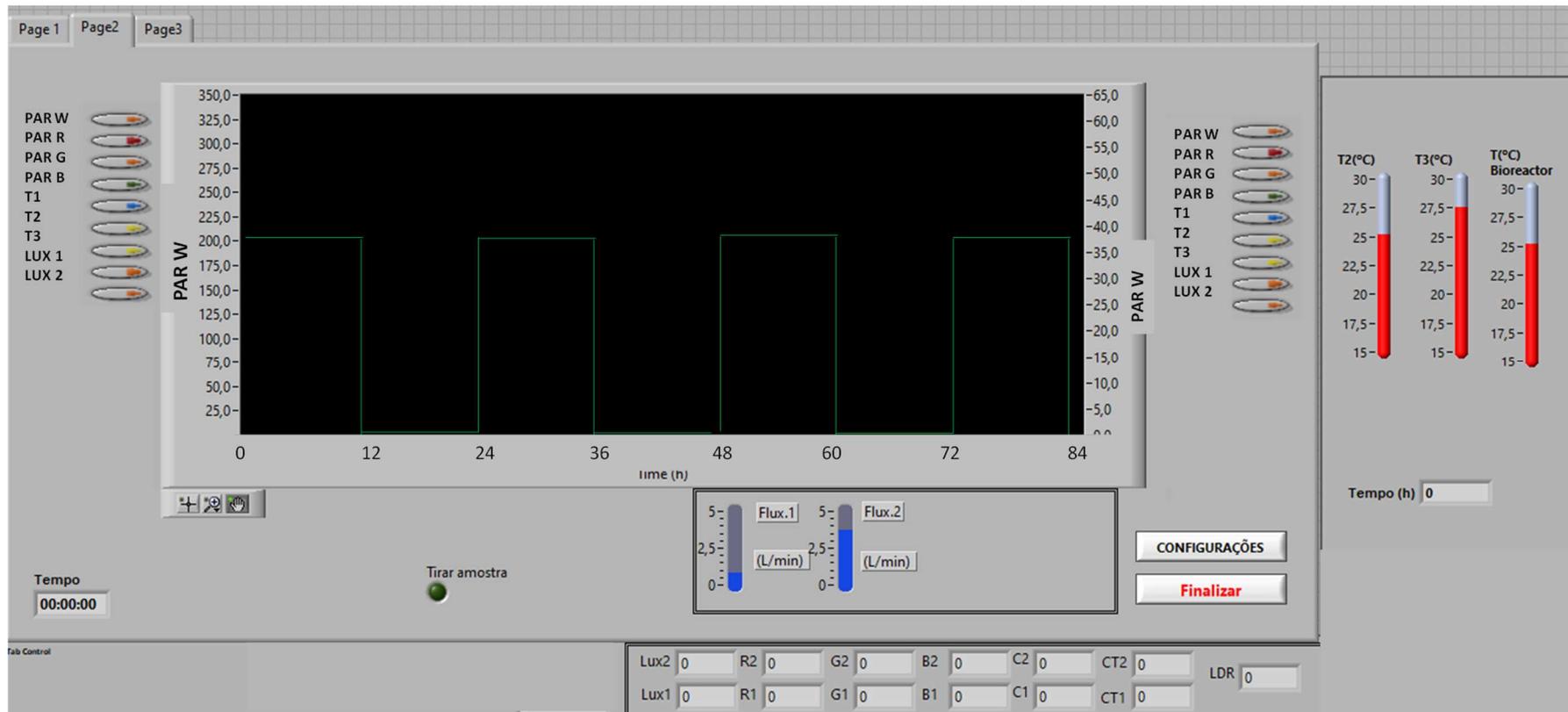
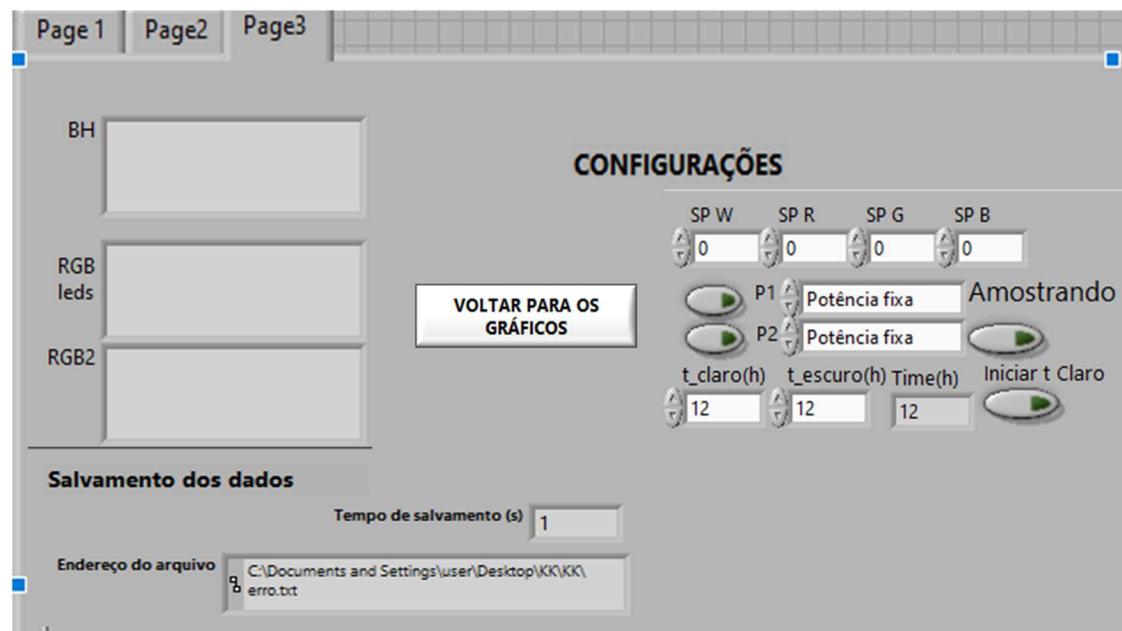


Figura 25: Terceira guia do programa, onde o usuário pode manipular o set point de luz do fotobiorreator, visualizar as “strings” enviadas e recebidas de dados e o endereço de salvamento do arquivo de dados.

Fonte: Do autor (2021)



A Figura 24 representa um monitoramento real durante um cultivo, plotando valores da radiação fotossinteticamente ativa sentida pelos sensores emitida pelo painel com comprimento de onda branco. Dessa forma ao finalizar o cultivo, temos um arquivo de dados, contendo todos os valores a cada minuto, durante os 7 dias de processo. Permitindo que esses dados possam ser utilizados também para modelar o processo, além de alimentar o controlador policromático de luz desenvolvido neste estudo.

5.4 CONCLUSÕES

Essa ferramenta de monitoramento e controle desenvolvida para ser utilizada junto ao fotobiorreator durante os processos de produção de microalgas, se fez primordial pois através dela os dados de todos os sensores a cada minuto de cultivo foram salvos, além de alimentarem o controlador policromático, que teve toda a sua inteligência implementada em Arduino, também permitiu que o usuário utilize essas informações para desenvolvimento de outras ferramentas que possam enriquecer o processo de produção, um exemplo disso é o treinamento de redes neurais que possam inferir a concentração celular de forma online durante esses cultivos. Tarefa que está sendo desenvolvida por outros pesquisadores no Laboratório de desenvolvimento e automação de bioprocessos (LADABIO2) da Universidade Federal de São Carlos. Portanto todos os dados de luz apresentados nesta tese, são advindos dos arquivos fornecido pelo Supersys_PHOTO® como também os principais resultados de otimização de produtividade, que só foram possíveis graças a utilização desta nova ferramenta.

CAPÍTULO 6- CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA QUALIDADE DA LUZ SOBRE A *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

Como visto na Seção 2 desta tese, a composição bioquímica das microalgas pode ser manipulada através do comprimento de onda disponível para as células durante o processo de cultivo. E por este motivo o presente capítulo apresenta a caracterização da composição bioquímica da espécie *Scenedesmus obliquus* quando submetida a cultivos em diferentes comprimentos de onda (Figura 26), a fim de preencher a lacuna de conhecimento sobre a dinâmica dessa espécie em função da qualidade da luz absorvida.

Figura 26: Aparato experimental utilizado durante os cultivos de caracterização dos efeitos de diferentes comprimentos de onda sob o crescimento de Scenedesmus obliquus.
Fonte: Do autor (2021)



6.1 EFEITOS DA QUALIDADE DA LUZ NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

6.1.1 Introdução

As microalgas fotoautotróficas dependem da luz para realizar a fotossíntese, que é um processo de transformação da energia luminosa em energia bioquímica utilizada pela célula para crescer e sobreviver (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; FALKOWSKI; RAVEN, 2007). A energia luminosa oferecida às microalgas possui dois fatores muito importantes que atuam no desenvolvimento do microrganismo, a intensidade e a qualidade do comprimento de onda.

A intensidade de luz oferecida as microalgas, refere-se ao fluxo de fótons em uma determinada área em um determinado intervalo de tempo. Essa variável pode limitar o crescimento das microalgas caso seu valor não seja suficiente, bem como fotoinibir esse

crescimento em caso de valores excessivos (QIANG; ZARMI; RICHMOND, 1998). No entanto, o uso da intensidade da luz excessiva ou inferior à ideal pode ser importante nos processos de otimização de produtos microalgais. Valores de luz indesejados causam estresse celular e acabam por desencadear mecanismos de defesa das microalgas, que podem aumentar a produção de um composto bioquímico, ou até mesmo modificar os parâmetros fisiológicos, alterações que podem ser de interesse para a indústria de biotecnologia (IASIMONE et al., 2018; PATEL et al., 2019; WHITTON et al., 2019).

A produção de um bioproduto específico de uma espécie de microalga pode ser aumentada levando em consideração não só a intensidade da luz, mas também a qualidade desta luz oferecida à cultura (comprimento de onda irradiado). De acordo com vários estudos, ao modificar o comprimento de onda durante o cultivo, o comportamento bioquímico da espécie também muda (DENIZ et al., 2019; HAN et al., 2019; JUNG et al., 2019; STEVČIĆ; PULKKINEN; PIRHONEN, 2019). Considerando que manipular a cor da luz em culturas é uma tarefa simples, exigindo apenas mudanças físicas no aparato experimental que irradia a energia, essa abordagem torna-se atrativa para bioprocessos, pois seu retorno tende a ser promissor. No entanto, para que a otimização de um determinado bioproduto microalgal seja eficiente pela manipulação da qualidade da luz, a composição bioquímica da espécie deve ser estudada em relação a diferentes cores de luz, para que sejam conhecidas quaisquer alterações em relação as diferentes cores. Portanto este estudo teve como princípio investigar a composição bioquímica do *Scenedesmus obliquus* quando submetida à luz azul, vermelha e branca, e a uma mistura de luzes (vermelha e azul).

6.1.2 Materiais e métodos

6.1.2.1 Condições de crescimento

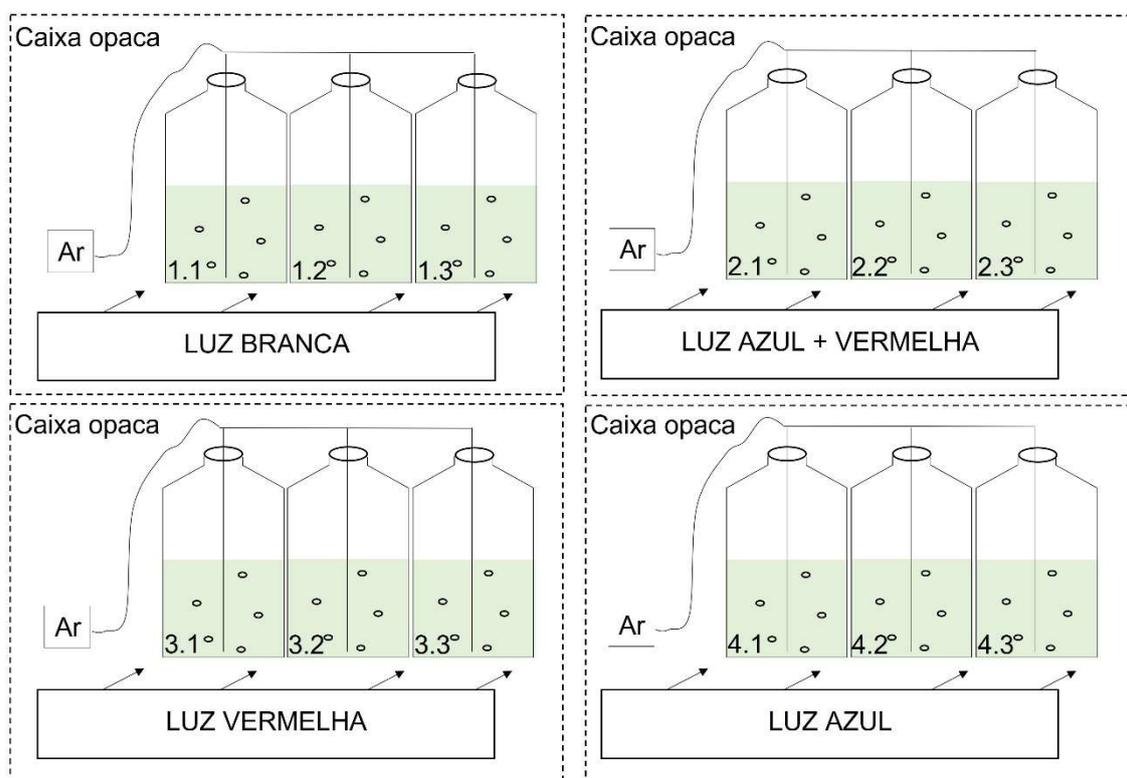
A espécie utilizada foi a *Scenedesmus obliquus* que foi cultivada em frascos de cultura de tecidos. O meio de cultura utilizado foi o BG-11 (RIPPKA et al., 1979) e 600 mL foi volume final da cultura. A concentração celular inicial era de 10^5 cel.mL⁻¹. Foram realizados quatro tratamentos, o primeiro consistiu na exposição das células à luz branca, o segundo a uma mistura de luz vermelha e luz azul, o terceiro utilizou luz vermelha e o quarto à luz azul. Os tratamentos foram dados em triplicata e foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12/12h e a intensidade de luz para cada um deles foi inicialmente ajustada para 200 $\mu\text{mol f\u00f3ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ar foi injetado nas culturas por borbulhamento durante todo o período de cultivo, sem interrupção. E as culturas foram isoladas da interferência da luz externa através de caixas opacas como mostra a Figura 27.

As culturas foram mantidas a temperatura de 24°C e intensidade de 200 $\mu\text{mol f\u00f3ton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Todos os materiais utilizados, incluindo o meio de cultura, foram esterilizados em autoclave

por 20 minutos, à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm. Toda a manipulação da cultura (inoculação e amostragem) foi feita em cabine de fluxo laminar para manter a cultura asséptica.

Os experimentos foram monitorados diariamente quanto à concentração celular, viabilidade celular, concentração de clorofila a e rendimento quântico fotossintético máximo. No terceiro dia de cultivo (fase exponencial), foram coletadas amostras para análises bioquímicas: carboidratos, proteínas, carotenoides e parâmetros fotossintéticos.

Figura 27: Aparato experimental utilizado durante o cultivo de *Scenedemus obliquus* em quatro diferentes comprimentos de onda: branco, azul e vermelho, vermelho e azul.
Fonte: Do autor (2021).



A densidade óptica foi analisada diariamente em um comprimento de onda de 684 nm que indica crescimento de microalgas (LEDUY; THERIEN, 1977), utilizando um espectrofotômetro (Femto 800 XI, Brasil). As células foram quantificadas usando uma câmara de contagem de células (Fuchs-Rosenthal) sob microscópio óptico (Nikon Eclipse modelo E200, Japão). A clorofila a foi determinada por fluorescência “in vivo” (Turner Designs, Trilogy, EUA). Para isso, uma curva de calibração foi construída plotando a concentração de clorofila a extraída de células de *Chlorella vulgaris* em crescimento exponencial (SHOAF; LIUM, 1976) contra a fluorescência de clorofila a “in vivo” (Chl a; $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A seção linear desta curva foi ajustada por regressão linear e usada para calcular a concentração de clorofila a. A viabilidade celular foi analisada usando um Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, EUA). A viabilidade foi expressa

como porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células analisadas por citometria.

As taxas de crescimento foram determinadas por regressão linear do logaritmo natural da densidade celular versus tempo (dias) e concentração de clorofila versus tempo (dias) para a fase de crescimento exponencial, com a inclinação correspondente à taxa de crescimento específica máxima (μ_{max}).

6.1.2.2 Análises fotossintéticas

A avaliação dos parâmetros fotossintéticos incluiu medidas adquiridas usando um fluorímetro de amplitude modulada (PHYTO-PAM, Heinz Walz GmbH, Alemanha) à temperatura ambiente, onde os cinco níveis fundamentais de fluorescência são obtidos a partir da fluorometria PAM (F_m , F'_m , F_s , F_0 e F'_0).

Antes das medições, todas as amostras foram adaptadas ao escuro por 20 minutos. A luz modulada de baixa intensidade foi de $1 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e forneceu uma medida da fluorescência constante inicial (F_0) da microalga (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002). O pulso saturante foi de 0,2 s; $2000 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e registrou a fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro (F_m). Com esses dois parâmetros foi calculado o rendimento quântico máximo (ϕ_M), de acordo com a Equação 8.

$$\phi_M = \frac{F_M - F_0}{F_M} \quad \text{Equação 8}$$

A condição operacional da *Scenedesmus obliquus* foi avaliada durante a fase de crescimento exponencial. A luz actínica foi de $130 \mu\text{mol fóton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o que garante fluorescência de estado estacionário (F_s), por novos pulsos de saturação, a cada 40 segundos por 20 minutos, registrou a fluorescência máxima em células adaptadas à luz (F'_m). A partir desses parâmetros, o rendimento quântico operacional (ϕ'_M) foi obtido pela Equação 9.

$$\phi'_M = \frac{F'_M - F_s}{F'_M} \quad \text{Equação 9}$$

A partir da Equação 10, proposta por Oxborough e Baker (1997), foi calculada a fluorescência mínima das células adaptadas à luz (F'_0).

$$F'_0 = \frac{F_0}{\frac{F_V}{F_M} + \frac{F_0}{F'_M}} \quad \text{Equação 10}$$

Os valores estimados para os dois tipos de *quenching* segundo Juneau, El Berdey e Popovic (2002), foram calculados a partir dos parâmetros de adaptação ao escuro e à luz. O *quenching* fotoquímico (qP), calculado pela Equação 11, indica a fração de energia luminosa destinada à fase fotoquímica. O *quenching* NPQ, calculado pela Equação 12, descreve a dissipação de energia, principalmente por calor, mecanismo utilizado como defesa contra excesso de luz e danos oxidativos (FRANCO et al., 2012; MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001).

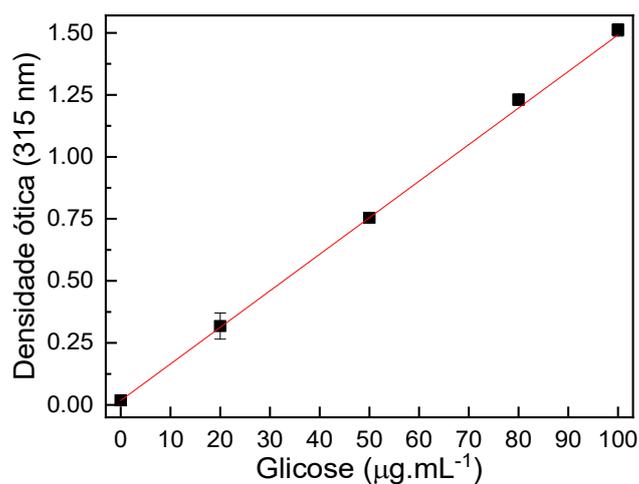
$$qP = \frac{F'_M - F_S}{F'_M - F'_0} \quad \text{Equação 11}$$

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} \quad \text{Equação 12}$$

6.1.2.3 Análises bioquímicas

A determinação dos carboidratos totais seguiu o método de Albalasmeh et al. (2013) e a curva padrão (Figura 28) foi baseada em solução de glicose (1 mg.mL^{-1}); os parâmetros do ajuste linear estão descritos na Equação 13, que teve um coeficiente de correlação 0,999. Para esta determinação foram utilizadas amostras de 10 mL coletadas durante a fase exponencial, estas foram centrifugadas (4400 rpm, 20°C , 15 min) e o pellet mantido a -22°C até a análise.

Figura 28: Curva padrão construída através de dados de concentração de carboidrato e absorvância lida em 315 nm.
Fonte: Do autor (2021).

