

Projeto de monitoramento microcontrolado do cultivo mixotrófico de *Haematococcus pluvialis*

Microcontrolled monitoring project for the mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*

RESUMO

Com o desenvolvimento da indústria de alimentos a demanda por corantes teve aumento devido ao fato de que a cor é um dos principais indicativos de qualidade do produto para seus consumidores. O crescimento do mercado de pigmentos naturais estimulou a busca por fontes alternativas de produção. A demanda pelo pigmento alaranjado astaxantina tornou-se expressiva, a pesquisa biotecnológica descobriu que o cultivo sob estresse da microalga *Haematococcus pluvialis* estimula a produção de cistos vermelhos ricos em astaxantina. Visando uma maior produção de pigmento, tal como uma linearidade da produção, torna-se necessário maior controle dos parâmetros de cultivo. O presente trabalho objetivou o monitoramento em tempo real através de sensores dos parâmetros umidade, temperatura, e luminância, por influenciarem a produção do pigmento. Utilizando linguagem open-source do software Arduino um sistema de sensores foi montado para captar e transformar os estímulos gerados pelos sensores em valores para que sejam passíveis de interpretação, desta forma torna-se possível analisar de forma mais precisa a influência de cada parâmetro na produção do carotenoide.

PALAVRAS-CHAVE: Microalga. Monitoramento. Arduino.

ABSTRACT

With the development of the food industry, the demand for dyes has increased due to the fact that a color is one of the main indicators of product quality for its consumers. The growth of the natural pigments market stimulated the search for alternative sources of production. The demand for the orange pigment astaxanthin has become expressive, a biotechnological research has found that cultivation under stress of the microalgae *Haematococcus pluvialis* stimulates the production of red cysts rich in astaxanthin. Aiming at a greater pigment production, as well as a linearity of production, greater control of the cultivation parameters is necessary. The present work aimed to monitor in real time through sensors of the parameters humidity, temperature, and luminance, as they emphasize the pigment production. Using an open-source language from the Arduino software, a sensor system was set up to capture and transform the stimuli generated by the sensors into values so that they could be interpreted, thus making it possible to analyze more precisely the influence of each parameter on the carotenoid produce.

KEYWORDS: Microalgae. Monitoring. Arduino.

Letícia Pinto

letpin@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Andréia Anschau

andreiaanschau@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da indústria de alimentos, tem-se observado o aumento da demanda por corantes, sendo a cor do produto um dos principais indicadores de qualidade do ponto de vista do consumidor e fator fundamental na decisão de compra do produto, utilizando-se deste conhecimento os produtores através de estratégias de marketing agregam valor comercial ao produto por meio dos corantes (DOWNHAM & COLLINS, 2000). A expansão do mercado de pigmentos naturais, surgiu da necessidade de se encontrar fontes alternativas para corantes em alimentos, sendo a produção de pigmentos de origem biotecnológica uma ferramenta importante a ser explorada (MAPARI et al., 2005). Diante deste cenário, a demanda do pigmento natural alaranjado astaxantina tem aumentado, e sua aplicação na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e cosmética, como pigmento e molécula bioativa tem se tornado muito expressiva (CIFUENTES et al., 2003).

Ainda que os principais produtores atualmente utilizam-se do pigmento advindo de síntese química, a pesquisa biotecnológica deste pigmento está em expansão e, destacam-se dois microrganismos como principais produtores de astaxantina, a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Devido à sua importância econômica e investimentos no conhecimento do processo biotecnológico da *H. pluvialis* com o objetivo de tornar-se competitiva a produção sintética, diversos estudos têm sido desenvolvidos visando aumentar a eficiência do processo de obtenção de biomassa e, conseqüentemente, aumentar os rendimentos de astaxantina (SUH et al., 2006, GARCIA-MALEA et al., 2006). O metabolismo mixotrófico deste microorganismo também tem sido estudado e documentado (GUERIN et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1993; GONG e CHEN, 1997). Diversas metodologias e modificações de parâmetros de cultivo afim da formação de astaxantina tem sido sugeridos, como: adição de sal (CORDERO et al., 1996), deficiência de nitrogênio (ZHEKISHEVA et al., 2002), alta irradiação (SUH et al., 2006), deficiência de fosfato (HARKER et al., 1996), elevada temperatura (BOUSSIBA et al., 2000) e entre outras.

No presente trabalho, com o intuito de monitorar as variáveis que influenciam a produção do pigmento astaxantina utilizaremos sensores para analisar em tempo real a influência do ambiente na obtenção do produto de interesse. De modo geral a produção de microalgas em grande escala ocorre por acompanhamento através de análises físico-químicas de modo offline, neste trabalho por sua vez, buscaremos o monitoramento de variáveis como umidade, temperatura, luminância, pela aquisição online de dados (GEORGITZIKIS et al, 2012). Para um melhor controle do processo de produção de biomassa e de pigmentos utilizaremos a plataforma de prototipagem para o controle de sensores.

