



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102016030139-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** BR 102016030139-4

**(22) Data do Depósito:** 21/12/2016

**(43) Data da Publicação Nacional:** 25/09/2018

**(51) Classificação Internacional:** F21S 10/00; F21S 8/00; F21V 33/00; H05B 37/02; F21W 131/20; F21Y 109/00; F21Y 115/10.

**(54) Título:** MÓDULO DE ILUMINAÇÃO CONTROLADA PARA CULTIVO DE MICRORGANISMOS FOTOATIVOS EM MESAS AGITADORAS

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Pessoa Jurídica. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

**(72) Inventor:** CARLOS RICARDO SOCCOL; JÚLIO CÉSAR DE CARVALHO.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 21/12/2016, observadas as condições legais

**Expedida em:** 06/09/2022

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## **MÓDULO DE ILUMINAÇÃO CONTROLADA PARA CULTIVO DE MICRORGANISMOS FOTOATIVOS EM MESAS AGITADORAS**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

(001) O presente modelo de utilidade trata de um módulo de iluminação acoplável a uma mesa agitadora (shaker). O modelo de utilidade amplia a utilidade de um shaker tradicional ao realizar a iluminação por sistema de LED endereçável, na parte inferior dos frascos, com as vantagens de: reduzir a reflexão de luz, aumentando a eficiência na iluminação; permitir a modulação de intensidade, fotoperíodo e espectro da luz individuais, aplicada aos frascos; e permitir a avaliação de alguns parâmetros físico-químicos da cultura durante o cultivo. Com esse melhoramento, amplia-se a gama de estudos que podem ser feitos usando cultivo de microrganismos fotoativos em mesas agitadoras.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA**

(002) Mesas agitadoras orbitais ou reciprocantes (shakers) são equipamentos laboratoriais clássicos que permitem o cultivo de microrganismos em frascos com agitação constante e controlada. Essa agitação atende a dois objetivos principais: 1) manter os microrganismos em suspensão, e 2) melhorar a transferência de gases como oxigênio e gás carbônico entre o líquido e o ar. Shakers trabalham com agitações típicas de 100-200 rpm. Em geral, quanto maior a agitação, melhor é a transferência gasosa e mais alto é o cisalhamento, o que pode ser um problema para alguns microrganismos. Mesas agitadoras podem também ser usadas para suspensão, homogeneização e mistura, extração, e outras operações realizadas em pequena escala.

(003) Mesas agitadoras consistem de uma base que contém um motor ligado a um sistema de transmissão com excentricidade, e uma mesa ou suporte onde são colocados os frascos a serem agitados. O sistema de transmissão transforma o movimento de alta rotação do motor (normalmente elétrico) em um movimento de baixa rotação e excêntrico (orbital, mais comum) ou reciprocante (vai e vem, usado em banhos tipo Dubnoff). A maioria dos shakers mantém o suporte de frascos logo acima da base motorizada, e o conjunto pode ou não ser refrigerado, e pode ou não ser iluminado. Como a mesa de suporte de frascos precisa ser ligada

ao sistema de transmissão, recomenda-se que as mesas agitadoras sejam carregadas com massas limitadas a algumas dezenas de quilogramas, o que é suficiente para o trabalho em pequena escala de cultivo de microrganismos em frascos tipo Erlenmeyer ou similar.

(004) Mesas agitadoras são versáteis para trabalhos em escala laboratorial, seja em pesquisa, seja em processos industriais – no controle de qualidade ou na produção de inóculos, por exemplo. Essas mesas podem trabalhar com quantidades variáveis de frascos, tipicamente de um a dezenas, e para cada frasco pode ser controlada a composição inicial e a taxa de inoculação. Pela natureza construtiva das mesas agitadoras, a temperatura e agitação a que os frascos são submetidos é essencialmente a mesma. A iluminação pode ser homogênea, mas isso depende da disposição e natureza da fonte de luz.

(005) Em cultivos microalgais de pequena escala, mesas agitadoras são úteis porque permitem realizar dezenas de cultivos simultâneos com condições controladas. A iluminação é especialmente importante nesse caso, já que as microalgas são microrganismos fotossintéticos e dependem da absorção de luz para seu desenvolvimento. Também existem bactérias fotossintéticas e uma miríade de organismos fotoativos, isto é, que podem sofrer alterações metabólicas e de fisiologia dependendo da irradiação luminosa a que estão submetidos.

