



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química – Câmpus Araraquara



PEDRO TITO FERREIRA DA SILVA DIAS

Microalgas para Bioenergia: Seleção e Cultivo Controlado em
Fotobiorreatores

Araraquara/ SP

2024

PEDRO TITO FERREIRA DA SILVA DIAS

Microalgas para Bioenergia: Seleção e Cultivo Controlado em
Fotobiorreatores

Trabalho de conclusão de curso apresentado
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Orientador: Ian Castro-Gamboa

Araraquara/SP

2024

PEDRO TITO FERREIRA DA SILVA DIAS

Microalgas para Bioenergia: Seleção e Cultivo Controlado em
Fotobiorreatores

Trabalho de conclusão de curso apresentado
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Araraquara, 13 de dezembro de 2024

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 IAN CASTRO GAMBOA
Data: 13/12/2024 14:59:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Documento assinado digitalmente
 KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA
Data: 13/12/2024 17:17:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina

Documento assinado digitalmente
 ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO
Data: 13/12/2024 15:48:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho

D541m	Dias, Pedro Tito Ferreira da Silva Microalgas para Bioenergia : Seleção e Cultivo Controlado em Fotobiorreatores / Pedro Tito Ferreira da Silva Dias. -- Araraquara, 2024 63 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Ian Castro-Gamboa 1. Engenharia química. 2. Microalgas. 3. Biomassa. 4. Biorreatores. I. Título.
-------	--

Dedico este trabalho aos meus pais, à quem
eu devo tudo aquilo que sou.

A Beatriz e Luis Tito, por estarem ao meu
lado a todo momento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Mônica e Pedro, por sempre terem me incentivado a seguir os meus sonhos, e pelo carinho que sempre tiveram por mim.

A minha namorada Beatriz, por estar ao meu lado sempre, me aconselhar e dividir comigo os dias mais difíceis.

Aos meus amigos, Bruna Borges, Giulia Machado, Maria Fernanda, William Tonello e Yves Cassiano, por sempre terem me apoiado e aturado durante a graduação e por serem a minha companhia longe de casa por tantos anos.

Aos professores do Instituto de Química de Araraquara, por todo o apoio e conhecimento transmitido ao longo da graduação. Em especial à professora Kelly, por todo o suporte na realização desse trabalho.

Ao professor Ian, por sua mente aberta, atenção e confiança nas minhas ideias, que tornou possível a realização desse trabalho. Obrigado por me dar essa oportunidade.

Ao Grupo de pesquisa NuBBE, que sempre me acolheu e me deu todo o suporte necessário para a pesquisa. Em especial Dr. Juliana Rodrigues e Dr. João Luiz Bronzel Júnior, que sempre estiveram de prontidão para me ajudar no laboratório.

Por fim, agradeço ao Instituto de Química de Araraquara e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro deste trabalho: Processo nº 2021/12246-0.

RESUMO

A produção de combustíveis a partir de fontes renováveis vem se tornando cada vez mais essencial no cenário global, impulsionada pela necessidade de reduzir emissões de carbono e de encontrar alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis. Nesse contexto, o cultivo de biomassa de microalgas surge como uma solução promissora, oferecendo diversas vantagens ambientais e econômicas. A biomassa obtida desses microrganismos é rica em óleo, que pode ser transformado em bio-óleo, um combustível neutro em carbono e de grande interesse econômico para a indústria energética. Além disso, as microalgas possuem altas taxas de produtividade e crescimento, características que favorecem seu cultivo em escala industrial, principalmente em fotobiorreatores. Esses sistemas são projetados para maximizar a produção de biomassa, permitindo um cultivo eficiente e em áreas reduzidas, ao contrário de culturas como a cana-de-açúcar e o eucalipto, que demandam grandes extensões de solo.

Este estudo apresenta um processo de seleção de microalgas de interesse econômico para a produção de biomassa, seguido de seu cultivo em escala laboratorial sob condições de iluminação artificial controlada. Por fim, foi desenvolvido e implementado um sistema de controle simples, com o objetivo de regular a densidade celular de um cultivo de microalgas em um fotobiorreator de bancada.

Palavras-Chave: Microalgas, Bioenergia, Fotobiorreator, Cultivo de biomassa, *Nannochloropsis oculata*.

ABSTRACT

The production of fuels from renewable sources has become increasingly essential in the global landscape, driven by the need to reduce carbon emissions and find sustainable alternatives to fossil fuels. In this context, cultivating microalgae biomass emerges as a promising solution, offering numerous environmental and economic advantages. The biomass obtained from these microorganisms is rich in oil, which can be converted into bio-oil, a carbon-neutral fuel of great economic interest to the energy industry. Furthermore, microalgae exhibit high productivity and growth rates, characteristics that favor their cultivation on an industrial scale, particularly in photobioreactors. These systems are designed to maximize biomass production, enabling efficient cultivation in reduced areas, unlike crops such as sugarcane and eucalyptus, which require large land extensions.

This study presents a process for selecting economically significant microalgae for biomass production, followed by their cultivation at the laboratory scale under controlled artificial lighting conditions. Finally, a simple control system was developed and implemented to regulate the cell density of a microalgae culture in a bench-scale photobioreactor.

Keywords: Microalgae, Bioenergy, Photobioreactor, Biomass cultivation, *Nannochloropsis oculata*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alga verde multicelular	1
Figura 2 - Microalga – <i>Nannochloropsis</i> sp.	2
Figura 3 - Lagoa aberta do tipo raceway	3
Figura 4 - Fotobiorrator de 120L.....	4
Figura 5 - Esquema de um fotômetro com filtro	7
Figura 6 - Cepa de <i>Nannochloropsis oculata</i>	10
Figura 7: Imagem de microscópio (100x) da cepa de microalga escolhida	10
Figura 8 - Sal marinho sintético Reef Salt.....	11
Figura 9 - Soluções estoque para enriquecimento	15
Figura 10: Frasco de cultivo pronto para colheita.....	16
Figura 11: Esquema do processo de cultivo das microalgas.....	17
Figura 12: Arranjo dos cultivos de microalga – sem iluminação.....	17
Figura 13: Arranjo dos cultivos de microalga – com iluminação	17
Figura 14: Testes de floculação imediatamente após adição de floculante e após 30 minutos, em ordem crescente de pH da esquerda para a direita.....	19
Figura 15: Testes de floculação após 1 dia de descanso	19
Figura 16: Imagem de microscópio (100x) - destaque de microalgas isoladas	20
Figura 17: Imagem de microscópio (20x) - suspensão já floculada.....	20
Figura 18: Placa Arduino MEGA ADK.....	21
Figura 19: Módulo com 4 interruptores relé e módulo RTC DS1302	22
Figura 20: Sensor de temperatura à prova de água DS18B20.....	23
Figura 21: Sensor de nível sem contato XKC-Y25-V	24
Figura 22: bomba peristáltica CKP-DC-S08.....	25
Figura 23: Diodo laser.....	25
Figura 24: Fototransistor TEMT6000	26
Figura 25: Sedimentação da biomassa em um funil de separação	29
Figura 26: Filtração da biomassa	30
Figura 27: Esquema do fotômetro proposto	32
Figura 28: Desenho do corpo do fotômetro	32
Figura 29: Fotômetro impresso em 3D desmontado	33
Figura 30: Fotômetro impresso em 3D montado	33

Figura 31: Conjunto de controle construído.....	34
Figura 32: Esquema do teste	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos formatos de fotobiorreator.....	5
Tabela 2 - Meio f/2 - solução de metais traço – 1L	12
Tabela 3 - Meio f/2 - solução de vitaminas – 1L	12
Tabela 4 - Meio f/2 - preparo do meio original – 1L.....	12
Tabela 5 - Meio f/2 - solução de metais traço concentradas – 50 mL	13
Tabela 6 - Meio f/2 - solução de metais traço – 500 mL	13
Tabela 7 - Meio f/2 - solução de vitaminas concentradas – 50 mL	13
Tabela 8 - Meio f/2 - solução de vitaminas – 50 mL.....	14
Tabela 9 - Meio f/2 – solução de macronutrientes – 500mL.....	14
Tabela 10 - Meio f/2 - preparo do meio– 1L	14
Tabela 11 - Dados de produtividade de biomassa relatados na literatura.....	27
Tabela 12 – Dados de porcentagem de lipídios na biomassa relatados na literatura.....	28
Tabela 13 – Massas recuperadas de biomassa.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Breve Contextualização Sobre algas	1
1.1.1. As algas unicelulares.....	2
1.2. Os sistema de cultivo de microalgas	2
1.2.1. Sistemas abertos	2
1.3. separando a biomassa de microalga	5
1.3.1. A floculação da biomassa como método de separação	5
1.4. Acompanhando O cultivo de microalgas	6
1.4.1. O fotômetro	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Seleção da microalga;.....	8
2.2. Cultivo da microalga;	8
2.3. Colheita da biomassa;.....	8
2.4. Sistema de controle;	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.2. A Cepa de microalga	9
3.3. O Meio de Cultura.....	10
3.3.1. Preparação do meio	11
3.4. O cultivo	15
3.5. A Separação da biomassa	18
3.5.1. Parâmetros da floculação	18
3.6. Componentes do sistema de monitoramento	21
3.6.1. O microcontrolador Arduino.....	21
3.6.3. Monitoramento da temperatura	22
3.6.4. Monitoramento de nível	23
3.6.5. Bombeamento de fluido	24
3.6.6. Diodo laser	25
3.6.7. Fototransístor	26
3.7. impressão 3D	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Seleção da espécie de microalga	27

4.2. Cultivo da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	29
4.2.1. Concentração de biomassa alcançada	29
4.3. Construção do sistema de controle	31
4.3.1. O fotômetro	31
4.3.2. O gabinete	34
4.3.3. Rotina seguida pelo microcontrolador	35
4.3.3.1. Controle de iluminação.....	35
4.3.3.2. Controle de nível	35
4.3.3.3. Controle de concentração	35
4.3.4. Teste do sistema construído	36
5. CONCLUSÃO.....	38
Referências BIBLIOGRÁFICAS	40
Apêndice I – código do microcontrolador arduino	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve Contextualização Sobre algas

O termo “alga” foi historicamente utilizado para descrever seres eucariotos fototróficos que não possuem tecidos especializados. Dessa forma, esse termo se refere a seres vivos com características semelhantes, mas que não possuem a mesma origem filogenética, ou seja, as algas formam um grupo polifilético. Embora geralmente associadas a ambientes aquáticos (especialmente marinhos), as algas estão presentes nos mais diversos ambientes, como no solo, em árvores ou em simbiose com outros seres vivos, líquens por exemplo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017).

Figura 1 - Alga verde multicelular



Fonte: (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017).

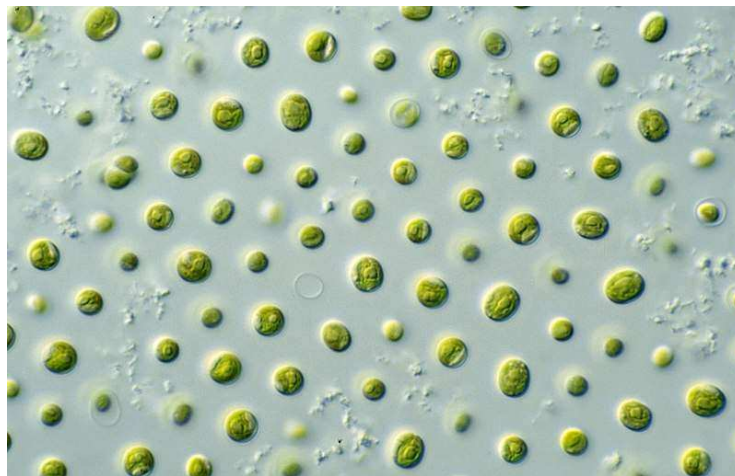
Devido ao caráter diverso do grupo, e para o melhor estudo e entendimento das algas, a divisão entre algas unicelulares e pluricelulares se faz interessante.

O termo comumente utilizado para se referir ao grupo das algas pluricelulares é *macroalga*. O uso comercial de macroalgas já existe há séculos, primeiramente como alimento para gado e fertilizante. Atualmente há uma grande indústria voltada para o consumo humano, tanto dos produtos extraídos das algas (ágar, alginatos, carragenina) quanto para consumo direto, como nori (SPILLING, 2020).

