



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS ALVES MAROUBO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO DE
MICROALGAS VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOENERGIA E
OUTRAS APLICAÇÕES:
ESTUDO DE CASO NO PARANÁ**

Londrina
2016

LUCAS ALVES MAROUBO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO DE
MICROALGAS VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOENERGIA E
OUTRAS APLICAÇÕES:
ESTUDO DE CASO NO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia. Área de Concentração: Biocombustíveis.

Orientadora: Diva de Souza Andrade, PhD.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M356i Maroubo, Lucas Alves.

Influência da temperatura no cultivo de microalgas visando à produção de bioenergia e outras aplicações : estudo de caso no Paraná / Lucas Alves Maroubo. - Londrina, 2016.
82 f.: il.

Orientador: Diva de Souza Andrade.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Biomassa - Teses. 2. Microalga - Cultivo - Efeito da temperatura - Teses. 3. Clorofila Análise - Teses. 4. Análise de componentes principais - Teses. I. Andrade, Diva de Souza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. III. Título.

CDU 620.97

LUCAS ALVES MAROUBO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CULTIVO DE MICROALGAS
VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOENERGIA E OUTRAS
APLICAÇÕES:
ESTUDO DE CASO NO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia. Área de Concentração: Biocombustíveis.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. PhD Diva de Souza
Andrade
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Dr.^a Profa. Carmen Luisa Barbosa Guedes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Prof. João Henrique Caviglione
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 22 de março de 2016.

Aos meus pais, Marcos e Lúcia, à
minha irmã, Laís, e aos demais
familiares e amigos que torcem pelo
meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, agradeço a Deus pela oportunidade concedida em vivenciar de modo proveitoso minha pós-graduação ao lado de pessoas fantásticas.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina (UEL), pelo fornecimento de estrutura básica necessária à minha formação como mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela receptividade e pelo fornecimento de sua estrutura física para execução do trabalho, bem como pelo aporte de materiais e técnico-científico.

Agradeço enormemente à minha orientadora Dr.^a Diva e ao pesquisador Dr. João Henrique Caviglione, não apenas pelas constantes orientações neste trabalho e na vida, mas, sobretudo pela amizade e por acreditarem em meu potencial e transmitirem seus ensinamentos com bastante respeito, dedicação, seriedade e paciência.

À minha eterna professora Dr.^a Lisandra Ferreira de Lima, que não hesita em colaborar comigo sempre quando solicito seu auxílio.

Em especial, aos estagiários, mestrandos, doutorandos e colaboradores do IAPAR que não mediram esforços para me ajudar nesta pesquisa: Alisson Sanzovo, Ana Paula Andrade, Antônio Rosa, Deisi Navroski, Getúlio Nagashima, Gisele Lovato, Guilherme Bruno, João Paulo Venzi, José Carlos Gomes, Kelly Góes, Maria Aparecida Matos, Nahyara Cezário, Paulo Sérgio Aguilar, Tamires Quenupa, Thainara Quadros e Victor Hugo de Mello.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia (PPGB), sem os quais eu não poderia ter chegado até aqui, especialmente à Dr.^a Carmen Luisa Barbosa Guedes, coordenadora do Programa.

Aos meus amigos de curso, sem exceção alguma. Vocês foram imprescindíveis para que meus dias se tornassem menos exaustivos!

Sou imensamente grato aos meus pais, Marcos e Lúcia, por muitas vezes abdicarem dos seus sonhos para que os meus se tornassem realidade.

À minha irmã, Laís, pelas palavras de consolo muito bem-vindas nos momentos de dificuldade e lamentações.

Aos demais familiares pelas orações e por todo o suporte concedido ao longo desta trajetória, especialmente à minha avó Dirce, às minhas tias Anna e Maria Izabel e à minha família postiça londrinense, os Frotas.

À Ingrid, pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo, que, mesmo à distância, esteve presente de forma ativa nesta minha conquista.

Sei que estes parágrafos talvez não tenham sido suficientes para que eu pudesse expressar de forma precisa minha gratidão às pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho se findasse com sucesso. Por este motivo, registro aqui meu pedido de desculpas àquelas que, por eventual descuido meu, não estão presentes entre essas palavras.

Muito obrigado a todos!

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem. Ou que seus planos nunca vão dar certo. Ou que você nunca vai ser alguém [...]. Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança!”.

(Renato Russo – Mais Uma Vez)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

MAROUBO, Lucas Alves. **Influência da temperatura no cultivo de microalgas visando à produção de bioenergia e outras aplicações: estudo de caso no Paraná.** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O grupo de microalgas clorofitas é composto por uma grande quantidade de espécies que podem ser encontradas em diversos ambientes e que são capazes de produzir metabólitos de interesse energético, industrial e comercial. Embora as microalgas ocorram desde regiões temperadas a tropicais, trabalhos que avaliem os efeitos da temperatura no desenvolvimento de diferentes espécies de microalgas ainda são escassos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biomassa, lipídeos e clorofilas *a*, *b* e *c* por microalgas clorófitas quando cultivadas em temperaturas que ocorrem em diferentes regiões do Paraná, visando a utilização destes compostos na produção de bioenergia e em outras aplicações. Os tratamentos foram distribuídos em parcelas subdivididas, em que, nas parcelas foram alocadas quatro condições de temperatura (claro/escuro, 12h/12h): W (15/08 °C), X (19/15 °C), Y (25/19 °C) e Z (39/35 °C); e, nas subparcelas, seis estirpes de microalgas, sendo cinco *Chlorella* spp. isoladas de águas continentais no Paraná (IPR7104, IPR7115, IPR7116, IPR7117 e IPR7151) e uma *Neochloris oleoabundans* (UTEX1185). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro repetições. Constatou-se que a temperatura influenciou na produção de biomassa, lipídeos e clorofilas *a*, *b* e *c* por algumas estirpes de microalgas, sendo possível selecioná-las para cultivos em larga escala no Paraná, com base nas condições de temperatura testadas, e indicá-las, em função da distribuição espacial e sazonal da temperatura no estado. Conhecida a relação existente entre a temperatura do cultivo de microalgas em sistema aberto e a temperatura do ar, pode-se utilizar a temperatura do ar para sugerir cultivos em sistemas abertos. Para produção de biomassa, a estirpe UTEX1185 apresenta potencial de cultivo no extremo sul do Paraná, durante o inverno, onde as temperaturas médias diurnas ficam abaixo de 17 °C e as noturnas, abaixo de 11,5 °C. Entretanto, esta estirpe apresenta baixo potencial para fins de produção de lipídeo no extremo noroeste, no inverno; centro e norte, na primavera; todo o estado, no verão; e noroeste, no outono, onde as temperaturas variam entre 22 a 32 °C durante o dia e entre 17 e 27 °C durante a noite. Nestas regiões, a estirpe IPR7116 demonstra potencial de cultivo para a produção de clorofilas. Tanto para produção de lipídeos quanto para clorofilas, a UTEX1185 apresenta potencial nas regiões: centro, no inverno; sul, na primavera; e centro-sul, no outono, onde as temperaturas médias diurnas variam entre 17 e 22 °C e as noturnas, entre 11,5 e 17 °C. A produção de biomassa pelas estirpes IPR7115 e IPR7116; o teor lipídico das estirpes IPR7115, IPR7117 e IPR7151; e o teor de clorofilas *a*, *b* e *c* das estirpes IPR7104 e IPR7151 não sofreram efeitos das condições de temperatura testadas.

