CAPÍTULO 8

Matrizes poliméricas para imobilização de microalgas aplicadas ao tratamento de efluentes: Uma análise de prospecção tecnológica de patentes

Paulo Alexandre Silveira da Silva, Beatriz Jacob-Furlan, Rafael Silva Ribeiro Gonçalves, Pedro Henrique Siqueira Zatta, Gilvana Scoculi de Lira, Ihana Aguiar Severo, André Bellin Mariano

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-8-1.c8

Resumo

A utilização de microalgas para o tratamento de efluentes vem obtendo destaque nas últimas décadas. Dessa maneira, novas tecnologias e processos se mostram satisfatórios no que concerne a eficiência de biorremediação. Uma das opções utilizadas está baseada na imobilização de microalgas em matrizes poliméricas, a qual visa otimizar as características intrínsecas desses microrganismos para o tratamento de águas residuárias. Portanto, o objetivo do presente capítulo consiste em analisar o estado da arte do uso de matrizes poliméricas para a imobilização de microalgas aplicadas a biorremediação de efluentes por meio da prospecção tecnológica de patentes. O estudo está centrado na busca por patentes em diversas bases de dados de acesso aberto, utilizando códigos booleanos combinados com palavras-chave específicas que contemplam o processo em estudo. O critério adotado está baseado no sistema de classificação internacional CPC (*Cooperative Patent Classification*). À vista disso, foi analisada a evolução histórica da atividade de patenteamento, o número de patentes depositadas por países e os principais cessionários. Muitos trabalhos científicos são publicados frequentemente na literatura sobre essa temática, no entanto, estudos prospectivos são pouco investigados, o que pode fornecer informações valiosas a respeito da maturidade tecnológica de um dado processo.

Palavras-chave: algas, biopolímeros, imobilização celular, inovação.

1. Introdução

As microalgas têm sido amplamente aplicadas para diversos fins biotecnológicos em detrimento do impacto ambiental oriundo das atividades humanas nos últimos anos. Por essa razão, houve a necessidade de buscar formas de tratamento e mitigação dos danos causados aos ecossistemas, principalmente aquáticos. A biorremediação tem sido utilizada para este propósito, a qual é definida como o uso de microrganismos no tratamento e transformação de contaminantes de uma matriz ambiental; entretanto, quando há o uso específico de microalgas, este processo é denominado de ficorremediação (EMPARAN *et al*., 2019).

O processo de ficorremediação tem o objetivo de remover ou tratar os contaminantes, consumindo-os como nutrientes para produção de biomassa, e de degradar ou transformar os compostos químicos tóxicos em compostos inertes (SARKAR; DEY, 2021).

Nos últimos anos, com o aumento da população e o uso descontrolado dos recursos naturais, estão surgindo muitos problemas relacionados à qualidade da água e saneamento básico. O tratamento de efluentes é realizado pelas estações de tratamento, e a sua purificação consiste basicamente em três etapas: tratamento primário, secundário e terciário (ABDEL-RAOUF *et al*., 2012).

O tratamento primário é responsável pela retirada dos sólidos suspensos, por meio de processos físico-químicos, como floculação e decantação, conseguindo remover cerca de 40% de todos os compostos orgânicos dos efluentes. O tratamento secundário utiliza principalmente os processos biológicos, para remover todos os compostos orgânicos e a maior parte possível dos compostos inorgânicos. Quando não for possível remover todas as impurezas presentes no efluente, é então necessário a realização do tratamento terciário, através de processos químicos ou biológicos, é responsável por remover substâncias específicas presentes na água (VON SPERLING, 2007).

As águas residuárias que precisam ser tratadas, são constituídas principalmente por compostos carbonáceos orgânicos (determinados pela demanda bioquímica de oxigênio – DBO) e compostos inorgânicos, como fosfatos, amônio, bicarbonato, sódio, dentre outros (ABDEL-RAOUF *et al*. 2012). Quando a matéria orgânica é o principal poluente, preferencialmente, deve-se

utilizar processos biológicos para o tratamento, pois são mais simples, eficientes e com um custo relativamente mais baixo quando comparado aos demais processos (MOHSENPOUR *et al*., 2021).