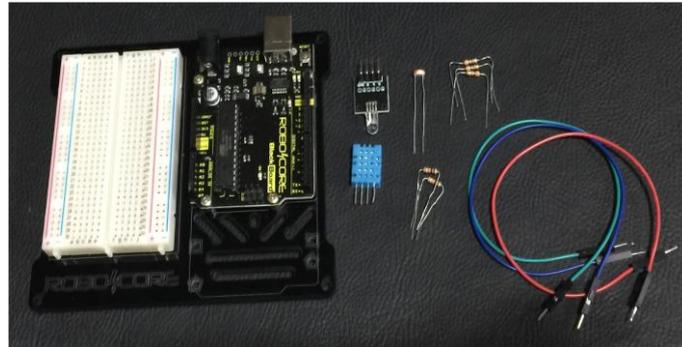
METODOLOGIA

Automatização por sistema aberto Arduino:

Para o obtenção dos parâmetros de controle visando a produção de carotenóides, foi utilizada a plataforma de prototipagem Arduino para o futuro controle de luminosidade das lâmpadas LEDs, acompanhamento da umidade local e temperatura para que posterior composição do fotobiorreator. Para a execução da

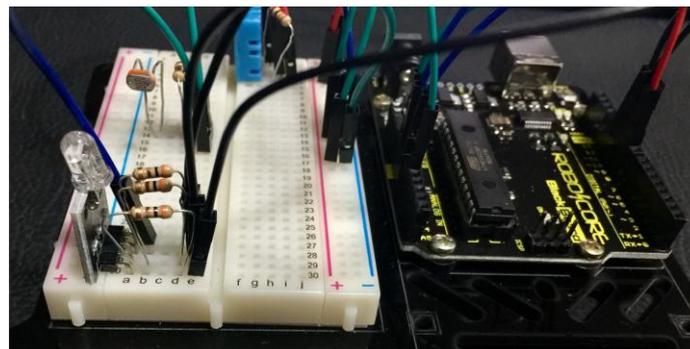
prototipagem do sistema utilizou-se placa Arduino UNO, sensor LDR (5mm), um sensor DHT11, resistores 10k ohms e 300 ohms, jumpers macho/fêmea, um LED RGB. Para a linguagem abordada no *open-source*, utilizou-se o Arduino Software (IDE) versão 1.8.12, segue abaixo software e sensores utilizados em circuito teste.

Figura 1: Componentes para montagem de circuito



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 2: Circuito teste montado



Fonte: Autoria própria (2020).

Para a programação dos sensores foram utilizados os seguintes códigos.

Sensor de umidade e temperatura:

```
#include "DHT.h"  
  
const int pino_dht = 9;  
  
float temperatura;  
  
float umidade;  
  
DHT dht(pino_dht, DHT11);  
  
void setup() {  
  Serial.begin(9600);  
  dht.begin();  
}  
  
void loop() {  
  delay(2000);  
  temperatura = dht.readTemperature();
```

```
umidade = dht.readHumidity();  
if (isnan(umidade) || isnan(temperatura)) {  
  Serial.println("Falha na leitura do Sensor DHT!");  
}  
else {  
  Serial.print("Temperatura:");  
  Serial.print(temperatura);  
  Serial.print(" *C ");  
  Serial.print("\t");  
  Serial.print("Umididade:");  
  Serial.print(umidade);  
  Serial.print(" %\t");  
  
  Serial.println();  
}  
}
```

Sensor de luz:

```
const int pinoLDR = A0;  
int leitura = 0;  
float tensao = 0.0;  
void setup() {  
  Serial.begin(9600);  
  pinMode(pinoLDR, INPUT);  
}  
void loop() {  
  leitura = analogRead(pinoLDR);  
  Serial.print("Leitura:");  
  Serial.print(leitura);  
  Serial.print("\t");  
  tensao = leitura * 5.0 / 1023.0;  
  Serial.print("Tensão:");  
  Serial.print(tensao);  
  Serial.print("V");  
  Serial.println();  
}
```

```
delay(1000);
```

```
}
```

Sensor de intensidade do LED RGB:

```
const int azul = 10;
```

```
const int verde = 11;
```

```
const int vermelho = 12;
```

```
String cor;
```

```
void setup()
```

```
{
```