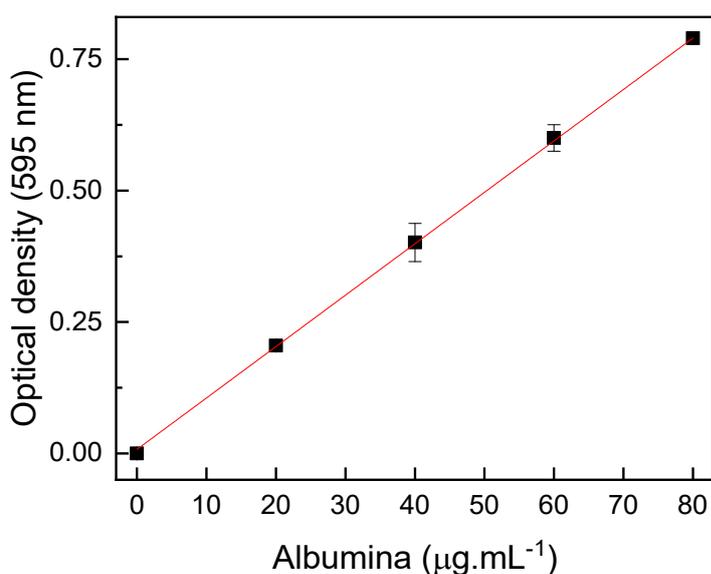


$$\text{Glicose } (\mu\text{g/mL}) = 0,015 \cdot DO(315 \text{ nm}) - 0,002 \quad \text{Equação 13}$$

A quantificação da proteína das microalgas foi feita de acordo com Bradford (1976) com albumina bovina (BSA; 1 mg.mL⁻¹) utilizada como padrão. Os parâmetros do ajuste linear da curva padrão (Figura 29) estão descritos na Equação 14, que teve um coeficiente de correlação de 0,999. Para determinação de proteínas, 50 mL de amostra da cultura em crescimento exponencial foram centrifugados (4400 rpm, 20°C, 15 min) e o pellet reservado (-22°C) para análise.

Figura 29: Curva padrão construída através de dados de concentração de proteinase m relação a absorbância lida em 595 nm.

Fonte: Do autor (2021)



$$Proteína (\mu g/mL) = 0.0099 \times DO(595 \text{ nm}) + 0.0125 \quad \text{Equação 14}$$

Carotenoides totais e clorofilas foram determinados de acordo com Wellburn (1994) em 3 mL de cultura em crescimento exponencial. A clorofila total foi determinada como em Shoaf and Lium (1976) com DMSO, e as concentrações foram calculadas seguindo a equação proposta por Jeffrey and Humphrey (1975) usando leituras de espectrofotômetro 665, 649 e 480 nm

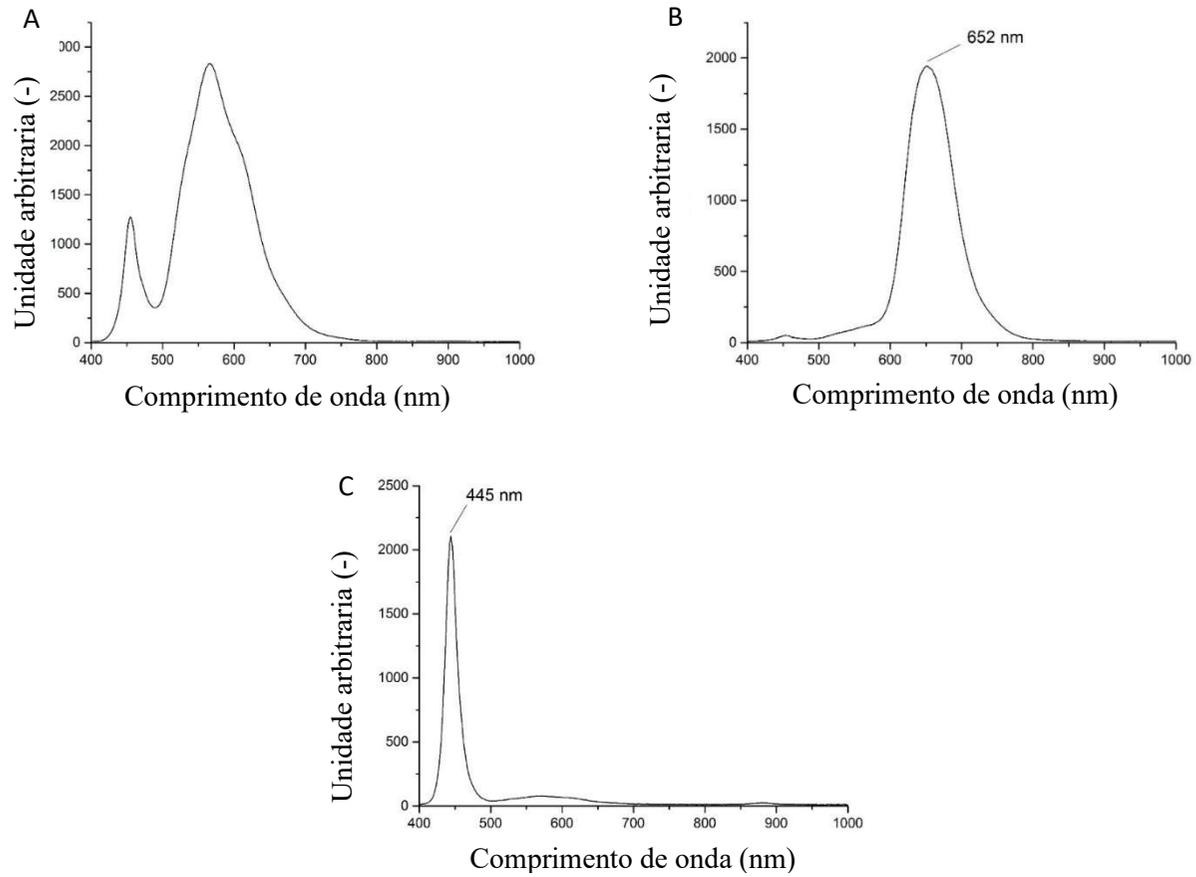
6.1.2.4 Análises estatísticas

Todas as comparações feitas neste estudo foram baseadas na ANOVA de fator único ($\alpha=5\%$), para indicar diferença estatisticamente significativa entre as amostras comparadas dos quatro tratamentos. As comparações indicadas pela ANOVA como estatisticamente diferentes foram submetidas ao teste de Tukey. O software utilizado foi o Excel.

6.1.2.5 Composição espectral

Os painéis utilizados tiveram sua composição espectral determinada por um radiômetro da marca StellarNet Inc, modelo Fiber Optic Spectrometer. A análise da qualidade da luz emitida pelos painéis é fundamental nesse tipo de investigação bioquímica, pois são esses dados que garantirão comparações precisas do comportamento das microalgas. No entanto, o espectro de emissão muitas vezes não é descrito na literatura, impedindo comparações entre os resultados publicados e os encontrados pelos pesquisadores. Assim, este trabalho declara a composição dos espectros emitidos pelos painéis utilizados na Figure 30.

Figure 30: Espectro de emissão dos três tipos de LEDs utilizados no painel: A) branco; B) Vermelho e C) Azul.
Fonte: Do autor (2021)



6.1.3 Resultados e discussões

O acompanhamento do crescimento da *Scenedesmus obliquus* quando submetida às diferentes cores de luz é apresentado pela Figura 31A em função dos dados de absorbância e pela Figura 31B em relação aos dados de concentração de clorofila a para todos os períodos de cultivo.

As taxas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) dos diferentes tratamentos foram obtidas ajustando linearmente os dados durante a fase exponencial, configuradas do dia 0 ao dia 2 (identificadas visualmente pelas curvas na Figura 31), e são mostradas na Tabela 7, para ajustes que utilizaram os dados de absorbância e de concentração de clorofila a.

Figura 31: Curva de crescimento para cada tratamento (Branco, Azul, Vermelho e Mix de Vermelho e Azul) em função da absorbância (A) e da concentração de clorofila a (B) durante o cultivo.
Fonte: Do autor (2021).

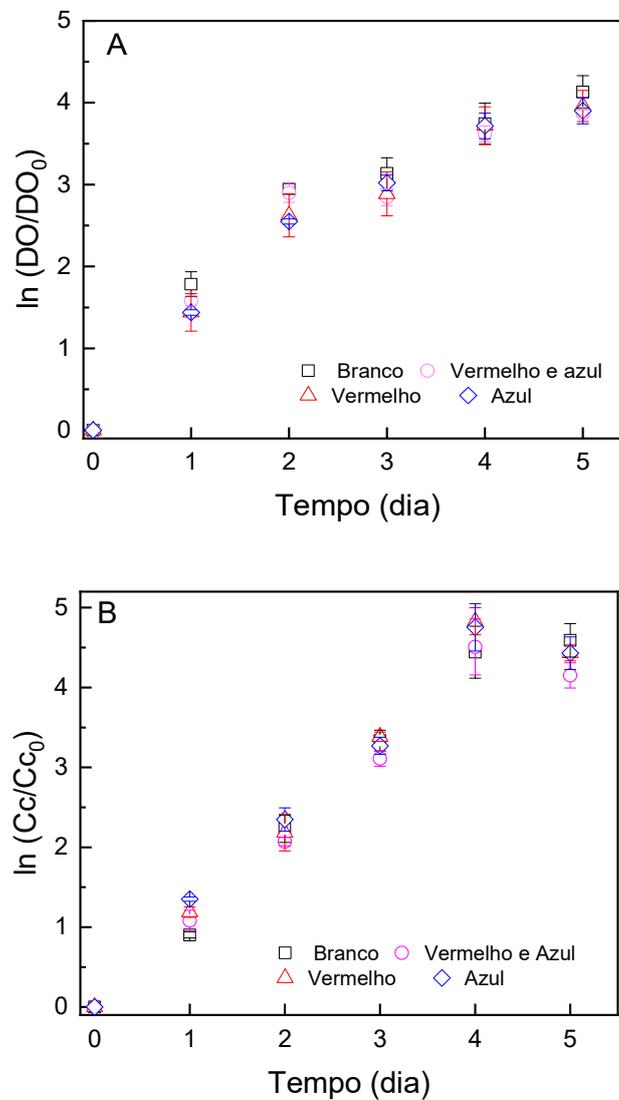


Tabela 7: Taxa de crescimento máxima calculada para os diferentes regimes de qualidade de luz emitida para a espécie com base em dados de absorvância (densidade óptica 684 nm) e dados de concentração de clorofila a.

Qualidade da luz	Absorvância	Concentração de Clorofila a
	$\mu\text{máx (dia}^{-1}\text{)}$	$\mu\text{máx (dia}^{-1}\text{)}$
Branco	1,5 ($\pm 0,2$)	1,13 ($\pm 0,06$)
Vermelho e Azul	1,45 ($\pm 0,07$)	1,03 ($\pm 0,01$)
Vermelho	1,31 ($\pm 0,07$)	1,11 ($\pm 0,03$)
Azul	1,27 ($\pm 0,09$)	1,08 ($\pm 0,07$)

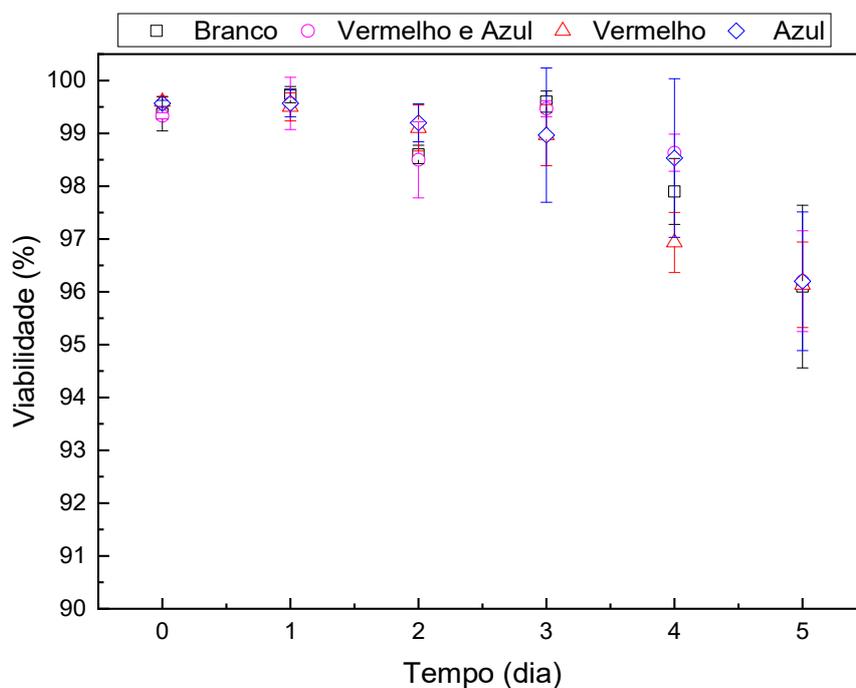
Fonte: Do autor (2021)

A velocidade máxima de crescimento, calculada através dos dados de absorvância nos diferentes tratamentos, não apresentou diferença estatisticamente significativa, exceto quando comparado o tratamento 1 com o 4. Neste caso, o $\mu\text{máx}$ das culturas em luz branca ($1,472 \text{ d}^{-1}$) foi de 15,52% superior à da luz azul (1.274 d^{-1}). Esse efeito pode ser explicado pela composição da luz branca, que contém picos em azul e vermelho, que são os principais comprimentos de onda absorvidos pela clorofila, principal pigmento fotossintético das clorófitas. As clorofilas possuem clorofila a (pico de absorção em 430 e 680 nm) e clorofila b (pico de absorção em 450 e 660 nm) (KEELING, 2013; TAKAICHI, 2011). Portanto o aumento de $\mu\text{máx}$ na luz branca pode estar associado à alta eficiência quântica das algas acima da luz vermelha (660-680 nm) (BLANKEN et al., 2013; PILON; BERBEROĞLU; KANDILIAN, 2011) que está presente no espectro de emissão dos LEDs brancos. Em relação ao $\mu\text{máx}$ obtido pelos dados de concentração de clorofila a, não foi obtida diferença significativa, implicando que a taxa máxima de crescimento não é alterada pelas qualidades de luz testadas. Isso está em desacordo com informações da literatura, como a do trabalho de Schulze et al. (2014), que estudaram os efeitos da qualidade da luz sobre *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis chuii*, e um de seus resultados mostra que a taxa de crescimento é afetada pela cor da luz. Outro estudo (FIGUEROA; AGUILERA; NIELL, 1995) relata que a maior taxa de crescimento observada em *Porphyra umbilicalis* foi detectada sob luz vermelha em comparação com luz azul. Para *Nannochloropsis* sp o maior nível de crescimento foi obtido sob luz azul (DAS et al., 2011). De acordo com Juneja et al. (2013) e Kommareddy e Anderson (2004) o efeito da qualidade da luz no crescimento de microalgas é específico para cada espécie devido a diferenças nas vias metabólicas, pigmentação e fotorreceptores.

Os dados de viabilidade celular obtidos suportam a ideia de que a qualidade da luz não interfere no crescimento da *Scenedemus obliquus* como visto na Figure 32. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as qualidades de luz e viabilidade celular. Esses resultados mostram que as células permaneceram saudáveis durante a fase exponencial em todos os comprimentos de onda testados, corroborando o fato de que os comprimentos emitidos são utilizados pela clorofila. No entanto, mesmo que esse não seja o comportamento obrigatório para outras espécies, a comparação dos resultados foi dificultada pela falta de estudos encontrados que

analisassem esse parâmetro. Assim, o presente estudo baseia-se nos parâmetros fotossintéticos que ainda serão discutidos para indicar que este era um resultado esperado, uma vez que a *Scenedesmus obliquus* não foi afetado fotossinteticamente pela qualidade da luz.

Figure 32- Comportamento da viabilidade celular durante o cultivo em diferentes tratamentos
Fonte: Do autor (2021).



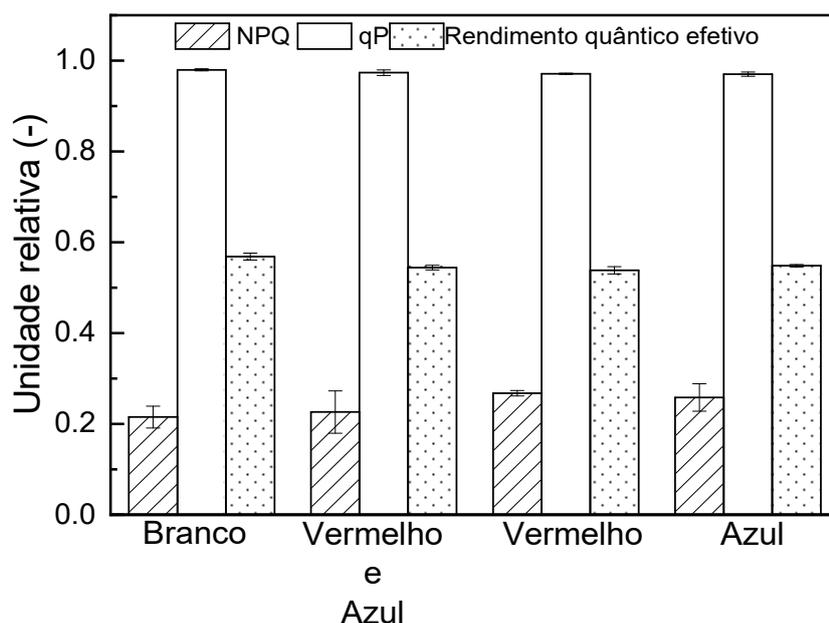
O rendimento quântico máximo do PSII (ϕ_M) não foi alterado pelas diferentes qualidades de luz neste estudo e durante todos os dias de cultivo foi obtido um perfil estável entre 0,74 a 0,76. De acordo com Masojídek et al. (2010) esse perfil corresponde ao de microalgas saudáveis, que varia de 0,6 a 0,8. O que concorda com Baba et al. (2012) que estudaram a *Botryococcus braunii* e também não encontraram alterações em ϕ_M com relação à luz vermelha, verde e azul. O estudo de Kamalanathan et al. (2019) testou os parâmetros fotossintéticos da *Scenedesmus* sp em função de seu crescimento (fotoautotrófia, mixotrófia e heterotrófia) e apresentou valores de ϕ_M para microalgas cultivadas fotoautotróficamente entre 0,68 e 0,73, aproximadamente a mesma faixa encontrada no presente trabalho. Assim, os resultados de ϕ'_M sugerem que o estado fisiológico do aparelho fotossintético era saudável (KRAUSE; WEIS, 1991; PARKHILL; MAILLET; CULLEN, 2001) e que não foi alterado por nenhum dos comprimentos de onda para em que a *Scenedesmus obliquus* foi exposta. No entanto, isso não significa que outro comportamento não possa ser encontrado em outras espécies, como no caso das diatomáceas que apresentaram redução de ϕ'_M na luz vermelha (VALLE et al., 2014).

A Figure 33 apresenta o quenching qP (fotoquímico) e o NPQ (não fotoquímico), bem como o rendimento quântico efetivo. As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas. Os resultados de qP permitem dizer que a energia luminosa estava sendo direcionada para a fotoquímica da fotossíntese em todas as qualidades de luz testadas, ou seja, o PSII estava convertendo a energia absorvida em energia bioquímica (KRAUSE; WEIS, 1991; MAXWELL; JOHNSON, 2000), não sendo prejudicados ou degradados como resultado dos tratamentos. Isso está de acordo com o comportamento obtido para *Botryococcus braunii*, onde o qP não foi afetado pela qualidade da luz utilizada (BABA et al., 2012). Uma das direções que a energia não enviada à via fotoquímica pode tomar é a dissipação de calor, que pode ser representada pelo NPQ (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). Segundo a literatura (ANDERSSON et al., 2006; IHNKEN; EGGERT; BEARDALL, 2010; LÓPEZ-CLIMENT et al., 2011) o NPQ é uma resposta ao estresse, uma via de autoproteção ao evitar o fluxo excessivo de elétrons para o PSI, reduzindo assim o potencial de fotoinibição (SONOIKE, 2011). Os presentes resultados não mostraram variação do NPQ em função da qualidade da luz em *Scenedesmus obliquus*, o que concorda com os resultados encontrados para *Botryococcus braunii* por Baba et al. (2012). Como as culturas desta pesquisa foram configuradas para ter a mesma intensidade de luz PAR, independentemente da cor da luz utilizada, elas não foram expostas a intensidades excessiva e nem a escassez de luz. Como os mecanismos de desencadeamento do NPQ dependem das características evolutivas das espécies de microalgas (GOSS; LEPETIT, 2015; IHNKEN; EGGERT; BEARDALL, 2010), apontamos que diferentes espécies de microalgas podem ter diferentes respostas à luz em comparação com a *Scenedesmus obliquus* do presente estudo. Semelhante ao qP e NPQ, nenhuma diferença foi obtida para o rendimento quântico efetivo de PSII (ϕ'_M) neste estudo. Assim, destacamos que a capacidade de mover elétrons além do PSII na cadeia de transporte em um determinado estado de adaptação à irradiância, determinado pelo coeficiente de rendimento quântico efetivo (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010), não sofre modificações na *Scenedesmus obliquus* em relação à qualidade das luzes testadas. Comportamento semelhante foi relatado por Baba et al. (2012), que indicou efeitos nulos no ϕ'_M em função das qualidades de luz testadas (vermelho, verde e azul) em *Botryococcus braunii*. Mercado et al. (2004) estudaram cinco espécies de diatomáceas e relataram que em três delas não foram detectadas alterações em ϕ'_M . Eles mostraram que *Nitzschia laevis* tinha o maior ϕ'_M , enquanto *Navicula* sp tinha seu ϕ'_M em valor 45% menor sob a luz azul em comparação com luz branca.