Como o tratamento de águas residuais é imprescindível, a busca por novas tecnologias de tratamento é urgente. A imobilização celular é um processo que consiste em aprisionar ou fixar células ou enzimas em uma matriz através de interações físico-químicas. A utilização de biomassa imobilizada para tratamento de efluentes está sendo cada vez mais estudada (CHEIRSILP *et al*., 2017; XIE *et al*., 2018; CAO *et al*., 2020; KUBE *et al*., 2021), pois a técnica tende a aprimorar as características intrínsecas dos microrganismos, como por exemplo, a remoção de DBO, retenção de sólidos, além de eliminar a etapa de sedimentação. Logo, o sistema de células imobilizadas é capaz de aumentar a eficiência e reduzir os custos dos processos biológicos (GIESE, 2015).

Considerando estes aspectos, os processos baseados em microalgas imobilizadas são alvo de inúmeras investigações envolvendo questões de sustentabilidade e econometria, as quais evidenciam as tendências, problemas que necessitam de soluções inovadoras, o nível de maturidade tecnológica, além de auxiliar na tomada de decisão dos investidores (TABERNERO *et al*., 2013). Essas pesquisas geralmente são refletidas em muitas publicações de artigos científicos, relatórios técnicos e patentes. No entanto, os documentos de patentes contêm uma riqueza incomparável de informações com grande relevância industrial. As patentes representam as inovações em um país ou organização e são um acordo entre o inventor e o governo ou agência. A utilização desses documentos é importante para mapear os níveis de desenvolvimento de uma área específica para fins industriais. A título de exemplificação, a análise de patentes ajuda a determinar a novidade e suas invenções, tanto na propriedade intelectual, quanto na competitividade tecnológica, ao determinar os pontos fortes e fracos do concorrente, bem como na estimativa de sua evolução ou declínio em um determinado período (WIPO, 2016).

Portanto, o objetivo do presente capítulo consiste em analisar o estado da arte do uso de matrizes poliméricas para a imobilização de microalgas aplicadas a biorremediação de efluentes por meio da prospecção tecnológica de patentes. Até onde se sabe, a análise de documentos de patentes sobre a

temática proposta neste trabalho raramente foi discutida na literatura atualmente disponível.

2. Principais matrizes utilizadas na imobilização celular: Uma breve revisão

A matriz de imobilização, comumente chamada de suporte, deve possuir algumas características básicas dependendo da sua aplicação, sendo as principais: Não ser tóxica para as células, resistente a ataques químicos e a degradação biológica, alta capacidade de retenção celular, apresentar maleabilidade a solicitações mecânicas (tensão de cisalhamento, compressão, pressão interna de gases, entre outros), e principalmente, permitir a difusividade de substratos e produtos. Existem três categorias principais quanto a origem do material que pode ser utilizado como suporte, podendo ser definidas como: (i) materiais poliméricos naturais (quitosana, alginato e celulose); (ii) polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno e poliuretano); e (iii) materiais inorgânicos (alumina, zircônia e sílica) (SCHMIDELL *et al*., 2001). Entretanto, os polímeros naturais baseados em quitosana e alginato são enfatizados neste estudo, uma vez que eles são uma classe de suportes amplamente empregados em procedimentos de imobilização celular em função da sua diversidade, custo relativamente baixo e facilidade na degradação, não causando danos ambientais.

2.1. Quitosana

A quitosana é um copolímero biodegradável derivado da quitina, e que apresenta propriedades termoplásticas. É amplamente utilizada em encapsulamentos de microrganismos ou como carreadores de fármacos. Diferentes métodos para formação de esferas de quitosana já foram descritos na literatura, porém o mais empregado é o método de gelificação iônica. O processo consiste basicamente no gotejamento de uma solução ácida de quitosana, em um recipiente contendo uma segunda solução rica em íons monovalentes, como o Ca^+ e Na^+ (SILVA *et al*. 2011).