1.1.1. As algas unicelulares

O termo comumente utilizado para se referir às algas unicelulares é microalga. Das algas, são as mais diversas, tanto em número de espécies quanto em presença no ambiente. Embora existam espécies heterotróficas, a maioria esmagadora (e as espécies tratadas nesse trabalho) são fototróficas, ou seja, produzem seu próprio alimento através da luz. Esses organismos são responsáveis por cerca de 50% do oxigênio gerado na Terra, e são considerados a base da cadeia alimentar oceânica (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Figura 2 - Microalga – *Nannochloropsis* sp.



Fonte: CSIRO, 2009.

A biomassa de microalgas já é estudada como uma alternativa viável para a produção de energia limpa e renovável por meio da conversão em biocombustível, em especial para a produção de bio-óleo (PETERSON, VOGEL, *et al.*, 2008) (TORRI, ALBA, *et al.*, 2011).

Algumas das vantagens do cultivo desse tipo de microrganismo para a produção de biomassa são a alta produtividade, composição celular adequada, entretanto, a separação eficiente da biomassa do meio de cultivo ainda é um desafio.

Ainda, diversas espécies possuem alta concentração de lipídios em sua biomassa, tornando-as ótimas candidatas para a conversão em bio-óleo ou biodiesel (SPILLING, 2020).

1.2. Os sistemas de cultivo de microalgas

1.2.1. Sistemas abertos

Os sistemas abertos são classicamente lagoas expostas, agitadas ou não, nas quais as microalgas crescem com a incidência da luz solar. Esse tipo de cultivo é o mais antigo e o mais empregado em aplicações comerciais atualmente. As vantagens dos sistemas abertos são o baixo custo e a fácil manutenção, a energia vem quase exclusivamente da luz solar e muito pouca (ou nenhuma energia) é utilizada para realizar a agitação do meio abaixando os custos drasticamente. Além disso, a construção é simples, barata e facilmente escalonável (SPILLING, 2020).

Figura 3 - Lagoa aberta do tipo *raceway*



Fonte: (SPILLING, 2020).

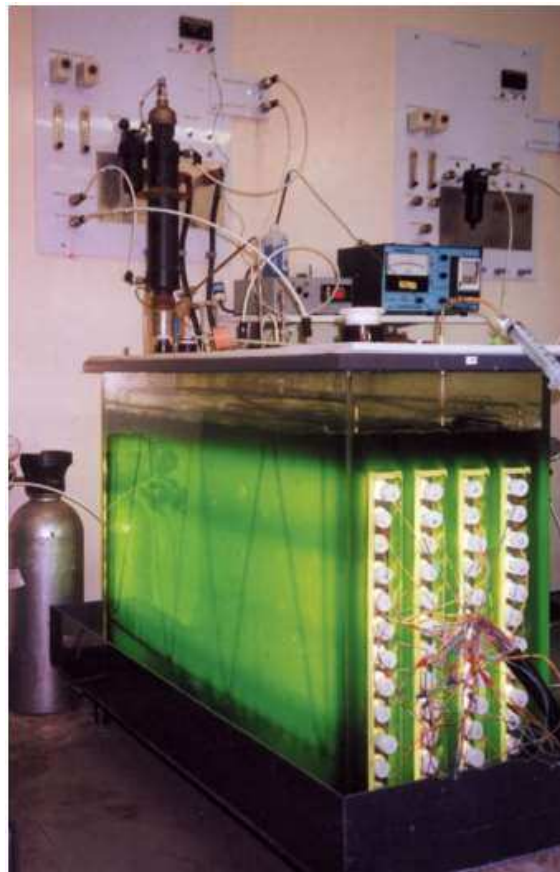
Entretanto, devido à natureza do sistema aberto, é quase impossível controlar aspectos físico-químicos do cultivo, tais como temperatura, pH, incidência de luz, tempo de residência do ar de aeração etc. Isso faz com que esse tipo de cultivo seja pouco eficiente, e inadequado para estudos metabólicos e em escala de bancada.

1.2.2. Sistemas Fechados

No escopo desse trabalho, que se restringe às microalgas fototróficas, os sistemas fechados são representados pelos fotobiorreatores.

Esses equipamentos nada mais são que biorreatores cuja entrada de energia para o cultivo vem principalmente na forma de luz, seja ela solar ou não. Existe uma diversidade de arranjos e construções de fotobiorreatores, mas todos se baseiam em um recipiente transparente no qual incide a luz, e uma série de aeradores, que introduzem o Oxigênio e o gás carbônico necessário para os processos metabólicos das algas (SPILLING, 2020)(ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Figura 4 - Fotobiorrator de 120L



Fonte: (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Diferentemente dos sistemas abertos, os fotobiorreatores tem um custo muito mais elevado de instalação e manutenção, pois possuem sistemas e peças muito mais complexas que as lagoas abertas. Ainda, devido à natureza de um sistema fechado, são necessários sistemas de controle de nível, arrefecimento e agitação muito mais complexos, o que aumentam ainda mais os custos (SPILLING, 2020) (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

A grande vantagem dos sistemas fechados está no controle do processo, um fotobiorreator permite o controle preciso das condições nas quais o cultivo ocorre. Parâmetros como temperatura, aeração, pH, densidade celular e assepsia são passíveis de controle em um sistema fechado. Logo, aplicações nas quais é necessário o controle das

condições de cultivo, como em estudos metabólicos ou na indústria farmacêutica, um fotobiorreator é a opção adequada para a realização do cultivo de microalgas.

Ainda, fotobiorreatores possuem, em geral um de dois formatos básicos, planar ou tubular. Como o nome sugere, reatores planares possuem uma superfície plana na qual a luz incide, e uma razão área-volume grande, ou seja, há uma grande incidência de luz para um pequeno volume de meio de cultura. Já reatores tubulares são basicamente constituídos de um cilindro transparente no qual a cultura de microalgas é aerada por um ou mais borbulhadores de ar. Esse cilindro pode ser orientado tanto na vertical, quanto na horizontal, e essa orientação tem um impacto direto na performance do reator (KUNJAPUR e ELDRIDGE, 2010) (GUPTA, LEE e CHOI, 2015).

Embora não haja consenso na literatura quanto as vantagens e desvantagens de cada um dos modelos de fotobiorreator, algumas considerações são plausíveis:

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos formatos de fotobiorreator

Formato	Vantagens	Desvantagens
Planar	Melhor relação área/volume	Problemas com limpeza
	Baixo acúmulo de O ₂	Controle de temperatura ruim
Tubular vertical	Boa transferência gasosa	Superfície iluminada menor
	Menor área utilizada	Escalonamento limitado
	Boa relação área/volume	Problemas com limpeza
Tubular horizontal	Apropriado para cultivo ao ar livre	Grande área necessária
	Baixo stress hidrodinâmico	Acúmulo de oxigênio

Fonte: Adaptado de (GUPTA, LEE e CHOI, 2015) e (KUNJAPUR e ELDRIDGE, 2010).

1.3. separando a biomassa de microalga

As células de microalgas com diâmetros entre 5 e 50 micrometros formam suspensões estáveis no meio de cultura no qual crescem. Isto representa um grande desafio para o cultivo de biomassa de microalgas, visto que a separação da biomassa do meio de cultura é um passo essencial para o processo. (WU, ZHU, *et al.*, 2012).

1.3.1. A floculação da biomassa como método de separação

Floculação é um processo no qual pequenas partículas em suspensão se agregam, formando grandes aglomerados (flocos) que são mais facilmente separados do líquido no qual se encontram do que as partículas originais. (TADROS, 2013)

Esse processo é amplamente utilizado na indústria nas quais suspensões de sólidos finamente particulados devem ser separadas, como no tratamento de efluentes ou mineração. O processo depende, principalmente, da colisão e adesão de partículas na suspensão, dessa maneira, formam-se agregados de partículas (flocos) que são significativamente maiores que as partículas originais (primárias), facilitando sua separação por métodos físicos como a filtração ou decantação. (TADROS, 2013)

No âmbito do cultivo de biomassa de microalgas, a floculação tem sido estudada como forma de facilitar a extração das células do meio de cultura (SHEN Y, Y. e W., 2013). Em geral, para realizar a coagulação (primeira etapa da separação), é adicionado um agente coagulante, responsável por agregar as partículas sólidas suspensas. Muitas vezes esse agente é um sal catiônico como sulfato de alumínio ou cloreto férrico. Entretanto a desestabilização da suspensão pode ser provocada pela simples mudança de pH (TADROS, 2013) (WU, ZHU, *et al.*, 2012).

1.4. Acompanhando O cultivo de microalgas

Para acompanhar o desempenho e controlar o crescimento de microalgas é preciso inferir ou estimar a quantidade de biomassa presente no meio de cultura. É interessante que essa medição, seja simples, barata, não destrutiva e, se possível, contínua.

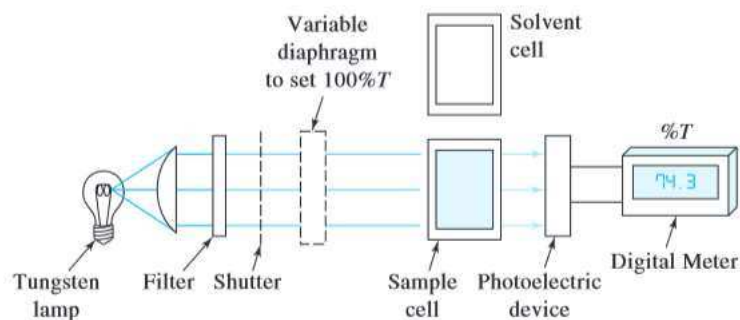
1.4.1. O fotômetro

A luz monocromática, ao passar por um meio transparente, tem sua intensidade atenuada. Essa atenuação é correlacionada a uma característica específica do meio, sua absorvância. Um dos métodos mais tradicionais para se medir a concentração de substâncias em soluções é a análise de absorvância.

Fotômetros são instrumentos simples e relativamente baratos para realizar medições de absorção. Os fotômetros são mais convenientes, robustos e fáceis de manter e usar que os espectrofotômetros sofisticados. Eles têm alta eficiência energética, proporcionando bons

índices de sinal-ruído. São úteis em instrumentos portáteis para uso em campo ou em medições de correntes de fluxo, além de serem empregados em análises quantitativas em laboratórios. (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2016).

Figura 5 - Esquema de um fotômetro com filtro



Fonte: (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2016).

A medição de concentração realizada por um fotômetro baseia-se na lei de Lambert-Beer:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Na qual a absorvância de uma radiação monocromática A é proporcional ao produto de três variáveis: a absorvidade (característica do meio), b a distância percorrida pela luz, c a concentração do analito. Dessa forma, pode-se inferir a concentração de um analito num meio realizado de forma indireta e não destrutiva, apenas medindo-se a intensidade da luz que é atenuada pelo meio com e sem o analito. (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Seleção da microalga;

Escolher a espécie de microalga, mais adequada, para o cultivo de biomassa.

2.2. Cultivo da microalga;

Selecionar o meio de cultura mais apropriado para a espécie escolhida.

Manter uma cultura da microalga selecionada em escala laboratorial.

2.3. Colheita da biomassa;

Criar um procedimento para separação da biomassa.

Calcular a concentração da biomassa que se atingiu no cultivo.

2.4. Sistema de controle;

Construir um equipamento que monitore e controle a concentração de biomassa no meio de cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. A SELEÇÃO DA ESPÉCIE DE MICROALGA

Primeiramente, deve-se estabelecer os parâmetros pelos quais serão elencadas as cepas de microalgas encontradas na literatura. Tendo em mente os objetivos do projeto, isto é, a produção de biomassa adequada para a conversão em biocombustível, duas principais características devem ser levadas em conta:

- a) produtividade de biomassa total: esse valor indica o quanto a microalga pode gerar de biomassa em um dado período, quanto maior for essa produtividade mais eficiente será o processo como um todo;
- b) porcentagem de lipídeos na biomassa final: tendo em mente a utilização da biomassa para a conversão em biocombustível, quanto maior for a produção de óleo das microalgas, maior será a conversão da biomassa em bio-óleo ou biodiesel.

3.2. A Cepa de microalga

A cepa de *Nannochloropsis oculata* foi fornecida pelo Banco de Microrganismos *Aidar & Kutner* (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A cepa foi enviada por correio para o laboratório de microrganismos do NuBBE (Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais), em Araraquara – SP.

Figura 6 - Cepa de *Nannochloropsis oculata*



Fonte: O autor, 2023.

Figura 7: Imagem de microscópio (100x) da cepa de microalga escolhida



Fonte: O autor, 2023.