Palavras-chave: Biomassa. Clorofila *a*. Clorofila *b*. Clorofila *c*. Lipídeo.

MAROUBO, Lucas Alves. **Temperature influence on the cultivation of microalgae aiming the production of bioenergy and other applications: a case study in Paraná.** 2016. 82 p. Dissertation (Master's degree in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The microalgae chlorophytes group is composed of a lot of species that can be found in different environments and are able to produce metabolites for energy, industrial and commercial interests. Although microalgae occur from temperate to tropical regions, studies assessing the effects of temperature on the development of different species of microalgae are still scarce. Thus, this study aimed to evaluate the production of biomass, lipids and chlorophylls *a*, *b* and *c* by microalgae chlorophytes when grown at temperatures that occur in different regions of Paraná, aiming to use these components in the production of energy and other applications. The treatments were arranged in a split plot which in the plots were allocated four temperature conditions (light/dark, 12h/12h): W (15/08 °C), X (19/15 °C), Y (25/19 °C) and Z (39/35 °C); and in the subplots, six strains of microalgae, five *Chlorella* spp. isolated from continental waters in Paraná (IPR7104, IPR7115, IPR7116, IPR7117 and IPR7151) and one *Neochloris oleoabundans* (UTEX1185). The experimental design was completely randomized with four replications. It was found that the temperature influenced the production of biomass, lipids and chlorophyll *a*, *b* and *c* by some strains of microalgae, being able to select them for large-scale cultivation in Paraná, based on tested temperature conditions, and point them, depending on the spatial and temporal distribution of temperature in the state. Known the relationship between the temperature of microalgae in an open system of cultivation and the temperature of the air, one can use the air temperature to suggest crops in open systems. For biomass production, UTEX1185 strain has growth potential in extreme southern Paraná, during the winter, where average daytime temperatures are below 17 °C and night, below 11.5 °C. However, this strain has a low potential for lipid production purposes in the far northwest in the winter; center and north in the spring; statewide in the summer; and the northwest in autumn, where temperatures range from 22 to 32 °C during the day and from 17 to 27 °C at night. In these regions, IPR7116 strain demonstrates cultivation potential for production of chlorophylls. Both for production of lipids and chlorophylls, UTEX1185 strain has potential in the regions: center, in winter; south in the spring; and center-south in autumn, where average daytime temperatures range between 17 and 22 °C and night, between 11.5 and 17 °C. Biomass production by the strains IPR7115 and IPR7116; lipid content of the strains IPR7115, IPR7117 and IPR7151; and chlorophylls *a*, *b* and *c* contents of the strains IPR7104 and IPR7151 were not affected by the temperature conditions tested.

Keywords: Biomass. Chlorophyll *a*. Chlorophyll *b*. Chlorophyll *c*. Lipid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Usos e aplicações da biomassa de microalgas.	18
Figura 2 – Sistemas de cultivo de microalgas.	24
Figura 3 – Classificação climática do estado do Paraná, segundo Köppen.	33
Figura 4 – Temperatura média anual no estado do Paraná.	33
Figura 5 – Localização das estações meteorológicas e dos locais de coleta das microalgas.	37
Figura 6 – Esquema do delineamento experimental.	38
Figura 7 – Dispersão dos tratamentos, de acordo com Análise de Componentes Principais (ACP).	49
Figura 8 – Dendrograma da análise de agrupamento dos tratamentos.	51
Figura 9 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no inverno.	62
Figura 10 – Combinações de temperatura de possível ocorrência na primavera.	62
Figura 11 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no verão.	63
Figura 12 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no outono.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Configuração geral das condições para o cultivo de microalgas.	30
Tabela 2 – Características das estirpes de microalgas.....	35
Tabela 3 – Definição das temperaturas para o cultivo das estirpes de microalgas...36	
Tabela 4 – Composição do meio BBM utilizado na preparação de inóculo.	39
Tabela 5 – Composição do meio de cultivo utilizado na condução do experimento. 40	
Tabela 6 – Classificação adotada nos mapas das temperaturas médias diurnas e noturnas de cada estação climática do ano.	46
Tabela 7 – Autovetores da matriz de correlação das variáveis.....	47
Tabela 8 – Autovalores da matriz de correlação das variáveis.....	47
Tabela 9 – Coeficientes da correlação de Pearson das variáveis e das componentes principais.	48
Tabela 10 – Biomassa seca (mg L^{-1}) após 15 dias de cultivo das estirpes.....	53
Tabela 11 – Teor lipídico (% , massa massa ⁻¹) após 15 dias de cultivo das estirpes.55	
Tabela 12 – Teor de clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.	57
Tabela 13 – Teor de clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.	58
Tabela 14 – Teor de clorofila <i>c</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.	59
Tabela 15 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no Paraná.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componentes Principais
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
pH	Potencial Hidrogeniônico
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SRTM	<i>Shuttle Radar Topography Mission</i>
SIMEPAR	Sistema Meteorológico do Paraná
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	PANORAMA ENERGÉTICO NACIONAL	16
3.2	MICROALGAS	17
3.2.1	Usos e Aplicações	17
3.2.2	Composição Celular	20
3.2.3	Sistemas de Cultivo	23
3.2.4	Condições de Cultivo	25
3.2.5	Dinâmica de Crescimento	27
3.2.6	Fatores que Influenciam o Crescimento	29
3.2.6.1	Temperatura	30
3.3	CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DO PARANÁ	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO	35
4.1.1	Estirpes de Microalgas	35
4.1.2	Condições de Temperatura nas Câmaras de Cultivo	36
4.1.3	Delineamento Experimental	38
4.1.4	Preparo dos Inóculos	38
4.1.4.1	Etapa 1	39
4.1.4.2	Etapa 2	40
4.1.5	Condução do Experimento	40
4.1.6	Determinações	41
4.1.6.1	Produção de biomassa seca	41
4.1.6.2	Teor lipídico	42
4.1.6.3	Teor de clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i>	43
4.1.7	Análises Estatísticas	44
4.2	POTENCIAL PRODUTIVO DE MICROALGAS NO PARANÁ	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO	47

5.1.1	Análises de Componentes Principais e de Agrupamento	47
5.1.2	Análise de Variância e Teste de Médias	52
5.1.2.1	Produção de biomassa seca	52
5.1.2.2	Teor lipídico.....	54
5.1.2.3	Teor de clorofila <i>a</i>	56
5.1.2.4	Teor de clorofila <i>b</i>	58
5.1.2.5	Teor de clorofila <i>c</i>	59
5.2	POTENCIAL PRODUTIVO DE MICROALGAS NO PARANÁ	60
6	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE.....	76
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares ou coloniais clorofilados representados por uma grande diversidade de espécies que podem viver em uma ampla variedade de condições ambientais. Através do processo de fotossíntese, as microalgas são capazes de produzir metabólitos como, por exemplo, lipídeos, polissacarídeos, proteínas e hidrocarbonetos, que apresentam potencial de serem empregados para diferentes fins: na nutrição humana e animal, no tratamento de águas residuais, na aquicultura e agricultura, na produção de energia, nas indústrias de polímeros, fármacos e cosméticos, além de ser objeto de interesse nas áreas de pesquisa e medicina.