A quitosana também pode assumir o papel de polímero de revestimento, com a finalidade de adicionar propriedades mecânicas, como resistência, melhoramento da ligação entre matrizes e suportes, além de poder ser modificada para sua forma de nanoquitosana, a qual possui nanoporos que

aumentam a superfície de contato e favorecem reações químicas e biológicas (VIJAYALAKSHMI *et al*., 2016; MALINOSKI e MARANHO, 2020).

2.2. Alginato

O alginato é um biopolímero proveniente da parede celular das algas marrons, geralmente encontrado comercialmente como alginato de cálcio e alginato de sódio. Capaz de formar estruturas coloidais, o composto tem despertado interesse do setor tecnológico. O alginato já vem sendo utilizado na saúde e na alimentação, principalmente na formulação de cápsulas farmacêuticas e alimentos, atuando como espessante e estabilizante. O uso do biopolímero como agente de encapsulamento celular apresenta muitas vantagens. O composto forma uma matriz biodegradável, não tóxica, e permite a difusão de nutrientes e gases pela matriz, mantendo a viabilidade dos microrganismos que ali estão retidos (SILVA, 2011; VIJAYALAKSHMI *et al*., 2016).

3. Metodologia

Com o propósito de compreender o panorama da propriedade intelectual no escopo deste estudo, foi realizada uma análise de patentes utilizando a plataforma de busca Espacenet, desenvolvida pelo Escritório Europeu de Patentes (*European Patent Office*, EPO). Essa base de dados contempla mais de 120 milhões de publicações de patentes registradas no mundo todo, fornecendo informações de atividades de invenção em um determinado período de tempo. O Espacenet agrupa documentos internacionais em famílias, com base na coleção de dados do Tratado de Cooperação de Patentes (*Patent Cooperation Treaty*, PCT), definido pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (*World Intellectual Property Organization*, WIPO).

A busca de patentes foi realizada em agosto de 2021, selecionando a opção de pesquisa avançada. O método consistiu em um procedimento de três etapas: (1) busca usando os códigos de classificação do CPC (*Cooperative Patent Classification*), baseado em uma organização categórica de seções (https://www.cooperativepatentclassification.org/index). Tais códigos são padronizados para classificar as patentes de acordo com diferentes áreas tecnológicas, proporcionando um alto nível de detalhamento nas pesquisas com

resultados mais precisos. O montante de códigos selecionados para o estudo proposto é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Códigos para prospecção de patentes.

Códigos	Descrição
C12N1/12	Unicellular algae; Culture media therefor (as new plants A01H 13/00)
C02F2003/001	Using granular carriers or supports for the microorganisms
C02F3/108	Immobilising gels, polymers or the like
C12N5/0012	Cell encapsulation
C12N11/04	Entrapped within the carrier, e.g. gel or hollow fibres
C12N11/06	Attached to the carrier via a bridging agent
C12N11/08	The carrier being a synthetic polymer
C12N11/10	The carrier being a carbohydrate
C12N11/14	Enzymes or microbial cells immobilised on or in an inorganic carrier

Posteriormente, (2) usou-se palavras-chave e suas variantes, incluindo os termos em inglês "*microalgae*", "*immobilization*", "*cell immobilization*" e "*bioremediation*". O propósito dessa etapa consiste em refinar a pesquisa, bem como, reduzir o conjunto de dados para documentos mais específicos. O truncamento "+" das palavras foi realizado a fim de recuperar diferentes variações relevantes vinculadas a um dado termo, além da combinação dos operadores booleanos "AND", "OR" e "NOT".

Devido a abrangência do tema, (3) os documentos resultantes da pesquisa foram compactados e exportados para o *software Microsoft Office*

Excel 2019 para realização de posterior análise mais detalhada. Os dados foram expostos de maneira visual, considerando indicadores como ano de publicação, país de origem e inventores.