O comportamento dos parâmetros fotossintéticos aqui discutidos estão diretamente ligados à arquitetura celular de cada espécie de microalga, à composição dos pigmentos e ao arranjo do cloroplasto, pois essas características são responsáveis pela captura de fótons pela molécula de clorofila (SCHULZE et al., 2014)

A composição bioquímica da biomassa durante o crescimento celular exponencial é apresentada na Figure 34, mostrando que, embora não tenham sido observadas diferenças significativas para os parâmetros fotossintéticos e para as taxas de crescimento, a produção de biomoléculas foi afetada para as diferentes cores de luz. Uma maior concentração de proteínas foi observada em *S. obliquus* sob luz azul (ANOVA $p < 0,05$), mas para os carboidratos o contrário foi indicado.

Figure 33: Parâmetros fotossintéticos NPQ, qP e rendimento quântico efetivo para *Scenedesmus obliquus* quando exposta a diferentes cores de luz.
Fonte: Do autor (2021).



Em relação aos carboidratos a luz azul se destacou mais uma vez, mas agora pela baixa quantidade produzida ($4,6 \pm 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Essa qualidade da luz foi a única com diferenças significativas em relação aos demais comprimentos de onda. Todas as demais comparações foram consideradas iguais.

A luz azul é encontrada na parte inferior da faixa de comprimentos de onda do espectro visível, e portanto, possui 57% mais energia do que a luz vermelha, localizada na outra extremidade do espectro e essa condição garante uma penetração mais profunda em culturas de microalgas do que os outros comprimentos de onda (KIRK, 1994). Por isso, uma das influências da luz azul é o excesso de energia que atinge o aparelho fotossintético. Esse excesso normalmente é indicado pelo aumento do NPQ e acúmulo de pigmentos (GOSS; LEPETIT, 2015), mas como visto, esse parâmetro fotossintético não foi afetado pela luz azul na presente pesquisa, indicando que isso não foi um problema para a *Scenedesmus obliquus*.

Outra importante influência da luz azul relatada por Ruyters (1984) está nas enzimas fotossintéticas, incluindo as de síntese de pigmentos e fotorrespiração, e enzimas de degradação

de carboidratos. O autor relatou que essas alterações enzimáticas são comandadas por dois tipos de mecanismos de defesa, chamados de controle grosso e controle fino. No controle grosso, a luz azul pode atuar sobre a quantidade de enzima ativa e sobre a capacidade da enzima, alterando a taxa de síntese ou degradação, e é através deste mecanismo que Ruyters (1984) indica um forte efeito da luz azul na síntese de proteínas. No controle fino, as alterações ocorrem por meio da regulação da atividade de moléculas enzimáticas preexistentes e um importante indicador desse tipo de influência é a quebra de carboidratos. As influências da luz azul relatadas por Ruyters (1984), podem explicar os resultados encontrados neste estudo para *Scenedesmus obliquus*, que constitui um aumento na síntese proteica e uma diminuição nos carboidratos, indicando que a influência pode estar relacionada às enzimas.

Tabela 8: Efeitos na proporção de carboidratos/proteínas em *S. obliquus* em função das diferentes qualidades de luz testadas.

	Carboidrato/Proteína
Branco	2,22 (\pm 0,02)
Vermelho e Azul	3,2 (\pm 0, 6)
Vermelho	2,3 (\pm 0,4)
Azul	0,8 (\pm 0,20)

Fonte: Do autor (2021).

O menor valor de carboidratos sob luz azul foi explicado por Emerson e Lewis (1943) em função do aumento do consumo de O₂ neste comprimento de onda. Em seu estudo, os autores observaram um maior consumo de O₂ na fase escura após o uso da luz azul durante o período fotossintético, do que em comparação com a luz vermelha. Kowallik (1982) explicou que o aumento na captação de O₂ não resulta da inibição do comprimento de onda, mas da interferência do consumo extra de oxigênio e que a degradação adicional de carboidratos ocorre mesmo durante a fotossíntese, independente do maquinário fotossintético quando a luz azul é utilizada.

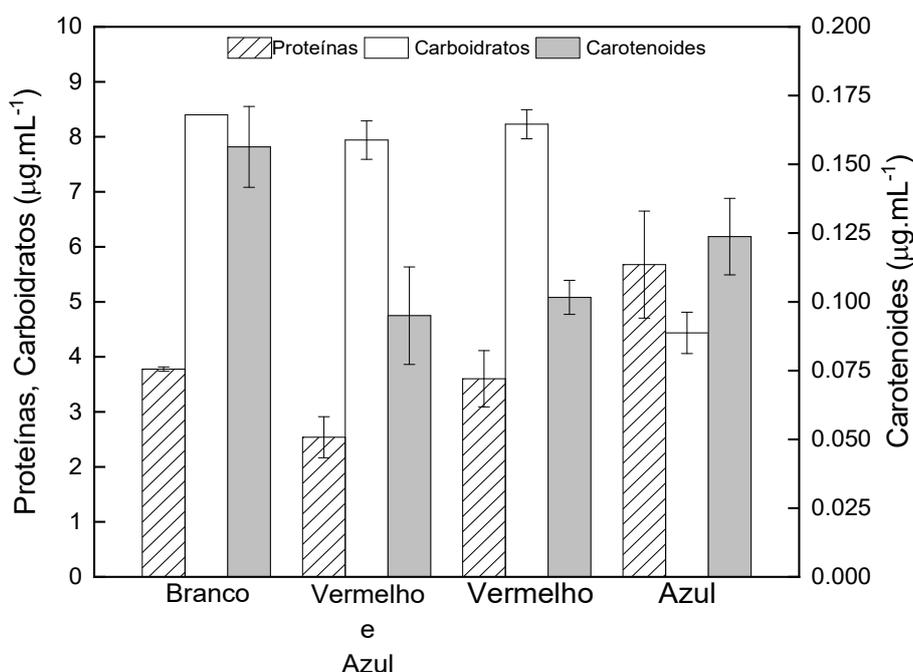
Schulze et al. (2016) indicaram uma estimulação da luz azul sob o uso de nutrientes como N-NO₃ em *Tetraselmis chuii*, quando comparado com a luz vermelha, indicando também um efeito negativo nas relações carboidrato-proteína em comprimentos de onda de 400 – 450 nm. Kim et al. (2013) encontraram um maior uso de fósforo, cerca de 50% , quando *Scenedesmus* sp foi exposta à luz azul, em comparação à luz branca. Informação que concorda plenamente com os resultados apresentados na Tabela 8 deste estudo, que demonstra uma diferença significativa para todos os comprimentos de onda em relação ao azul. No entanto, esse aumento no uso de nutrientes está ligado à ativação de transportadores/enzimas responsáveis pela assimilação de NO₃ e P. Um indicador desse fenômeno são as altas relações C:N e níveis mais elevados de carboidratos ou lipídios em vez de proteínas (ADAMS; BUGBEE, 2014). Essa opção foi então descartada no presente estudo, pois a luz azul foi responsável pela menor síntese de carboidratos

e maior proteína, contrariando o indicador de inibição por falta de nutrientes. A ausência da limitação de nutrientes neste caso também é confirmada pela taxa máxima de crescimento, que foi igual entre os tratamentos.

Em relação à análise dos carotenoides, foram apontadas diferenças estatisticamente significativas entre a luz branca e a mistura (azul e vermelha) e entre a luz branca e a vermelha. Todos os outros sendo considerados iguais. A média da luz branca ($0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$) é superior à da luz vermelha ($0,102 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e da luz mista ($0,095 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Como é bem conhecido, os carotenoides desempenham dois papéis principais no cloroplasto, atuando como pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores (SUN et al., 2018).

A diferença da luz branca em relação à mistura (vermelha e azul) e a luz vermelha pode ser explicada pela composição do espectro dos LEDs utilizados (Figure 30) e pela composição dos pigmentos das Clorófitas. Assim, baseamos a explicação em informações difundidas que indicam que as luzes vermelha e azul são intensamente absorvidas pela clorofila a (MADIGAN, MARTINKO, BENDER, 2016). Assim, neste estudo a comparação da luz branca, que é composta por comprimento de onda além do azul e do vermelho, desenvolveu carotenoides capazes de lidar com essas energias fora dos picos de absorção ótimos, explicando o maior valor para a luz branca em relação à luz mista e luz vermelha.

Figure 34: Análise bioquímica da biomassa da *Scenedesmus obliquus* nos diferentes tratamentos: luz branca, luz combinada (vermelho e azul), luz vermelha e luz azul. O eixo principal y faz referência as colunas de proteínas e carboidratos e o eixo secundário y as colunas de carotenoides.
Fonte: Do autor (2021).



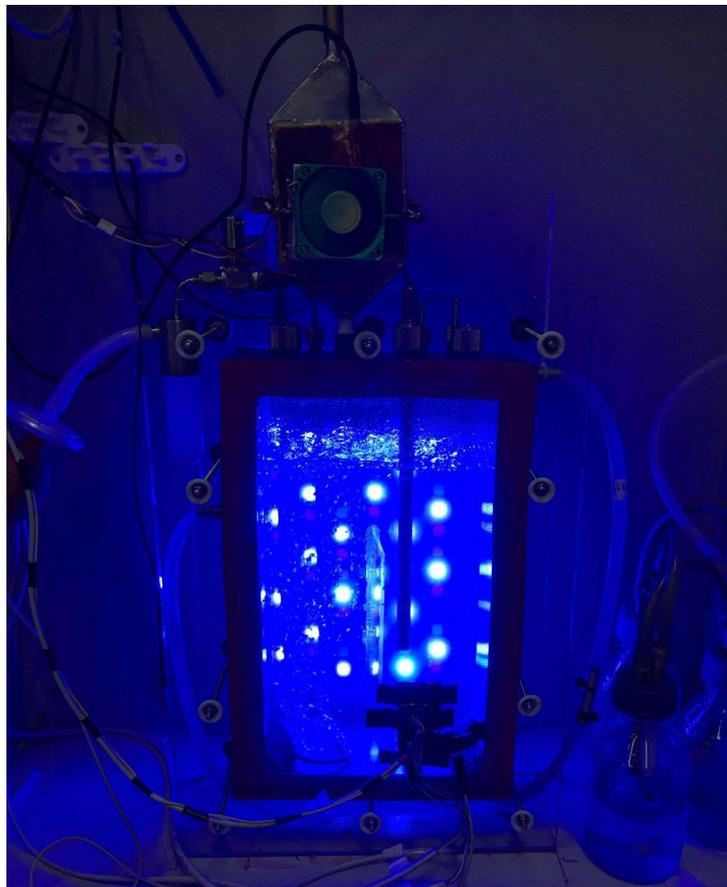
6.1.4 Conclusão

As taxas máximas de crescimento não foram afetadas pelos tratamentos, mantendo o crescimento constante independente da qualidade de luz oferecida. Os parâmetros fotossintéticos indicaram que as qualidades de luz testadas não afetam a fotossíntese. Fornecemos ferramentas para produzir proteínas de *Scenedesmus obliquus* de forma otimizada e de fácil implementação, pois basta a alteração do comprimento de onda oferecido à cultura. Nossa pesquisa abre também uma lacuna a ser preenchida pela área de controle de luz, que poderá aliar o efeito da intensidade com a qualidade da luz para maximizar a produtividade. A luz azul foi identificada como o melhor comprimento de onda a ser oferecido a *Scenedesmus obliquus* quando o objetivo é maximizar a produção de proteínas totais na biomassa. Quando o objetivo é a produção de carboidratos, todas as qualidades de luz testadas são indicadas, exceto a luz azul. Para a produção de carotenoides, a luz branca é mais promissora, pois tem uma vantagem sobre a mistura da luz vermelha com a azul em 39,10% e sobre a luz vermelha em 34,52%.

CAPÍTULO 7- DESENVOLVIMENTO DO CONTROLADOR POLICROMÁTICO DE LUZ APLICADO À PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Neste capítulo será abordado o desenvolvimento e a avaliação do controlador policromático de luz, objetivo central desta tese, que visou à otimização da produção microalgal em função da luz (Figura 35). E como visto no Capítulo 2, existem raríssimas aplicações de lógicas de controle convencionais dentro de controladores automáticos neste setor da biotecnologia, evidenciando uma grande lacuna a ser preenchida pela pesquisa e desenvolvimento, sendo, portanto, uma aplicação nobre que o estudo pretende proporcionar para a área de produção de microalgas.

*Figura 35: Fotobiorreator em funcionamento durante os cultivos de validação do controlador
Fonte: Do autor (2021)*



7.1 CONTROLADOR POLICROMÁTICO DE RADIAÇÃO FOTOSSINTETICAMENTE ATIVA APLICADO A MICROALGAS

7.1.1 Resumo

A utilização de microalgas na biotecnologia está em ascensão, pois apresenta algumas vantagens sobre outros microrganismos, como o uso de luz e dióxido de carbono como substratos para seu crescimento, devolvendo oxigênio e sintetizando naturalmente antioxidantes, proteínas, carboidratos, carotenoides, entre outros produtos. No entanto, a produção de microalgas ainda enfrenta sérios problemas devido à luz. Este estudo aborda o desenvolvimento de um controlador automático PAR (Photosynthetic Active Radiation) baseado em lógica Fuzzy, contemplando também uma funcionalidade inédita, a possibilidade de escolha do comprimento de onda que será emitido. O presente estudo comparou cultivos que não utilizaram o controlador desenvolvido com cultivos que usaram. As culturas controladas tiveram uma produtividade de biomassa ~ 200% maior em comparação com as não controladas. A alteração do comprimento de onda de branco para azul em culturas não controladas mostrou um aumento de 173% na produção de proteínas totais e acionando o controlador, obteve-se um aumento adicional de 23%. Além disso, o controlador PAR reduziu o consumo de energia em três vezes.

7.1.2 Introdução

Tornar os processos produtivos sustentáveis é uma necessidade eminente em nosso planeta, e diante disso, diversas alternativas de substituição de fontes não renováveis por renováveis vêm se destacando. Nesse sentido, as microalgas se encaixam perfeitamente como sintetizadores naturais de antioxidantes, antibióticos, ácidos graxos insaturados, proteínas, carboidratos, carotenoides, entre outros, despertando o interesse de setores industriais como cosméticos, farmacêuticos e alimentícios (BOROWITZKA, 2013). As microalgas também se destacam por contribuir para a mitigação do CO₂ atmosférico, pois a fotossíntese realizada por esses organismos promove a descarbonização do ar e devolve o oxigênio como bônus, ou seja, um subproduto metabólico essencial à vida no planeta (ZHAO; SU, 2014).

Em linhas gerais, a fotossíntese pode ser definida como o processo de transformação da energia luminosa em energia bioquímica, utilizada pelas células para seu desenvolvimento e sobrevivência (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; FALKOWSKI; RAVEN, 2007). No entanto, o fornecimento de luz para culturas de microalgas não é trivial e apresenta-se como um dos gargalos de produção para este bioprocessos.

A escolha da qualidade da luz, ou seja, o comprimento de onda oferecido à cultura, pode levar a alterações bioquímicas nas células em relação às culturas em diferentes bandas do espectro eletromagnético e torna-se uma ferramenta interessante para processos de microalgas, podendo

direcionar a cultura no caminho de otimização dos produtos de interesse (BABA et al., 2012; CHEN et al., 2010b; KIM et al., 2013). O grande problema da luz no crescimento de microalgas não está relacionado apenas a qualidade da luz, mas também na sua intensidade, que pode fotoinibir, se em excesso, ou limitar o crescimento, se não for suficiente (QIANG; ZARMI; RICHMOND, 1998). Dessa forma, foi sugerido uma operação de controle, chamada por vários autores de operação lumostática, que tem como princípio manter a intensidade luminosa adequada em função da concentração celular na cultura (CHOI; SUH; LEE, 2003b; ERIKSEN; GEEST; IVERSEN, 1996).

A intensidade da luz pode ser manipulada usando um painel de LEDs (diodos emissores de luz), que são fontes de luz muito promissoras, pois apresentam alta eficiência energética e controlabilidade em relação à intensidade e comprimento de onda (BANTIS et al., 2018; SCHULZE et al., 2014)

Para controlar a intensidade luminosa das culturas, muitos estudos adotaram a operação lumostática manual, ajustando a variável controlada através do número de luzes e da distância entre elas e a cultura (CHEN et al., 2011; LEE et al., 2006a, 2016; MURCHIE; LAWSON, 2013; SUH; LEE, 2001). Pouquíssimos trabalhos automatizam o controle da luz como um sistema mais refinado, como é o caso do estudo de Eriksen et al., (1996) que corrigiu a intensidade da luz usando um potenciômetro manipulado digitalmente. No entanto, os autores não deixam claro qual lógica de controle foi utilizada para gerar as ações lumostáticas. Ifrim et al. (2013) utilizaram a técnica de controle de linearização por feedback para linearizar o modelo utilizado e, assim, controlar a intensidade luminosa média, através da manipulação do gerador de tensão do painel luminoso. Além desses estudos, existe ainda outra classificação de controle da luz, que não se dá necessariamente pela manipulação da fonte de luz, mas pelo controle da concentração celular, fazendo uma pré-colheita das células sempre que a iluminação tende a ser prejudicada pela densidade celular, devido ao fenômeno do auto-sombreamento (LIU et al., 2018; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991).

O interesse em lógicas de controle automático para manter a variável luz em seu valor ideal deve aumentar, pois o controle de outras variáveis de processos biotecnológicos já estão difundidas e em pleno funcionamento, como: pH (GALES et al., 2020; PAWLOWSKI et al., 2014), oxigênio dissolvido (CAMPANI et al., 2018; GEHAN et al., 2019), temperatura (LI et al., 2021; SILVA et al., 2021) e pressão (FITZMAURICE et al., 2021; KUMAR; MANDAL, 2021).. O controle automático nada mais é do que um sistema que monitora a variável controlada por meio de um sensor conectado diretamente ao controlador, que por sua vez gera sinais elétricos de saída responsáveis por manter a variável controlada em seu valor de set point, sem a necessidade de um operador humano, que neste caso, é responsável por realizar ações corretivas (OGATA, 2010; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017). Existem inúmeros tipos de controladores que

podem ser utilizados para esta finalidade, como on-off, proporcional-integral-derivativo (o clássico PID), lógica fuzzy (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017), entre outros.

O controlador liga-desliga é o tipo de controlador mais simples comumente utilizado. Sua ação é ligar o sinal (estado de ação 1) sob uma determinada condição e desligar (estado de ação 2) caso contrário. O controlador proporcional (P) agrega mais precisão, pois atua proporcionalmente ao erro, ou seja, quanto maior a diferença entre o setpoint e o valor lido da variável controlada, maior a atuação do controle. Este modo de controle é útil, mas possui um erro estacionário inerente, o que limita sua aplicação. O controlador proporcional-integral (PI) apresenta uma resposta proporcional ao tempo de permanência do erro, eliminando o erro estacionário inerente ao controlador puramente proporcional; o problema com este controlador é que ele adiciona *jitter* na resposta do controle, o que pode adicionar instabilidade ao sistema. O termo derivativo (D) analisa a tendência do erro e adiciona uma resposta antecipatória ao PI; prever o comportamento do sistema. O problema deste controlador é sua sensibilidade a ruídos nas leituras da variável controlada. Neste caso, este controlador não é adequado para controlar variáveis com sensores ruidosos, pois podem tornar a resposta de controle instável. O controlador proporcional-integral-derivativo (PID) é o mais abrangente, pois engloba as três ações: proporcional, integral e derivativa. Este controlador se beneficia das vantagens dos três controladores ao mesmo tempo, razão pela qual é muito utilizado (STEPHANOPOULOS, 1983). Cerca de 90% dos controladores atualmente em operação são PID (PASSINO; YURKOVICH, 1998).