Para que o emprego das microalgas nestas atividades se torne uma alternativa ambientalmente sustentável, energeticamente eficiente e/ou economicamente viável, existem certos aspectos biológicos, técnicos e econômicos que ainda precisam ser mais bem compreendidos. Sendo assim, é necessário analisar tais aspectos, desde o cultivo das microalgas até a exploração comercial de seus constituintes. Ou seja, devem ser considerados: as variáveis que influenciam o crescimento celular, as técnicas de colheita da biomassa de microalgas e o processo de extração e de beneficiamento dos metabólitos de interesse.

Embora as microalgas ocorram desde regiões temperadas a tropicais, trabalhos que avaliem os efeitos da temperatura do ar no desenvolvimento de diferentes espécies de microalgas ainda são escassos. Neste sentido, o presente trabalho envolveu a avaliação da influência da temperatura na produção de biomassa, lipídeos e clorofilas por microalgas clorófitas isoladas de águas continentais no Paraná e uma da espécie *Neochloris oleoabundans*, no intuito de verificar o potencial produtivo destas no território paranaense para diversas aplicações, propiciando uma discussão quanto às possibilidades do cultivo em larga escala e do aumento das unidades de produção no estado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial produtivo de microalgas clorófitas em temperaturas que ocorrem em diferentes regiões do Paraná para a produção de bioenergia e outras aplicações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Avaliar a influência da temperatura no cultivo de estirpes de microalgas clorófitas, quanto à produção de biomassa, de lipídeos e de clorofilas *a*, *b* e *c*.
- ii) Selecionar estirpes para cultivos em larga escala no Paraná, com base nas diferentes condições de temperaturas, por meio de associação de técnicas estatísticas.
- iii) Indicar o potencial de cultivo de estirpes em sistema aberto no Paraná, em função da distribuição espacial e sazonal da temperatura no estado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PANORAMA ENERGÉTICO NACIONAL

A demanda de energia no mundo vem crescendo, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao aumento da população e do consumo *per capita* (DEFANTI; SIQUEIRA; LINHARES, 2010).

No Brasil, as principais fontes de energia utilizadas são de origem fóssil, sendo que 60,6% são não renováveis. De toda a oferta interna de energia, 39,4% é proveniente de petróleo e seus derivados, os quais abastecem majoritariamente o segundo maior segmento demandador de energia: o setor de transportes. Neste setor, que representa 32,5% de toda a energia consumida no país, há participação de apenas 18% das fontes renováveis de energia, que correspondem, principalmente, ao biodiesel e ao álcool etílico (BRASIL, 2015).

Existe uma necessidade de se manter a matriz energética nacional diversificada, a fim de garantir com segurança o fornecimento de energia que sustente à crescente demanda do país. Neste contexto, a participação das fontes de energia renováveis deve ser tida como prioridade, devido a fatores de caráter físico, político, econômico e ambiental, como: a possibilidade de esgotamento das fontes de energia não renováveis; a existência de disputas comerciais e geopolíticas acerca da exploração das fontes fósseis; a oscilação do valor dos combustíveis fósseis no mercado, de acordo com as crises internacionais; e a emissão de gases intensificadores do efeito estufa originados através da queima de combustíveis fósseis, que agravam o processo de aquecimento global (GOLDEMBERG; LUCON, 2007; DEFANTI; SIQUEIRA; LINHARES, 2010).

Neste sentido, as microalgas se inserem como matéria-prima alternativa, devido sua capacidade de produzirem grandes quantidades de metabólitos que servem como insumo tanto na produção de bioenergia, quanto em outras aplicações industriais ou ecológicas (DERNER et al., 2006; SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

3.2 MICROALGAS

As algas representam um grupo de organismos macro e microscópicos de grande diversidade morfofisiológica e genética, podendo ter estrutura celular eucariótica ou procariótica (REVIERS, 2010; ANDRADE et al., 2014a).

A caracterização sistemática das microalgas envolve a avaliação de uma série de critérios como tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva, constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004), além de aspectos citológicos e morfológicos como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório dos cloroplastos e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana celular (DERNER et al., 2006).

As classes mais abundantes em número de espécies são: cianobactérias (*Cyanobacteria*), clorófitas (*Chlorophyceae*), diatomáceas (*Bacillariophyceae*) e algas douradas (*Chrysophyceae*), sendo a primeira classe com estrutura celular procariótica e as demais, com estrutura eucariótica (REVIERS, 2010; KHAN et al., 2009; BICUDO; MENEZES, 2006).

Os principais componentes das microalgas são as proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo que a porcentagem destes constituintes varia de acordo com cada espécie (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; ANDRADE et al., 2014b). A maioria das espécies de microalgas de interesse para produção destes compostos está distribuída dentro dos grupos das cianobactérias ou das clorófitas (LEE, 2008).

Este trabalho envolveu o cultivo de algumas estirpes de microalgas pertencentes ao grupo das clorófitas. A escolha pelas estirpes deste grupo baseou-se na disponibilidade destas em uma coleção de microalgas mantidas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e também considerando que as mesmas são nativas do Paraná e já podem estar adaptadas as condições climáticas do estado.