Ao final da realização da pesquisa foi possível gerar gráficos e tabelas com os documentos de patentes encontradas nos bancos de dados a partir da metodologia descrita acima.

4. Resultados e discussão

Considerando a combinação entre os códigos C12N1/12 e C12N11/04 e utilizando o operador booleano “AND”, esta busca foi a que melhor atendeu o objetivo proposto neste estudo, contemplando 25 documentos de patentes pertencentes a 15 famílias, as quais correspondem aos critérios de pesquisa, como mostrado na Figura 1. O número de famílias pode englobar diversas publicações de uma mesma patente em diferentes países e idiomas.

C12N1/12	C02F2003/001	C02F3/108	C12N5/0012	C12N11/04	C12N11/06	C12N11/08	C12N11/10	C12N11/14	Patentes
X									3186
	X								1404
		X							627
			X						279
				X					1364
					X				321
						X			2044
							X		1546
								X	2068
X	X								3
X		X							1
X			X						0
X					X				0
X				X					15
X				X		X			4
X				X		-			11
X								X	10

Figura 1. Combinações entre os códigos de classificação de patentes.

Conforme mostrado na Figura 2, com base no número de documentos acumulados, pode-se observar que existe uma tendência no aumento de deposito de patentes na área estudada, com poucas concessões a longo dos últimos 10 anos. A partir dessa observação, é possível constatar que existem

poucas patentes atuais sobre imobilização de microalgas em matrizes poliméricas para o tratamento de efluentes. Além disso, existe uma tendência e necessidade de depósitos de novos produtos e processos inventivos.

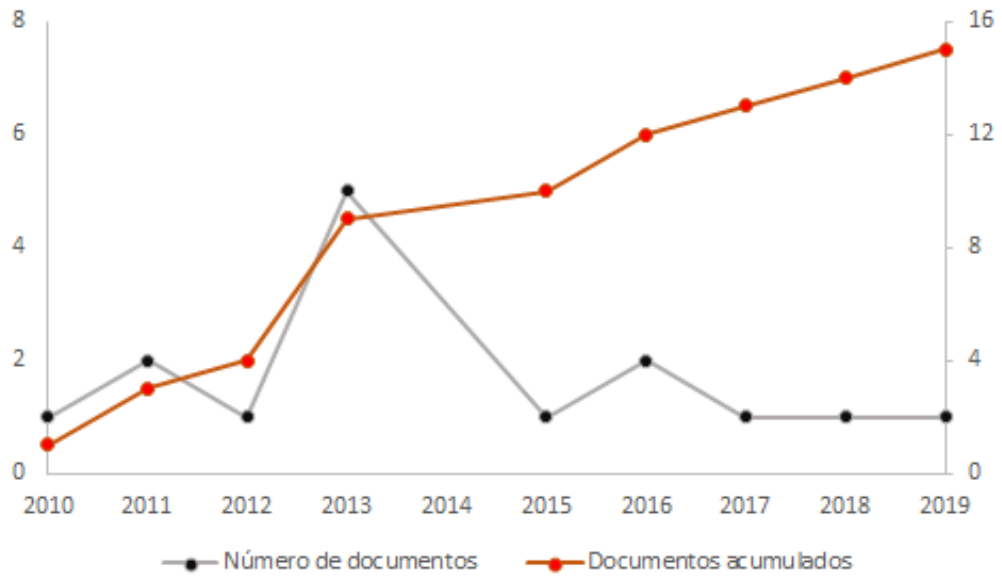

Figura 2. Evolução do depósito de patentes nos últimos anos.

Um fator considerável na busca por depósito de patentes é o critério CPC, que é apontada como base para avaliação do desempenho tecnológico e estatísticas sobre propriedade intelectual. Dessa maneira, a Figura 3 representa o gráfico referente ao número de patentes depositadas por países. É possível notar que diante da quantidade de patentes analisadas, a disputa está entre China e Estados Unidos. Isso deve-se ao fato de que estes países estão frequentemente presentes no mercado tecnológico atual quando comparados aos demais países.