3.3. O Meio de Cultura

Dada a escolha da espécie *Nannochloropsis oculata*, procurou-se na literatura os meios de cultura nos quais essa espécie de microalga já foi cultivada. Nos trabalhos de

(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON) e de (BORGES) , bem como no BMAK, que forneceu a cepa para este trabalho, o meio utilizado é o f/2 de (GUILLARD).

Esse é um meio enriquecido à base de água marinha esterilizada amplamente utilizado para o cultivo de diversas microalgas marinhas (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004), por ser utilizado pela literatura consultada e já ser um meio amplamente empregado para esse fim determinou-se que o meio f/2 seria o utilizado para o cultivo da cepa de *Nannochloropsis oculata* fornecida pelo BMAK.

3.3.1. Preparação do meio

Dada a escolha do meio f/2, optou-se por seguir o protocolo descrito por (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*). Por se tratar de um meio de enriquecido seria necessária a aquisição e posterior esterilização de água oceânica, entretanto, a aquisição de água oceânica em Araraquara-SP é inviável em quantidades suficientes para realizar o estudo.

Diante disso, optou-se pela utilização de água do mar artificial, disponível comercialmente para aquarismo na forma de sal marinho sintético *Reef Salt - Aquaforest*. Esse produto, o ser dissolvido em água deionizada na proporção correta, imita de maneira adequada a composição mineral da água oceânica, permitindo o preparo do meio escolhido mesmo sem acesso à água do mar.

Figura 8 - Sal marinho sintético Reef Salt



Fonte: O autor, 2023.

Em seguida, as soluções estoque, que enriqueceram a água do mar sintética, devem ser preparadas a base de água deionizada, de acordo com a receita compilada por (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*) sintetizada nas tabelas abaixo. Por não se tratar do cultivo de uma microalga diatomácea, omitiu-se o uso de silicato para reduzir o risco de precipitação e diminuir os custos do preparo.

Tabela 2 - Meio f/2 - solução de metais traço – 1L

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada	Concentração no meio (mol L ⁻¹)
FeCl ₃ · 6H ₂ O	-	3,15 g	1,17 · 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	4,36 g	1,17 · 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180	1 mL	9,10 · 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22	1 mL	7,65 · 10 ⁻⁸
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10	1 mL	4,20 · 10 ⁻⁸
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,8	1 mL	3,93 · 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,3	1 mL	2,60 · 10 ⁻⁸

Fonte: Adaptado de (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Tabela 3 - Meio f/2 - solução de vitaminas – 1L

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada	Concentração no meio (mol L ⁻¹)
Tiamina · HCl (Vit. B ₁)	-	200 mg	2,96 · 10 ⁻⁷
Biotina (Vit. H)	1	1 mL	2,05 · 10 ⁻⁹
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	1	1 mL	3,69 · 10 ⁻¹⁰

Fonte: Adaptado de (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Tabela 4 - Meio f/2 - preparo do meio original – 1L

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada	Concentração no meio (mol L ⁻¹)
NaNO ₃	75	1 mL	8,82 · 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5	1 mL	3,62 · 10 ⁻⁵
Solução de metais	-	1 mL	-
Solução de vitaminas	-	0,5 mL	-

Fonte: Adaptado de (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004).

Para o preparo do meio enriquecido, adiciona-se os componentes nas quantidades indicadas na Tabela 4 a 950 mL de água do mar (no caso artificial), e completa-se o nível até 1 L.

Para facilitar o manejo das soluções preparadas, optou-se por fazer algumas modificações na receita descrita acima.

Para a solução de metais, optou-se por mudar as concentrações das soluções estoque de metais isolados (Mn, Zn, Co, Cu e Mo), para isso apenas 50mL de cada solução foi preparada, com as concentrações indicadas na Tabela 5. Além disso, apenas 500mL de solução estoque foi preparada, a fim de facilitar o manejo.

Tabela 5 - Meio f/2 - solução de metais traço concentradas – 50 mL

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada (g)	Fornecedor
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,310	9,016	Neon
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,160	1,108	Êxodo Científica
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10,082	0,504	Neon
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,820	0,491	Êxodo Científica
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,420	0,321	Neon

Fonte: O autor, 2023.

Essas soluções concentradas foram então utilizadas para o preparo da solução de metais traço:

Tabela 6 - Meio f/2 - solução de metais traço – 500 mL

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada	Fornecedor
FeCl ₃ · 6H ₂ O	-	1,57 g	Êxodo Científica
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	2,18 g	Neon
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,310	0,5 mL	Neon
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,160	0,5 mL	Êxodo Científica
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10,082	0,5 mL	Neon
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,820	0,5 mL	Êxodo Científica
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,420	0,5 mL	Neon

Fonte: O autor, 2023.

Para a solução de vitaminas, por conta do custo dos reagentes e a quantidade utilizada para o preparo do meio final, optou-se por mudar as concentrações das soluções estoque das vitaminas isoladas (tiamina e cianocobalamina). Para isso apenas 50mL de cada solução foi preparada, com as concentrações indicadas na Tabela 7, além disso apenas 250mL de solução de vitamina foi preparado.

Tabela 7 - Meio f/2 - solução de vitaminas concentradas – 50 mL

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada (mg)	Fornecedor
Tiamina · HCl (Vit. B ₁)	40,000	20,00 · 10 ²	Neon
Biotina (Vit. H)	0,514	25,700	Êxodo Científica
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	0,560	28,000	Êxodo Científica

Fonte: O autor, 2023.

Em seguida, essas soluções foram usadas para preparar a solução de vitaminas utilizada para o enriquecimento:

Tabela 8 - Meio f/2 - solução de vitaminas – 50 mL

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada (ml)	Fornecedor
Tiamina · HCl (Vit. B ₁)	40,000	0,25	Neon
Biotina (Vit. H)	0,514	0,10	Êxodo Científica
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	0,560	0,10	Êxodo Científica

Fonte: O autor, 2023.

Os 50 mL preparados foram separados em alíquotas de 10 mL estocados no freezer do laboratório para garantir a estabilidade das vitaminas, seguindo o procedimento indicado por (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*).

Por fim, optou-se por fazer uma solução de macronutrientes (NaNO₃ e KHPO₄) a fim de facilitar o preparo do meio e diminuir a quantidade de soluções estocadas. Note que foi utilizado o sal de potássio e não o de sódio para o fosfato.

Tabela 9 - Meio f/2 – solução de macronutrientes – 500mL

Componente	Concentração da solução (g L ⁻¹)	Quantidade usada (g)	Fornecedor
NaNO ₃	75,000	37,500	Êxodo Científica
K ₂ HPO ₄	5,000	2,500	Neon

Fonte: O autor, 2023.

Para o preparo do meio enriquecido, adiciona-se os componentes nas quantidades indicadas na Tabela 10 à 950 mL de água do mar (no caso artificial), e completa-se o nível até 1 L.

Tabela 10 - Meio f/2 - preparo do meio– 1L

Componente	Quantidade usada
Solução de macronutrientes	1,0 mL
Solução de metais	1,0 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL

Fonte: O autor, 2023.

Seguindo o procedimento montado acima, preparou-se todas as soluções estoque necessárias para a confecção do meio f/2 modificado.com

Figura 9 - Soluções estoque para enriquecimento



Fonte: O autor, 2023.

3.4. O cultivo

Primeiramente a cepa de *Nannochloropsis oculata* foi replicada em meio F/2, preparado a partir das soluções estoque, em 5 Erlenmeyers de 500mL. Para isso, 300mL de meio foram adicionados à cada frasco, que foram fechados com espuma de poliuretano e papel pardo e, em seguida, autoclavados em 121°C por 15 minutos. Os frascos esterilizados foram então deixados descansar por 24 horas, seguindo as recomendações compiladas por (ANDERSEN, BEHRENS, *et al.*, 2004), a fim de que os gases removidos durante o processo de esterilização pudessem se difundir do ar para o meio novamente.

Os frascos preparados foram então inoculados com 9mL do inóculo de *Nannochloropsis oculata* e cultivados, sem agitação ou aeração forçada, sob luz LED fria (6500K) em fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuridão por 2 semanas. Estes cinco primeiros frascos foram então utilizados para gerar as subsequentes gerações de cultivos.

Figura 10: Frasco de cultivo pronto para colheita



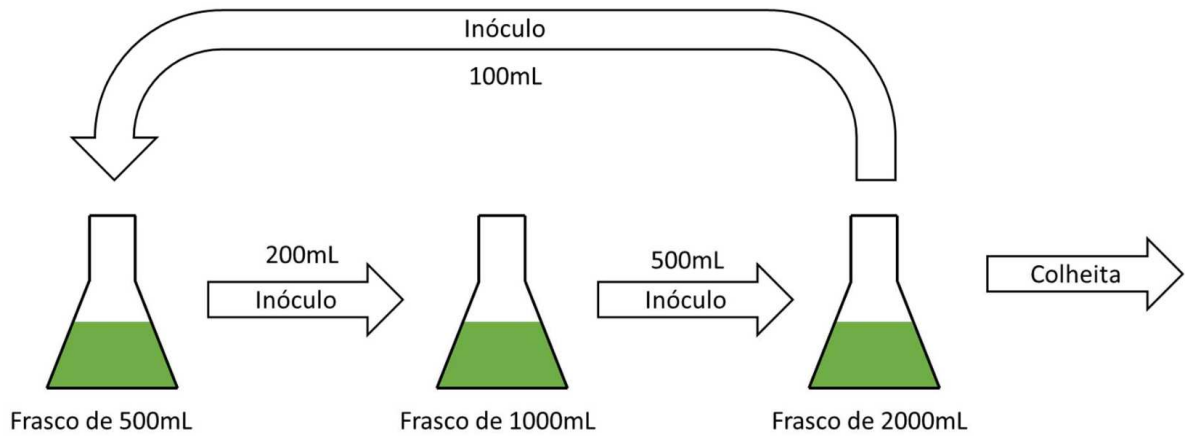
Fonte: O autor, 2023.

A fim de produzir biomassa o bastante para os testes, foi criado um protocolo para o cultivo descrito a seguir:

- a) preparo de 3 conjuntos de Erlenmeyers de 500mL, 1000mL e 2000mL, contendo respectivamente 200mL, 400mL e 1000mL de meio F/2 preparado de soluções estoque preparadas anteriormente;
- b) inóculo de cada conjunto de Erlenmeyers a partir do cultivo anterior, consistindo em 100mL para os frascos de 500mL, 200mL para os frascos de 1000mL e 500mL para os frascos de 2000mL.

Conforme esquematizado abaixo, note que os cultivos são passados para um frasco maior e com meio novo a cada 14 dias, até que sejam coletados após 14 dias no frasco de 2000mL, quando o ciclo recomeça:

Figura 11: Esquema do processo de cultivo das microalgas



Fonte: O autor, 2023.

Figura 12: Arranjo dos cultivos de microalga – sem iluminação



Fonte: O autor, 2023.

Figura 13: Arranjo dos cultivos de microalga – com iluminação



Fonte: O autor, 2023.

Dessa forma, a cada 2 semanas, considerando perdas por evaporação e a retirada de inóculo para o próximo ciclo, foram coletados aproximadamente 8 L de meio contendo a biomassa cultivada.

3.5. A Separação da biomassa

Para a separação da biomassa do meio de cultura, foi realizado uma floculação seguida de uma filtração a vácuo. A floculação é necessária pois o tamanho original das partículas de biomassa em suspensão colmata rapidamente o filtro.

Dois métodos já foram analisados na literatura com grande sucesso em flocular *Nannochloropsis oculata*, floculação por meio da adição dos sais catiônicos sulfato de alumínio e cloreto férrico (SHEN Y, Y. e W., 2013) e floculação pelo aumento de pH (WU, ZHU, *et al.*, 2012). Como a adição de um sal floculante implicaria no aumento da concentração de íons metálicos no meio decantado, seria mais difícil um possível reaproveitamento do meio (visando cultivos em larga escala), bem como geraria um efluente mais carregado em metais, algo não desejável.

Dessa forma, optou-se por utilizar floculação por meio do aumento de pH como método de coagulação (e subsequente floculação), seguida de decantação e filtração a vácuo para a separação da biomassa do meio de cultura.