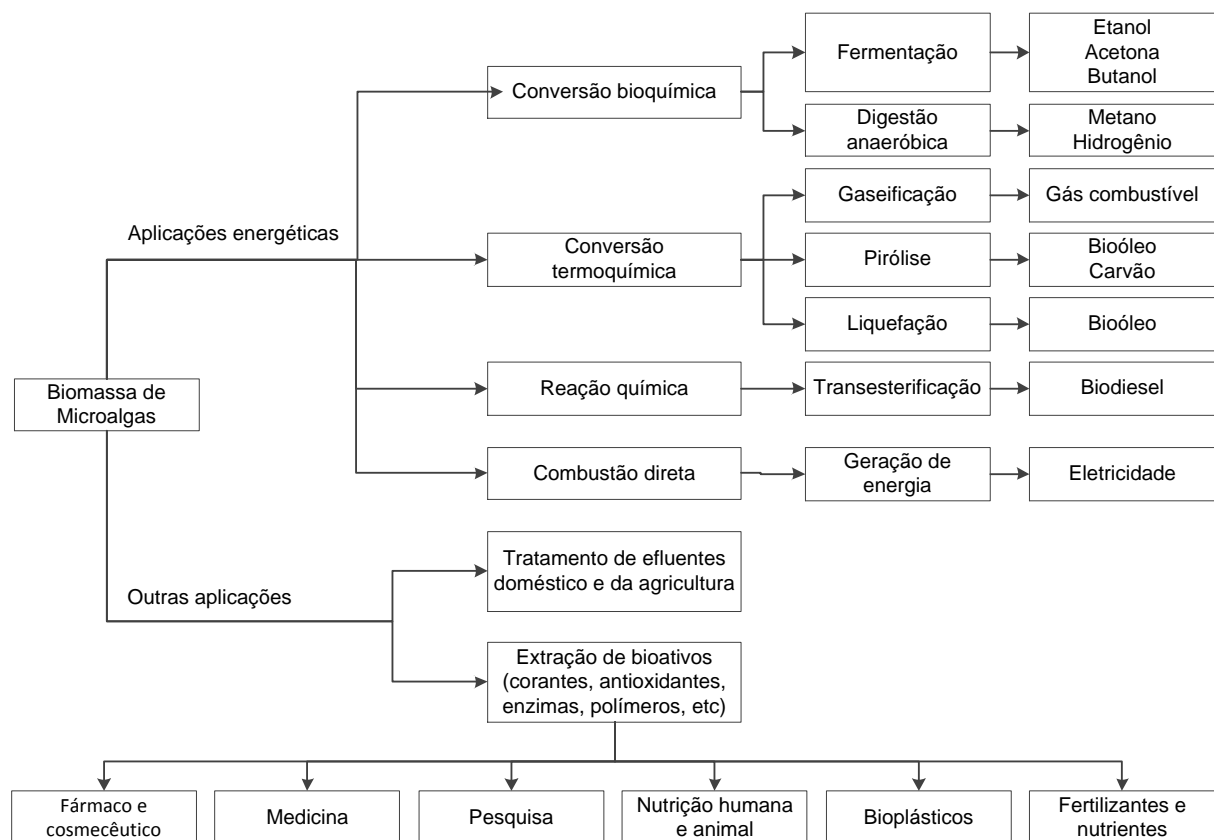
3.2.1 Usos e Aplicações

As aplicações de microalgas se relacionam à sua composição química, que se manifesta pela presença de componentes majoritários como proteínas,

carboidratos e lipídeos totais e de substâncias tipicamente menos abundantes como pigmentos, ácidos graxos, aminoácidos, entre outras (LOURENÇO, 2006).

A biomassa de microalgas pode ser utilizada para diversos fins (Figura 1), como na alimentação humana e animal, no tratamento de efluentes, na aquicultura e agricultura, nas indústrias (de fármacos, de cosméticos e de bioplásticos), na produção de energia e nas áreas de pesquisa e medicina (BECKER, 2004; SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

Figura 1 – Usos e aplicações da biomassa de microalgas.



Fonte: adaptado de Tsukahara e Sawayama (2005).

A coleta e o cultivo de microalgas para utilização na alimentação humana são atividades realizadas há séculos, sendo que ainda hoje, as microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento nutricional, podendo ser encontradas formulações em pó, tabletas, cápsulas ou extratos ou incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc., tanto como suplemento alimentar quanto como corantes naturais (DERNER et al., 2006).

As microalgas possuem uma grande importância ecológica, devido sua alta capacidade de fixação de dióxido de carbono e bio-sorção de metais tóxicos. Por

este motivo, algumas espécies podem ser empregadas no tratamento de águas residuais domésticas ou efluentes da agricultura (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012; ANDRADE et al., 2014b).

As microalgas também podem ser utilizadas na aquicultura para alimentação de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. Na agricultura, pode ser utilizado como fertilizantes, atuando como condicionador de solo (BARBOSA, 2003).

Devido sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos com propriedades terapêuticas, tais como ácidos graxos polinsaturados e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina, etc.), as microalgas tem potencial aplicação na indústria farmacêutica e na fabricação de cosméticos (SPOLAORE et al., 2006).

No setor energético, a biomassa de microalgas é vista como matéria-prima renovável que pode ser utilizada para geração de eletricidade, por meio da combustão direta ou ser convertida de forma química, bioquímica ou termoquímica em diferentes tipos de biocombustíveis como etanol, acetona, butanol, metano, hidrogênio, bio-óleo, carvão ou biodiesel (TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2005).

Neste setor, o biodiesel é o principal produto proveniente das microalgas, tendo em vista que os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas similares aos de óleos vegetais comumente utilizados na produção deste biocombustível (TEIXEIRA; MORALES, 2006), além de que o cultivo de microalgas possui numerosas vantagens sobre os cultivos agrícolas destinados a este mesmo fim (biodiesel), tais como: potencial de produção de óleo bastante superior por área equivalente de cultivo, desenvolvimento vegetativo sem dependência do cultivo em safras, tempo médio de cultivo significativamente reduzido, maior atividade fotossintética e capacidade de fixação de CO₂, além da possibilidade de cultivo em água salgada ou doce ou ainda em efluentes industriais ou urbanos (DEFANTI; SIQUEIRA; LINHARES, 2010; LEMOS, 2012; OHSE et al., 2007; SCRAGG et al., 2002).

Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), embora ainda não haja um custo-benefício suficiente para introduzir o biodiesel a partir de microalgas de forma competitiva no mercado, pesquisas têm sido feitas a fim de transformar a produção de biodiesel de microalgas economicamente viável. Arceo (2012) aponta que o custo de produção pode ser reduzido ao usar um meio de cultivo de baixo custo, bem

como uma fonte de CO₂ resultante de processo de fermentação para a fabricação de cana-de-açúcar, por exemplo. Outra alternativa que contribui para viabilidade financeira é o aproveitamento de outros componentes das microalgas: após a extração lipídica para a produção de biodiesel, os carboidratos existentes no bolo vegetal remanescente podem ser utilizados como substrato de fermentação para a produção de bioetanol (ANTUNES; SILVA, 2010). A biomassa resultante poderá ser transformada em metano, ração animal, utilizada como adubo orgânico devido sua elevada relação nitrogênio:fósforo, ou ainda queimada para cogeração de energia (eletricidade ou calor) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Estas medidas permitem otimizar o uso da biomassa proveniente das microalgas por meio do aproveitamento mais eficiente de seus coprodutos, assegurando a rentabilidade global do processo (FERRERO, 2011).

3.2.2 Composição Celular

Segundo Ohse et al. (2007), a concentração de cada componente bioquímico das microalgas varia em função da natureza dos organismos, das condições empregadas no cultivo e do próprio estado fisiológico da cultura, o que possibilita a obtenção de diferentes composições químicas para uma mesma espécie em função da manipulação de alguns fatores.