(006) Algumas mesas agitadoras comerciais possuem sistemas próprios de iluminação, onde a fonte de luz é colocada acima dos frascos, ou lateralmente. Nos sistemas atuais, a iluminação é deficiente - há dificuldade em distribuir a luz de forma homogênea, o que é agravado porque as paredes cônicas dos frascos de Erlenmeyer usados nas mesas agitadoras causam reflexão parcial da luz. A forma ideal de iluminar shakers seria por baixo, mas há dois inconvenientes principais: 1) como a base é móvel e a maioria dos sistemas de iluminação (lâmpadas fluorescentes) possui uma altura tal que eleva o centro de gravidade, o esforço no sistema mecânico fragiliza o equipamento, e 2) há geração de calor que é transmitido diretamente para as culturas. Com o advento de novas fontes de iluminação compacta, como LEDs, já é possível iluminar mesas agitadoras de forma alternativa, como se descreve neste modelo de utilidade.

(007) O trabalho com microrganismos fotossintéticos ou fotoativos consiste normalmente de cultivo e submissão a condições diversas de iluminação. Entre as condições de iluminação que afetam os ensaios, estão a qualidade da luz (espectro da fonte de luz), a intensidade luminosa, e o fotoperíodo (proporção do dia em que a cultura é iluminada).

(008) Os principais inconvenientes dos sistemas de agitação orbital de hoje, para cultivo de microalgas e microrganismos fotoativos, são a impossibilidade de se usar condições variáveis de irradiação luminosa - os sistemas não permitem, em geral, a simulação de um fotoperíodo genuíno, com uma irradiação variável como ocorre no meio ambiente. Os sistemas também não

permitem avaliar condições individuais de iluminação, muito menos usando espectros de irradiação variáveis.

(009) Por outro lado, o trabalho em mesas agitadoras tem um inconveniente que é a dificuldade em acompanhar, de forma contínua, o desenvolvimento e estado fisiológico das culturas. Análises típicas para essas culturas são pH inicial e final, concentração de diversos componentes do meio de cultivo e metabólitos, e a análise da biomassa. Para realizar essas análises, é necessário remover os frascos, retirar uma alíquota da suspensão, e proceder às análises. A interrupção da agitação, a redução de volume pela retirada de amostra, e a possibilidade de contaminação são dificuldades inerentes a esse processo.

(0010) As últimas décadas viram a miniaturização de tecnologias de iluminação (como LEDs e materiais eletroluminescentes) e detecção de luz (com fotodiodos, fotorresistores, sensores CMOS e CCD), assim como a ampliação da *qualidade* de luz que pode ser obtida (com LEDs de vários comprimentos de onda). Em particular, o uso de LEDs das três cores primárias (vermelho, verde e azul) permite a simulação de todo o espectro luminoso, o que é explorado comercialmente em displays de diversos dispositivos eletrônicos.

(0011) O uso adequado dessas novas tecnologias permite a ampliação não apenas da *qualidade* da iluminação em sistemas em mesas agitadoras, como uma análise espectroscópica contínua dos cultivos, que é o que se apresenta neste modelo de utilidade.

(0012) O documento US2009111179A1 (Cell Culture Shaking Device and Shaking Culture Method as Cell Culture Method, depositado por MEDINET CO LTD), descreve um aparato e um método para agitação de culturas celulares em bags ou sacos, os quais contemplam um sistema de iluminação controlada para sistemas agitados por pressionadores mecânicos. No entanto, tal sistema de agitação não é de uso difundido em culturas de microalgas, de modo que o estado da técnica carece de sistemas que possam ser utilizados em mesas agitadoras tradicionais ou shakers. Além disso, a iluminação prevista no referido documento é indicativa de operação, e não para suportar o desenvolvimento de fotossíntese, pois é desenvolvida para células animais, como especificado no parágrafo 55 daquele documento.

## **DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

(0013) A Figura 1 representa uma mesa agitadora dotada de um sistema de iluminação e espectroscopia acoplados. A Figura 2 representa detalhes do sistema de iluminação e espectroscopia.