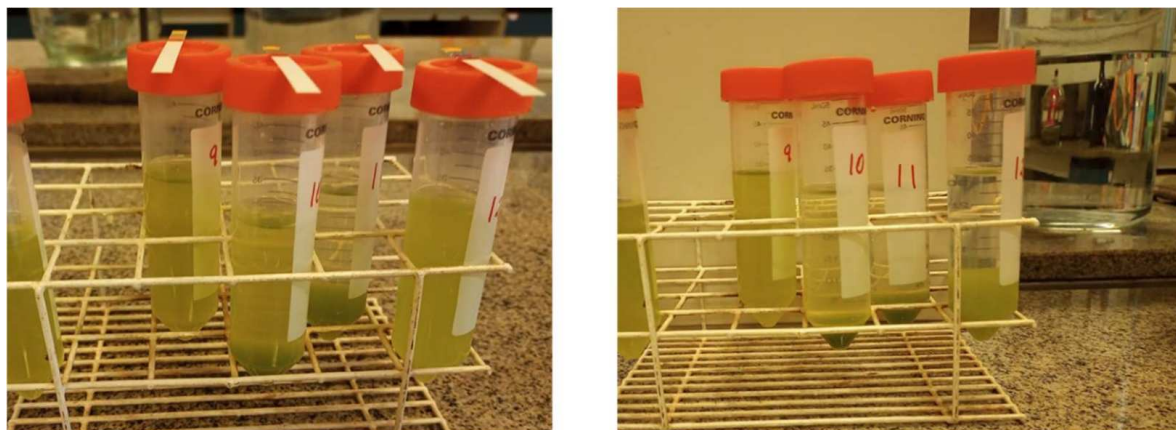
Embora a literatura utilizada como base, (WU, ZHU, *et al.*, 2012), indicasse que a partir de pH 9.7 a eficiência de floculação era maior que 95%, decidiu-se realizar pequenos testes para determinar não somente o pH escolhido para realizar a floculação, como também o método utilizado para se aumentar o pH.

3.5.1. Parâmetros da floculação

Primeiramente, optou-se por utilizar uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) para aumentar o pH do meio de cultura, isso pois esse é um reagente barato, facilmente encontrado, capaz de produzir pHs altos e cujo contra íon (Na^+) já está presente no meio de cultura. Para isso foram preparadas duas soluções de NaOH, nas concentrações de 1 mol/L e 0,1 mol/L.

Em seguida, utilizando-se as soluções preparadas previamente, alíquotas de 30mL de meio de cultivo foram separadas em tubos Falcon® de 50mL e tiveram seus pH ajustados de 9 a 12 por meio da adição de alíquotas de 50 μL de solução 1 mol/L de NaOH. Após rápida agitação os tubos foram postos em um suporte e deixados descansar por 30 minutos:

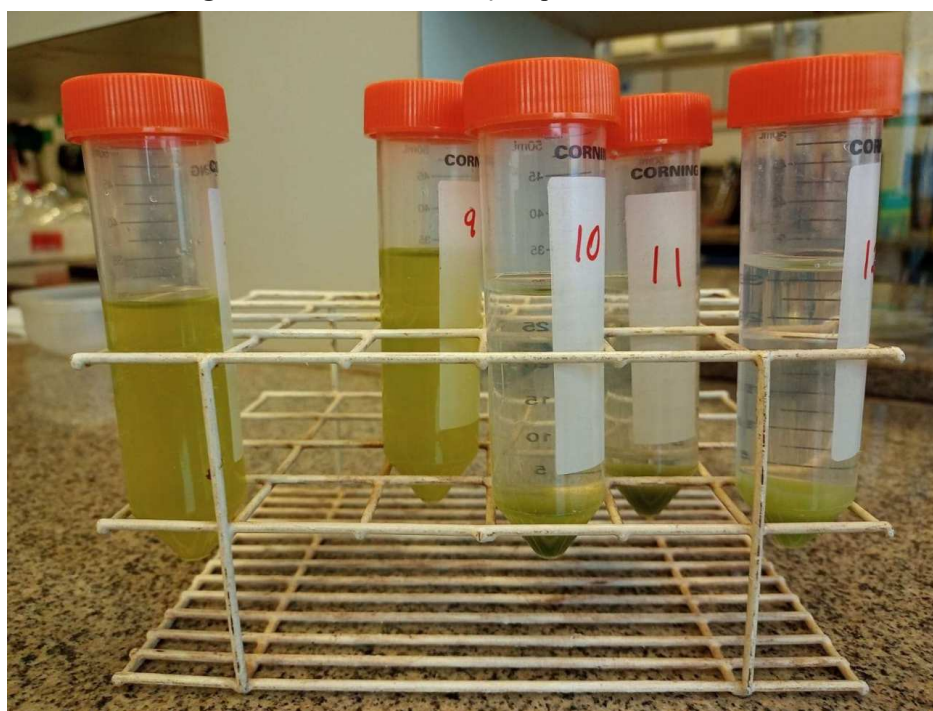
Figura 14: Testes de floculação imediatamente após adição de floculante e após 30 minutos, em ordem crescente de pH da esquerda para a direita



Fonte: O autor, 2023.

Nota-se que, assim como observado por (WU, ZHU, *et al.*, 2012), acima de pH 9 houve boa separação da biomassa. As amostras ainda foram deixadas descansar de um dia para o outro para observar melhor o comportamento da biomassa:

Figura 15: Testes de floculação após 1 dia de descanso



Fonte: O autor, 2023.

Ao se observar as amostras é clara a diferença entre o aspecto da biomassa para pH 12 em comparação às amostras em pH 10 e 11. A alíquota com pH ajustado em 12 demorou significativamente mais do que as em pH 10 e 11 para sedimentar, bem como o aspecto da biomassa não era flocular. Isso pode indicar lise celular e possivelmente degradação da biomassa, algo indesejável, visto que a biomassa é o produto de interesse do cultivo. Dessa

forma, optou-se por escolher um pH entre 10 e 11 para realizar as floculações. Para isso, com base nos volumes utilizados no teste com 30 mL, foi estipulado a utilização de 15mL de solução 1 mol/L de NaOH por litro de meio de cultivo a ser colhido.

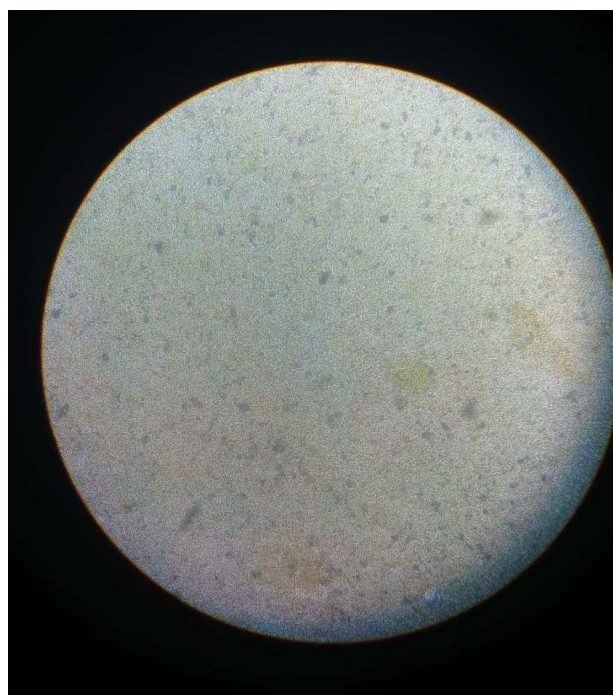
Por fim, abaixo estão imagens obtidas no microscópio antes e após a sedimentação, claramente se vê a aglomeração das células na segunda imagem, permitindo a sedimentação:

Figura 16: Imagem de microscópio (100x) - destaque de microalgas isoladas



Fonte: O autor, 2023.

Figura 17: Imagem de microscópio (20x) - suspensão já floculada



Fonte: O autor, 2023.

3.6. Componentes do sistema de monitoramento

3.6.1. O microcontrolador Arduino

A plataforma Arduino foi escolhida como base para a construção deste controlador devido a várias vantagens. Primeiramente, trata-se de uma opção relativamente acessível em termos de custo, o que a torna viável para projetos de desenvolvimento e prototipagem. Além disso, o Arduino é amplamente utilizado em diversas áreas, desde projetos educacionais até aplicações industriais, o que facilita o acesso a uma grande comunidade de usuários e desenvolvedores.

Outro aspecto importante é que a plataforma possui código aberto, permitindo a modificação e personalização do software conforme as necessidades específicas do projeto. O Arduino também é altamente versátil, oferecendo flexibilidade para adaptar-se a diferentes funcionalidades e demandas. Por fim, há uma ampla variedade de módulos e componentes adicionais que são facilmente encontrados no mercado, o que simplifica e agiliza o processo de construção e integração do sistema controlador.

Figura 18: Placa Arduino MEGA ADK



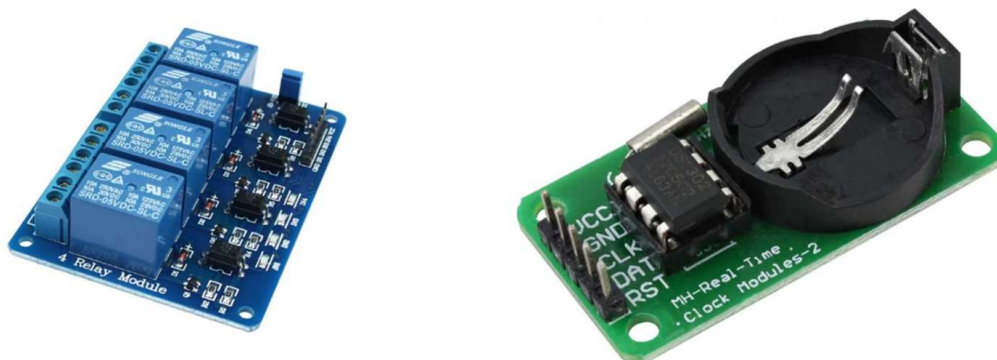
Fonte: (USINAINFO, 2023).

Pensando em simplificar o controle do fotobiorreator, fixou-se apenas 4 parâmetros a serem monitorados/controlados, sendo eles, o período de iluminação, a temperatura, o nível de meio no corpo do reator e a concentração de biomassa no meio.

3.6.2. Controle do período de iluminação

O acionamento das lâmpadas da iluminação das culturas foi feito a partir de interruptores do tipo relé, controlados por uma placa Arduino MEGA ADK. Para permitir que a placa possua dados de hora, um módulo do tipo Real Time Clock (RTC) baseado no chip DS1302 será usado. Após calibrado, esse módulo informa à placa o horário atual, permitindo que esta acione ou desligue o relé, que por sua vez liga ou desliga a iluminação. Inicialmente optou-se por manter o fotoperíodo de 12hr, mantendo-se a iluminação das 8:00 às 20:00 de cada dia.

Figura 19: Módulo com 4 interruptores relé e módulo RTC DS1302



Fonte: (USINAINFO, 2023).

3.6.3. Monitoramento da temperatura

A temperatura do meio foi medida por meio de um sensor de temperatura do tipo *bandgap* de silício de modelo DS 18B20 que pode ser imerso em água. O princípio de funcionamento deste tipo de sensor é baseado na influência da temperatura no funcionamento de um diodo de silício.

Figura 20: Sensor de temperatura à prova de água DS18B20



Fonte: (USINAINFO, 2023).

3.6.4. Monitoramento de nível

Considerando que a mudança de nível no reator se deve à evaporação de água, a fim de manter a concentração do meio, deve-se repor a água evaporada sempre que possível. Para isso, dois sensores de nível sem contato do modelo XKC-Y25-V foram empregados. Esses sensores foram acoplados do lado externo do reator e emitem um sinal elétrico quando o a altura de fluido passa um certo nível. Para acionar a bomba que repõe a água perdida, um outro interruptor do tipo relé será controlado por meio da placa Arduino.

Dessa forma, quando o nível desce até o sensor inferior, a placa recebe um sinal lógico e liga o relé da bomba de reposição de água. O nível sobe até acionar o sensor de nível superior, que envia um sinal lógico para a placa, que então desliga-se o relé e a bomba de reposição de água. Este sensor também foi incorporado ao sistema.

Figura 21: Sensor de nível sem contato XKC-Y25-V



Fonte: (USINAINFO, 2023).

3.6.5. Bombeamento de fluido

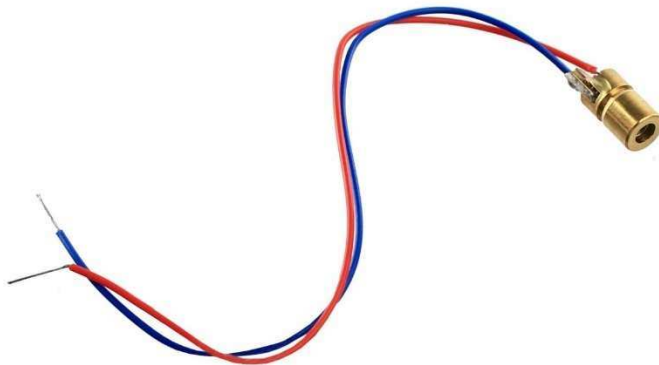
Para movimentar o meio de cultura, bombas peristálticas do modelo CKP-DC-S08 foram utilizadas. Elas são acionadas pela placa Arduino por meio de interruptores relé e alimentadas por uma fonte própria.