Os lipídeos compreendem um conjunto de substâncias químicas que são caracterizadas pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos apolares e baixa solubilidade em água (NELSON; COX, 2011). A natureza física dos lipídeos e sua consequente nomenclatura são comandadas pelo comprimento da cadeia, pelo grau de insaturação e pela distribuição dos radicais. De acordo com Fahy et al. (2005) os lipídeos podem ser classificados em três grupos, de acordo com a natureza do ácido e do álcool que os formam:

- a) Simples: ésteres de ácidos graxos com algum tipo de álcool, podendo ser glicerídeos (ésteres de glicerol, que são os óleos e as gorduras) ou cerídeos (ésteres de alcoóis acíclicos superiores, que são as ceras);
- b) Compostos: apresentam além dos elementos contidos nos lipídeos simples (C, H e O), átomos de nitrogênio e fósforo. Dividem-se em

fosfolipídeos (ésteres de ácidos graxos, ácido fosfórico e álcool) e glicolipídeos (ésteres de ácidos graxos, carboidrato e álcool); e

- c) Derivados: obtidos por hidrólise de lipídeos simples e compostos, incluindo substâncias como ácidos graxos, alcoóis, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis, pigmentos e compostos nitrogenados.

O óleo das microalgas é composto principalmente pela mistura de ácidos graxos insaturados, apesar de também contar com a presença dos ácidos graxos saturados, porém em menor proporção (KHAN et al., 2009). Segundo Radmann e Costa (2008), em algumas espécies, os ácidos graxos polinsaturados representam entre 25 e 60% dos lipídeos totais. Esta considerável quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes em algumas espécies limita sua utilização como matéria-prima para produção de biodiesel, uma vez que instauração facilita a oxidação do biodiesel durante seu armazenamento (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Desta forma, torna-se preferível a escolha de uma espécie de microalga com uma proporção majoritária de ácidos graxos saturados, a fim de garantir um produto de melhor qualidade. Neste sentido, as espécies promissoras são como a *Trichodesmium erythraeum*, que possuem 27 a 50% dos ácidos graxos totais presentes em cadeia saturada de 10 carbonos (PARKER; VAN BAALEN; MAURER, 1967); a *Chlorella sorokiniana*, com 40% presentes em cadeia de 16 carbonos (PATTERSON, 1970); e *Emiliana huxleyi*, com 35% presentes em cadeia de 14 carbonos (VOLKMAN et al., 1981).

Segundo HU et al. (2008), através de indução, muitas espécies de microalgas podem acumular quantidades substanciais de lipídeos, o que permite uma produção significativa de biodiesel, por exemplo.

As microalgas produzem mais óleo do que alguns vegetais oleaginosos. As espécies de microalgas de teor reduzido de óleo (30% em massa) são capazes de produzir 58.700 L ha⁻¹ ano⁻¹ de óleo, valor muito superior quando comparado à cultura de milho (172 L ha⁻¹ ano⁻¹), soja (636 L ha⁻¹ ano⁻¹), canola (974 L ha⁻¹ ano⁻¹) ou mesmo palma (5.366 L ha⁻¹ ano⁻¹) (CHISTI, 2007).

Entretanto, Chen et al. (2011) destaca que o teor de lipídeos não é o único fator que determina a capacidade de produção de óleo de microalgas. Segundo o autor, o teor de lipídeos e a produção de biomassa precisam ser considerados simultaneamente. Assim, a produtividade lipídica, que representa o efeito combinado

destes dois fatores mencionados, é o índice de desempenho mais adequado para indicar a capacidade produtiva de lipídeos por uma microalga.

Por serem microrganismos fotossintetizantes, as microalgas são capazes de produzir diferentes proporções de pigmentos em resposta a diferentes condições de iluminação. Os pigmentos das microalgas apresentam diferentes espectros de absorção, específicos para cada um dos mesmos. Estas especificidades possibilitam determinar as concentrações de cada pigmento utilizando diferentes comprimentos de onda nas leituras espectrofotométricas. É possível obter, a partir da biomassa de microalgas, clorofilas com cores que variam desde verde-amarelo a azul-esverdeado, além de seus derivados que, em condições químicas extremas, podem produzir cores que vão do laranja ao vermelho (MARQUEZ; BORRMANN, 2009; ANDRADE et al., 2014b).

Existem três classes de pigmentos encontrados na biomassa de microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenoides. As ficobilinas são do grupo das proteínas e as demais, do grupo dos lipídeos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; ANDRADE et al., 2014b).

As clorofilas são praticamente os únicos pigmentos naturais verdes e são essenciais para o processo de fotossíntese. Possuem potencial de aplicação como corantes lipossolúveis em alimentos, fármacos, cosméticos e produtos de higiene pessoal. A proporção entre os diversos tipos de clorofila variam em função da intensidade luminosa (DANESI et al., 2011).

Estruturalmente, as clorofilas são moléculas complexas, de caráter hidrofóbico, com alto grau de instauração. A partir da estrutura básica, existem cinco classes de clorofilas que podem ser encontrados naturalmente em algas: clorofilas *a*, *b*, *c*, *d* e *e*.

A clorofila *a* é a mais abundante, presente em todas as espécies de microalgas, independente da divisão, e atua como agente catalítico no primeiro estágio do processo de fotossíntese (fotoquímica). As demais clorofilas estão distribuídas nos diversos grupos e são pigmentos acessórios cuja função é auxiliar na absorção de luz e na transferência de energia radiante para os centros de reação (STREIT et al., 2005; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; MARQUEZ; BORRMANN, 2009).

A produção de pigmentos a partir de microalgas em escala comercial ainda é restrita a algumas espécies, principalmente dos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella*,

Haematococcus, *Muriellopsis* e *Spirulina* (DERNER et al., 2006; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; DANESI et al., 2011; TINOCO; TEIXEIRA; REZENDE, 2015).

3.2.3 Sistemas de Cultivo

De acordo com Lavens e Sorgeloos (1996), as microalgas podem ser cultivadas utilizando uma grande variedade de métodos, desde os mais estritamente controlados, como os laboratoriais, até os menos previsíveis, como os tanques ao ar livre. Segundo os autores, os sistemas de cultivo podem ser descritos por meio das seguintes terminologias:

- Interno/Externo: o sistema de cultivo interno permite o controle de iluminação, temperatura, níveis de nutrientes e de contaminação e competição com predadores, enquanto que no sistema de cultivo externo (tanques a céu aberto) é muito difícil manter um cultivo axênico de microalgas por muito tempo;
- Aberto/Fechado: o cultivo aberto, como lagoa e tanque descoberto, é mais facilmente contaminado do que recipiente de cultura fechado, como tubos, frascos, sacos, etc;
- Estéril/Contaminado: culturas estéreis são livres de organismos estranhos e exigem uma esterilização mais rigorosa de todas as vidrarias, meios de cultura e recipientes, a fim de evitar contaminação. Para aplicações em grande escala (comerciais), o controle de contaminação se torna impraticável, tanto que, em alguns casos, são utilizadas águas de reúso ou efluentes na composição parcial ou total do meio de cultivo.
- Batelada/Contínuo/Semicontínuo: o cultivo em batelada consiste em promover o crescimento das células microalgais em pequenos volumes até atingirem a fase estacionária e então transferi-las para volumes cada vez maiores, de forma gradativa. O cultivo contínuo pode ocorrer de duas formas: diluindo ou concentrando as culturas (controle da densidade celular das microalgas no meio) ou mantendo o fornecimento de

quantidades predeterminadas de nutrientes (controle da taxa de crescimento das microalgas). O cultivo semicontínuo consiste em realizar a colheita periódica da cultura microalgal desenvolvida (em sistemas internos ou externos) e, posteriormente, reajustar a cultura remanescente para que as microalgas cresçam novamente e possam ser colhidas quando atingirem o nível de crescimento desejado.