(0014) Na Figura 1: (1) representa uma mesa agitadora tradicional, aos quais são acoplados um separador (2), o sistema de iluminação e espectroscopia (3), detalhado na Figura 2; uma lâmina de proteção transparente (4), uma grade de suporte e isolamento (5), um controlador de interface programável (PIC) (6), o ponto de alimentação de energia DC (7) e o ponto de ligação de um cabo de lógica (8), para programação através de um computador.

(0015) Na Figura 2, (i) representa um módulo individual de iluminação e espectroscopia, (ii) indica o um LED RGB endereçável, disposto junto a outros LEDs, (iii) representa fotorreceptores (fotodiodo ou detetor CMOS) para análise espectroscópica, nesse desenho (iii) para cada módulo, (iv) representa a largura de um módulo individual e (v) é o comprimento de um módulo individual.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

(0016) O presente modelo de utilidade descreve um módulo de iluminação e análise espectroscópica acoplável a uma mesa agitadora orbital, que pode ser usado para cultivar microrganismos fotoativos como microalgas, bactérias e fungos. Com esse módulo é possível trabalhar de forma individual as seguintes características da iluminação de frascos colocados acima dos módulos de iluminação: a) o espectro luminoso aparente, podendo trabalhar com luz de um comprimento de onda puro (vermelho, verde ou azul) ou mistura de luz desses comprimentos de onda com diferentes intensidades, efetivamente simulando luz de qualquer cor; b) a intensidade luminosa, que pode ser variada com o tempo; c) o fotoperíodo, que pode ser variado com o tempo, inclusive com vários períodos de claro-escuro durante um dia. Com esse módulo é possível ler de forma individual as seguintes características do sistema: a) a fluorescência de clorofila, pela irradiação da cultura com luz azul, seguida da leitura de emissão a 680nm; b) a cor e a refletância da cultura, usando iluminação nos três comprimentos de onda e leitura da emissão de luz por fotorreceptor. Essas leituras podem ser feitas em alguns segundos e *in situ*, permitindo o acompanhamento contínuo do desenvolvimento de cada frasco individual.

(0017) Mais especificamente, na Figura 1: (1) representa uma mesa agitadora tradicional. Essa mesa agitadora pode ser de qualquer marca ou modelo, sendo que o que muda na aplicação do presente modelo de utilidade é o tamanho e o número de módulos que podem ser acoplados, que devem juntos ocupar aproximadamente a mesma área da plataforma da mesa agitadora. A fixação do sistema pode ser feita por colagem, uso de parafusos, rebites ou outra forma de fixação que não altere o funcionamento dos circuitos. À mesa agitadora é acoplado inicialmente

um separador (2), feito em material isolante, para evitar o contato dos componentes eletrônicos do sistema de iluminação com a plataforma da mesa agitadora, que é geralmente metálica. Vantajosamente, esse separador é feito de lâmina polimérica fina, para facilitar a condutividade térmica, e o resfriamento do sistema de iluminação quando usado com altas potências. Sobre esse separador é apoiado e fixado o sistema de iluminação e espectroscopia (3), que consiste de quatro tipos principais de componentes: a) os LEDs RGB, que podem ser do tipo endereçável para poderem trabalhar com cor e intensidade luminosa fixa após programação; esses LEDs podem ser da família 2812B ou similar; b) o sistema de detecção (espectroscopia), através de fotorreceptores, que podem ser escolhidos entre uma diversidade de fotodiodos, fototransistores, sensores CMOS e outros comerciais, inclusive na faixa UV e infravermelha, mas preferencialmente na faixa visível e usando filtros passa-banda para as cores azul, verde e vermelho, c) o sistema de controle e interface lógica programável (PIC) (6), que pode ser uma placa baseada em microprocessador ARM Cortex, Atmel AVR, Intel Quark, entre outros; e d) os componentes de alimentação e periféricos como uma fonte de energia DC que é ligada ao sistema de iluminação em (7), capaz de fornecer potência suficiente diretamente para os módulos (por exemplo, para os módulos ilustrados, que têm potência máxima de 10W, são necessários até 5V e 2A por módulo). Logo acima do módulo de iluminação é colocada uma lâmina de proteção, transparente, feita em vidro ou polímero incolor. Vantajosamente, essa lâmina pode ser rígida e colocada sobre suporte que permita o resfriamento do sistema no caso de uso de altas potências de iluminação, com conseqüente aquecimento do sistema. Mais vantajosamente, a lâmina é recoberta com uma segunda camada, em polímero flexível e transparente, com índice de refração entre 1,33 e 1,55. Os frascos são apoiados sobre esse suporte transparente, recebendo luz pela base do frasco Erlenmeyer, o que permite uma melhor irradiação de luz, devido ao ângulo de incidência da luz ser próximo ao eixo normal ao fundo plano do frasco Erlenmeyer. O sistema ainda conta com uma grade de suporte e isolamento (5), feita em material polimérico leve, por exemplo poliestireno expandido. Essa grade tem duas funções: dar mais segurança à fixação dos frascos que serão agitados, e isolar a luz refratada por frascos vizinhos, permitindo melhor controle da qualidade individual de luz para cada um dos frascos. Por ser programável, o sistema pode funcionar sem ligação permanente com um computador após a sua programação; no entanto, é vantajoso do ponto de vista experimental monitorar continuamente o comportamento das culturas, o que pode ser feito conectando um cabo de dados ou um transmissor (8) embutido ao sistema de controle.