Embora exista um número consideravelmente baixo de patentes na área em estudo, nota-se um grande interesse da indústria em inovar nesse campo, visto que o setor industrial, em geral, apresenta lidera o maior número de patentes concedidas, conforme apresentado na Figura 4.

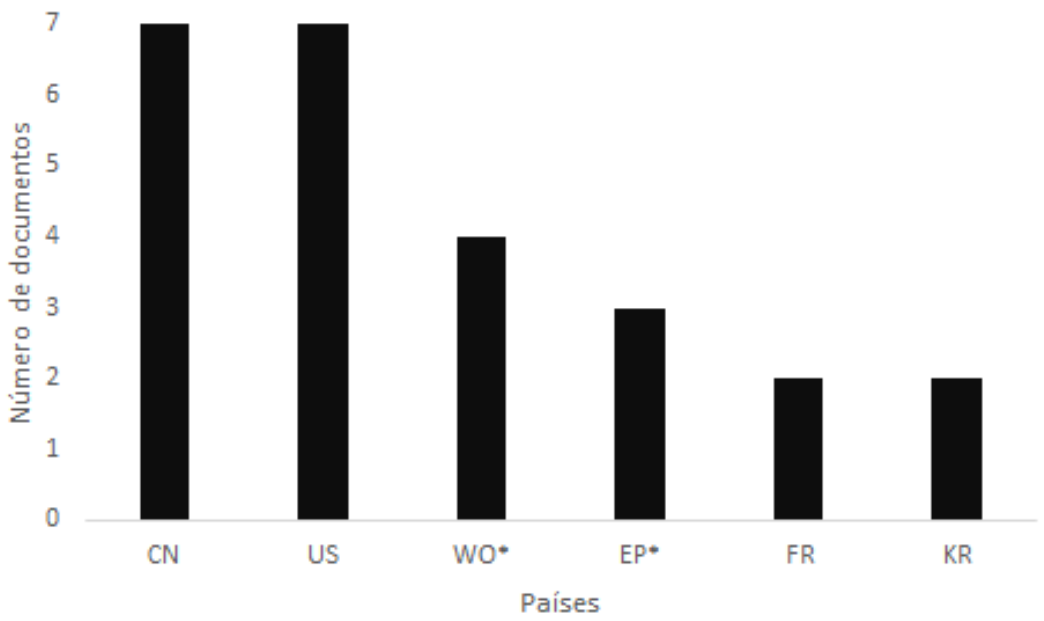

Figura 3. Número de documentos por país. Nota: *WO se refere aos pedidos de patentes pedidos pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI/WIPO).

Figura 4. Principais depositantes.

Após um estudo individual de cada patente, foram selecionadas àquelas que apresentam maior aderência ao tema. Nesse sentido, a patente representada pelo código EP3104684A1, pertencente a empresa Phycofeeds LTD, refere-se à utilização de alginato ou pectina como uma matriz de imobilização. O texto apresenta o processo de execução da imobilização das microalgas. Além disso, ele descreve o método para a obtenção dos principais constituintes do material aglutinador (alginato e pectina), sendo descrito o tempo de processamento e as principais fontes de origem desses constituintes, utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* no processo de imobilização.

Outra patente que se assemelha a este estudo é a WO201628366A1, pertencente a empresa francesa CAPSUM, a qual sugere a utilização da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. O documento também descreve o processo de imobilização de células unicelulares de plantas, e especialmente no caso de algas, utilizando matriz de alginato de sódio. Nessa patente, foi reivindicado que o encapsulamento minimiza contaminações no cultivo e facilita a obtenção de produtos de interesse, como os utilizados no mercado de cosméticos, compostos farmacêuticos e *agrifoods,* assim como na obtenção de ácidos graxos. O documento cita três experimentos, os quais comprovam o aumento da resistência mecânica do processo de encapsulamento e a permeabilidade da membrana de alginato.