Sendo assim, verifica-se que o cultivo de microalgas pode ser executado em diversos sistemas, com volumes e características diferentes, como os exemplos mostrados na Figura 2. Dentre os sistemas abertos, destacam-se *raceway ponds* (tanques de recirculação a céu aberto), lagos e lagoas naturais ou artificiais e sistema *turf scrubber*¹. O fotobiorreator se sobressai como principal sistema fechado de cultivo de microalgas (MULBRY et al., 2008; BJERK, 2012).

Figura 2 – Sistemas de cultivo de microalgas: **(a)** sistema aberto; e **(b)** sistema fechado.



Do ponto de vista operacional, diversas literaturas apresentam comparações entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas. O Quadro 1 apresenta uma compilação delas:

¹ “Consiste na utilização de uma comunidade de espécies de algas filamentosas, bactérias, fungos entre outras associadas, que se desenvolvem sobre uma tela por onde flui uma solução com excesso de nutrientes” (BJERK, 2012).

Quadro 1 – Comparativo entre sistemas fechados e abertos para o cultivo de microalgas.

Sistemas de cultivo de microalgas	Sistemas fechados (fotobiorreatores)	Sistemas abertos (tanques)
Start-up**	2 a 4 semanas	6 a 8 semanas
Controle da contaminação*	Fácil	Difícil
Risco de contaminação*	Reduzido	Alto
Esterilidade*	Possível	Nenhuma
Ação de chuvas**	Insignificante	Afeta a produção
Controle do processo*	Fácil	Difícil
Controle das espécies*	Fácil	Difícil
Mistura*	Uniforme	Muito baixa
Regime operacional*	Batelada ou semicontínuo	Batelada ou semicontínuo
Espaço requerido*	Depende da produtividade	Depende da produtividade
Razão área/volume*	Alta (20 – 200 m ⁻¹)	Baixa (5 –10 m ⁻¹)
Densidade populacional (células algais)*	Alta	Baixa
Investimento*	Alto	Baixo
Custo operacional*	3 a 10 vezes mais caro	Tanques < Fotobiorreatores
Reprodutividade dos parâmetros*	Fácil	Difícil
Eficiência de utilização da luz*	Alta	Baixa
Controle da temperatura*	Temperatura mais uniforme	Difícil
Produtividade*	3 a 5 vezes mais produtivo	Baixa
Perda de água*	Depende da refrigeração	Depende da refrigeração
Tensão hidrodinâmica nas algas*	Baixa a Alta	Muito baixa
Evaporação em crescimento médio*	Baixo	Alto
Controle de transferência gasosa*	Alto	Baixo
Perda de CO ₂ *	Depende do pH, alcalinidade, etc.	Depende do pH, alcalinidade, etc.
Inibição por O ₂ *	Possível	Tanques < Fotobiorreatores
Concentração da biomassa*	3 a 5 vezes maior	Tanques < Fotobiorreatores
Qualidade da biomassa**	Alta	Baixa
Ampliação da escala*	Difícil	Difícil

Fonte: *Mata, Martins e Caetano (2010); **Arceo (2012).

3.2.4 Condições de Cultivo

De acordo com Chen et al. (2011), o crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo. As características das principais formas de cultivo estão apresentadas no Quadro 2:

Quadro 2– Características das condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou orgânico
Foto-heterotrófico	Luz	Orgânico

Fonte: adaptado de Chen et al. (2011).

O cultivo fototrófico é o mais comumente empregado no crescimento de microalgas. Esta condição ocorre quando as microalgas utilizam a luz (natural ou artificial) como fonte de energia e o carbono inorgânico (dióxido de carbono, por exemplo) como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese (BORGES, 2010).

O cultivo heterotrófico representa a utilização de composto orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono pelas microalgas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Neste tipo de cultivo não há necessidade de luz, uma vez que os compostos orgânicos, tais como glicose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose e galactose a substituem, atuando como fonte de energia (CHEN et al., 2011).

Quando as microalgas utilizam tanto composto orgânico quanto carbono inorgânico como fonte de carbono para seu crescimento, tem-se o cultivo mixotrófico. Neste sistema, as microalgas são capazes de viver em condições fototróficas ou heterotróficas, ou ambas. O dióxido de carbono liberado na respiração das microalgas é reutilizado como fonte de carbono pelas fototróficas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

No cultivo foto-heterotrófico, as microalgas necessitam de luz como fonte de energia e de composto orgânico como fonte de carbono (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A principal diferença entre o cultivo mixotrófico e o foto-heterotrófico é que o último necessita de luz como fonte de energia, enquanto que o cultivo mixotrófico pode utilizar compostos orgânicos para este mesmo propósito (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Uma breve análise acerca das condições de cultivo foi descrita por Chen et al. (2011):

- a) Embora o cultivo heterotrófico resulte em uma elevada produtividade lipídica quando comparada a outras condições de cultivo, pode haver contaminação muito facilmente, principalmente em sistemas abertos, causando problemas de produção em larga escala. Além disso, do ponto de vista econômico, o custo de uma fonte de carbono orgânico também é maior.
- b) O cultivo fototrófico é promissor porque as microalgas podem fixar o gás carbônico originado em fábricas, por exemplo, e convertê-lo em óleo. Mesmo que a produtividade de óleo neste tipo de cultivo seja significativamente inferior ao cultivo heterotrófico, o baixo custo para aumento da escala produtiva torna este método muito atraente.
- c) Há pouca informação na literatura sobre a utilização de cultivos mixotrófico e foto-heterotrófico para produção de óleo de microalgas, mas essas duas condições de cultivo também são limitadas pelo risco de contaminação, pela inibição por fonte de carbono ou pela exigência de luz, podendo exigir um projeto especial de fotobiorreator, aumentando assim o custo de operação.