(0018) O software utilizado depende da implementação específica usada para os LEDs RGBs e o PIC usados (fabricantes e modelos), e o sistema operacional usado no computador, e pode vantajosamente ser baseado em sistemas proprietários ou de código aberto, como é descrito

no Exemplo. De forma simplificada, a programação consiste em definir, para cada um dos módulos do sistema de iluminação, a curva de irradiação e as análises e registro de dados. O técnico com conhecimento na área saberá reconhecer qual a biblioteca adequada para o controle dos LEDs e leitura de intensidade luminosa interfaceada pelo PIC. Vantajosamente, esta implementação usa LEDs RGB endereçáveis, com a alimentação de energia feita por fonte independente da ligação lógica entre LEDs.

(0019) A curva de irradiação define a cor e a intensidade luminosa como função do tempo, podendo-se trabalhar com luz de um comprimento de onda puro (vermelho, verde ou azul) ou mistura de luz desses comprimentos de onda com diferentes intensidades, efetivamente simulando luz de qualquer cor, com qualquer intensidade entre 0 e a irradiação máxima do módulo; a cor pode ser alterada com o tempo, embora isso seja menos comum que alterar a intensidade luminosa.

(0020) A análise do sistema consiste em definir a frequência de interrupção da iluminação para análise, feita automaticamente pelo PIC, usando algoritmos para avaliar: a) a fluorescência de clorofila, pela irradiação da cultura apenas com luz azul, seguida da leitura de emissão a 680nm; o efeito de fluorescência é isolado do de reflexão pela comparação das leituras com fotorreceptores dotados de filtros diferentes; e b) a cor RGB e a refletância da cultura, usando iluminação nos três comprimentos de onda e a leitura do sinal pelos fotorreceptores. Para essas leituras, que são feitas em alguns segundos, a irradiação do sistema é temporariamente interrompida para entrada das rotinas de análise. O técnico com conhecimento na área saberá reconhecer outras possibilidades de análise espectroscópica usando o mesmo sistema físico, que podem ser feitas processando e interpretando as curvas de emissão de luz e refletância.

(0021) Uma vez estabelecida a programação do sistema, pode ser feita a calibração para intensidade luminosa, usando sensores externos ao sistema que indicarão a intensidade luminosa máxima fornecida por cada módulo do sistema de iluminação, e a intensidade de sinal fornecida pelos fotorreceptores. Como todos os dispositivos usados são de estado sólido, a resposta dos componentes varia pouco com o tempo, e uma calibração deve ser válida por longo período.

(0022) Uma vez programado e calibrado o sistema, prossegue-se com os experimentos ou rotinas de trabalho, colocando os frascos no sistema, iniciando a rotina de controle e a agitação da mesa.