Por outro lado, a patente chinesa CN106277646A, pertencente a Universidade Jiaxing, apresenta a utilização de processos simbióticos na imobilização, sendo citados como algas, a *Chlorella* sp. e o *Phytoplancton sp.*, e como fungos, o *Ganoderma lucidum* e o *Pleurotus* sp. aprisionados em uma matriz de alginato de sódio. O documento destaca o processo de purificação de biogás produzido através da digestão anaeróbica de dejetos suínos, utilizando a simbiose entre o consumo de CO_2 e a remoção de nitrogênio e fósforo, obtendo um processo de purificação de biogás e concomitantemente o tratamento secundário da água.

5. Desafios e perspectivas futuras

O uso de sistemas baseados em microalgas imobilizadas para o tratamento de efluentes tem sido relatado na literatura com certa frequência. No entanto, raramente surgiu uma nova tecnologia a partir de décadas de pesquisa

para usar intencionalmente esses microrganismos como um processo efetivo. Por essa razão, diversas propostas, incluindo a imobilização de microalgas em matrizes poliméricas naturais e combinações de processos para o tratamento simultâneo de efluentes, apresentam potencial para uso comercial no futuro.

Existem muitos desafios para o emprego de microalgas em sistemas de ficorremediação. Primeiramente, a compreensão dos detalhes técnicos das estações de tratamento biológico de efluentes é muito limitada, o que pode resultar em um custo relativamente elevado em relação aos métodos convencionais de tratamento químico, os quais são mais simples e baratos. Considerando o volume de águas residuárias a serem tratadas, qualquer aumento no custo operacional pode dificultar a venda de novas tecnologias. Em segundo lugar, a proporção relativamente baixa de remoção de certos contaminantes, associado ao maior tempo de retenção nas plantas de tratamento de efluentes, elevam os custos e a relutância dos envolvidos em operar sistemas que naturalmente não são muito precisos e dependem essencialmente de fatores ambientais imprevisíveis. Tudo isso torna o emprego de processos biológicos, principalmente mediados por microalgas, uma tecnologia de nicho.

Contudo, considerando os procedimentos operacionais atualmente disponíveis, essa rota tecnológica pode ser integrada como uma estratégia complementar em sistemas tradicionais de tratamento de efluentes. Hoje, as empresas estão exigindo cada vez mais tecnologias ou processos com sustentabilidade ambiental e econômica para a maioria dos aspectos da sociedade moderna.

Os processos baseados em microalgas imobilizadas apresentam diversas vantagens como o controle e proteção do microrganismo dominante dentro do polímero empregado; é possível projetar e otimizar um biorreator para diferentes sistemas de imobilização tratar paralelamente vários contaminantes no efluente; as microalgas usam energia solar e requerem quantidades mínimas de outros insumos/recursos para operação; os sistemas de imobilização são fáceis de manusear em grande escala, não oferecem riscos à saúde humana, são ambientalmente corretos, não produzem poluição secundária e seus produtos finais podem ser transformados em matéria-prima para a produção de diversos bioprodutos, como biocombustíveis, bioenergia, biofertilizantes e químicos, que

podem agregar valor ao processo. Além disso, as microalgas imobilizadas podem ser produzidas em sistemas modulares, híbridos e compactos, gerando menos lodo e sendo menos dispendiosos em manter.

Independente destes aspectos, uma série de barreiras técnicas inerente a tecnologia de imobilização propriamente dita ainda persiste e precisa ser melhor estudada, como o aprimoramento e otimização dos polímeros de encapsulamento para aplicações específicas, desenvolvimento de processos em larga escala e alterações no comportamento metabólico das espécies de microalgas. Solucionar esses gargalos aumentará o potencial futuro de microalgas imobilizadas em instalações de tratamento de efluentes.