Recentemente, houve um aumento no interesse de controladores baseados em lógica Fuzzy, que manipulam valores aproximados usando regras linguísticas como “se (...), então (...)”. Esses algoritmos podem absorver o conhecimento de operadores especialistas humanos e podem lidar com não linearidades de sistemas reais de processos complexos e dinâmicos. Esses controladores têm quatro componentes principais: i- A "base de regras" que reúne (na forma de regras) o conhecimento do especialista humano sobre como operar o sistema; ii- O mecanismo de inferência que avalia quais regras devem estar em vigor no momento; iii- A fuzzificação que transforma e classifica as entradas comparando-as com as regras da base de regras e iv- A defuzzificação que converte as conclusões alcançadas pelo mecanismo de inferência no sinal de controle que será utilizado como entrada para a planta.

Este estudo teve como objetivo utilizar a lógica Fuzzy para controlar a intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) que passa por um fotobiorreator durante um processo de produção de microalgas, bem como manipular a potência luminosa do painel de LED, de forma independente, para cada comprimento de onda, vermelho, verde, azul e branco, para otimizar o crescimento celular durante o processo.

7.1.3 Materiais e métodos

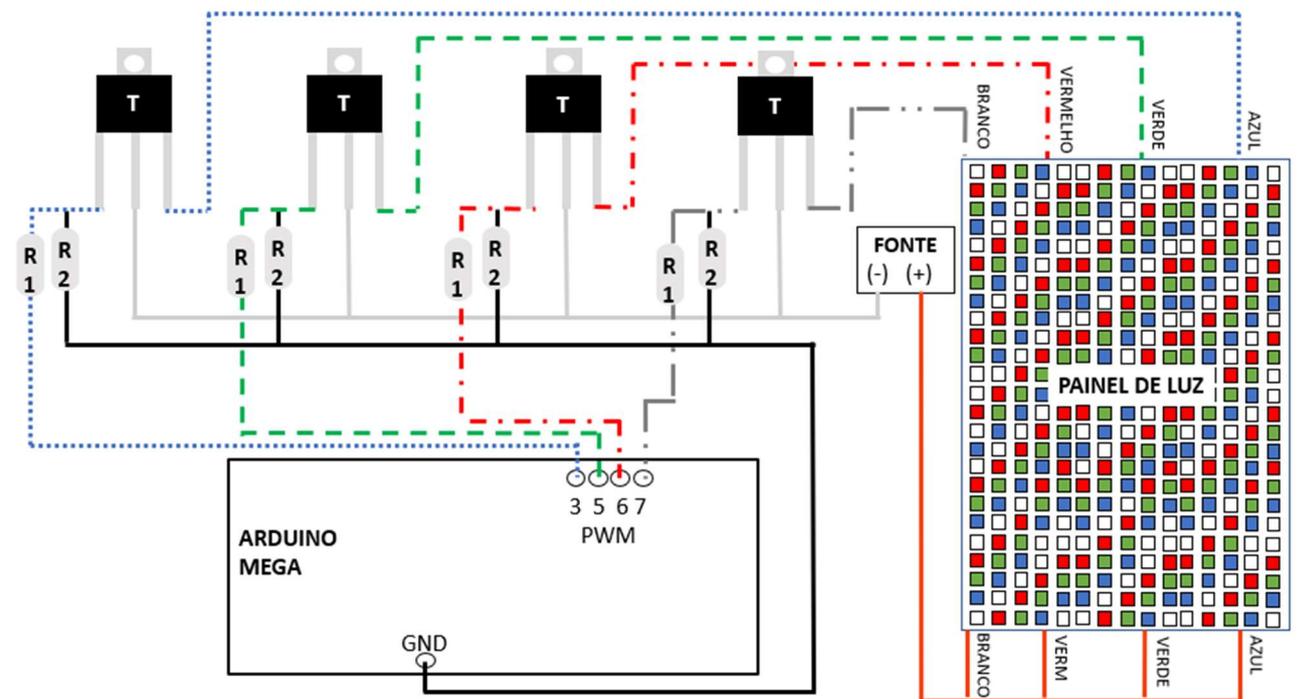
7.1.3.1 Aparato experimental

Foi utilizado um fotobiorreator *Airlift* feito com placas planas de vidro transparente, com volume útil de 6 L, encamisado a uma temperatura de 24°C e aerado com ar a uma vazão de 1,5 L/min. A saída de gás do fotobiorreator passa por um condensador para minimizar a perda de líquido por arraste gasoso e a saída de gás do condensador por sua vez é borbulhada em uma solução de sulfato de cobre para manter a assepsia. Antes de cada batelada, o fotobiorreator foi esterilizado em autoclave a 1,5 atm e 120°C por 20 min.

A fonte de luz utilizada consiste em dois painéis de LED constituídos por luz: branca (400-710 nm), vermelha (580-720 nm), azul (410-495 nm) e verde (475-600 nm). Cada painel é responsável por cobrir uma superfície do fotobiorreator e para tanto possuem dimensões de 20 x 35 cm. A potência de cada canal de cor é manipulada através de um circuito controlado por um Arduino Mega através de portas PWM. O circuito controlado é composto por transistores, modelo IRFZ46, e resistores (1 KOhm e 10 KOhm), conforme Figura 36 que amplificam o sinal PWM enviado aos LEDs de potência, portanto neste estudo foram utilizados dois destes sistemas, pois dois painéis de LEDs são requeridos.

Figura 36: Circuito de potência responsável por amplificar a tensão enviada pelo microcontrolador Arduino na faixa de 0-5 volts para as portas PWM (3, 5, 6 e 7) conectadas ao painel de LED que opera na faixa de 0-12 volts. T corresponde aos transistores (IRFZ46), R1 ao resistor de 1 KOhm e R2 ao resistor de 10 KOhm.

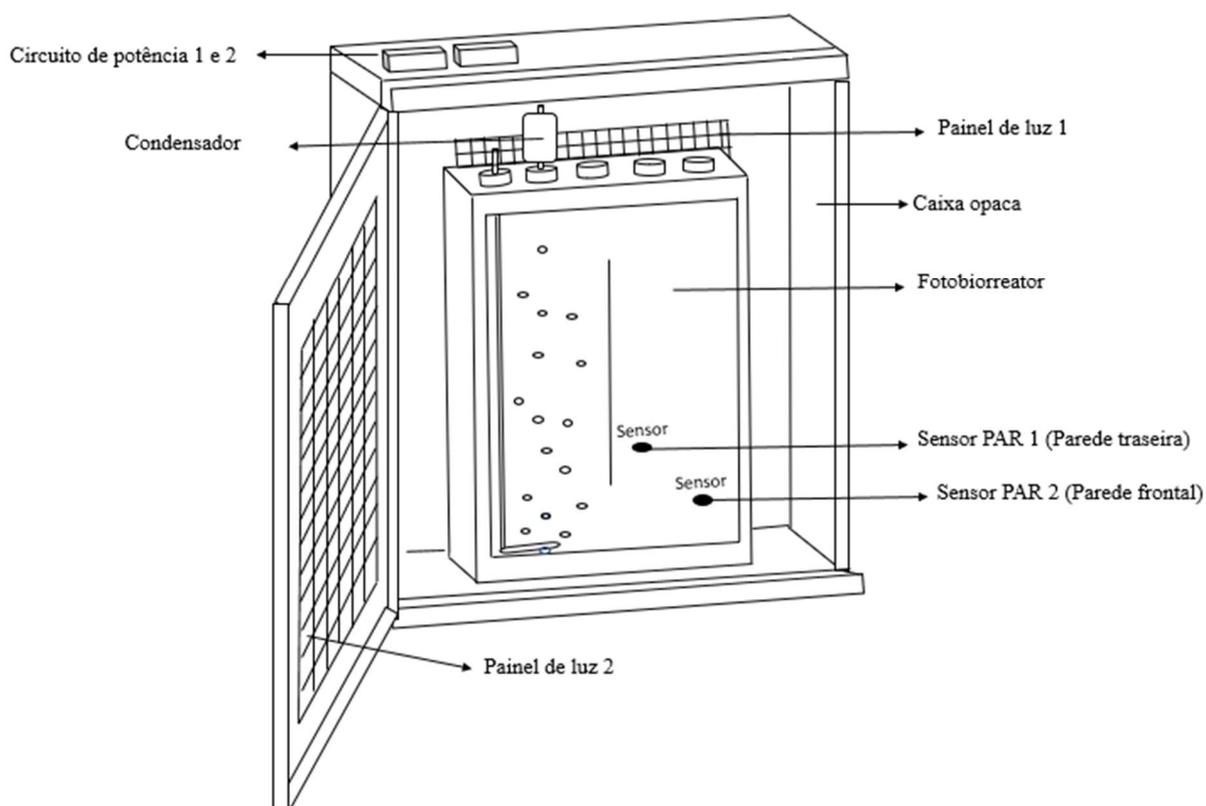
Fonte: Do autor (2021).



Dois de sensores RGB, modelo TCS34725, foram utilizados para monitorar online as variáveis controladas PAR de cada painel: PAR_R1 (vermelho), PAR_G1 (verde), PAR_B1 (azul) PAR_W1 (branco), PAR_R2 (vermelho), PAR_G2 (verde), PAR_B2 (azul) e PAR_W2 (branco).

Para evitar a interferência da luz externa, o fotobiorreator foi colocado no centro de uma caixa metálica escura (Figure 37), que possui dois painéis de luz fixados nas suas paredes, que estão posicionados paralelos às superfícies do fotobiorreator. Os respectivos sensores RGB foram fixados em cada parede do fotobiorreator, posicionado no lado oposto do painel que sofrerá as ações de controle.

Figure 37: Aparato experimental dos cultivos. Sensor 1 instalado na parede frontal e Sensor 2 instalado na parede traseira do fotobiorreator.
Fonte: Do autor (2021).



7.1.3.2 Cultura

A espécie cultivada foi uma clorófito de água doce comum, *Scenedesmus obliquus*, gentilmente cedida pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar) por meio do Laboratório de Biotecnologia de Algas. O meio de cultura BG-11 foi utilizado (RIPPKA et al., 1979). O fotoperíodo foi de 12 h claro e 12 h escuro e a concentração inicial de células foi de 10^5 células.mL⁻¹.

A contagem celular foi dada através de uma câmara de contagem de células Fuchs-Rosenthal sob um microscópio óptico (Nikon Eclipse modelo E200, Japão). A clorofila foi determinada por fluorescência in vivo (Turner Designs, Trilogy, EUA) e para isso foi construída uma curva de calibração plotando a concentração de clorofila a extraída de células de *Chlorella vulgaris* em crescimento exponencial (SHOAF; LIUM, 1976) contra a fluorescência de clorofila a in vivo. A seção linear desta curva foi ajustada por meio de regressão linear e usada para calcular a concentração de clorofila a

As taxas de crescimento foram determinadas por regressão linear do logaritmo natural da densidade celular versus tempo (dias) e da concentração de clorofila a versus o tempo (dias), durante a fase de crescimento exponencial, com a inclinação correspondente à taxa de crescimento específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$).

A produtividade global com base nos dados de concentração celular ($P_{\text{global, cx}}$) foi calculada pela Equação 15, onde dCx é a variação da concentração celular e dt é a variação do tempo. A Equação 16 foi usada para calcular a produtividade global com base nos dados de concentração de clorofila a ($P_{\text{global, cc}}$), onde dCc é a variação da concentração de clorofila a.

$$P_{\text{global, cx}} = \frac{dCx}{dt} \quad \text{Equação 15}$$

$$P_{\text{global, cc}} = \frac{dCc}{dt} \quad \text{Equação 16}$$

7.1.3.3 Estratégia de controle

Foram realizados quatro conjuntos de culturas diferentes, em triplicata, conforme Tabela 9, totalizando um total de 12 bateladas no fotobiorreator. A primeira triplicata, identificada por W, foi iluminada por LEDs brancos com intensidade inicial de $200 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medida pelo sensor RGB após a inoculação, cuja potência elétrica correspondente foi mantida constante até o final do processo. A segunda triplicata, B, foi iluminada por LEDs azuis com intensidade inicial de $200 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e também mantida em potência elétrica constante até o final do cultivo, observando-se queda na PAR medida pelo sensor ao longo do tempo, como no caso W. A terceira e quarta triplicatas, CW e CB, foram culturas iluminadas por luz branca e azul respectivamente e utilizaram o sistema de controle automático, que manteve a PAR medida pelo sensor em seu valor ótimo de $200 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante todo o cultivo, manipulando a potência elétrica e respectivamente a luminosidade do painel. As culturas foram amostradas a cada 24 h para medir a concentração celular e a concentração de clorofila a. A concentração de proteína foi analisada a partir de amostras colhidas no segundo dia da fase de crescimento exponencial (BRADFORD, 1976).

Tabela 9: Culturas realizadas em triplicata com potência de luz fixa (W e B) e com potência de luz controlada (CW e CB). W significa emissão de luz branca e B emissão de luz azul. Inicialmente, independente do controle do sistema, o PAR foi ajustado para 200 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

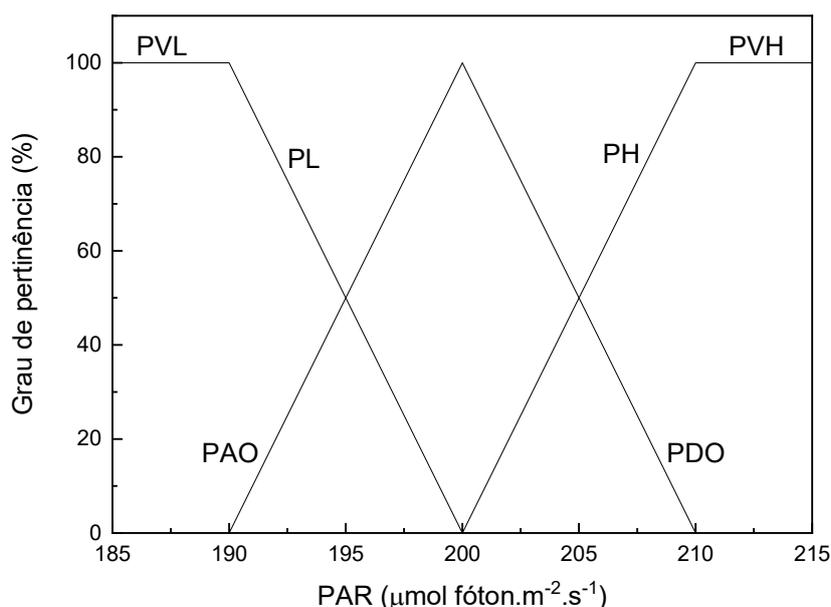
Nomenclatura	W	B	CW	CB
Cor	Branco	Azul	Branco	Azul
PAR ($\mu\text{mol fóton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	200 (sem controle)	200 (sem controle)	200 (controlado)	200 (controlado)

Fonte: Do autor (2021).

O controlador desenvolvido considera múltiplas entradas e múltiplas saídas (MIMO), reunindo ações de controle de 4 controladores específicos de uma única entrada e uma saída (SISO), um para cada cor: vermelho, verde, azul e branco. Os controladores foram construídos com lógica *Fuzzy*, cada um possuindo uma variável de entrada PAR correspondente à sua respectiva cor medida pelo sensor RGB; como saída, cada controlador SISO calcula a modulação por largura de pulso (sinal PWM) para lidar com a tensão de alimentação do respectivo painel de luz. Os pontos de ajuste dos processos controlados foram definidos de acordo com os resultados dos cultivos não controlados. Os dados obtidos foram utilizados para definir os limites, inferiores e superiores, do universo discursivo das regras *Fuzzy*.

Figura 38: Visualização gráfica dos conjuntos Fuzzy definidos para a variável de entrada PAR: PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR ótimo ascendente (PAO), PAR ótimo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH).

Fonte: Do autor (2021).



Os conjuntos nebulosos foram: PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR ótimo ascendente (PAO), PAR ótimo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH), descritos na

Tabela 10 e Figura 38. E o conjunto de regras Fuzzy é mostrado na Tabela 11.

Tabela 10: Conjuntos difusos do contexto da radiação fotossinteticamente ativa (PAR). PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR ótimo ascendente (PAO), PAR ótimo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH), onde a PAR seria a variável controlada.

Radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$)				
Configuração Fuzzy	Identificador	Universo Fuzzy		Grau de pertinência
PAR Muito baixo	PVL	PAR < 190		$DM_{PVL} = 1$
PAR Baixo	PL	190	200	$DM_{PL} = -0,1*PAR_lido + PAR_setpoint/10$
PAR Ótimo ascendente	PAO	190	200	$DM_{PAO} = 0,1*PAR_lido - (PAR_setpoint-10)/10$
PAR Ótimo descendente	PDO	200	210	$DM_{PDO} = -0,1*PAR_lido + (PAR_setpoint+10)/10$
PAR Alto	PH	200	210	$DM_{PH} = 0,1*PAR_lido - (PAR_setpoint)/10$
PAR Muito alto	PVH	PAR > 210		$DM_{PVH} = 1$

Fonte: Do autor (2021).

Tabela 11: Conjunto de regras difusas: PAR muito baixo (PVL), PAR baixo (PL), PAR ótimo ascendente (PAO), PAR ótimo descendente (PDO), PAR alto (PH) e PAR muito alto (PVH).

Se	Então	Incremento/ Decremento
PVL	Incrementa potência (IP)	10
PL	Incrementa potência (IP)	10
PAO	Mantenha potência (KP)	0
PDO	Mantenha potência (KP)	0
PH	Decrementa potência (DP)	-10
PVH	Decrementa potência (DP)	-10

Fonte: Do autor (2021).

A Equação 17 apresenta a resposta final de cada controlador SISO, portanto, o controlador MIMO é composto por quatro equações equivalentes, uma para cada cor (i=R para vermelho, i=G para verde, i=B para azul e i=W para branco).

$$PWM_i = PWM_{i-1} + DM_{PVLi} * IP + DM_{PLi} * IP + DM_{PAOi} * KP + DM_{PDOi} * KP + DM_{PHi} * DP + DM_{PVHi} * DP \quad \text{Equação 17}$$

A energia ("ε" em mWh) foi calculada a partir da potência do painel (P em mW) e do tempo ligado (dt em h), a partir da Equação 18. Em seguida, o valor da energia consumida foi integrado ao longo de todo o tempo e dividido pela concentração celular acumulada no fotobiorreator, gerando a quantidade de energia gasta por célula.

$$\epsilon = P \cdot dt \quad \text{Equação 18}$$

O custo em dólares gasto em iluminação por célula foi calculado multiplicando o valor de 0,1376 dólares por KWh (publicado pela Energy Information Administration (EIA, 2021) dos Estados Unidos para o mês de abril de 2021) pela energia utilizada por célula acumulada, descrita na seção 2.3.3.