(0023) Com esse sistema, abre-se uma gama de novas possibilidades para o estudo de microrganismos fotoativos, desde a simulação e acompanhamento cinético de organismos com a variação do ciclo e intensidade de iluminação, até a simulação de condições ambientais de profundidade variável, onde o espectro luminoso difere daquele da luz solar. Em todos os casos, a análise espectroscópica contínua traz uma possibilidade de análises sem precedentes aos

experimentos. A precisão atingida depende da calibração inicial, mas o uso de fontes chaveadas, componentes de precisão e leitura com mais de um fotorreceptor, ou uma matriz de fotorreceptores (fotodiodos ou sensores CMOS ou CCD), permite melhorar a qualidade dos resultados.

## EXEMPLO

(0024) O presente modelo de utilidade é explicado em maior detalhe pelo seguinte exemplo de implementação, porém não é limitado pelo mesmo.

(0025) A uma mesa agitadora com base de dimensões 40 x 60 cm é adaptada uma lâmina de PVC de 0,5mm. Sobre a folha, é colocado diretamente um sistema de iluminação constituído por 24 módulos, cada módulo com 36 LEDs WS2812B com a lógica ligada em série e a alimentação (5V) em paralelo, e três fotodiodos da série C30817EH, ligados a uma interface analógico-digital embutida. Esses componentes eletrônicos são montados em uma placa de circuito impresso, em arranjo radial conforme Figura 2, e que contém os outros componentes periféricos (resistores, capacitores, e as pistas condutoras que interligam os módulos). O sistema é ligado a um circuito microcontrolador comercial Arduino Uno SMD R3, e esse microcontrolador é ligado a um computador por cabo USB. O sistema é alimentado por uma fonte chaveada de 24V, e 3A, e consome no máximo 60W. Sobre o módulo de iluminação é colocada uma máscara espaçadora de alumínio, de 1,6mm de altura, e o sistema todo é recoberto por uma manta removível de 1mm, de PVC cristalino e flexível. O conjunto é perfurado nas extremidades, e preso por 4 parafusos. Acima da manta de PVC é colocada uma grade de poliestireno expandido, como ilustrado na Figura 1. O sistema é calibrado usando um sensor de luz quantum, de forma que a intensidade luminosa máxima possa ser estabelecida: as cores individuais são calibradas para 216 (azul), 265 (verde) e 322  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (vermelho), dando uma intensidade luminosa máxima de 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  com luz branca (resultante das três cores emitidas simultaneamente). Os fotodiodos são calibrados para intensidade zero, colocando uma placa negra com sobre cada módulo, e desligando o sistema, e para a intensidade nominal calibrada pelo sensor quantum, colocando uma placa refletiva difusora de alumínio fosco sobre a grade, com refletividade de 90%, e com o sistema ligado e alimentado com uma potência por módulo de 20% da potência máxima, ou 0,4W. Com os valores de calibração alimentados ao sistema de controle, e após programação do sistema de controle, a mesa agitadora está pronta para receber até 24 frascos que terão suas curvas de iluminação e análise independentes.

## REIVINDICAÇÃO

1. MÓDULO DE ILUMINAÇÃO CONTROLADA PARA CULTIVO DE MICRORGANISMOS FOTOATIVOS acoplado a mesas agitadoras (shakers) entre a plataforma da mesa agitadora (1) e os frascos que nela são posicionados com o auxílio de uma grade (5), caracterizado por apresentar componentes de estado sólido montados em módulos (i) de largura representada por (iv) e comprimento representado por (v), individuais ou acoplados em placa de circuito (3), ter os componentes de iluminação e detecção distribuídos com simetria radial em relação ao centro do módulo, ter iluminação feita usando LEDs RGB programáveis (ii) existentes no mercado, ter um número de LEDs suficiente para que a intensidade luminosa por módulo seja de 0 a  $2,5\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , conter um microcontrolador (6) para modular a cor, intensidade luminosa e duração do período de iluminação para cada LED, apresentar fotorreceptores (iii) para a detecção de luz com sensibilidade na faixa de comprimento de onda de 200 a 2000nm, ter um sistema de detecção lido por um microcontrolador (6), que registra em memória ou envia a um computador por meio de um cabo de lógica (8) a intensidade de sinal, conter um microcontrolador (6) comercial e programado através de computador, que usa bibliotecas proprietárias ou de acesso livre, ter uma manta isolante de material polimérico (2) entre o sistema de iluminação e a mesa agitadora, ter uma manta transparente de material polimérico ou de vidro (4) entre o sistema de iluminação e os frascos e ter um ponto de alimentação de energia (7).