6. Conclusões

Estudar a prospecção de patentes para mapear as tendências tecnológicas globais no campo-alvo demonstram as lacunas que podem ser exploradas e complementadas para o desenvolvimento de trabalhos futuros com base em duas perspectivas principais. A primeira está baseada no fato de que as análises de patentes podem ser usadas para examinar os indicadores de colaboração entre instituições e requerentes, permitindo usa visão mais detalhada do grau de interação entre os setores público e privado, bem como parcerias globais para diferentes tipos de tecnologia. Adicionalmente, mapear e quantificar as patentes protegidas pode ser proveitoso para obter informações sobre sua relevância econômica em um determinado local. Com relação ao segundo ponto de vista, aspectos relacionados ao processamento de microalgas devem ser abordados considerando os custos de capital. Por exemplo, uma discussão mais aprofundada sobre o projeto bem-sucedido de biorreatores para o cultivo de células imobilizadas merece mais atenção, pois poucas tecnologias foram desenvolvidas até o momento. Portanto, a análise de documentos de patentes contribui para o avanço considerável em pesquisa, desenvolvimento e inovação, bem como para a tomada de decisão por parte dos investidores na área de processos de microalgas imobilizadas, pois um entendimento do cenário atual é útil em fornecer uma melhor previsão das mudanças tecnológicas.

7. Referências

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.

CAO, S.; TENG, F.; WANG, T.; LI, X.; LV, J.; CAI, Z.; TAO, Y. Characteristics of an immobilized microalgae membrane bioreactor (iMBR): Nutrient removal, microalgae growth, and membrane fouling under continuous operation. **Algal Research**, v. 51, 102072, 2020.

CHEIRSILP, B.; THAWECHAI, T.; PRASERTSAN, P. Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 787-794, 2017.

EMPARAN, Q.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: A review. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 17, n. 1, p. 889–915, 2019.

ESPACENET. https://worldwide.espacenet.com/ (Acesso em 15 de agosto de 2021).

GIESE, E. C. **Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio**. 2015.

KUBE, M.; FAN, L.; RODDICK, F. Alginate-immobilised algal wastewater treatment enhanced by species selection. **Algal Research**, v. 54, 102219, 2021.

MALINOSKI, L.; MARANHO, L. T. Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50373–50395, 2020.

MOHSENPOUR, S. F.; HENNIGE, S.; WILLOUGHBY, N.; ADELOYE, A.; GUTIERREZ, T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 752, n. September 2020, p. 142168, 2021. The Authors. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>.

SARKAR P.; DEY, A. Phycoremediation – An emerging technique for dye abatement: An overview. **Process Safety and Environmental Protection**, v.

147, p. 214–225, 2021.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2º ed. EDITORA EDGARD BLUCHER LTDA, 2001.

SILVA, M. C. C. de P. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalgas *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2011.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E. M.; GALAN, M. A. Microalgae Technology: A Patent Survey. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 2013.

VIJAYALAKSHMI, K.; GOMATHI, T.; LATHA, S.; HAJEETH, T.; SUDHA, P. N. Removal of copper(II) from aqueous solution using nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 440–452, 2016.

VON SPERLING, M. **Basic Principles of Wastewater Treatment**. IWA Publishing, 2007.

XIE, B.; GONG, W.; YU, H.; TANG, X.; YAN, Z.; LUO, X.; GAN, Z.; WANG, T.; LI, G.; LIANG, Z. Immobilized microalgae for anaerobic digestion effluent treatment in a photobioreactor-ultrafiltration system: Algal harvest and membrane fouling control. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 139-148, 2018.

WIPO. World Intellectual Property Organization, 2016. **Patent Landscape Report on Microalgae-Related Technologies.** Disponível em: https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4042&plang=FR. Acesso em: 04 de outubro de 21.

Autores

Paulo Alexandre Silveira da Silva*, Beatriz Jacob-Furlan, Rafael Silva Ribeiro Gonçalves, Pedro Henrique Siqueira Zatta, Gilvana Scoculi de Lira, Ihana Aguiar Severo, André Bellin Mariano.

Universidade Federal do Paraná, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), S/N Centro Politécnico, Setor de Tecnologia, 81531-990, Curitiba, Brasil.

* Autor para correspondência: paulo.alexandre@ufpr.br