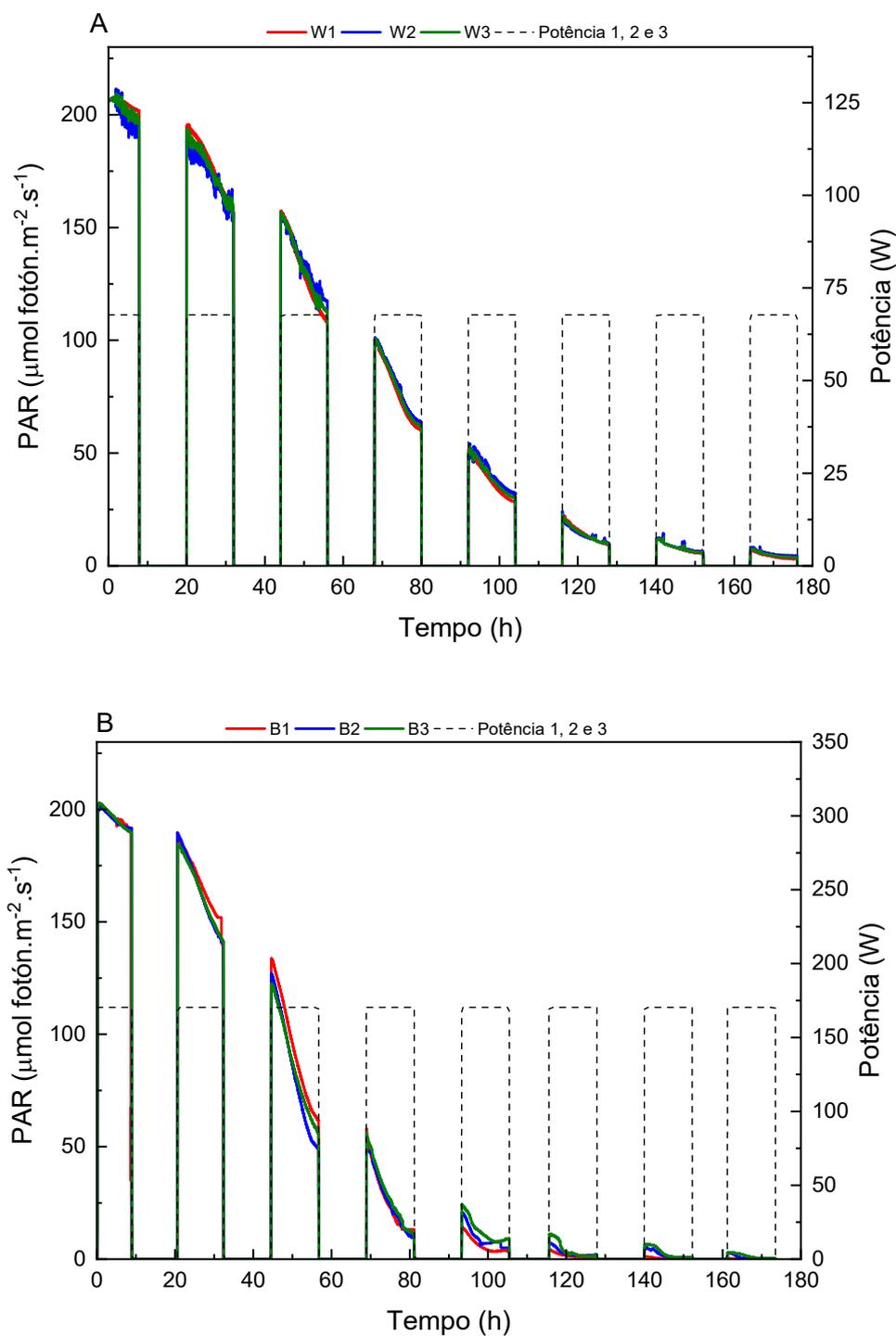
7.1.4 Resultados e discussões

Este estudo apresenta alguns resultados importantes sobre o desempenho de um controlador de radiação fotossinteticamente ativa baseado em lógica Fuzzy e a possibilidade de selecionar o comprimento de onda que será emitido para o cultivo de microalgas. Além disso, mostramos que a luz azul favoreceu a síntese de proteínas em *S. obliquus*.

As culturas realizadas com potência constante (emitida pelo painel), tanto na luz branca (W) quanto na azul (B) apresentaram um perfil de luz (medido pelo sensor RGB) decrescente ao longo do tempo, apresentado pela Figura 39, iniciando em 200 μmol fóton.m⁻².s⁻¹ (valor PAR ideal para *S. obliquus*) no tempo zero e terminando com ~9,49 μmol fóton.m⁻².s⁻¹ para luz branca e em ~1,01 μmol fóton.m⁻².s⁻¹ para luz azul, em 128 h de cultivo.

As culturas em batelada em fotobiorreator que são adotadas por sua simplicidade, baixo custo e flexibilidade (BEZERRA et al., 2011), enfrentam um regime de luz desfavorável como mostra a Figura 39, em baixas concentrações celulares não há déficit de luz e/ou problemas com efeitos de sombreamento, permitindo que as células cresçam em taxas máximas (MARKER; TSAVALOS; YOUNG, 1996; PARK, 2001). No entanto, em altas concentrações celulares, o fornecimento de luz torna-se insuficiente e o auto-sombreamento se destaca, ocasionando um problema que impede o cultivo de atingir taxas ótimas de crescimento, uma vez que há uma diminuição na taxa de captura de luz (BOROWITZKA; HUISMAN; OSBORN, 1991; CHOI; SUH; LEE, 2003b; OGBONNA; YADA; TANAKA, 1995; OLGA; JORDI, 1996).

Figura 39: Monitoramento do PAR durante as triplicatas de culturas submetidas a: A) luz branca (W1, W2 e W3) e B) luz azul (B1, B2 e B3), representada pelas linhas preenchidas e pelo eixo principal da PAR. A potência de emissão do painel durante o cultivo é mostrada por linhas pontilhadas e refere-se ao eixo Potência. Fonte: Do autor (2021).

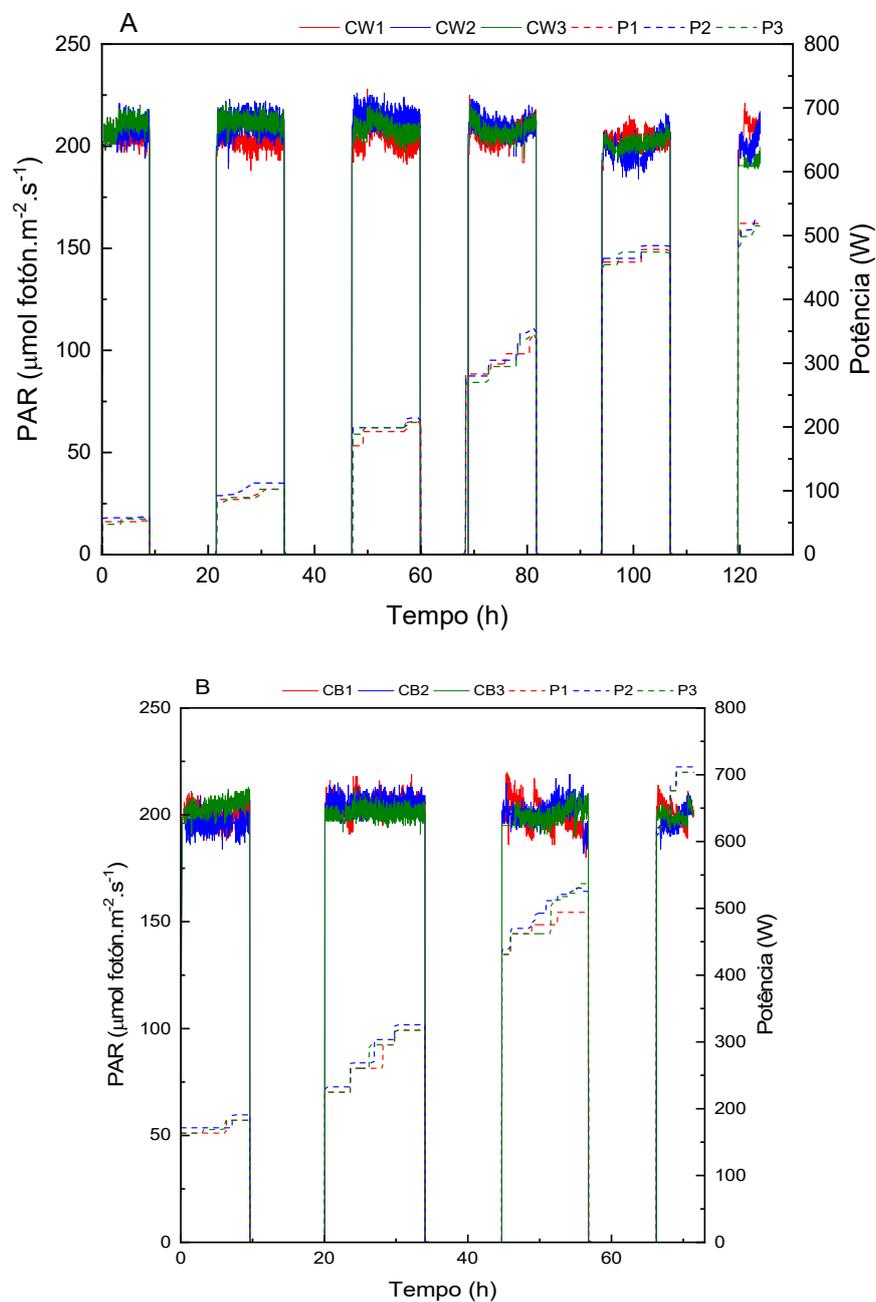


Ao contrário dos primeiros experimentos com a potência de iluminação constante, o perfil de luz oferecido às microalgas pelo controlador PAR desenvolvido neste estudo apresentou um comportamento crescente, como pode ser visto na Figure 40A (para as triplicatas em luz branca controlada: CW1, CW2 e CW3) e pela Figura 40B (para as triplicatas em luz azul controlada:

CB1, CB2 e CB3). Como pode ser visto nas duas figuras, a ação do controlador *Fuzzy* foi estável, com baixas oscilações no sinal de controle, garantindo a qualidade da potência de saída e mantendo as variáveis controladas, PAR_W e PAR_B, em seus respectivos *setpoints* (200 $\mu\text{mol f\acute{o}t\acute{o}n.m}^{-2}.s^{-1}$), mantendo a PAR dentro da faixa \u00f3tima estabelecida nos par\u00e2metros da l\u00f3gica *Fuzzy* utilizada, proporcionando \u00e0s c\u00e9lulas presentes nas culturas um ambiente com luz adequada para o seu crescimento.

Figure 40: Monitoramento da PAR durante os cultivos de valida\u00e7\u00e3o do controlador: A) utilizando luz branca (CW1, CW2 e CW3) representada pela linha preenchida referente ao eixo y principal; e o comportamento da pot\u00eancia el\u00e9trica (P1, P2 e P3) emitida pelo painel durante os tr\u00eas cultivos para manter o PAR em seu valor \u00f3timo para o eixo y \u00e0 direita; B) utilizando a luz azul (CB1, CB2 e CB3) representada pela linha preenchida referente ao eixo y esquerdo; e o comportamento da pot\u00eancia el\u00e9trica (P1, P2 e P3) emitida pelo painel durante os tr\u00eas cultivos para manter a PAR em seu valor \u00f3timo para o eixo y \u00e0 direita.

Fonte: Do autor (2021).



A fonte de luz utilizada neste estudo possui uma limitação física em relação à potência máxima de emissão, o que foi evidenciado durante os cultivos controlados. Os experimentos com controle *Fuzzy* foram finalizados logo após atingir a potência máxima do respectivo painel luminoso. As culturas em branco, CW1, CW2 e CW3, atingiram a potência máxima de painel de 500 W em aproximadamente 123 h, enquanto as culturas azuis CB1, CB2 e CB3, atingiram uma potência máxima de 700 W em aproximadamente 75 horas.

As curvas de crescimento foram obtidas a partir dos dados de concentração celular e podem ser visualizadas na Figura 41. A definição da fase exponencial (dia 1 ao 3) proporcionou o cálculo das taxas máximas de crescimento obtidas pelas culturas. A Tabela 12 apresenta a comparação do $\mu_{\text{máx}}$ entre culturas não controladas e controladas. Um aumento na taxa máxima de crescimento de 40% (± 1) foi obtido para a luz branca e 35% (± 4) para a azul.

Figura 41: Curvas de crescimento para culturas não controladas e controladas sob luz branca (A) e luz azul (B). W1, W2 e W3 referem-se a culturas sem uso do controlador e CW1, CW2 e CW3 para aqueles que utilizaram o controlador sob luz branca, para luz azul foram utilizados B1, B2 e B3 para culturas que não utilizaram o controlador e CB1, CB2 e CB3 para as controladas.

Fonte: Do autor (2021).

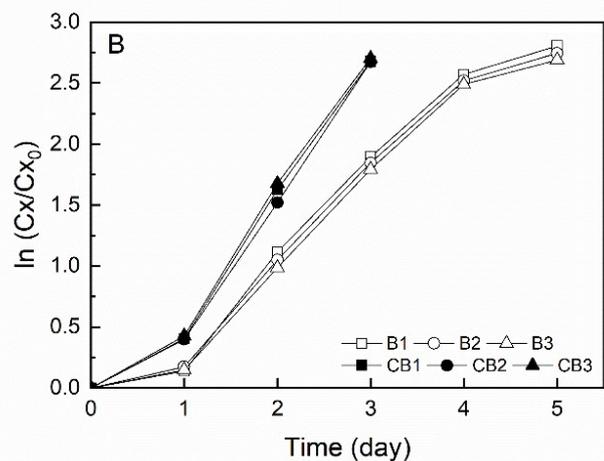
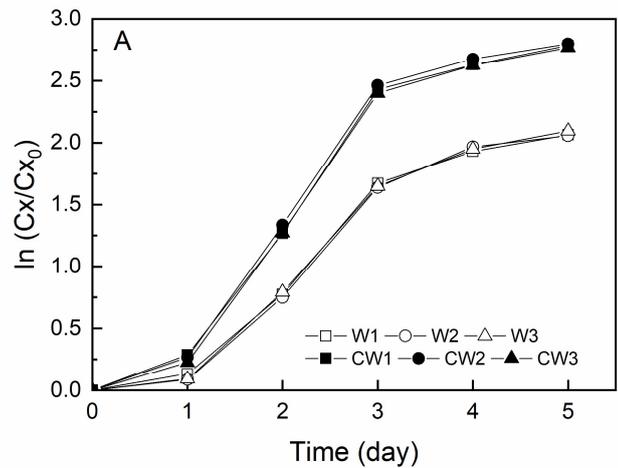


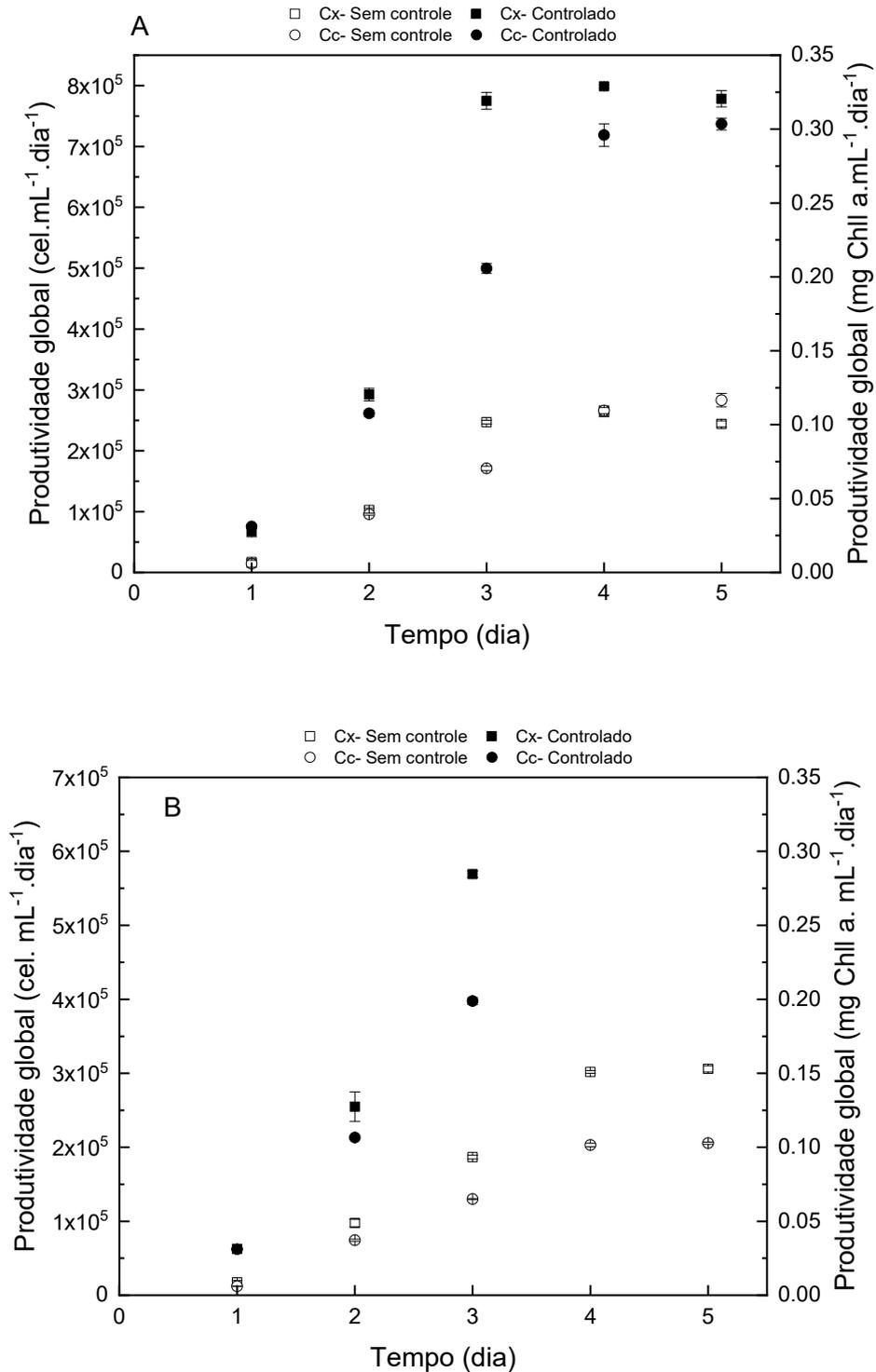
Tabela 12: Taxa máxima de crescimento obtida para os diferentes regimes de qualidade de luz emitida para a espécie através dos dados de concentração celular.

$\mu_{\text{máx}} (\text{dia}^{-1})$			
Branco		Azul	
Sem controle	Controlado	Sem controle	Controlado
0,78 ± 0,01	1,09 ± 0,02	0,84 ± 0,03	1,14 ± 0,00

Fonte: Do autor (2021)

Espera-se um aumento da concentração celular das culturas quando estas são submetidas a ações lumostáticas (ações que ajustam a luz durante o cultivo ao valor desejado) (CHOI; SUH; LEE, 2003a; IMAIZUMI et al., 2016; LEE et al., 2006a, 2006b). E para monitorar esta variável durante este estudo, a amostragem diária para determinação da concentração celular e concentração de clorofila a permitiu o cálculo da produtividade para todas as culturas (W1, W2, W3, B1, B2, B3, CW1, CW2, CW3, CB1, CB2 e CB3). A Figure 42 mostra o perfil de produtividade global das culturas usando o controlador em relação às culturas sem controle de luz, em função da concentração celular (C_x) e concentração de clorofila a (C_c), Figura 42A para luz branca e Figura 42B para luz azul.

Figure 42: Produtividade em relação à concentração celular (Cx) no eixo y esquerdo e em relação à concentração de clorofila a (Cc) no eixo y direito: A) cultivos com luz branca, sem usar o controlador (Cx não controlado e Cc não controlado) e usando o controlador (Cx controlado e Cc controlado); B) cultivos em luz azul, sem utilizar o controlador (Cx não controlado e Cc não controlado) e usando o controlador (Cx controlado e Cc controlado).
 Fonte: Do autor (2021).



Em ambas as comparações da Figure 42 a produtividade foi maior para os cultivos que utilizaram o sistema de controle da radiação fotossinteticamente ativa em relação aos cultivos

dados sem o controlador, confirmando que o controle da PAR é uma boa estratégia para aumentar a concentração celular durante o cultivo de microalgas. O aumento da produtividade celular dos cultivos em luz branca utilizando o controlador elaborado neste estudo em relação aos cultivos sem o uso do controlador foi de 196%, e 192% para a concentração de clorofila a, praticamente dobrando a produtividade da espécie *Scenedesmus obliquus* no segundo dia de crescimento exponencial. O conjunto de culturas que utilizou a luz azul apresentou um aumento de 205% na produtividade celular e 206% na produtividade calculada a partir dos dados da concentração da clorofila a.

Quando comparamos o controlador desenvolvido neste estudo com o desenvolvido por Eriksen et al., (1996), que indica uma maior produtividade de *Synechococcus sp* ao utilizar o sistema de controle em relação ao sem controle, essa comparação não é justa, pois o seu controlador de luz foi guiado pelo controlador de pH, que por sua vez adiciona CO₂ com base no pH lido. Seu controlador acessa a quantidade de pulsos de CO₂ adicionados em um período de tempo e os compara com o intervalo anterior, e é essa comparação que direciona se a luz permanecerá inalterada, se aumentará ou diminuirá, em incrementos constantes. O controlador de pH promove um perfil ótimo de CO₂ às microalgas fotossintéticas cultivadas durante os testes, otimizando a fotossíntese; e isso não foi abordado pelo controlador deste trabalho, que visou desenvolver um controlador suave da PAR para não prejudicar a microalga, ou seja, manipulou a luz em diferentes etapas dependendo da necessidade do microrganismo a cada 1 minuto, utilizando a lógica *Fuzzy* para este feito. Isso não foi observado no controlador de Eriksen et al. (1996) que manipula a luz em degraus constantes de 25 $\mu\text{mol f\acute{o}ton.m}^{-2}.s^{-1}$ a cada 15 minutos. O controlador desenvolvido na presente pesquisa pode e deve ser utilizado em conjunto com um controlador de pH para otimizar a fotossíntese no sistema de cultivo.