Neste trabalho, a condição de cultivo adotada foi mixotrófica, tendo em vista que, em qualquer época do ano, não há impedimento para o cultivo de microalgas no Paraná no que se refere à intensidade luminosa (CAVIGLIONE; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

3.2.5 Dinâmica de Crescimento

O crescimento de um cultivo axênico de microalgas pode ser caracterizado em cinco fases, como descrito por Coutteau (1996):

- i) Fase *lag* ou fase de indução: durante esta fase ocorre pouco aumento da densidade celular, sendo relativamente lenta quando uma cultura de microalga é transferida de um meio sólido para um cultivo líquido. Microalgas que crescem exponencialmente têm curtas fases de

indução, o que reduz drasticamente o tempo necessário para o aumento de escala. O atraso no crescimento é atribuído à adaptação fisiológica do metabolismo celular da microalga, como o aumento das concentrações de enzimas e metabólitos envolvidos na divisão celular e na fixação de carbono.

- ii) Fase exponencial: nesta fase, a densidade celular cresce em função do tempo, de acordo com a função logarítmica $C_t = C_0 \cdot e^{mt}$, em que: C_t e C_0 correspondem às concentrações celulares no tempo t e 0 , respectivamente, e m corresponde à taxa de crescimento específico. A taxa de crescimento específico é dependente da espécie de microalga, da intensidade de luz e da temperatura. A chave para o sucesso da produção de algas é manter as culturas nesta fase de crescimento.
- iii) Fase de declínio da taxa de crescimento: as divisões celulares desaceleram quando nutrientes, luz, pH, dióxido de carbono ou outros fatores físicos e químicos começam a limitar o crescimento.
- iv) Fase estacionária: nesta quarta fase, o fator limitativo e a taxa de crescimento são balanceados, o que resulta em uma densidade constante de células.
- v) Fase de morte: durante a fase final, a qualidade do cultivo se deteriora e os nutrientes são esgotados a níveis incapazes de sustentar o crescimento. A densidade celular decresce rapidamente e a cultura eventualmente entra em colapso.

A morte das microalgas pode ser causada por uma variedade de razões, incluindo o esgotamento de nutrientes, a deficiência de oxigênio, o sobreaquecimento, as alterações de pH, ou a contaminação (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002; VIEIRA COSTA et al., 2002).

3.2.6 Fatores que Influenciam o Crescimento

Segundo Derner et al. (2006), o crescimento de uma população microalgas é resultado de uma interação entre fatores biológicos, químicos e físicos.

Os fatores biológicos se relacionam às taxas metabólicas da espécie cultivada, ao tamanho das células e à possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento das microalgas (OHSE et al., 2007).

Do ponto de vista químico, interferem no crescimento das microalgas: a disponibilidade de nutrientes, a salinidade e o pH (LATALA, 1991; SCRAGG et al., 2002; VIEIRA COSTA et al., 2002; DERNER et al., 2006; OHSE et al., 2007).

Para as microalgas apresentarem um ótimo crescimento são necessários macronutrientes (C, N, O, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Co, Cu, Zn, Se e B), além de que, algumas espécies necessitam da adição de certas vitaminas ou de substâncias específicas ao meio de cultura. Os nutrientes mais utilizados pelas microalgas são o nitrogênio e o fósforo, embora o carbono seja considerado o macronutriente mais importante, o que se deve ao fato de constituir em média 50% da biomassa seca microalgal (OHSE et al., 2007; OLIVEIRA, 2009).

Existem diversos meios de cultura que fornecem quantidades apropriadas de nutrientes às microalgas. Para fins de produção de microalgas em escala de laboratório utilizam-se normalmente sais de pureza pró-análise (p.a.), enquanto que em cultivos de grande escala os meios podem ser preparados de fontes residuais e/ou comerciais de composição nutricional conhecida (ANDRADE; COSTA, 2008; OLIVEIRA, 2009; BAUMGARTNER et al., 2013).

De maneira geral, tem sido constatado por diversos autores que a deficiência de nitrogênio e enxofre nos meios de cultivo influencia positivamente a síntese lipídica em diversas espécies de microalgas, proporcionando incremento do conteúdo de lipídeos e de ácidos graxos. Por outro lado, a deficiência de fósforo gerou resultados controversos: aumento do teor lipídico em algumas espécies e redução em outras (SAHA; UMA; SUBRAMANIAN, 2003; KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006; VERMA et al., 2010).

Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), essa resposta às condições de estresse por deficiência nutricional é particular de cada espécie, sendo que a alteração na composição dos ácidos graxos e no teor de lipídeos das microalgas pode ocorrer de forma negativa ou positiva.

De acordo com Lemos (2012), o aumento na porcentagem de lipídeos totais nas células ocorre na fase estacionária de crescimento. Para diferentes gêneros de microalgas os teores lipídicos são menores na fase exponencial de crescimento, devido à alta demanda de energia, mas tendem a aumentar na fase estacionária, quando as células passam acumular reservas energéticas devido à limitação de nutrientes no meio (EMDADI; BERLAND, 1989; FERNÁNDEZ-REIRIZ et al., 1989).

Quanto aos fatores físicos, tem-se que a aeração, o tamanho e a forma dos tanques de cultivo, a luminosidade e a temperatura influenciam diretamente o crescimento das microalgas (SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; SANDNES et al., 2005; AL-QASMI et al., 2012; SINGH; SINGH, 2015).

A maioria das espécies de microalgas é fotoautotrófica, ou seja, retira a sua energia da luz e utiliza o carbono necessário para a construção de sua biomassa, através da fotossíntese. Portanto, devido à fundamental importância da luz para as algas, sua manutenção deve ser realizada com bastante atenção, de modo a encontrar um ponto ótimo de intensidade luminosa que proporcione a maior taxa fotossintética e evitar inibição de crescimento pelo excesso ou pela falta de luz (fotoinibição) (OHSE et al., 2007).

Embora as condições ótimas de desenvolvimento variem de acordo com a espécie, Coutteau (1996) apresenta uma configuração generalizada de alguns parâmetros para o cultivo de microalgas (Tabela 1).

Tabela 1 – Configuração geral das condições para o cultivo de microalgas.

Parâmetros	Faixa de alcance	Faixa ótima
Temperatura (°C)	16 – 27	18 - 24
Salinidade (g L ⁻¹)	12 – 40	20 - 24
Intensidade de luz fotossinteticamente ativa (μmol fótons m ⁻² s ⁻¹)	13,5 – 135,0 (depende do volume e da densidade)	33,8 – 67,6
Fotoperíodo (claro:escuro, horas)	- -	16:8 (mínimo) 24:0 (máximo)
pH	7 – 9	8,2 - 8,7

Fonte: adaptado de Coutteau (1996).

3.2.6.1 Temperatura

A temperatura tem o seu principal efeito sobre processos enzimáticos. A maioria das espécies de algas sobrevive numa ampla faixa térmica, porém, só há

incremento na síntese orgânica em determinada faixa térmica, considerada a faixa ótima de crescimento, a qual varia de acordo com a espécie de alga, com a estirpe e com a composição do meio de cultura (OHSE et al., 2007; COUTTEAU, 1996).