A escolha de uma bomba peristáltica se deu por dois principais fatores. O primeiro é que o mecanismo peristáltico é muito suave com as células de microalga em suspensão, não as danificando (diferentemente de uma bomba do tipo centrífuga por exemplo). O segundo é que há um completo isolamento do fluido e das partes rotativas da bomba (não são necessários selos mecânicos no eixo rotativo).

A blue and black peristaltic pump with two clear tubes attached. The pump has a blue body and a black base. A label on the side of the pump reads "CKP-CC-1000" and "B98222". The pump is shown from a side-on perspective, highlighting its compact design and the tubing connections.

3.6.6. Diodo laser

Figura 23: Diodo laser

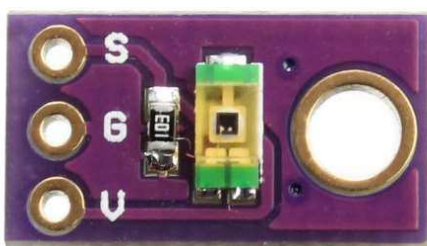


Fonte: (USINAINFO, 2023).

3.6.7. Fototransistor

Como sensor de luz para o fotômetro foi escolhido utilizar um fototransistor. Esse tipo de sensor consegue medir a intensidade luminosa que o atinge por meio de um diodo que tem sua propriedade alterada quando atingido por radiação luminosa no comprimento visível de 360nm a 970nm.

Figura 24: Fototransistor TEMT6000



Fonte: (USINAINFO, 2023).

3.7. impressão 3D

As peças do fotômetro foram desenhadas pelo autor no software de desenho AutoCAD 3D, software disponível UNESP, que os alunos de engenharia química do Instituto de Química de Araraquara utilizam em diversas disciplinas ministradas.

Um CAD 3D, ou desenho assistido por computador em três dimensões, é uma tecnologia empregada para design. Amplamente utilizado, o CAD 3D permite representar e visualizar objetos com alta precisão na forma de modelos tridimensionais digitais. (AUTODESK, 2023).

As peças foram então impressas na impressora 3D modelo Sethi3D S2 em plástico *ABS* (Acrilonitrila butadieno estireno) preto. A impressora foi disponibilizada pelo Instituto de Química da UNESP de Araraquara, sob os cuidados da professora doutora Kelly Johana Dussán Medina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção da espécie de microalga

Os parâmetros escolhidos para a seleção da espécie mais adequada (produtividade de biomassa total e porcentagem de lipídeos da biomassa) foram buscados em revisões bibliográficas e estudos de caso para diversas cepas de microalgas já voltados para a produção de biomassa para biocombustível. Esses dados coletados são sintetizados nas seguintes tabelas, nota-se que nem todos os estudos disponibilizam dados de ambos os parâmetros e que devido a abundância de espécies, dificilmente estudos utilizam as mesmas cepas:

Tabela 11 - Dados de produtividade de biomassa relatados na literatura

Espécie de microalga	Produtividade (g/L/dia)	Observações	Referência
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	0,25	H*	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	0,23	L**	
	0,41		(ANDREW, YONG, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,28	H	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	0,24	L	
	0,16		(ANDREW, YONG, <i>et al.</i> , 2022)
	0,15		
	0,23		
<i>Chlorella singularis</i>	0,17		
<i>Neochloris oleoabundans</i>	0,29	H	
	0,29	L	
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	0,35	H	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	0,29	L	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0,24	H	
	0,21	L	
<i>Isochrysis C4</i>	0,29	H	
	1,23	L	
<i>Isochrysis sp</i>	0,17		(ANDREW, YONG, <i>et al.</i> , 2022)

* – Nitrogênio abundante; ** – Nitrogênio limitado

Fonte: O autor, 2023.

Tabela 12 – Dados de porcentagem de lipídios na biomassa relatados na literatura

Espécie de microalga	Lipídeos (%massa seca)	Observações	Referência
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	12	H*	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	30	L**	
<i>Chlorella vulgaris</i>	14	H	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	57	L	
	30,4		(ANDREW, YONG, <i>et al.</i> , 2022)
	4,6		
<i>Neochloris oleoabundans</i>	13	H	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	44	L	
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	27	H	
	32	L	(ANDREW, YONG, <i>et al.</i> , 2022)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	11,5		
	16,2		(BORGES, 2005)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	24	H*	(GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012)
	35	L**	
<i>Isochrysis C4</i>	7	H	
	15	L	

* – Nitrogênio abundante; ** – Nitrogênio limitado

Fonte: O autor, 2023.

Das espécies selecionadas, as duas mais promissoras, encontradas com base nesses parâmetros e a luz dos estudos de caso ((GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012))((BORGES, 2005)) foram cepas de *Chlorella sp.* e de *Nannochloropsis sp.*

Ambas as espécies já são comercialmente cultivadas em grande escala, *Chlorella* para suplementação alimentar humana e *Nannochloropsis sp.* para alimentação animal, principalmente na piscicultura. Essas por si só já são grandes vantagens para a utilização dessas espécies, pois há abundante literatura sobre o seus respectivos cultivos e comportamentos e a obtenção de cepas dessas espécies são comercialmente disponíveis.

Entretanto, nota-se que os valores encontrados para *Chlorella* variam bastante de um estudo para o outro, inclusive dentro da revisão bibliográfica (ANDREW, YONG, *et al.*, 2022), visando a replicabilidade e os resultados obtidos nos estudos de caso, optou-se por cultivar a espécie *Nannochloropsis oculata* neste trabalho.

4.2. Cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata*

4.2.1. Concentração de biomassa alcançada

Seguindo o procedimento descrito anteriormente, um cultivo de *Nannochloropsis oculata* foi realizado a fim de medir qual a concentração de biomassa atingida após o período de crescimento estipulado de 14 dias.

Utilizando o procedimento de floculação pelo aumento de pH desenvolvido, os aproximadamente 8L de meio de cultivo contendo biomassa foi processado da seguinte forma:

- a) separar o volume total em alíquotas de 500mL em frascos Erlenmeyer;
- b) adicionar o volume apropriado de solução 1 mol/L de NaOH à alíquota (15mL de solução por litro de meio de cultivo);
- c) agitar suavemente a suspensão até que a formação de flocos seja visível;
- d) transferir a suspensão para um funil de separação de volume apropriado;
- e) esperar de 30 a 40 minutos a sedimentação dos flocos;
- f) drenar a fração inferior, contendo a biomassa, para um recipiente de volume adequado;
- g) drenar a fração superior para um recipiente de volume adequado.

Figura 25: Sedimentação da biomassa em um funil de separação



Fonte: O autor, 2023.

Feita essa segregação, deu-se início à etapa de filtração. Primeiramente o papel filtro foi pesado na balança analítica, sua massa anotada e ele instalado num conjunto de funil de buchner, kitassato e bomba de vácuo previamente montado. Em seguida, a fração superior, pobre em biomassa, foi filtrada. Isso foi realizado pois garante que toda a biomassa cultivada seja colhida e, por ser pobre em biomassa, não colmata o filtro.

Em seguida, no mesmo filtro, é filtrada a fração inferior rica em biomassa. Dado o processo de floculação, as partículas de biomassa não entupiram o filtro com facilidade e a filtração ocorreu sem demais problemas.

O procedimento de floculação seguido de filtração foi repetido um total de 10 vezes para o total das 10 alíquotas de 500mL

Figura 26: Filtração da biomassa



Fonte: O autor, 2023.

A fim de se determinar a concentração em gramas de biomassa por litro de meio da suspensão obtida, os papéis filtro com a lama de biomassa foram secos em estufa à 60 °C e as massas antes e após colheita anotadas:

Tabela 13 – Massas recuperadas de biomassa

Alíquota	Massa antes da colheita (g)	Massa após a colheita (g)	Massa coletada (g)
1	0,779	1,189	0,41
2	0,811	1,230	0,419
3	0,798	1,064	0,266
4	0,804	1,284	0,480
5	0,818	1,157	0,339
6	0,817	1,278	0,461

7	0,794	1,328	0,534
8	0,801	1,203	0,402
9	0,836	1,293	0,457
10	0,825	1,349	0,524

Fonte: O autor, 2023.

Observando os dados tratados, calculou-se a média das massas coletadas, obtendo-se um valor de 0,429 gramas de biomassa a cada 500mL de meio de cultivo, ou 0,858 gramas de biomassa por litro de meio de cultivo. Ao se consultar os estudos de (GRIFFITHS, VAN HILLE e HARRISON, 2012) e de (ALÉMAN-NAVA, MUYLAERT, *et al.*, 2017), que também realizaram experimentos de cultivo de *Nannochloropsis oculata*, nota-se que as concentrações médias de biomassa encontradas foram de respectivamente 1,74 e 1,0 gramas de biomassa por litro de meio.

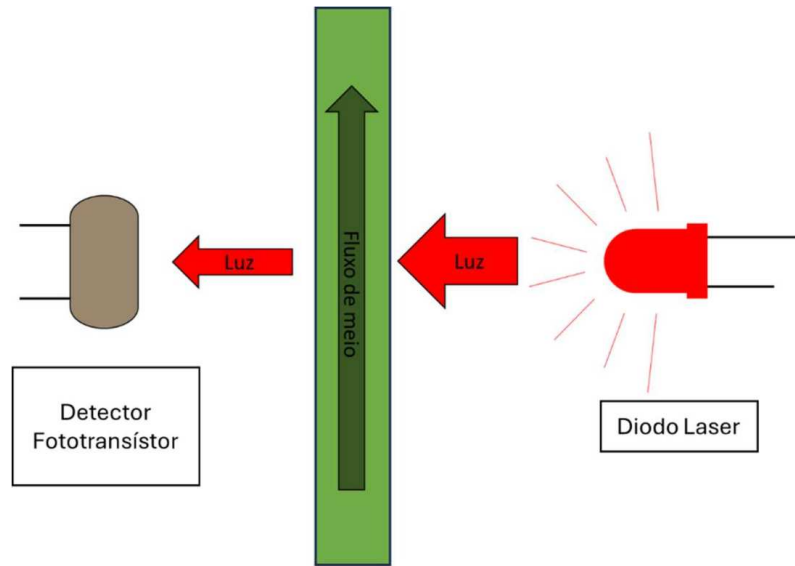
Diante disso, torna-se interessante estudar uma otimização das condições de crescimento utilizadas, visto que o valor de concentração de biomassa encontrada foi mais de 20% menor do que o reportado na literatura. Essa otimização pode ser a introdução de aeração forçada, ou mudança no fotoperíodo adotado, por exemplo.

4.3. Construção do sistema de controle

4.3.1. O fotômetro

A fim de medir continuamente a concentração de biomassa no meio de cultura, optou-se por construir um fotômetro de fluxo. Isto é, um fotômetro cuja amostra pode ser passada continuamente pelo analisador. Para isso, optou-se por utilizar um tubo de vidro como caminho ótico da luz da fonte monocromática escolhida.

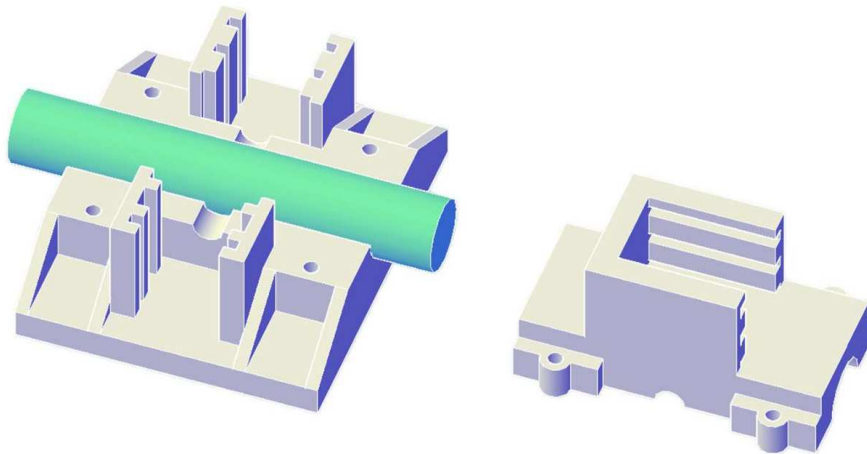
Figura 27: Esquema do fotômetro proposto



Fonte: O autor, 2023.