Ifrim et al. (2013) implementaram um controlador não linear, através da técnica de linearização de *feedback*, para controlar a intensidade média da luz incidente. O controlador foi guiado por uma sonda de turbidez, que teve seus dados previamente correlacionados com dados de biomassa de microalgas. O controlador aumentou sua intensidade sempre que a biomassa aumentou. O sistema de I/O desenvolvido por eles teve sua complexidade aumentada por possuir um modelo de crescimento que não conseguia prever o crescimento acima de 70 horas, mas mesmo assim o controlador demonstrou para o cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* uma produção de pelo menos 10% maior em biomassa por mol de fóton fornecido à cultura quando comparado a sistemas com intensidade de luz constante, podendo chegar a 30% a mais. Comparando o presente controlador com o de Ifrim et al. (2013) notamos que os autores utilizaram a biomassa como parâmetro e no presente estudo foi utilizada a produtividade celular e a concentração de clorofila. Entendemos que o aumento celular e a concentração de clorofila a estão ligados ao crescimento da cultura e conseqüentemente da biomassa e dessa forma podemos considerar que o controlador baseado em lógica *Fuzzy* é mais promissor, pois aumentou a

produtividade do *Scenedesmus obliquus* em aproximadamente 200%, além de ter um desenvolvimento mais simples baseado na experiência do operador proporcionada pela lógica *Fuzzy*.

O controlador proposto também permitiu manipular a composição bioquímica da biomassa das microalgas utilizando sua flexibilidade para modificar o espectro emitido, alterando a luz branca convencional para o comprimento de onda escolhido pelo usuário, característica nunca relatada em controladores automáticos de luz para produção de microalgas. Apresentando-se como uma poderosa ferramenta para otimizar as alterações bioquímicas causadas por diferentes comprimentos de onda em espécies microalgais, permitindo o controle do fluxo de fótons emitidos. O uso de um determinado comprimento de onda para modificar a composição bioquímica da biomassa microalgal é uma alternativa que vem sendo amplamente discutida na literatura (DENIZ et al., 2019; HAN et al., 2019; JUNG et al., 2019; SCHULZE et al., 2014; STEVČIĆ; PULKKINEN; PIRHONEN, 2019). Considerando esta possibilidade, foi incorporado ao presente controlador diferentes cores de luz além da branca. Os efeitos da exposição de *S. obliquus* à luz azul no acúmulo de proteínas foram analisados e comparados com a luz branca.

Os resultados indicaram que a luz azul aumentou a produção de proteínas totais em 57,05% quando a luz azul foi utilizada em culturas sem o uso do controlador PAR em relação à luz branca, mas com o controlador proposto obteve-se um aumento adicional de 44,61% de proteínas. Isso pode ser explicado pela melhor assimilação dos nutrientes sob luz azul, que é causada pela ativação de transportadores/enzimas responsáveis pela captação e assimilação de nitrogênio e fósforo (KAMIYA; SAITOH, 2002; KIM et al., 2013). A influência da luz azul nas enzimas também foi relatada por Ruyters (1984), que indicou uma alteração na síntese proteica pelo mecanismo denominado controle grosso das enzimas, ou seja, na quantidade e atividade das enzimas. Assim, está implícito que o alto teor de proteína sob luz azul é devido ao efeito que esse comprimento de onda tem nas enzimas fotossintéticas. Os presentes resultados indicam que mesmo em culturas onde a qualidade da luz é o fator mais importante para direcionar a produção para as biomoléculas de interesse, o controle da intensidade do comprimento de onda aumenta ainda mais a produção.

O aumento da produtividade celular e da produtividade calculada através dos dados da concentração de clorofila a demonstram a eficácia do sistema de controle proposto neste estudo, que ao manter a radiação fotossinteticamente ativa em seu valor ótimo ajustado pela densidade de cultura implicou a melhora do desenvolvimento da espécie em relação ao problema da atenuação de luz durante o cultivo. O controlador forneceu às células um perfil de PAR constante não limitando seu crescimento por falta de luz em alta concentração celular, nem inibindo-as por excesso de luz quando em concentração celular baixa.

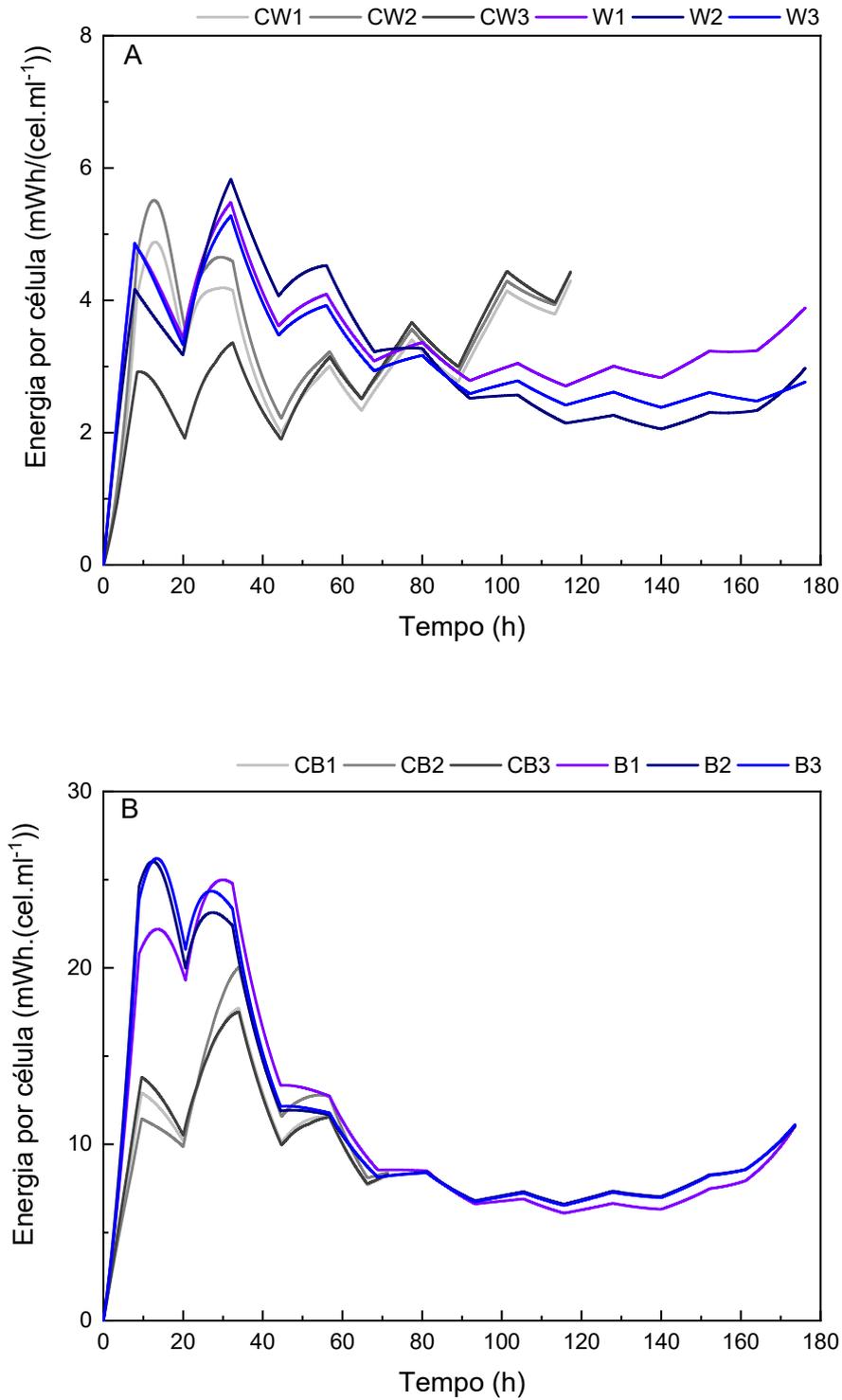
O controlador, além de aumentar a produtividade e manter a qualidade da biomassa nas culturas do fotobiorreator, também apresentou vantagens econômicas em relação à energia

específica, ou seja, a energia utilizada por célula. A Figura 43 demonstra o perfil da energia específica consumida durante a triplicata de cultivos em luz branca controlada (CW1, CW2 e CW3) e luz azul (CB1, CB2 e CB3) e luz branca não controlada (W1, W2 e W3) e luz azul (B1, B2 e B3). Os índices da Figura 43 mostram alto consumo de energia durante a fase lag para culturas que não utilizaram controle de luz, e um consumo muito menor em culturas dadas utilizando o sistema de controle.

Na fase exponencial, o sistema de controle aumentou o consumo de energia, mas permanece em níveis muito mais baixos do que os sistemas não controlados. Neste caso, a partir do final da fase exponencial (~80 h) as culturas não controladas começam a declinar em relação ao acúmulo crescente de células, que aumenta com o tempo mesmo com luz constante.

Os custos operacionais do processo utilizando o sistema controlado foram menores quando comparados aos cultivos operados com energia elétrica constante. Esta é outra vantagem dos sistemas controlados, que permitem a otimização da energia fornecida e consequentemente dos custos envolvidos no processo. Considerando um processo de 70 horas como base de cálculo, a quantidade média de energia elétrica consumida no cultivo com luz branca não controlado foi de 0,0022 e de 0,0017 US\$/ (cel/mL) para os cultivos controlados, indicando uma redução de 23,96% para o mesmo período utilizando o controlador. Para a luz azul, o processo não controlado consumiu 0,0089 US\$.mL.cel⁻¹, enquanto o controlado consumiu 0,0064 US\$.mL.cel⁻¹ no mesmo período indicando uma redução de 28,77%. O consumo de energia foi menor nas culturas que utilizaram o controlador.

Figura 43: Perfil de energia utilizada por célula (mWh) para iluminar cada triplicata de: A) luz branca controlada (CW1, CW2 e CW3) e luz branca não controlada (W1, W2 e W3); B) luz azul controlada (CB1, CB2 e CB3) e luz azul não controlada (B1, B2 e B3), por concentração celular (células.ml⁻¹).
Fonte: Do autor (2021).



7.1.5 Conclusão

O controlador PAR policromático desenvolvido neste trabalho é uma contribuição para a comunidade científica que ainda estuda formas de viabilizar bioprocessos que envolvem a produção de microalgas e seus derivados. O controlador desenvolvido mostrou um aumento na produtividade celular e de clorofila a em ~200% em relação aos cultivos sob potência de luz constante. A funcionalidade de controlar de forma independente a intensidade e os comprimentos de onda que alimentam o fotobiorreator permite a otimização da composição bioquímica das células no bioprocessos. No presente estudo, a iluminação com lumostática oferecida pelo controlador *Fuzzy* em luz azul aumentou a concentração de proteína em 231% quando comparada à luz branca comum em culturas de microalgas. Além disso, foram obtidas proteínas 23% maiores para o sistema controlado em relação ao não controlado, ambos em luz azul. Assim, este estudo impulsiona pesquisas na área de bioprocessos fotossintéticos, especialmente aqueles envolvendo culturas de microalgas em fotobiorreatores em busca de compostos de alto valor que necessitam de condições controladas. Além de aumentar a produtividade das células e proteínas, o sistema de controle também reduz o consumo de energia elétrica, pois emite apenas a potência necessária em relação à fase do processo, ou seja, em baixa concentração celular a potência luminosa será minimizada e aumentada gradativamente em função do crescimento e do sombreamento natural devido à presença de mais células no meio de cultura.

CAPÍTULO 8- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contemplou uma lacuna em relação à produção de microalgas, propondo um controlador policromático automático que raras vezes foi desenvolvido para ser utilizado nos processos microalgais, aplicando a lógica Fuzzy para desempenhar esta função. Foi também incorporado a este controlador uma nova funcionalidade, que permite a seleção do comprimento ou a mistura de comprimentos de onda irradiados, o que acarreta além de um aumento na produtividade, advindo do ambiente de luz ideal fornecido pelo controlador às microalgas, o direcionamento da composição bioquímica das células microalgais cultivadas, otimizando ainda mais os resultados que já eram muito expressivos mesmo sem a nova funcionalidade, 200% de aumento na produtividade celular.

A grande problemática da produção de microalgas está nos altos custos desse processo, implicando em relação custo/benefício desfavorável, o que prejudica o interesse da indústria biotecnológica quanto a esses microrganismos. Contudo, pode-se contribuir com informações para reduzir tal limitação por meio de estudos que objetivem otimizar o processo de produção, minimizando custos e aumentando a produtividade microalgal. Os bioprocessos em geral superaram essa barreira através da tecnologia, desenvolvendo controladores automáticos baseados em lógicas de controle renomadas, dedicados a manter o ambiente o mais próximo do ideal possível e proporcionando crescimentos otimizados de diversas espécies. Também é um contribuidor à otimização de bioprocessos, a compreensão biológica e bioquímica das espécies cultivadas.

O Capítulo 3 apresenta opções de “*hardware*” para um cultivo de baixo custo através do desenvolvimento do painel luminoso constituído por LEDs, como também pelo desenvolvimento do sistema responsável pela manipulação da potência da fonte luminosa e do condensador utilizada no fotobiorreator. Todo esse conjunto foi desenvolvido com componentes eletrônicos baratos e que minimizam o valor final da produção.

O Capítulo 4 também reduz os custos finais através do sistema de inferência PAR desenvolvido neste trabalho, o qual apresentou excelentes resultados quando comparado ao sistema comercial, com correlações quadráticas lineares acima de 0,999, estabilidade de mais de 140 horas de uso contínuo em medições *online* e com custo estimado de implantação da ordem de US \$ 50, aproximadamente 10 vezes menor do que o custo dos sensores comerciais. Além de oferecer dados de intensidade de luz em tempo real durante os processos de produção de microalgas, o sistema permitiu também que o controle lógico fosse facilmente implementado. Isso foi possível pois um único controlador Arduino pode manipular a intensidade luminosa emitida por meio de um painel luminoso manipulável. Outra vantagem que esse sistema apresentou foi a facilidade de acesso aos dados, por meio do software livre próprio do Arduino,

o que permite a integração quase automática com outro software como o LabVIEW, amplamente utilizado para implementação de programas de controle industrial.

O Capítulo 5, por sua vez, considerou o desenvolvimento e o registro junto ao INPI, da ferramenta de monitoramento e controle, de suma importância, desenvolvida para ser utilizada junto ao fotobiorreator durante os processos de produção microalgais. Através dela os dados de todos os sensores a cada minuto de cultivo foram salvos, além de alimentarem o controlador policromático, que teve toda a sua inteligência implementada em Arduino, permitindo ainda que o usuário utilize essas informações para desenvolvimento de outras ferramentas que possam enriquecer o processo de produção. Portanto, todos os dados de luz apresentados nesta Tese, são advindos dos arquivos fornecido pelo Supersys_PHOTO® como também os principais resultados de otimização de produtividade, que só foram possíveis graças a utilização desta nova ferramenta que desenvolvemos.

No Capítulo 6, a caracterização dos efeitos sentidos pela microalga *Scenedesmus obliquus* em função do comprimento de onda foram compreendidos. As taxas máximas de crescimento não foram afetadas pelos comprimentos, mantendo constante o crescimento populacional independente da qualidade da luz oferecida. Os parâmetros fotossintéticos indicaram que as qualidades de luz testadas não afetam a fotossíntese para a *Scenedesmus obliquus*. Também apontando uma ferramenta de fácil implementação, mas muito potente em relação à otimização da produção de proteínas para esta espécie, bastando apenas a modificação do comprimento de onda oferecido à cultura. A luz azul foi identificada como o melhor comprimento de onda a ser oferecido a *Scenedesmus obliquus* quando o objetivo é maximizar a produção de proteínas totais na biomassa. Quando o objetivo é a produção de carboidratos, todas as qualidades de luz testadas são indicadas, exceto a luz azul. Para a produção de carotenoides, a luz branca é mais promissora, pois teve vantagem sobre a luz vermelha e azul mista em 39,10% e sobre a luz vermelha em 34,52%.

Já no Capítulo 7, a fim de otimizar a produção microalgal, utilizou-se de todos os Capítulos anteriores e desenvolvemos o controlador PAR, que é uma contribuição para a comunidade científica que ainda estuda formas de viabilizar bioprocessos que envolvam a produção de microalgas e seus derivados. O controlador desenvolvido possibilitou um aumento na produtividade celular e na clorofila a de ~ 200% em relação às culturas sob potência de luz incidente constante. A funcionalidade de controlar de forma independente a intensidade e os comprimentos de onda que alimentam o fotobiorreator permitiu, além de um aumento de produtividade, a otimização da composição bioquímica das células no bioprocessos. No presente estudo, a iluminação lumostática automática oferecida pelo controlador Fuzzy na luz azul aumentou a concentração total de proteínas em 231% quando comparada à luz branca comum em culturas de microalgas. Além disso, um aumento de 23% em proteínas foi obtido para o sistema controlado em relação ao não controlado, ambos em luz azul. Assim, este estudo direciona

pesquisas na área de bioprocessos fotossintéticos, especialmente aqueles envolvendo culturas de microalgas em fotobiorreatores na busca de compostos de alto valor que necessitem de condições controladas. Além de aumentar a produtividade celular e proteica, o sistema de controle também reduziu o consumo de energia elétrica, através da emissão apenas da potência necessária em relação à fase de crescimento, ou seja, em baixa concentração celular a potência da luz será minimizada e gradativamente aumentada com o crescimento populacional e sombreamento natural devido à presença de mais células no meio de cultura.

Portanto, de modo geral, esta pesquisa em muito contribuiu com o desenvolvimento de processos e sua automatização para cultivos microalgais, abrindo caminho para uma ampliação de escala de cultivo com relação custo/benefício favorável.

CAPÍTULO 9- REFERÊNCIAS

- AASLYNG, Jesper M.; ROSENQVIST, Eva; HØGH-SCHMIDT, Kristian. A sensor for microclimatic measurement of photosynthetically active radiation in a plant canopy. **Agricultural and Forest Meteorology**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 189–197, 1999. DOI: 10.1016/s0168-1923(99)00057-x.
- ABIUSI, Fabian; SAMPIETRO, Giacomo; MARTURANO, Giovanni; BIONDI, Natascia; RODOLFI, Liliana; D’OTTAVIO, Massimo; TREDICI, Mario R. 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. DOI: 10.1002/bit.25014.
- ADAMS, Curtis; BUGBEE, Bruce. Nitrogen retention and partitioning at the initiation of lipid accumulation in nitrogen-deficient algae. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 356–365, 2014. DOI: 10.1111/JPY.12167. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/jpy.12167>. Acesso em: 13 ago. 2021.
- AKITSU, Tomoko; NASAHARA, Kenlo Nishida; HIROSE, Yasuo; IJIMA, Osamu; KUME, Atsushi. Quantum sensors for accurate and stable long-term photosynthetically active radiation observations. **Agricultural and Forest Meteorology**, [S. l.], v. 237–238, p. 171–183, 2017. DOI: 10.1016/j.agrformet.2017.01.011.
- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2013.04.072.
- 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. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1968.tb04667.x.
- ALLEN, Mary Mennes; 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. DOI: 10.1099/00221287-51-2-199.
- ANDERSSON, M.; SCHUBERT, H.; PEDERSÉN, M.; SNOEIJIS, P. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. **Marine Biology** 2006 149:3, [S. l.], v. 149, n. 3, p. 653–665, 2006. DOI: 10.1007/S00227-005-0174-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00227-005-0174-3>. Acesso em: 20 set. 2021.

- ANDRADE, G. ...; BERENGUEL, M.; GUZMAN, L. ...; PAGANO, D. ...; ACÍEN, F. ...
Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, [S. l.], v. 37, p. 58–69, 2016.
- ATTA, Madiha; IDRIS, Ani; BUKHARI, Ataulah; WAHIDIN, Suzana. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 148, p. 373–378, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.162.
- BABA, Masato; KIKUTA, Fumie; SUZUKI, Iwane; WATANABE, Makoto M.; SHIRAIWA, Yoshihiro. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 109, p. 266–270, 2012. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2011.05.059.
- BANTIS, Filippou; SMIRNAKOU, Sonia; OUZOUNIS, Theoharis; KOUKOUNARAS, Athanasios; NTAGKAS, Nikolaos; RADOGLU, Kalliopi. Current status and recent achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs). **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 235, p. 437–451, 2018. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.02.058.
Disponível em: <https://research.wur.nl/en/publications/current-status-and-recent-achievements-in-the-field-of-horticultu>. Acesso em: 14 maio. 2021.
- BASHEER, Ashraf Ali; SUBRAMANIAM, Pushpavanam. Hydrodynamics , mixing and selectivity in a partitioned bubble column. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 187, p. 261–274, 2012. DOI: 10.1016/j.cej.2012.01.078. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.078>.
- BELTRAN, L. M. Web Control and Monitoring System: Experimentation with *Haematococcus Pluvialis*. **International Journal of Engineering**, [S. l.], v. 26, n. 3(C), 2013. DOI: 10.5829/idosi.ije.2013.26.03c.01.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. **Biochemistry**. Fifth ed. New York.
- BERNSTEIN, Hans C.; KONOPKA, Allan; MELNICKI, Matthew R.; HILL, Eric A.; KUCEK, Leo A.; ZHANG, Shuyi; SHEN, Gaozhong; BRYANT, Donald A.; BELIAEV, Alexander S. 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. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00488.
- BEZERRA, Raquel Pedrosa; MONTOYA, Erika Yuliana Ortiz; SATO, Sunao; PEREGO, Patrizia; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro; CONVERTI, Attilio. Effects of light

intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. A kinetic Monod-type approach. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 3215–3219, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.009.