DESENHOS

FIGURA 1

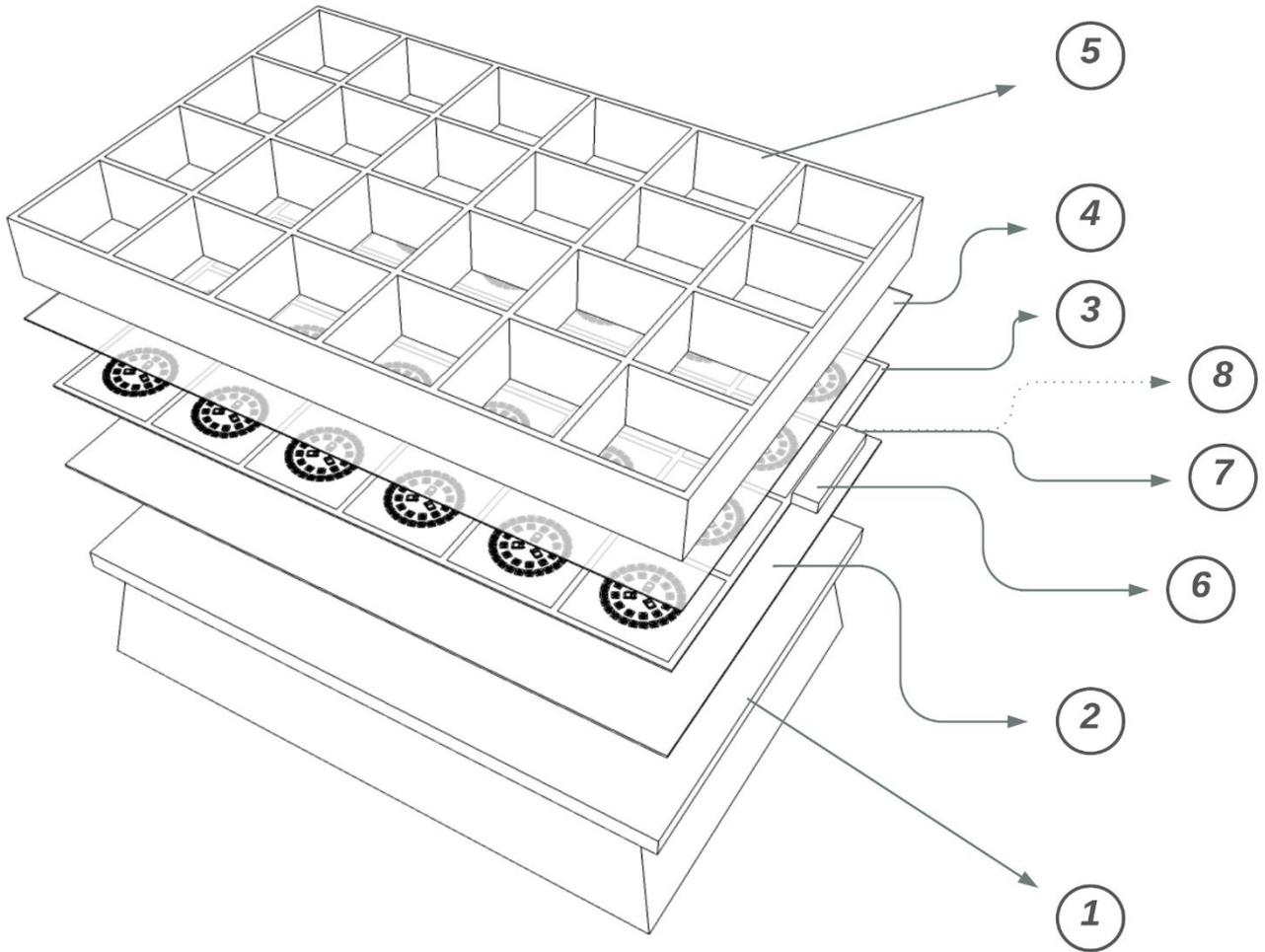


FIGURA 2