Com o esquema decidido em mente, o corpo do fotômetro foi desenhado no software AutoCAD 3D. A seguir o desenho, em branco o corpo e em verde a representação do cilindro de vidro.

Figura 28: Desenho do corpo do fotômetro



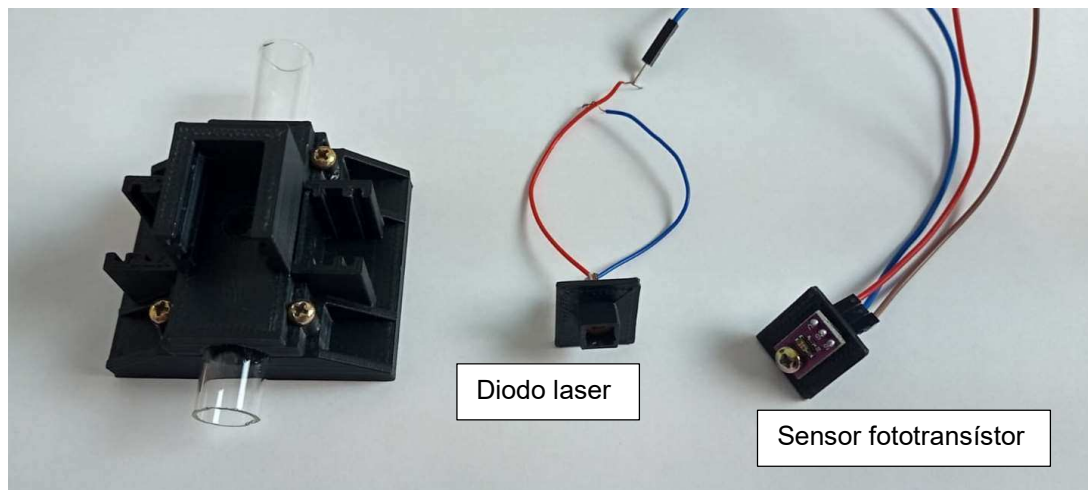
Fonte: O autor, 2024.

O design escolhido foi em feito duas metades, para possibilitar a fácil instalação da parte mais frágil do equipamento, o tubo de vidro. Dada a liberdade criada pela possibilidade de imprimir as peças desenhadas em impressora 3D, as estruturas para suportar a fonte de luz monocromática e o fototransistor puderam ser adicionadas diretamente ao corpo do equipamento, simplificando a montagem.

Aproveitando a possibilidade, foi adicionado um conjunto de janela e suporte perpendicular à fonte luminosa, na forma da estrutura no topo da parte superior do equipamento. Isso foi realizado para permitir a conversão do equipamento de um fotômetro de fluxo, que mede absorbância, para um turbidímetro, que mede a luz refletida pelas partículas em suspensão passando pelo tubo de vidro.

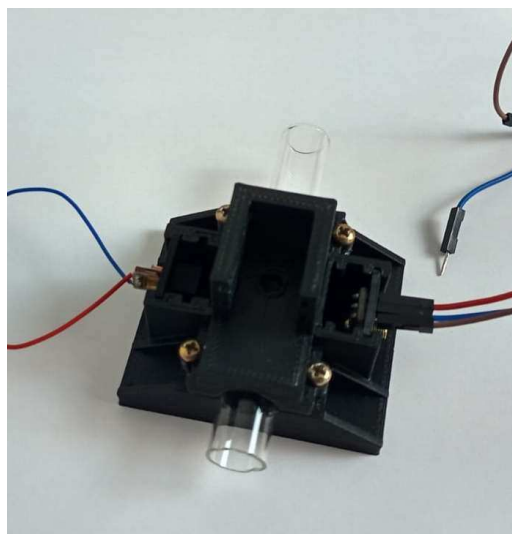
Realizado o desenho, as partes do corpo do fotômetro, e algumas placas de suporte para os eletrônicos foram impressas em ABS preto. O tubo de vidro de borossilicato de 12mm de diâmetro externo utilizado na construção do equipamento foi obtido de um tubo de ensaio comum, cortado pelo autor com uma serra diamantada.

Figura 29: Fotômetro impresso em 3D desmontado



Fonte: O autor, 2024.

Figura 30: Fotômetro impresso em 3D montado



Fonte: O autor, 2024.

4.3.2. O gabinete

Um gabinete foi construído em MDF e acrílico para sustentar os elementos que realizam os controles das condições do fotobiorreator. Além de manter os elementos eletrônicos seguros de respingos de água, batidas e poeira, essa estrutura permite o suporte adequado das bombas, relés e o fotômetro.

Como o fotômetro e a placa Arduino são os elementos que mais exigem manipulação e inspeção, optou-se por construir uma estrutura em dois andares. No andar superior, abaixo de uma tampa basculante, estão dispostos o fotômetro e a placa Arduino. Já no andar inferior, de mais difícil acesso, estão dispostos os relés, as bombas peristálticas e a fonte de energia.

Essa fonte é uma fonte chaveada de corrente contínua, que converte a eletricidade vinda da rede (127 V e corrente alternada) para 12 V e corrente contínua com um limite de 10 A para a carga conectada. Essa fonte alimenta as bombas diretamente com 12V, e passa por um regulador de corrente de potencial para alimentar os relés com 5V.

Figura 31: Conjunto de controle construído



Fonte: O autor, 2024.

Na parte superior foi adicionada uma interface gráfica para permitir a alteração de parâmetros de controle utilizando-se um display LCD e um *encoder* rotativo.

4.3.3. Rotina seguida pelo microcontrolador

Foram estabelecidos três loops de controle para nível, iluminação e concentração de biomassa no fotobiorreator. Por se tratar de um microcontrolador que possui apenas uma linha de execução, ele não pode realizar processos em paralelo. Para isso foi estabelecida uma ordem de operação, que checa os parâmetros de tempo de iluminação, nível e concentração e biomassa nessa respectiva ordem.

4.3.3.1. Controle de iluminação

O mais simples *loop* de controle. Nele o microcontrolador confere a hora do dia marcada no RTC e determina se deve ligar ou desligar o relé responsável pela iluminação. Se a hora marcada estiver dentro dos limites especificados (entre 8:00 e 20:00) ele liga o relé. Caso contrário ele o desliga.

4.3.3.2. Controle de nível

Neste *loop* o controlador confere as chaves de nível. Se a chave de nível inferior acusar nível baixo, o microcontrolador entra em modo correção de nível.

Nesse modo o equipamento ignora os outros parâmetros (concentração de biomassa e período de iluminação) e corrige o nível ao ligar o relé que controla a bomba peristáltica responsável por abastecer o fotobiorreator com água desmineralizada. Ele mantém a bomba ligada até que a chave de nível alto seja acionada. Assim que o nível é atingido o controlador volta para modo de operação normal.

4.3.3.3. Controle de concentração

Se nível e iluminação estiverem dentro dos limites, o controlador determina se deve realizar uma análise de concentração. Isto é feito comparando a hora atual do RTC com a

hora da última análise, se o período for superior ao estipulado o microcontrolador realiza a seguinte lista de tarefas:

- a) realiza uma medida de temperatura;
- b) liga a bomba de amostragem no sentido normal;
- c) liga o diodo laser do fotômetro;
- d) aguarda o período estipulado em milissegundos;
- e) realiza 10 medidas de absorbância no fotômetro em intervalos de 100 milissegundos;
- f) calcula a média dos valores obtidos;
- g) inverte o sentido da bomba de amostragem;
- h) mantém a bomba de amostragem drenando o fotômetro pelo período estipulado;
- i) desliga a bomba de amostragem;
- j) desliga o diodo laser;
- k) anota a média calculada e a temperatura na memória externa;
- l) anota a hora da última análise na memória RAM.

Se a medida de absorbância estiver acima do limite estipulado, significa que o cultivo cresceu e deve ser diluído. Para isso o controlador entra em modo de colheita.

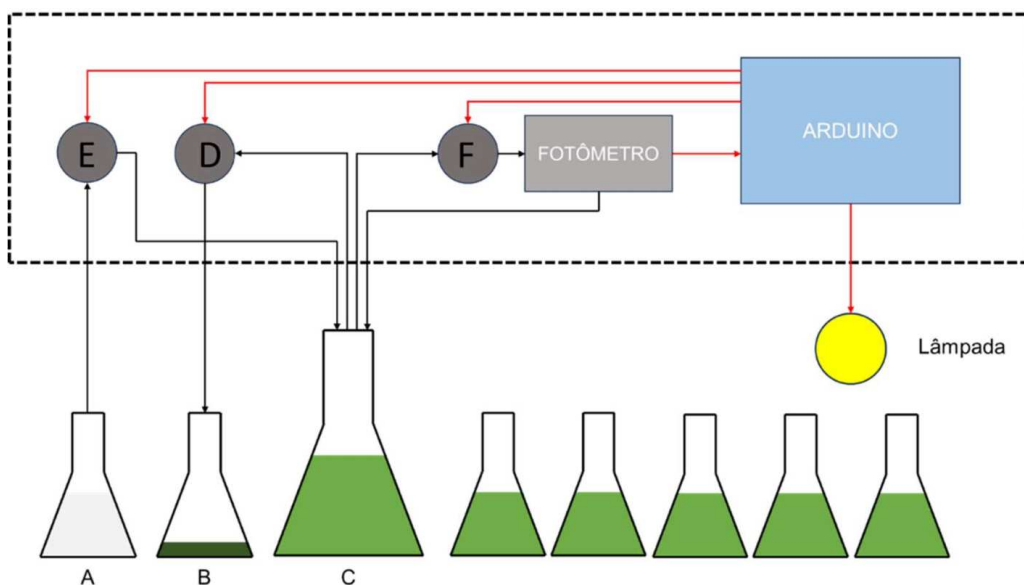
Nesse modo o equipamento ignora os outros parâmetros (controle de nível e período de iluminação) e corrige a concentração do fotobiorreator ao extrair meio rico em biomassa e repor a mesma quantidade de meio estéril. Para isso o controlador liga os relés bombas de colheita e reposição. Por se tratar da mesma corrente alimentada em ambas as bombas peristálticas, o volume movimentado por ambas é o mesmo e mantém-se o nível constante.

Em seguida, o controlador altera o intervalo no qual ele realiza as análises de concentração para o intervalo de colheita (mais curto que o normal). Dessa forma o equipamento manterá as bombas ligadas até que a concentração atinja o valor estipulado, e então retornará para os períodos de análise e operação normal.

4.3.4. Teste do sistema construído

Para testar as capacidades do equipamento desenvolvido, foi realizado um cultivo teste com o sistema acoplado a um dos frascos de 2000mL. O cultivo seguiu o procedimento descrito anteriormente e o sistema promoveu o controle da ligação e desligamento das lâmpadas para todos os 6 frascos de cultivo. A seguir o esquema utilizado para esse teste:

Figura 32: Esquema do teste



Fonte: O autor, 2024.

No teste montado, o frasco A serve como reservatório de meio estéril para o frasco de cultivo C, já o frasco B coleta o meio rico em biomassa proveniente de C. A transferência de fluido é promovida pelas bombas (E e D), que são ligadas em conjunto quando o fotômetro informa o Arduino que a absorbância do meio em C está acima do permitido. O sistema foi programado para realizar medidas de absorbância a cada 10 minutos, essa medida é realizada ao se passar o meio de C pelo fotômetro (impulsionado pela bomba F).

Entretanto, durante o período do teste e devido ao clima na cidade de Araraquara, houve instabilidades na rede elétrica do laboratório durante o experimento. Como o parâmetro de intervalo entre medidas foi armazenado na memória volátil da placa (RAM) a queda de energia fez com que o sistema utilizasse o tempo padrão de medida de 40 segundos, o que prejudicou muito o cultivo. Ainda, os dados de absorbância ao longo do tempo não puderam ser registrados, pois as quedas de energia danificaram o circuito do *Shield Ethernet* responsável por se comunicar com cartão SD que catalogava os dados.

5. CONCLUSÃO

A presente pesquisa trouxe contribuições valiosas ao desenvolvimento de um sistema de controle para o cultivo de *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreatores, com o propósito de otimizar a produção de biomassa de microalgas para bioenergia. Este estudo se alinha a princípios fundamentais da química verde, que busca processos mais eficientes, sustentáveis e menos prejudiciais ao meio ambiente.

A produção de biomassa a partir de microalgas, ao ser convertida em biocombustível, propicia uma alternativa renovável de baixo impacto ambiental, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e para o cumprimento das metas de descarbonização.