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

```
  pinMode(azul, OUTPUT);
```

```
  pinMode(verde, OUTPUT);
```

```
  pinMode(vermelho, OUTPUT);
```

```
}
```

```
void vermelhoFuncao(){
```

```
  digitalWrite(azul, LOW);
```

```
  digitalWrite(verde, LOW);
```

```
  digitalWrite(vermelho, HIGH);
```

```
}
```

```
void azulFuncao(){
```

```
  digitalWrite(azul, HIGH);
```

```
  digitalWrite(verde, LOW);
```

```
  digitalWrite(vermelho, LOW);
```

```
}
```

```
void verdeFuncao(){
```

```
  digitalWrite(azul, LOW);
```

```
  digitalWrite(verde, HIGH);
```

```
  digitalWrite(vermelho, LOW);
```

```
}
```

```
void amareloFuncao(){
```

```
  analogWrite(azul, 0);
```

```
  analogWrite(verde, 50);
```

```
  analogWrite(vermelho, 255);
```

```
}
```

```
void roxoFuncao(){
analogWrite(azul, 207);
analogWrite(verde, 0);
analogWrite(vermelho, 255);
}
void brancoFuncao(){
digitalWrite(azul, HIGH);
digitalWrite(verde, HIGH);
digitalWrite(vermelho, HIGH);
}
void loop()
{
if(Serial.available()){
cor = Serial.readString();
Serial.println(cor);
}
if(cor == "Vermelho"){
vermelhoFuncao();
}
if(cor == "Azul"){
azulFuncao();
}
if(cor == "Verde"){
verdeFuncao();
}
if(cor == "Amarelo"){
amareloFuncao();
}
if(cor == "Roxo"){
roxoFuncao();
}
if(cor == "Branco"){
brancoFuncao();
}
}
```

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos testes iniciais realizados para a verificação do funcionamento dos sensores de umidade e temperatura, intensidade luminosa do LED e iluminância proporcionou a obtenção de muitos dados, o agrupamento e posterior interpretação foram um grande desafio, por este motivo é necessário pensar em medições com maiores intervalos de tempo, além da utilização de novo software para a plotagem gráfica, facilitando as posteriores análises. O estabelecimento do fluxo de informações foi imprescindível na tentativa de organização dos dados.

Em relação a prototipagem do fotobiorreator notamos a necessidade da adição de novas variáveis como pH e densidade ótica, que serão implementadas. Na segunda etapa do projeto realizaremos além da calibração de todos os sensores em laboratório, a estruturação do fotobiorreator para o cultivo da cepa de *H. pluvialis*.

No circuito teste para a intensidade luminosa foi testado único LED RGB, que por sua vez será substituído por fita de LED para que haja maior exposição luminosa. Com a possibilidade de alteração das variáveis de intensidade luminosa gostaríamos de realizar testes com diferentes valores, afim de obter aumentar a produção de carotenóides.

Em relação ao uso do sensor de temperatura e umidade, tal como o de intensidade luminosa servirão apenas para controle destas variáveis. Também sendo possível analisar a influência da temperatura na produção.

CONCLUSÕES

Para que o sistema de automação seja posto em prática alcance os objetivos esperado por este trabalho é necessário a inserção dos sensores de pH, densidade ótica, assim como a estruturação do protótipo.

A partir do estabelecimento do sistema de automação será possível dispor dos dados através dos sensores e analisar como os setpoints influenciam na obtenção do produto final, além de estabelecer maior controle sob o processo.

Com o processo de produção de carotenóides estabelecido e as variáveis compreendidas é possível então, alterar os setpoints afim de encontrar o melhor índice de produção. Caso seja do interesse também é possível estabelecer um novo meio de cultivo e analisar as variações em relação aos dados de controle, assim tornará possível por comparação propor a maior eficiência do meio frente a produção do composto de interesse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária e ao CNPQ pelo incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRINDA B.R.; Sarada R.; KAMATH, B.S.; RAVISHANKAR, G.A., Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*—cultural and regulatory aspects. *Curr Sci* 87, p.1290–1295, 2004

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A., Procedure for large-scale production of astaxanthin from haematococcus, US Patent 6,022,701, 2000.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A.; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N., Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 36(3-4), 343-357, 2003.

CORDERO, B.; OTERO, A.; PATINO, M.; ARREDONDO, B. O.; FABREGAS, J. Astaxanthin Production from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with Different Stress Conditions. *Biotechnology LeCers*, v. 18, n.2, p. 213-218, Feb. 1996.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P., Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 5-22, 2000.

GUERIN, M.; HUNTLEY M. E.; OLAIZOLA, M., *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition; Mera Pharmaceuticals Inc., *TRENDS in Biotechnology*, v.21, n.5, 2003.

GEORGITZIKIS, V.; AKRIBOPOULOS, O.; CHATZIGIANNAKIS, I., Controlling Physical Objects via the Internet using the Arduino PlaNorm; *IEEE Latin America Transactions*, v. 10, Issue 3, 2012.

MAPARI, S.A.S.; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O. ; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. Thrane, U.; Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, v.16, p. 231-238, 2005.

SUH, I. S.; JOO, H-N; LEE, C-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology*, 2006.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z.; Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of Astaxanthin esters, *Journal of Phycology*, v.38, issue 2, 2002.