BLANKEN, Ward; CUARESMA, Maria; WIJFFELS, René H.; JANSSEN, Marcel. **Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost** *Algal Research* Elsevier, , 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.004.

BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae : ponds , tanks , tubes and fermenters. [S. l.], v. 70, p. 313–321, 1999.

BOROWITZKA, Michael A. **High-value products from microalgae-their development and commercialisation** *Journal of Applied Phycology* Springer, , 2013. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9. Disponível em: [https://link.springer-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10811-013-9983-9](https://link.springer.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10811-013-9983-9). Acesso em: 7 jun. 2021.

BOROWITZKA, Michael A.; HUISMAN, John M.; OSBORN, Ann. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. **Journal of Applied Phycology** 1991 3:4, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 295–304, 1991. DOI: 10.1007/BF02392882. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02392882>. Acesso em: 12 jul. 2021.

BOROWITZKA, Michael A.; MOHEIMANI, Navid R. **Algae for biofuels and energy**. [s.l.] : Springer Netherlands, 2013. DOI: 10.1007/978-94-007-5479-9.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1006/ABIO.1976.9999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>. Acesso em: 12 jul. 2021.

BREDDA, Eduardo Henrique; DA SILVA, Aneirson Francisco; SILVA, Messias Borges; DA RÓS, Patrícia Caroline Molgero. 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. DOI: 10.1080/10826068.2019.1697936.

CAHOON, A. Bruce; TIMKO, Michael P. Biochemistry and Regulation of Chlorophyll Biosynthesis. *In*: LARKUM, Anthony W. D.; DOUGLAS, Susan E.; RAVEN, John A. (org.). **Photosynthesis in Algae**. [s.l: s.n.]. p. 95–131. DOI: 10.1007/978-94-007-1038-2_6.

CAMPANI, Gilson; RIBEIRO, Marcelo P. A.; ZANGIROLAMI, Teresa C.; LIMA, Fernando V. A hierarchical state estimation and control framework for monitoring and dissolved oxygen

regulation in bioprocesses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. Submitted, 2018.

CARVALHO, Ana P.; SILVA, Susana O.; BAPTISTA, José M.; MALCATA, F. Xavier. **Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-3047-8.

CASTRUCCI, P. L.; BITTAR, A.; SALES, R. .. **Controle Automático**. Rio de Janeiro, RJ: Editora GEN/LTC, 2011.

CHEN, Hua-Bing; WU, Jiun-Yan; WANG, Chin-Feng; FU, Chun-Chong; SHIEH, Chwen-Jen; CHEN, Chih-I.; WANG, Chih-Yu; LIU, Yung-Chuan. Modeling on chlorophyll a and phycoerythrin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 53, p. 52–56, 2010. a. DOI: 10.1016/j.bej.2010.09.004.

CHEN, Hua Bing; WU, Jiun Yan; WANG, Chin Feng; FU, Chun Chong; SHIEH, Chwen Jen; CHEN, Chih I.; WANG, Chih Yu; LIU, Yung Chuan. Modeling on chlorophyll a and phycoerythrin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 52–56, 2010. b. DOI: 10.1016/J.BEJ.2010.09.004.

CHEN, Xue; GOH, Qianru Yvonne; TAN, Weifeng; HOSSAIN, Iqbal; CHEN, Wei Ning; LAU, Raymond. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 10, p. 6005–6012, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.061.

CHENG-WU, Zhang; ZMORA, Odi; KOPEL, Reuven; RICHMOND, Amos. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). **Aquaculture**, [S. l.], v. 195, p. 35–49, 2001.

CHENG-YAU, T.; NIK, M. N. S.; SOH, K. L.; SIEW-MOI, P. ., *Chlorella* biomass production in annular photobioreactor using palm oil mill effluent (POME): effect of hydrodynamics and mass transfer, irradiance, aeration rate and POME concentration. **Journal of oil palm research**, [S. l.], v. 28(2), p. 496–509, 2016.

CHOI, Su-Lim; SUH, In Soo; LEE, Choul-Gyun. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 403–409, 2003. a. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00137-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903001376>. Acesso em: 6 abr.

2019.

CHOI, Su Lim; SUH, In Soo; LEE, Choul Gyun. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. *In: ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY 2003b, Anais [...]*. : Elsevier Inc., 2003. p. 403–409. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00137-6.

COSTA, Benjamin Schellenberger; JUNGANDREAS, Anne; JAKOB, Torsten; WEISHEIT, Wolfram; MITTAG, Maria; WILHELM, Christian. Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 483–493, 2013. DOI: 10.1093/jxb/ers340. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers340>. Acesso em: 26 dez. 2020.

CUARESMA, María; JANSSEN, Marcel; VÍLCHEZ, Carlos; WIJFFELS, René H. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 104, n. 2, p. 352–359, 2009. DOI: 10.1002/bit.22394. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517522>. Acesso em: 6 abr. 2019.

DALLAIRE, V.; LESSARD, P.; VANDENBERG, G.; NOÛE, J. De. Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. [S. l.], v. 98, p. 1433–1439, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.043.

DAS, Probir; LEI, Wang; AZIZ, Sarah; OBBARD, Jeffrey Philip. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.102.

DAS, Probir; LEI, Wang; AZIZ, Siti Sarah; OBBARD, Jeffrey Philip. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 3883–3887, 2011. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2010.11.102.

DENIZ, Irem; DEMIREL, Zeliha; IMAMOGLU, Esra; DALAY, Meltem Conk. Enhanced microalgal lipid production in internally illuminated airlift photobioreactor. **Marine Technology Society Journal**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 38–45, 2019. DOI: 10.4031/MTSJ.53.2.4.

DIETZSCH, Christian; SPADIUT, Oliver; HERWIG, Christoph. On-line multiple component analysis for efficient quantitative bioprocess development. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 163, n. 4, p. 362–370, 2013. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2012.03.010.

EIA, U. S. Energy Information Administration. **Electric Power Monthly - U.S. Energy Information Administration (EIA)**. 2021. Disponível em:

https://www.eia.gov/electricity/monthly/epm_table_grapher.php?t=epmt_5_6_a. Acesso em: 2 jul. 2021.

ELOKA-EBOKA, A. C.; INAMBAO, F. Effects of CO₂ sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. **Applied Energy**, [S. l.], v. 195(1), p. 1100–1111, 2017.

EMBLEY, T. Martin; MARTIN, William. **Eukaryotic evolution, changes and challenges** Nature Publishing Group, , 2006. DOI: 10.1038/nature04546.

EMERSON, Robert; LEWIS, Charlton M. I. The Dependence of the Quantum Yield of Chlorella Photosynthesis on Wave Length of Light. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 165–178, 1943.

ENRÍQUEZ, Susana; BOROWITZKA, Michael A. The Use of the Fluorescence Signal in Studies of Seagrasses and Macroalgae. *In: Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. [s.l.] : Springer Netherlands, 2010. p. 187–208. DOI: 10.1007/978-90-481-9268-7_9.

ERIKSEN, Niels T.; GEEST, Torben; IVERSEN, J. J. Lønsmann. Phototrophic growth in the lumostat: A photo-bioreactor with on-line optimization of light intensity. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 8, n. 4–5, p. 345–352, 1996. DOI: 10.1007/BF02178577.

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

FALKOWSKI, PG; KOLBER, Z. Variations in Chlorophyll Fluorescence Yields in Phytoplankton in the World Oceans. **Functional Plant Biology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 341–355, 1995. DOI: 10.1071/PP9950341. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/fp/pp9950341>. Acesso em: 24 ago. 2021.

FERREIRA, T. B.; GONZÁLEZ, J. ..; FERNANDES, A. L. .. Effect of carbon dioxide and sunlight on algae biomass produced in laminar photobioreactor. **Ambiente e Água**, [S. l.], p. 601–611, 2016.

FIGUEROA, Félix L.; AGUILERA, José; NIELL, F. Xavier. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). **European Journal of Phycology**, [S. l.], v. 30, n. 1, 1995. DOI: 10.1080/09670269500650761. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670269500650761>. Acesso em: 15 set. 2021.

FITZMAURICE, Brianna C.; APPLEBY-THOMAS, Gareth J.; PAINTER, Jonathan D.; WOOD, David C.; HAZAEL, Rachael. The effects of quasi-one-dimensional shock on

Escherichia coli while controlling pressure and temperature. **Icarus**, [S. l.], v. 359, p. 114221, 2021. DOI: 10.1016/j.icarus.2020.114221.

FRANCO, María Cuaresma; BUFFING, Marieke F.; JANSSEN, Marcel; LOBATO, Carlos Vilchez; WIJFFELS, R. H. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 693–699, 2012. DOI: 10.1007/s10811-011-9687-y.

FREITAS, H. F. S.; ANDRADE, C. G. M. A brief review on biotechnological process sensing. **2015 IEEE 12th International Conference on Electronic Measurement and Instruments, ICEMI 2015**, [S. l.], v. 3, p. 1622–1627, 2016. DOI: 10.1109/ICEMI.2015.7494490.

FU, Weiqi; GUOMUNDSSON, Ólafur; PAGLIA, Giuseppe; HERJÓLFSSON, Gísli; ANDRÉSSON, Ólafur S.; PALSSON, Bernhard O.; BRYNJÓLFSSON, Sigurour. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 6, p. 2395–2403, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-4502-5.

GALÈS, Amandine et al. Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO₂ fixation improvement in intensive cultures. **Journal of CO₂ Utilization**, [S. l.], v. 38, p. 187–193, 2020. DOI: 10.1016/j.jcou.2020.01.019.

GAO, Feng; LI, Chen; YAN, Zhao-Hui; ZENG, Guang-Ming; FENG, Li-Juan; LIU, Jun-zhi; LIU, Mei; CAI, Hui-wen. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. **Ecological Engineering**, [S. l.], v. 92, p. 55–61, 2016.

GEHAN, O.; PIGEON, E.; MENARD, T.; MOSRATI, R.; POULIQUEN, M.; FALL, L. M.; REUTER, J. Dissolved oxygen level output feedback control based on discrete-time measurements during a *Pseudomonas putida* mt-2 fermentation. **Journal of Process Control**, [S. l.], v. 79, p. 29–40, 2019. DOI: 10.1016/j.jprocont.2018.10.004.

GEST, Howard. History of the word photosynthesis and evolution of its definition.

Photosynthesis Research 2002 73:1, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 7–10, 2002. DOI:

10.1023/A:1020419417954. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020419417954>. Acesso em: 24 ago. 2021.

GLINDKAMP, Anne; RIECHERS, Daniel; REHBOCK, Christoph; HITZMANN, Bernd; SCHEPER, Thomas; REARDON, Kenneth F. Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [S. l.], v. 115, p. 145–169,

2009. DOI: 10.1007/10_2009_10. Disponível em:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2009_10. Acesso em: 25 out. 2021.

GOMIDE, Fernando; GUDWIN, Ricardo. Modelagem, Controle, Sistemas e Lógica Fuzzy.

SBA Controle & Automação, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 97–115, 1994. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/c4ea/4484bdd2449053d7b7384b05c0e2def86449.pdf>.

GONZÁLEZ-CAMEJO, J.; BARAT, R.; PACHÉS, M.; MURGUI, M.; SECO, A.; FERRER, J.

Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. **Environmental Technology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 503–515, 2018. DOI: 10.1080/09593330.2017.1305001.

GOSS, Reimund; LEPETIT, Bernard. Biodiversity of NPQ. **Journal of Plant Physiology**, [S.

l.], v. 172, p. 13–32, 2015. DOI: 10.1016/J.JPLPH.2014.03.004.

GRIS, Barbara; MOROSINOTTO, Tomas; GIACOMETTI, Giorgio M.; BERTUCCO, Alberto;

SFORZA, Eleonora. 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. DOI:

10.1007/S12010-013-0679-Z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24371003/>.

Acesso em: 15 set. 2021.

GROBBELAAR, Johan U.; NEDBAL, Ladislav; TICHÝ, Vladimír. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae

photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation.

Journal of Applied Phycology 1996 8:4, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 335–343, 1996. DOI:

10.1007/BF02178576. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02178576>.

Acesso em: 25 ago. 2021.

GUEDES, V. C. **Desenvolvimento e Avaliação da Transferência de Massa, Transferência de Calor e dos Parâmetros Hidrodinâmicos de Fotobiorreator “Airlift” Estreito de Placas Planas para Produção de Microalgas**. 2017. Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2017.

HALLIDAY, David; RESNICK, Robert; WALKER, Jearl. **Fundamentos de Física. Ótica e física moderna**. [s.l.: s.n.].

HAN, Pei pei; SHEN, Shi gang; WANG, Hui Yan; YAO, Shun yu; TAN, Zhi lei; ZHONG,

Cheng; JIA, Shi ru. 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. DOI: 10.1007/s10811-016-0963-8.

HAN, Sang-II; KIM, Sok; LEE, Changsu; CHOI, Yoon-E. Blue-Red LED wavelength shifting strategy for enhancing beta-carotene production from halotolerant microalga, *Dunaliella salina*. **Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 101–106, 2019. DOI: 10.1007/s12275-019-8420-4.

HARMS, Peter; KOSTOV, Yordan; RAO, Govind. Bioprocess monitoring. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 124–127, 2002. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00295-1.

HAVLIK, Ivo; LINDNER, Patrick; SCHEPER, Thomas; REARDON, Kenneth F. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 406–414, 2013. DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2013.04.005.

HONDA, R.; TERAOKA, Y.; NOGUCHI, M.; YANG, S. Optimization of Hydraulic Retention Time and Biomass Concentration in Microalgae Biomass Production from Treated Sewage with a Membrane Photobioreactor. **Journal of water and environment technology**, [S. l.], v. 15(1), p. 1–11, 2017.

HUESEMANN, M. H.; VAN WAGENEN, J.; MILLER, T.; CHAVIS, A.; HOBBS, S.; CROWE, B. 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. DOI: 10.1002/bit.24814.

HWANG, Jae Hoon; MAIER, Nicholas. Effects of LED-controlled spatially-averaged light intensity and wavelength on *Neochloris oleoabundans* growth and lipid composition. **Algal Research**, [S. l.], v. 41, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101573.

IASIMONE, F.; PANICO, A.; DE FELICE, V.; FANTASMA, F.; IORIZZI, M.; PIROZZI, F. Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 223, 2018. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.024.

IFRIM, George Adrian; TITICA, Mariana; BOILLEREAUX, Lionel; CARAMAN, Sergiu. Feedback linearizing control of light-to-microalgae ratio in artificially lighted photobioreactors. *In: IFAC PROCEEDINGS VOLUMES (IFAC-PAPERSONLINE) 2013, Anais [...]. : IFAC Secretariat, 2013. p. 169–174. DOI: 10.3182/20131216-3-IN-2044.00038.*

IHNKEN, Sven; EGGERT, Anja; BEARDALL, John. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. **Aquatic Botany**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 185–194, 2010. DOI: 10.1016/J.AQUABOT.2010.07.002.

IMAIZUMI, Yuki; NAGAO, Norio; YUSOFF, Fatimah Md; KUROSAWA, Norio; KAWASAKI, Nobuyuki; TODA, Tatsuki. Lumostatic operation controlled by the optimum

light intensity per dry weight for the effective production of *Chlorella zofingiensis* in the high cell density continuous culture. **Algal Research**, [S. l.], v. 20, p. 110–117, 2016. DOI: 10.1016/j.algal.2016.09.015.

IZADPANAHAH, Mahsa; GHESHLAGHI, Reza; AKHAVAN MAHDAVI, Mahmood; ELKAMEL, Ali. Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. **Algal Research**, [S. l.], v. 29, p. 154–158, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.029.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem Physiol Pflanz BPP**, [S. l.], 1975.

JENZSCH, Marco; GNOTH, Stefan; KLEINSCHMIDT, Martin; SIMUTIS, Rimvydas; LÜBBERT, Andreas. Improving the batch-to-batch reproducibility in microbial cultures during recombinant protein production by guiding the process along a predefined total biomass profile. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 2006 29:5, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 315–321, 2006. DOI: 10.1007/S00449-006-0080-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-006-0080-1>. Acesso em: 25 out. 2021.

JONES, H. G. **Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Physiology**. 2. ed. [s.l.] : Cambridge University Press, 1992.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002. DOI: 10.1007/s00244-001-0027-0.

JUNEJA, Ankita; CEBALLOS, Ruben Michael; MURTHY, Ganti S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. **Energies**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 4607–4638, 2013. DOI: 10.3390/EN6094607. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1073/6/9/4607/htm>. Acesso em: 15 set. 2021.

JUNG, Jang-Hyun; SIRISUK, Phunlap; RA, Chae Hun; KIM, Jong-Myung; JEONG, Gwi-Taek; KIM, Sung-Koo. Effects of green LED light and three stresses on biomass and lipid accumulation with two-phase culture of microalgae. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 77, p. 93–99, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.11.014.

KAMALANATHAN, Manoj; DAO, Ly Hai Thi; CHAISUTYAKORNA, Panjaphol; GLEADOW, Ros; BEARDALL, John. Photosynthetic physiology of *Scenedesmus* sp.

(Chlorophyceae) under photoautotrophic and molasses-based heterotrophic and mixotrophic conditions. <https://doi.org/10.2216/17-45.1>, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 666–674, 2019. DOI: 10.2216/17-45.1. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2216/17-45.1>. Acesso em: 22 set. 2021.

KAMIYA, Akio; SAITOH, Takeshi. Blue-light-control of the uptake of amino acids and of ammonia in *Chlorella* mutants. **Physiologia Plantarum**, [S. l.], v. 116, n. 2, p. 248–254, 2002. DOI: 10.1034/J.1399-3054.2002.1160215.X. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1034/j.1399-3054.2002.1160215.x>. Acesso em: 6 ago. 2021.

KATSUDA, Tomohisa; LABABPOUR, Abdolmajid; SHIMAHARA, Kazumichi; KATOH, Shigeo. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 81–86, 2004. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016.

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. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120144. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451781>. Acesso em: 6 mar. 2020.

KIM, Chul Woong; SUNG, Min-Gyu; NAM, Kibok; MOON, Myounghoon; KWON, Jong-Hee; YANG, Ji-Won. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 159, p. 30–35, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.024.

KIM, Tae Hyeong; LEE, Yunhee; HAN, Su Hyun; HWANG, Sun Jin. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 130, p. 75–80, 2013. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.11.134.

KIRK, John T. O. **Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems**. [s.l.] : Cambridge University Press, 1994. v. 16 DOI: 10.1017/CBO9780511623370. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/light-and-photosynthesis-in-aquatic-ecosystems/C19B28AE07B1CDEBDA5593194DE4E304>. Acesso em: 13 ago. 2021.

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. DOI: 10.13031/2013.36277.

KOMMAREDDY, A.; ANDERSON, G. Study of light requirements of a photobioreactor. *In*:

NORTH CENTRAL ASAE/CSAE CONFERENCE PRESENTATION MB04-111 2004, Winnipeg, USA. **Anais** [...]. Winnipeg, USA

KOWALLIK, Wolfgang. Blue Light Effects on Respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 51–72, 1982. DOI: 10.1146/ANNUREV.PP.33.060182.000411. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.33.060182.000411>. Acesso em: 14 ago. 2021.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 313–349, 1991. DOI: 10.1146/ANNUREV.PP.42.060191.001525. Disponível em: <https://www-annualreviews-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>. Acesso em: 12 ago. 2021.

KULA, Monika; RYS, Magdalena; MOŹDŹEŃ, Katarzyna; SKOCZOWSKI, Andrzej. Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 57–67, 2014. DOI: 10.1002/elsc.201200184.

KUMAR, Lokesh; MANDAL, Pada Nimai. Pressure control of variable displacement radial piston pump with PID controller. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.01.692.