Entre os 12 princípios da química verde, destacam-se aqueles aplicados neste trabalho, como a maximização da eficiência atômica e o uso de matérias-primas renováveis. O cultivo de microalgas em sistemas fechados, como os fotobiorreatores desenvolvidos, potencializa o aproveitamento de recursos naturais, como luz e dióxido de carbono, em um ciclo fechado de conversão bioenergética.

Além disso, o método de floculação por aumento de pH utilizado no processo de separação de biomassa minimiza o uso de reagentes tóxicos ou com resíduos persistentes, destacando-se como uma prática sustentável.

No contexto das ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável) da ONU, este trabalho endossa, particularmente, os seguintes objetivos:

- a) ODS 7 (Energia Limpa e Acessível): a pesquisa contribui para o desenvolvimento de fontes renováveis de energia, promovendo biocombustíveis que podem substituir combustíveis fósseis e assegurar acesso à energia limpa;
- b) ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis): ao integrar práticas de cultivo e controle otimizadas para microalgas, este estudo promove uma produção sustentável, com menor impacto sobre recursos naturais, demonstrando a viabilidade de processos industriais mais limpos;
- c) ODS 13 (Ação Contra a Mudança Global do Clima): a utilização de biomassa como fonte de energia renovável ajuda a mitigar as mudanças climáticas, ao absorver CO₂ durante o cultivo e gerar combustíveis de ciclo fechado;

- d) ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura): A construção e automação de fotobiorreatores com monitoramento contínuo exemplificam inovação tecnológica aplicada à bioenergia.

As perspectivas futuras incluem a necessidade de aprimorar os sistemas de controle, garantindo maior resiliência às condições adversas, como falhas de energia, por meio de armazenamento de dados robusto e integração com tecnologias inteligentes. A expansão para aplicações comerciais em grande escala exigirá uma abordagem colaborativa, englobando pesquisa científica, incentivos governamentais e parcerias público-privadas para criar cadeias de valor sustentáveis e que promovam a geração de emprego e inclusão social.

Finalmente, a exploração de microalgas como biomassa bioenergética representa um passo importante na transição para um modelo econômico de baixo carbono, impulsionado pela inovação e alinhado com as metas globais de sustentabilidade. Este trabalho destaca a importância de avanços tecnológicos para soluções de impacto, com o potencial de transformar o futuro energético, proteger o meio ambiente e contribuir para a construção de um mundo mais justo e equilibrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉMAN-NAVA, Gibran S. et al. Two-stage cultivation of *Nannochloropsis oculata* for lipid production using reversible alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, 2017. 18-23.

ANDERSEN, Robert A. et al. **Algal Culturing Techniques**. 1^a. ed.

ANDREW, Audrey.R et al. Selection of Tropical Microalgae Species for Mass Production Based on Lipid and Fatty Acid Profiles. **Frontiers in Energy Research**, 2022.

AUTODESK. SOFTWARE CAD 3D. **Autodesk**, 2023. Disponível em: <<https://www.autodesk.com/br/solutions/3d-cad-software>>. Acesso em: 10 Outubro 2023.

BORGES, Lucélia D. V. **Caracterização do Potencial de Absorção do Dióxido de Carbono Atmosférico Por Microalgas Utilizadas na Aquicultura para a Geração de um Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL)**.

GRIFFITHS, Melinda J.; VAN HILLE, Robert P.; HARRISON, Susan T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, 2012. 989-1001.

GUILLARD, Robert R. L. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. 1. ed.

GUPTA, Prabuddha L.; LEE, Seung-Mok; CHOI, Hee-Jeong. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. **World J Microbiol Biotechnol**, Setembro 2015. 1409-1417.

KUNJAPUR, Aditya M.; ELDRIDGE, R. B. Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 23 Março 2010. 3516-3526.

PETERSON, Andrew A. et al. Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies. **Energy & Environmental Science**, 9 julho 2008. 34.

SHEN Y; Y., Cui; W., Yuan. Flocculation Optimization of Microalga. **Appl Biochem Biotechnol**, 30 Janeiro 2013. 2049–2063.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Principles of Instrumental Analysis**. 7a. ed.

SPELLING, Kristian (Ed.). **Biofuels from Algae - Methods and Protocols**. 1. ed.

TADROS, Tharwat. **Encyclopedia of Colloid and Interface Science**.

TORRI, Cristian et al. Hydrothermal Treatment (HTT) of Microalgae: Detailed Molecular Characterization of HTT Oil in View of HTT Mechanism Elucidation. **Energy Fuels**, 11 Novembro 2011. 14.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**.

USINAINFO. Usinainfo eletrônica e robótica. **Usinainfo eletrônica e robótica**, 2023. Disponível em: <<https://www.usinainfo.com.br>>. Acesso em: 05 Junho 2023.

WU, Zechen et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae. **Bioresource Technology**, 28 Janeiro 2012. 496–502.

APÊNDICE I – CÓDIGO DO MICROCONTROLADOR ARDUÍNO

A seguir está transcrito o código construído pelo autor escrito na linguagem nativa para o Arduino (C/C++), que está contido no microcontrolador que compõe o sistema de controle construído.

```
#include <SPI.h>
#include <SD.h>
#include "stdio.h"
#include "DS1302.h"
#include "OneWire.h"
#include "DallasTemperature.h"
#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
#include <EEPROM.h>
#define ONE_WIRE_BUS 39
OneWire oneWire(ONE_WIRE_BUS);
LiquidCrystal_I2C lcd(0x27,16,2);
DallasTemperature sensors(&oneWire);
//EEPROM ADDRESS
const int normal_interval = 1
const int harvest_interval = 3
// RTC pins
const int ClkPino = 5; // Pin Clk
const int DatPino = 6; // Pin Dat
const int RstPino = 7; // Pi Rst
// Detector pins
const int LED_pin = 37; // Pin to control the laser diode
const int LDR_pin = A15; // Pin to read the LDR value
// Level sensor pins
const int top_level_pin = 31;
const int bot_level_pin = 30;
// Relay pins
```

```

const int relay_lights = 32;
const int relay_water_pump = 33;
const int relay_media_and_culture_pumps = 42;
const int relay_detector_pump_in = 35;
const int relay_detector_pump_out = 36;

// Rotary encoder pin
const int rotary_clk = 8;
const int rotary_data = 9;
const int rotary_sw = 10;
//filenames
const String filename = "ALOG.txt";
const String filename_harvest_time = "HLOG.txt";
// Time Constants
long absorbance_normal_delay = 40;    //in seconds
long absorbance_harvesting_delay = 40; //in seconds
const int absorbance_fill_pump_on_time = 15000; //in mili seconds
const int absorbance_clean_pump_on_time = 25000; //in mili seconds
long time_difference = 0;
int light_on_time = 8;                //an hour (0-24)
int light_off_time = 20;              //an hour (0-24)
// Absorptions Limts
float max_absorption = 700;
// Rotary Encoder states
int currentStateCLK = LOW;
int previousStateCLK = LOW;
File myFile;
DS1302 rtc(RstPino, DatPino, ClkPino);
float average (int * array, int len) { // assuming array is int.
    long sum = 0L ; // sum will be larger than an item, long for safety.
    for (int i = 0 ; i < len ; i++)

```

```

    sum += array [i] ;
    return ((float) sum) / len ; // average will be fractional, so float may be appropriate.
}

String dayAsString(const Time::Day day) {
    switch (day) {
        case Time::kSunday: return "Domingo";
        case Time::kMonday: return "Segunda-Feira";
        case Time::kTuesday: return "Terca-Feira";
        case Time::kWednesday: return "Quarta-Feira";
        case Time::kThursday: return "Quinta-Feira";
        case Time::kFriday: return "Sexta-Feira";
        case Time::kSaturday: return "Sabado";
    }
    return "(Dia nao encontrado)";
}

String printTime() { //Prints the current time on Serial and returns the current time as a String
    Time t = rtc.time();
    const String day = dayAsString(t.day);
    static char buf[50];
    snprintf(buf, sizeof(buf), "%s %04d-%02d-%02d %02d:%02d:%02d", day.c_str(), t.yr,
t.mon, t.date, t.hr, t.min, t.sec);
    //Serial.println(buf);
    return buf;
}

bool checkLeapYear(int the_year) {
    if (the_year % 4 != 0) return false;
    if (the_year % 100 == 0 && the_year % 400 != 0) return false;
    if (the_year % 400 == 0) return true;
    return true;
}

int days_in_month(Time T1){
    if ((T1.mon == 4) || (T1.mon == 6) || (T1.mon == 9) || (T1.mon == 11)){ return 30;}

```

```

    if ((T1.mon == 2)) { return 28; }
    return 31;
}

int timePassed(Time T1, Time T2) {
    int days_in_T1_month = days_in_month(T1);
    int days_in_T1_year = 365;
    if (checkLeapYear(T1.yr)) {
        days_in_T1_year = 366;
    }
    else {
    }
    int dif_secs = T2.sec - T1.sec;
    int dif_mins = (T2.min - T1.min) * 60;
    int dif_hrs = (T2.hr - T1.hr) * 60 * 60;
    int dif_days = (T2.date - T1.date) * 60 * 60 * 24;
    int dif_mon = (T2.mon - T1.mon) * 60 * 60 * 24 * days_in_T1_month;
    int dif_yr = (T2.yr - T1.yr) * 60 * 60 * 24 * days_in_T1_year;
    int total_dif = dif_yr + dif_mon + dif_days + dif_hrs + dif_mins + dif_secs;
    return total_dif;
}

int mode(int array[], int len) {
    int modeMap[len];
    int maxEl = array[0];
    int maxCount = 1;
    for (int i = 0; i < len; i++) {
        int el = array[i];
        if (modeMap[el] == 0) {
            modeMap[el] = 1;
        }
        else {
            modeMap[el]++;
        }
    }
}

```

```

    }
    if (modeMap[el] > maxCount) {
        maxEl = el;
        maxCount = modeMap[el];
    }
}
return maxEl;
}

String drawselected(int active_menuitem,String menuitem, String menuitems[]){
    if( menuitems[active_menuitem] == menuitem){return "-" + menuitem;}
    else{return " " + menuitem;} {}
}

void drawmenu(int page,int active_menuitem,int frame, String menuitems[]){
    //Selection Menu
    if(page == 1){
        switch(frame){
            case 1:
                lcd.setCursor(0,0);
                lcd.print("Menu Principal");
                lcd.setCursor(0,1);
                lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[0],menuitems));
                break;
            case 2:
                lcd.setCursor(0,0);
                lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[1],menuitems));
                lcd.setCursor(0,1);
                lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[2],menuitems));
                break;
            case 3:
                lcd.setCursor(0,0);
                lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[3],menuitems));

```

```

    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[4],menuitems));
    break;
    case 4:
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[5],menuitems));
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(drawselected(active_menuitem,menuitems[6],menuitems));
    break;
}
}
if(page == 2){
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print(menuitems[active_menuitem]);
    switch(active_menuitem){
    case 1:
        //Intervalo padrão (sec)
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print (String(absorbance_normal_delay)+ " sec");
        break;
    case 2:
        //Intervalo coleta (sec)
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print (String(absorbance_harvesting_delay)+ " sec");
        break;
    case 3:
        //Limite superior ABS
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print (String(max_absorption));
        break;
    case 4:

```

```

//Hora ligar luzes
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print (String(light_on_time) + "hrs");
break;
case 5:
//Hora ligar luzes
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print (String(light_off_time) + "hrs");
break;
//Padrão
default:
break;
}
}

}
//
void WriteIntToEEPROM(int address, int number)
{
byte byte1 = (number >> 8) & 0xFF;
byte byte2 = number & 0xFF;
EEPROM.write(address, byte1);
EEPROM.write(address + 1, byte2);
}

int ReadIntFromEEPROM(int address)
{
byte byte1 = EEPROM.Read(address);
byte byte2 = EEPROM.Read(address+1);
int result = (byte1 << 8) + byte2;
return result;
}

```

```
}
```

```
// SET BEGINING STATE AND MENU VARIABLES
```

```
int State = 0;
```

```
Time latest_measure(2023, 4, 22, 16, 45, 30, Time::kSaturday);
```

```
int page = 1;
```

```
int active_menuitem = 0;
```

```
int last_menuitem = 0;
```

```
bool label_is_written = 0;
```

```
bool return_to_menu = 0;
```

```
String menuitems[7] = {"Relizar medida","intervalo Norm","intervalo Col","Limite  
Absorção","Hr Ligar Luz","Hr Desligar Luz","Retomar"};
```

```
void setup() {
```

```
  // Start LCD
```

```
  lcd.init();
```

```
  lcd.setBacklight(HIGH);
```

```
  // Open serial communications and wait for port to open:
```

```
  Serial.begin(9600);
```

```
  while (!Serial) {
```

```
    ; // wait for serial port to connect. Needed for native USB port only
```

```
  }
```

```
  // Start the temperature sensor
```

```
  sensors.begin();
```

```
  // Configura o Chip RTC
```

```
  rtc.writeProtect(false);
```

```
  rtc.halt(false);
```

```
  // Defina a hora nesta linha e descomente-as para setar a hora no chip
```

```
  Time t(2023, 4, 22, 16, 45, 30, Time::kSaturday);
```

```
  rtc.time(t);
```

```
  // Setting Outputs and Inputs
```

```

pinMode(LED_pin, OUTPUT);
pinMode(LDR_pin, INPUT);
pinMode(top_level_pin, INPUT);
pinMode(bot_level_pin, INPUT);
pinMode(relay_lights, OUTPUT);
pinMode(relay_water_pump, OUTPUT);
pinMode(relay_media_and_culture_pumps, OUTPUT);
pinMode(relay_detector_pump_in, OUTPUT);
pinMode(relay_detector_pump_out, OUTPUT);
pinMode(rotary_clk, INPUT);
pinMode(rotary_data, INPUT);
pinMode(rotary_sw, INPUT_PULLUP);
digitalWrite(LED_pin, LOW);
digitalWrite(relay_water_pump, HIGH);
digitalWrite(relay_lights, HIGH);
digitalWrite(relay_media_and_culture_pumps, HIGH);
digitalWrite(relay_detector_pump_in, LOW);
digitalWrite(relay_detector_pump_out, LOW);

```

```

// Initializing SD CARD
Serial.print("Initializing SD card...");
//if (!SD.begin(4)) {
//  Serial.println("initialization failed!");
//  while (1);
//}
Serial.println("initialization done.");
// open the file
myFile = SD.open(filename, FILE_WRITE);
// if the file opened okay, close it:
if (myFile) {

```

```

    // close the file:
    myFile.close();
    Serial.println("done.");
} else {
    // if the file didn't open, print an error:
    Serial.println("error opening test.txt");
}
//-----
// Define initial state
// Possible States:
// Menu          -1
// Normal         0
// Correcting Level  1
// Absorbance debug  2
// Harvesting Biomass  3
State = 0;
latest_measure = rtc.time();
currentStateCLK = digitalRead(rotary_clk);
previousStateCLK = currentStateCLK;

}

void loop() {
    currentStateCLK = digitalRead(rotary_clk);
    // Menu Code
    if(currentStateCLK != previousStateCLK || State == -1 ){
        State = -1;
        //drawmenu(page,active_menuitem,frame,menuitems);
        if(page == 1){
            if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW) || return_to_menu){
                return_to_menu = 0;
                if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){

```

```

    active_menuitem++;
    if(active_menuitem > 6){active_menuitem = 6;} // Clamp upper limit of the menuitems
array
    }
    else{
        active_menuitem--;
        if(active_menuitem < 0){active_menuitem = 0;} // Clamp upper lower of the menuitems
array
    }
}

previousStateCLK = currentStateCLK;
Serial.println(active_menuitem);
if(active_menuitem != last_menuitem){
    lcd.clear();
    switch(active_menuitem){
        case 0:
            lcd.setCursor(0,0);
            lcd.print("Menu Principal");
            lcd.setCursor(0,1);
            lcd.print("-Relizar medida");
            break;
        case 1:
            lcd.setCursor(0,0);
            lcd.print("-intervalo Norm");
            lcd.setCursor(0,1);
            lcd.print(" intervalo Col");
            break;
        case 2:
            lcd.setCursor(0,0);
            lcd.print(" intervalo Norm");
            lcd.setCursor(0,1);
            lcd.print("-intervalo Col");

```

```

break;
case 3:
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print("-Limite Absorção");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print(" Hr Ligar Luz");
break;
case 4:
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print(" Limite Absorção");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("-Hr Ligar Luz");
break;
case 5:
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print("-Hr Desligar Luz");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print(" Retomar");
break;
case 6:
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print(" Hr Desligar Luz");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("-Retomar");
break;
}
last_menuitem = active_menuitem;
}
if(digitalRead(rotary_sw)== LOW){
if(active_menuitem == 6){
State = 0;

```

```

    lcd.clear();
    delay(250);
} //restarts operation
if(active_menuitem == 0){
    //latest_measure = latest_measure+1000
    State = 0;
    lcd.clear();
    delay(250);
} //make abs read
else{
    lcd.clear();
    page = 2;
    delay(250);
}
}
}

if(page == 2){
    switch(active_menuitem){
    case 1:
        //Intervalo padrão (sec)
        if(label_is_written){}
        else{
            lcd.setCursor(0,0);
            lcd.print("intervalo Norm");
            lcd.setCursor(0,1);
            lcd.print (String(absorbance_normal_delay));
            lcd.setCursor(12,1);
            lcd.print("Sec");
            label_is_written = 1;
        }
    }
}

```

```

if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW)){
    if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){
        if(absorbance_normal_delay < 120){absorbance_normal_delay++;}
        else{absorbance_normal_delay = absorbance_normal_delay + 60; }
        if(absorbance_normal_delay > 30000){absorbance_normal_delay = 30000;} // Clamp
High of the delay time
    }
    else{
        if(absorbance_normal_delay < 120){absorbance_normal_delay--;}
        else{absorbance_normal_delay = absorbance_normal_delay - 60; }
        if(absorbance_normal_delay < 30){absorbance_normal_delay = 30;} // Clamp lower of
the delay time
    }
}
previousStateCLK = currentStateCLK;
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print (String(absorbance_normal_delay)+" ");
break;
case 2:
//Intervalo coleta (sec)
if(label_is_written){}
else{
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("intervalo Coleta");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print (String(absorbance_harvesting_delay));
    lcd.setCursor(12,1);
    lcd.print("Sec");
    label_is_written = 1;
}
if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW)){
    if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){

```

```

    if(absorbance_harvesting_delay < 120){absorbance_harvesting_delay++;}
    else{absorbance_harvesting_delay = absorbance_harvesting_delay + 60; }

    if(absorbance_harvesting_delay > 30000){absorbance_harvesting_delay = 30000;} //
Clamp High of the delay time
    }
    else{
        if(absorbance_harvesting_delay < 120){absorbance_harvesting_delay--;}
        else{absorbance_harvesting_delay = absorbance_harvesting_delay - 60; }

        if(absorbance_harvesting_delay < 30){absorbance_harvesting_delay = 30;} // Clamp
lower of the delay time
    }
}

previousStateCLK = currentStateCLK;
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print (String(absorbance_harvesting_delay)+" ");
break;
case 3:
//Limite superior ABS
if(label_is_written){}
else{
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Limite Absorção");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print (String(max_absorption));
    lcd.setCursor(12,1);
    lcd.print("ABS");
    label_is_written = 1;
}

if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW)){
    if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){
        max_absorption++;
        if(max_absorption > 1000){absorbance_harvesting_delay = 1000;} // Clamp High

```

```

    }
    else{
        max_absorption--;
        if(max_absorption < 0){max_absorption = 0;} // Clamp lower
    }
}
previousStateCLK = currentStateCLK;
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print (String(max_absorption)+" ");
break;
case 4:
    //Hora ligar luzes
    if(label_is_written){}
    else{
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print("Hr ligar Luz");
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print (String(light_on_time));
        lcd.setCursor(12,1);
        lcd.print("Hr");
        label_is_written = 1;
    }
    if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW)){
        if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){
            light_on_time++;
            if(light_on_time > 24){light_on_time = 24;} // Clamp High
        }
        else{
            light_on_time--;
            if(light_on_time < 0){light_on_time = 0;} // Clamp lower
        }
    }
}

```

```

    }
    previousStateCLK = currentStateCLK;
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print (String(light_on_time)+" ");
    break;
case 5:
    //Hora ligar luzes
    if(label_is_written){}
    else{
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print("Hr Desligar Luz");
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print (String(light_off_time));
        lcd.setCursor(12,1);
        lcd.print("Hr");
        label_is_written = 1;
    }
    if((currentStateCLK == HIGH) && (previousStateCLK == LOW)){
        if(digitalRead(rotary_data) == HIGH){
            light_off_time++;
            if(light_off_time > 24){light_off_time = 24;} // Clamp High
        }
        else{
            light_off_time--;
            if(light_off_time < 0){light_off_time = 0;} // Clamp lower
        }
    }
    previousStateCLK = currentStateCLK;
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print (String(light_off_time)+" ");
    break;

```

```

    default:
    break;
}
if(digitalRead(rotary_sw)== LOW){
    return_to_menu = 1;
    label_is_written = 0;
    lcd.clear();
    page = 1;
    delay(250);}
}
}
// Operation Code
if (State != -1){
    int last_cycle_state = State;
    Time now_time = rtc.time();
    // Light Control-----
    if ( now_time.hr >= light_on_time && now_time.hr < light_off_time) {
        digitalWrite(relay_lights, LOW);
    }
    else{
        digitalWrite(relay_lights, HIGH);
    }
    // Correcting Level-----
    Serial.println(State);
    Serial.println(digitalRead(bot_level_pin));
    Serial.println(digitalRead(top_level_pin));
    if(State == 0){
        if(digitalRead(bot_level_pin) == 0){
            int previus_state = State;
            State = 1;
            while(digitalRead(top_level_pin) == 0){

```

```

    digitalWrite(relay_water_pump, LOW);
    delay(100);
}
digitalWrite(relay_water_pump, HIGH);
State = previus_state;
}
//}
// Make an Absorption Read-----
long max_interval = absorbance_normal_delay;
if( State == 0){
    max_interval = absorbance_normal_delay;
}
if( State == 3){
    max_interval = absorbance_harvesting_delay;
}
//Serial.println(timePassed(latest_measure,now_time));
//Serial.println(max_interval);
//Serial.println(printTime());
if(State == 2 ){
    //int points[10] = {0};
    digitalWrite(relay_detector_pump_in, HIGH);
    digitalWrite(LED_pin, HIGH);
    //delay(absorbance_fill_pump_on_time);
    //for(int i = 0; i <10 ; i++){
    //points[i] = analogRead(LDR_pin);
    //delay(100);
    //}
    float result = analogRead(LDR_pin);
    Serial.println (result);
}
if(((timePassed(latest_measure,now_time)) >= max_interval) && (State != 2)){

```

```

//Temperature read
sensors.requestTemperatures();
float tempC = sensors.getTempCByIndex(0);
//Absorbance read
int points[10] = {0};
digitalWrite(relay_detector_pump_in, HIGH);
digitalWrite(LED_pin, HIGH);
delay(absorbance_fill_pump_on_time);
for(int i = 0; i < 10 ; i++){
points[i] = analogRead(LDR_pin);
delay(100);
}
float result = average(points, 10);
digitalWrite(relay_detector_pump_in, LOW);
digitalWrite(relay_detector_pump_out, HIGH);
delay(absorbance_clean_pump_on_time);
digitalWrite(relay_detector_pump_out, LOW);
latest_measure = rtc.time();
digitalWrite(LED_pin, LOW);
// Writes results to SD
!SD.begin(4);
Serial.println (printTime()+ ";" + result + ";" + "Temperatura: "+ tempC);
myFile = SD.open(filename, FILE_WRITE);
if (myFile) {
    myFile.println(printTime()+ ";" + result + ";" + "Temperatura: "+ tempC);
}
myFile.close();
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print("ABS: "+ String(result));
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("Temp: "+ String(tempC)+"C");

```

```

// Set State to Harvesting
if(result <= max_absorption){
    State = 3;
}
else{
    State = 0;
}
}

// Harvesting
if(State == 3){
    if(last_cycle_state == 0){
        !SD.begin(4);
        myFile = SD.open(filename_harvest_time, FILE_WRITE);
        if (myFile) {
            myFile.println(printTime()+ ";" + "START");
        }
        myFile.close();
    }
    digitalWrite(relay_media_and_culture_pumps, LOW);
}
if(State == 0){
    if(last_cycle_state == 3){
        !SD.begin(4);
        myFile = SD.open(filename_harvest_time, FILE_WRITE);
        if (myFile) {
            myFile.println(printTime()+ ";" + "STOP");
        }
        myFile.close();
    }
    digitalWrite(relay_media_and_culture_pumps, HIGH);
}

```

}
}