KWON, Hyeong Kyu; OH, Seok Jin; YANG, Han Soeb; KIM, Dong Myung; KANG, Ik Joon; OSHIMA, Yuji. Laboratory Study for the Phytoremediation of Eutrophic Coastal Sediment Using Benthic Microalgae and Light Emitting Diode (LED). **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, [S. l.], v. 58, p. 417–425, 2013.

LAI, Yi-Chun; KARAM, Amanda L.; SEDEROFF, Heike W.; DUCOSTE, Joel J.; DE LOS, Francis L.; III, Reyes. Relating nitrogen concentration and light intensity to the growth and lipid accumulation of *Dunaliella viridis* in a photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1007/s10811-019-01897-4.

LARKUM, Anthony W. Photosynthesis and Light Harvesting in Algae. In: BOROWITZKA, Michael A.; BEARDALL, John; RAVEN, John A. (org.). **The Physiology of Microalgae**. [s.l.] : Springer International Publishing, 2016. p. 67–87. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2_3.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.],

l.], v. 19, n. 8, p. 1219–1224, 1977. DOI: 10.1002/bit.260190812.

LEE, Ho-Sang; KIM, Z. Hun; JUNG, Sung-Eun; KIM, Jeong-Dong; LEE, Choul-Gyun. Specific Light Uptake Rate Can be Served as a Scale-Up Parameter in Photobioreactor Operations. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], p. 1890–1896, 2006. a.

LEE, Ho-Sang; SEO, Mun Won; KIM, Z. Hun; LEE, Choul Gyun. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic cultures in bubble column photobioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, [*S. l.*], v. 39, n. 3, p. 447–452, 2006. b. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.038.

LEE, Ho Sang; KIM, Z. Hun; PARK, Hanwool; LEE, Choul Gyun. Specific light uptake rates can enhance astaxanthin productivity in *Haematococcus lacustris*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [*S. l.*], v. 39, n. 5, p. 815–823, 2016. DOI: 10.1007/s00449-016-1561-5.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LELIAERT, Frederik; SMITH, David R.; MOREAU, Hervé; HERRON, Matthew D.; VERBRUGGEN, Heroen; DELWICHE, Charles F.; CLERCK, Olivier De. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [*S. l.*], v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012. DOI: 10.1080/07352689.2011.615705. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.615705>. Acesso em: 24 ago. 2021.

LI, Wei; ZHANG, Jili; ZHAO, Tianyi; REN, Jiankang. Experimental study of an indoor temperature fuzzy control method for thermal comfort and energy saving using wristband device. **Building and Environment**, [*S. l.*], v. 187, p. 107432, 2021. DOI: 10.1016/j.buildenv.2020.107432.

LIU, Huan; CHEN, Hongjun; WANG, Shan; LIU, Qing; LI, Sen; SONG, Xueer; HUANG, Jiaojiao; WANG, Xin; JIA, Lishan. Optimizing light distribution and controlling biomass concentration by continuously pre-harvesting *Spirulina platensis* for improving the microalgae production. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 252, p. 14–19, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.046.

LIU, Junhan; YUAN, Cheng; HU, Guangrong; LI, Fuli. 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. DOI: 10.1007/s12010-012-9639-2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415786>. Acesso em: 6 mar. 2020.

LOMBARDI, Ana Teresa; WANGERSKY, Peter J. Influence of phosphorus and silicon on lipia

class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 77, n. 1987, p. 39–47, 1991. DOI: 10.3354/meps077039.

LÓPEZ-CLIMENT, M. F.; ARBONA, V.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; GÓMEZ-CADENAS, A. Effects of cadmium on gas exchange and phytohormone contents in citrus. **Biologia Plantarum** 2011 55:1, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 187–190, 2011. DOI: 10.1007/S10535-011-0028-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10535-011-0028-4>. Acesso em: 20 set. 2021.

LORENZ, R. Tod.; CYSEWSKI, Gerald R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 160–167, 2000. a. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01433-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779900014335>. Acesso em: 1 abr. 2019.

LORENZ, R. Todd; CYSEWSKI, Gerald R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. [S. l.], v. 18, n. April, p. 160–167, 2000. b.

LUNKA, Alex A.; BAYLESS, David J. Effects of flashing light-emitting diodes on algal biomass productivity. **Journal of Applied Phycology** 2013 25:6, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1679–1685, 2013. DOI: 10.1007/S10811-013-0044-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0044-1>. Acesso em: 25 ago. 2021.

MADIGAN, MARTINKO, BENDER, BUCKLEY STAHL. **Microbiologia De Brock**. 14. ed. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://livros-pdf-ciencias-exatas.blogspot.com.br/%0AREvisão>.

MAIRET, Francis; MUÑOZ-TAMAYO, Rafael; BERNARD, Olivier. Adaptive control of light attenuation for optimizing microalgae production. **Journal of Process Control**, [S. l.], v. 30, p. 117–124, 2015. DOI: 10.1016/j.jprocont.2015.03.010.

MARCHETTI, Julie; BOUGARAN, Gaël; JAUFFRAIS, Thierry; LEFEBVRE, Sébastien; ROUXEL, Catherine; SAINT-JEAN, Bruno; LUKOMSKA, Ewa; ROBERT, René; CADORET, Jean Paul. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 109–119, 2013. DOI: 10.1007/s10811-012-9844-y.

MARISCAL, Vicente; HERRERO, Antonia; FLORES, Enrique. Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. **Molecular microbiology**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 1139–1145, 2007. DOI: 10.1111/J.1365-2958.2007.05856.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17645442/>. Acesso em: 24 ago. 2021.

MARKER, Mark; TSAVALOS, Alex J.; YOUNG, Andrew J. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 113–118, 1996. DOI: 10.1016/0922-338X(96)85031-8.

MARKOU, Giorgos. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 172, n. 5, p. 2758–2768, 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-0727-3.

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.

MASOJÍDEK, Jiří; VONSHAK, Avigad; TORZILLO, Giuseppe. Chlorophyll Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures. **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**, [S. l.], p. 277–292, 2010. DOI: 10.1007/978-90-481-9268-7_13. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-9268-7_13. Acesso em: 11 ago. 2021.

MATTHIJS, Hans C. P.; BALKE, Hans; VAN HES, Udo M.; A KROON, Bernd M.; MUR, Luuc R.; BINOT, Roger A. Application of Light-Emitting Diodes in Bioreactors: Flashing Light Effects and Energy Economy in Algal Culture (*Chlorella pyrenoidosa*). [S. l.], v. 50, p. 98–107, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. DOI: 10.1093/JEXBOT/51.345.659. Disponível em: <https://academic-oup-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/jxb/article/51/345/659/652534>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MERCADO, Jesús M.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. Del Pilar; CORREA-REYES, Gabriel; LUBIÁN, Luis; MONTERO, Olimpio; FIGUEROA, Félix L. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. **Aquatic Botany**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 265–277, 2004. DOI: 10.1016/J.AQUABOT.2003.11.004.

MOHSENPOUR, Seyedeh Fatemeh; WILLOUGHBY, Nik. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. **Bioresource Technology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.024.

MÜLLER, Patricia; LI, Xiao-Ping; NIYOGI, Krishna K. Non-Photochemical Quenching. A

Response to Excess Light Energy. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 2001. DOI: 10.1104/PP.125.4.1558. Disponível em:

<https://academic.oup.com/plphys/article/125/4/1558/6097724>. Acesso em: 20 set. 2021.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013. DOI: 10.1093/JXB/ERT208. Disponível em: <https://academic-oup-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/jxb/article/64/13/3983/436509>. Acesso em: 12 ago. 2021.

NELLES, Oliver. Local Linear Neuro-Fuzzy Models: Fundamentals. **Nonlinear System Identification**, [S. l.], p. 341–389, 2001. DOI: 10.1007/978-3-662-04323-3_12. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04323-3_12. Acesso em: 26 ago. 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [s.l.] : ARTMED, 2011. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Principios_de_bioquimica_de_Lehninger.html?id=Ziu4uAAACAAJ&source=kp_book_description&redir_esc=y. Acesso em: 24 abr. 2019.

NUGENT, Jonathan H. A.; PURTON, Saul; EVANS, Michael C. W. Oxygenic Photosynthesis in Algae and Cyanobacteria: Electron Transfer in Photosystems I and II. In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. (org.). **Photosynthesis in Algae**. [s.l.] : Springer, Dordrecht, 2003. p. 133–156. DOI: 10.1007/978-94-007-1038-2_7. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1038-2_7. Acesso em: 25 ago. 2021.

OGATA, K. **Engenharia de Controle Moderno**. 5º ed. [s.l.] : Person, 2010.

OGBONNA, James C.; YADA, Hirokazu; TANAKA, Hideo. Light supply coefficient: A new engineering parameter for photobioreactor design. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 369–376, 1995. DOI: 10.1016/0922-338X(95)94206-7.

ÖGREN, Erling; SJÖSTRÖM, Michael. Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. **Planta**, [S. l.], v. 181, n. 4, p. 560–567, 1990. DOI: 10.1007/BF00193011.

OKUMURA, Chikako; SAFFREENA, Noor; RAHMAN, M. Azizur; HASEGAWA, Hiroshi; MIKI, Osamu; TAKIMOTO, Akira. 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. DOI: 10.1002/ep.11951.

OLGA, Sanchez; JORDI, Mas. Measurement of light absorption and determination of the specific rate of light uptake in cultures of phototrophic microorganisms. **Applied and**

- environmental microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 620–624, 1996. DOI: 10.1128/AEM.62.2.620-624.1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16535243/>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- OXBOROUGH, Kevin; BAKER, Neil R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - Calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 135–142, 1997. DOI: 10.1023/A:1005936823310.
- PARK, Eun-Kyung; Lee, Choul-Gyun; Astaxanthin Production by Haematococcus pluvialis under Various Light Intensities and Wavelengths. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1024–1030, 2001.
- PARKHILL, Jean-Paul; MAILLET, Gary; CULLEN, John J. FLUORESCENCE-BASED MAXIMAL QUANTUM YIELD FOR PSII AS A DIAGNOSTIC OF NUTRIENT STRESS. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 517–529, 2001. DOI: 10.1046/J.1529-8817.2001.037004517.X. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1046/j.1529-8817.2001.037004517.x>. Acesso em: 12 ago. 2021.
- PASSINO, Kevin M.; YURKOVICH, Stephen. **Fuzzy control**. [s.l.] : Addison Wesley Longman, 1998. DOI: 10.1007/978-3-319-02135-5_5.
- PATEL, Anil Kumar; JOUN, Jae Min; HONG, Min Eui; SIM, Sang Jun. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 282, p. 245–253, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.024.
- PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 170, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.088.
- PÉREZ-PAZOS, Jazmín-Vanessa; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, Pablo. Synthesis of neural lipids in Chlorella sp. under different light and carbonate conditions. **C.T.F Cienc. Tecnol. Futuro**, [S. l.], v. 4, 2011.
- PILON, Laurent; BERBEROĞLU, Halil; KANDILIAN, Razmig. **Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae** **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, 2011. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2011.07.004.
- POSTEN, Clemens. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 165–177, 2009. DOI:

10.1002/ELSC.200900003. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elsc.200900003>. Acesso em: 24 ago. 2021.

PRUVOST, J.; LE GOUIC, B.; LEPINE, O.; LEGRAND, J.; LE BORGNE, F. Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 284, p. 850–861, 2016.

QIANG, HU; ZARMI, YAIR; RICHMOND, AMOS. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 165–171, 1998. DOI: 10.1017/s0967026298001632.

RAJA, Rathinam; SHANMUGAM, Hemaiswarya; GANESAN, Venkatesan; CARVALHO, Isabel S. Biomass from Microalgae: An Overview. **Journal of Oceanography and Marine Research**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 7, 2014. DOI: 10.4172/2332-2632.1000118.

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. DOI: 10.6000/1927-3037.2013.02.03.3.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton**. [s.l.] : Cambridge University Press, 2006. DOI: 10.1017/CBO9780511542145. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/ecology-of-phytoplankton/7E14FD43792ECC717C9E90E3519A1803>. Acesso em: 24 ago. 2021.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STAINER, R. Y. 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. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1.

RUYTERS, G. Effects of Blue Light on Enzymes. In: SENGER, H. (org.). **Blue Light Effects in Biological Systems**. [s.l.] : Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. p. 283–301. DOI: 10.1007/978-3-642-69767-8_32. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-69767-8_32. Acesso em: 6 ago. 2021.

SCHULZE, Peter S. C.; BARREIRA, Luísa A.; PEREIRA, Hugo G. C.; PERALES, José A.; VARELA, João C. S. **Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production** **Trends in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2014. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.06.001.

SCHULZE, Peter S. C.; PEREIRA, Hugo G. C.; SANTOS, Tamára F. C.; SCHUELER, Lisa; GUERRA, Rui; BARREIRA, Luísa A.; PERALES, José A.; VARELA, João C. S. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, [S. l.], v. 16, p. 387–398,

2016. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2016.03.034.

SFORZA, E.; SIMIONATO, D.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; MOROSINOTTO, T. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0038975.

SHOAF, W. Thomas; LIUM, Bruce W. **Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide** *Limnology and Oceanography* John Wiley & Sons, Ltd, , 1976. DOI: 10.4319/lo.1976.21.6.0926. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1976.21.6.0926>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SHU, Chin-Hang; TSAI, Chieh-Chung; LIAO, Wei-Hsiu; CHEN, Kun-Yan; HUANG, Hao-Chen. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S. l.], v. 87, n. 5, p. 601–607, 2012. DOI: 10.1002/jctb.2750.

SILVA, André; SILVA, Francisco J. G.; CAMPILHO, Raul D. S. G.; NEVES, Pedro M. P. F. A new approach to temperature control in the extrusion process of composite tire products. **Journal of Manufacturing Processes**, [S. l.], v. 65, p. 80–96, 2021. DOI: 10.1016/j.jmapro.2021.03.022.

SIMÕES, Marcelo Godoy; SHAW, Ian S. **Controle e modelagem Fuzzy**. [s.l.] : Blucher, 2007.

SONOIKE, Kintake. Photoinhibition of photosystem I. **Physiologia Plantarum**, [S. l.], v. 142, n. 1, p. 56–64, 2011. DOI: 10.1111/J.1399-3054.2010.01437.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3054.2010.01437.x>. Acesso em: 20 set. 2021.

SPOLAORE, Pauline; JOANNIS-CASSAN, Claire; DURAN, Elie; ISAMBERT, Arsène. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006. DOI: 10.1263/jbb.101.87.

STANBURY, Peter F.; WHITAKER, Allan; HALL, Stephen J. Chapter 8 - Instrumentation and control. In: **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. [s.l.] : Butterworth-Heinemann, 2017. p. 487–535. DOI: 10.1016/b978-0-08-099953-1.00008-9.

STEPHANOPOULOS, George. **Chemical Process Control: An Introduction to Theory and Practice**. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. Disponível em: <https://www.amazon.com.br/Chemical-Process-Control-Introduction-Practice/dp/0131286293>.

STEPHENS, Evan; ROSS, Ian L.; KING, Zachary; MUSSGUG, Jan H.; KRUSE, Olaf; POSTEN, Clemens; BOROWITZKA, Michael A.; HANKAMER, Ben. **An economic and**

technical evaluation of microalgal biofuels *Nature Biotechnology* Nature Publishing Group, , 2010. DOI: 10.1038/nbt0210-126. Disponível em: <http://www.nature.com/>. Acesso em: 7 jun. 2021.

STEVČIĆ, Čedomir; PULKKINEN, Katja; PIRHONEN, Juhani. Screening of microalgae and LED grow light spectra for effective removal of dissolved nutrients from cold-water recirculating aquaculture system (RAS) wastewater. *Algal Research*, [S. l.], v. 44, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101681.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [S. l.], v. 55, p. 909–941, 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2015.11.026. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115012782>. Acesso em: 18 fev. 2019.

SUH, In Soo; LEE, Sun Bok. Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. *In: JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY 2001, Anais [...]*. : Springer, 2001. p. 381–388. DOI: 10.1023/A:1017979431852. Disponível em: <https://link-springer-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1023/A:1017979431852>. Acesso em: 26 mar. 2021.

SUN, Tianhu; YUAN, Hui; CAO, Hongbo; YAZDANI, Mohammad; TADMOR, Yaakov; LI, Li. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant*, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 58–74, 2018. DOI: 10.1016/J.MOLP.2017.09.010.

TAKAICHI, Shinichi. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1101, 2011. DOI: 10.3390/MD9061101. Disponível em: </pmc/articles/PMC3131562/>. Acesso em: 11 ago. 2021.

TEBBANI, S.; TITICA, M.; IFRIM, G.; CARAMAN, S. Control of the light-to-microalgae ratio in a photobioreactor. *In: PROCEEDINGS OF THE 18TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYSTEM THEORY, CONTROL AND COMPUTING, SINIAIA, ROMANIA 2014, Anais [...]*. [s.l: s.n.] p. 17–19.

TEO, Chee Loong; ATTA, Madiha; BUKHARI, Attaullah; TAISIR, Mohamad; YUSUF, Afendi M.; IDRIS, Ani; BAHRU, Johor. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*, [S. l.], v. 162, p. 38–44, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.113.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2006.

TREDICI, Mario R.; RODOLFI, Liliana; BIONDI, Natascia; BASSI, Niccolò; SAMPIETRO,

Giacomo. Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. **Algal Research**, [S. l.], v. 19, p. 253–263, 2016. DOI:

10.1016/J.ALGAL.2016.09.005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926416303320>. Acesso em: 1 abr. 2019.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. [S. l.], v. 99, p. 4021–4028, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.046.

VALLE, Kristin Collier; NYMARK, Marianne; AAMOT, Inga; HANCKE, Kasper; WINGE, Per; ANDRESEN, Kjersti; JOHNSEN, Geir; BREMBU, Tore; BONES, Atle M. System Responses to Equal Doses of Photosynthetically Usable Radiation of Blue, Green, and Red Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e114211, 2014. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0114211. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114211>. Acesso em: 23 set. 2021.

VEJRAZKA, Carsten; JANSSEN, Marcel; STREEFLAND, Mathieu; WIJFFELS, René H. Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in attenuated, flashing light.

Biotechnology and Bioengineering, [S. l.], v. 109, n. 10, p. 2567–2574, 2012. DOI: 10.1002/bit.24525.

VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring: Part I: In situ sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 1083–1091, 2006. DOI: 10.1016/J.SNB.2005.07.059.

WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.

WHITTON, Rachel; OMETTO, Francesco; VILLA, Raffaella; PIDOU, Marc; JEFFERSON, Bruce. Influence of light regime on the performance of an immobilised microalgae reactor for wastewater nutrient removal. **Algal Research**, [S. l.], v. 44, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101648.

WIJFFELS, René H.; BARBOSA, Maria J. An Outlook on Microalgal Biofuels. **Science**, [S. l.], v. 329, n. 5993, p. 796–799, 2010. DOI: 10.1126/SCIENCE.1189003. Disponível em: <https://science-sciencemag-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/content/329/5993/796>. Acesso em: 7 jun. 2021.

WONG, Y. K.; HO, K. C.; TSANG, Y. F.; WANG, L.; YUNG, K. K. L. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Column Photobioreactor for Biomass Production and Lipid Accumulation. **Water Environment Research**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 40–46, 2016. DOI:

10.2175/106143015X14362865227553. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26803025>. Acesso em: 1 abr. 2019.

XU, Bing; CHENG, Pu; YAN, Cheng; PEI, Haiyan; HU, Wenrong. 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. DOI: 10.1007/s11274-013-1292-6.

YING YING TANG, Doris; SHIONG KHOO, Kuan; WAYNE CHEW, Kit; TAO, Yang; HO, Shih-Hsin; LOKE SHOW, Pau. Potential Utilization of Bioproducts from Microalgae for the Quality Enhancement of Natural Products. **Bioresource Technology**, [S. l.], p. 122997, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122997. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852420302662>. Acesso em: 18 fev. 2020.

YOSHIMURA, Takeshi; OKADA, Shigeru; HONDA, Masaki. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 133, p. 232–239, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.095.

YOSHIOKA, Miwa; YAGO, Takahide; YOSHIE-STARK, Yumiko; ARAKAWA, Hisayuki; MORINAGA, Tsutomu. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 338–341, p. 111–117, 2012. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.01.005.

ZADEH, L. A. Fuzzy sets. **Information and Control**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 338–353, 1965. DOI: 10.1016/S0019-9958(65)90241-X.

ZHAO, Bingtao; SU, Yaxin. **Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2013.11.054.

ZHAO, Xurui; MA, Ruijuan; LIU, Xiaoting; HO, Shih-Hsin; XIE, Youping; CHEN, Jianfeng. Strategies related to light quality and temperature to improve lutein production of marine microalga *Chlamydomonas* sp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 42, p. 435–443, 2018. DOI: 10.1007/s00449-018-2047-4.