Ras, Steyer e Bernard (2013) mencionam a classificação das microalgas de acordo com suas temperaturas ótimas de crescimento, sendo denominadas psicrófilas as espécies que possuem faixa térmica ótima abaixo de 17 °C, mesófilas as que possuem faixa ótima entre 20 a 25 °C e termófilas as que melhor se desenvolvem em temperaturas de até 40 °C. Tais autores salientam que quando as temperaturas ótimas são excedidas, a fotossíntese, a respiração e o crescimento decaem devido ao desequilíbrio entre a demanda de energia e a produção de adenosina trifosfato (ATP), e em maior grau, devido à inativação ou desnaturação de proteínas envolvidas na fotossíntese.

Alguns pesquisadores estudaram o efeito da temperatura no desenvolvimento das microalgas, como Danesi et al. (2011) que cultivaram a microalga *Spirulina platensis* a temperaturas de 25 a 34,5 °C e intensidades luminosas de 15 a 69 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e observaram que a melhor produtividade celular ocorreu em 30 °C e 60 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cho et al. (2007) cultivaram as espécies *Chlorella ellipsoidea* e *Nannochloris oculata* em quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) e três salinidades (10, 20 e 30) e concluíram que a melhor taxa de crescimento específico ocorreu a 25 °C com salinidade de 10 para ambas as espécies, sendo que a densidade celular máxima se deu a 15 °C com salinidade de 10 para espécie *Chlorella ellipsoidea* e a 25 °C com salinidade de 30 para a espécie *Nannochloris oculata*.

Ma et al. (2014) empregaram os resíduos hidrolisados enzimáticos da extração lipídica de biomassa de microalgas como substrato nutricional para o cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris*, com intuito de avaliar a produção lipídica desta espécie quando cultivadas em diferentes temperaturas. Foi observado que a temperatura ótima para o crescimento de células e acumulação de lipídeos foi entre 25 e 30 °C.

Levando em consideração que a temperatura é um fator importante no desenvolvimento das microalgas e que no Paraná não há limitação de luz para o crescimento das microalgas em nenhuma época do ano (CAVIGLIONE; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014), este trabalho buscou avaliar a influência da temperatura na

produção de biomassa, lipídeos e clorofilas por microalgas clorófitas, no intuito de analisar seu potencial produtivo no Paraná para diversas aplicações.

3.3 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DO PARANÁ

O Paraná situa-se na região sul do Brasil, com o trópico de Capricórnio passando pelo estado e, conforme a classificação climática proposta por Köppen², apresenta transições entre dois predominantes tipos climáticos.

No norte, oeste, sudoeste e centro do estado, predomina-se o tipo climático Cfa, caracterizado pelo clima subtropical úmido, com verões quentes, cuja temperatura média do mês mais quente é superior aos 22 °C, temperatura média do mês mais frio inferior a 18 °C, com tendências de concentração de chuvas nos meses de verão e sem estação seca definida.

No sul, leste e centro do estado, tem predomínio o tipo climático Cfb, caracterizado pelo clima subtropical úmido, com verões amenos, cuja temperatura média do mês mais quente é inferior a 22 °C, temperatura média do mês mais frio inferior a 18 °C, com pelo menos 4 meses com médias acima de 10 °C e com chuvas abundantes e bem distribuídas ao longo do ano.

A Figura 3 apresenta o mapa do Paraná com sua respectiva classificação climática proposta por Köppen e a Figura 4 expõe a temperatura média anual ocorrente no Estado.

² O sistema global de classificação climática proposto por Köppen se baseia nas médias termo-pluviométricas comparadas aos domínios vegetais para distinguir as características estacionais, designando-as em cinco grupos principais e diversos subgrupos que caracterizam o clima (MAACK, 1981). Cada clima é denotado por um código constituído por um conjunto de duas ou três letras, sendo que a primeira letra (maiúscula) corresponde ao grupo climático principal e as demais letras (maiúsculas ou minúsculas) correspondem aos subgrupos climáticos.

O conhecimento das características climáticas de uma região é ferramenta estratégica para a seleção dos locais e das épocas do ano mais adequadas ao cultivo de microalgas com foco no aproveitamento de seus metabólitos para fins energéticos ou para outras aplicações.

Neste sentido, as temperaturas do cultivo de microalgas clorófitas realizado neste trabalho foram definidas com base no comportamento de temperaturas que ocorrem no Paraná, com intuito de aproximar o ensaio experimental à realidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em duas partes, sendo que a primeira compreendeu em avaliar a influência da temperatura na produção de biomassa, lipídeos e pigmentos pelas microalgas, e a segunda, em avaliar o potencial de produção das microalgas em função da distribuição da temperatura no Paraná.

4.1 EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR, no município de Londrina - PR.

4.1.1 Estirpes de Microalgas

Foram utilizadas seis estirpes de microalgas clorófitas, sendo cinco escolhidas da coleção IPR do IAPAR e uma adquirida comercialmente (*Neochloris oleoabundans* - UTEX1185).

A Tabela 2 dispõe as características das estirpes utilizadas.

Tabela 2 – Características das estirpes de microalgas.

Identificação	Classificação taxonômica	Local de coleta	Características das células			
			Estrutura do talo	Forma	Tamanho (µm)	
					Largura	Comprimento
IPR7104*	<i>Chlorella sorokiniana</i>	SMS	Cenobial	Elipsoide	5,30	14,43
IPR7115*	<i>Chlorella</i> sp.	FEP	Unicelular	Esférica	8,85	8,85
IPR7116*	<i>Chlorella</i> sp.	FEP	Unicelular	Esférica	ND	ND
IPR7117*	<i>Chlorella</i> sp.	FEP	Unicelular	Esférica	ND	ND
IPR7151*	<i>Chlorella</i> sp.	PTB	Unicelular	Esférica	9,00	13,50
UTEX1185**	<i>N. oleoabundans</i>	TEX	Unicelular	Esférica	5,00	5,00

Fonte: Andrade e Colozzi Filho (2014); *UTEX (2016).

FEP: Fernandes Pinheiro; PTB: Pato Branco; TEX: Texas (EUA); SMS: São Mateus do Sul.

ND: Não Determinado.

4.1.2 Condições de Temperatura nas Câmaras de Cultivo

Foram simuladas quatro condições de temperatura (W, X, Y e Z) para o crescimento das estirpes microalgas, sendo que:

- a) para definir as temperaturas das condições W e Z, foram consideradas temperaturas extremas, possivelmente limitantes ao cultivo;
- b) para definir as temperaturas das condições X e Y, foram consideradas as temperaturas médias diurnas e noturnas de inverno e de verão ocorrentes no Paraná, respectivamente.

As temperaturas médias das condições X e Y foram obtidas a partir do banco de dados do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR, 2015), com registros de 38 estações meteorológicas, de outubro de 1999 a julho de 2005. Para a média diurna considerou-se o período compreendido entre as 06h00 e as 18h00 enquanto que para a média noturna considerou-se o período das 18h00 às 06h00 do dia seguinte.

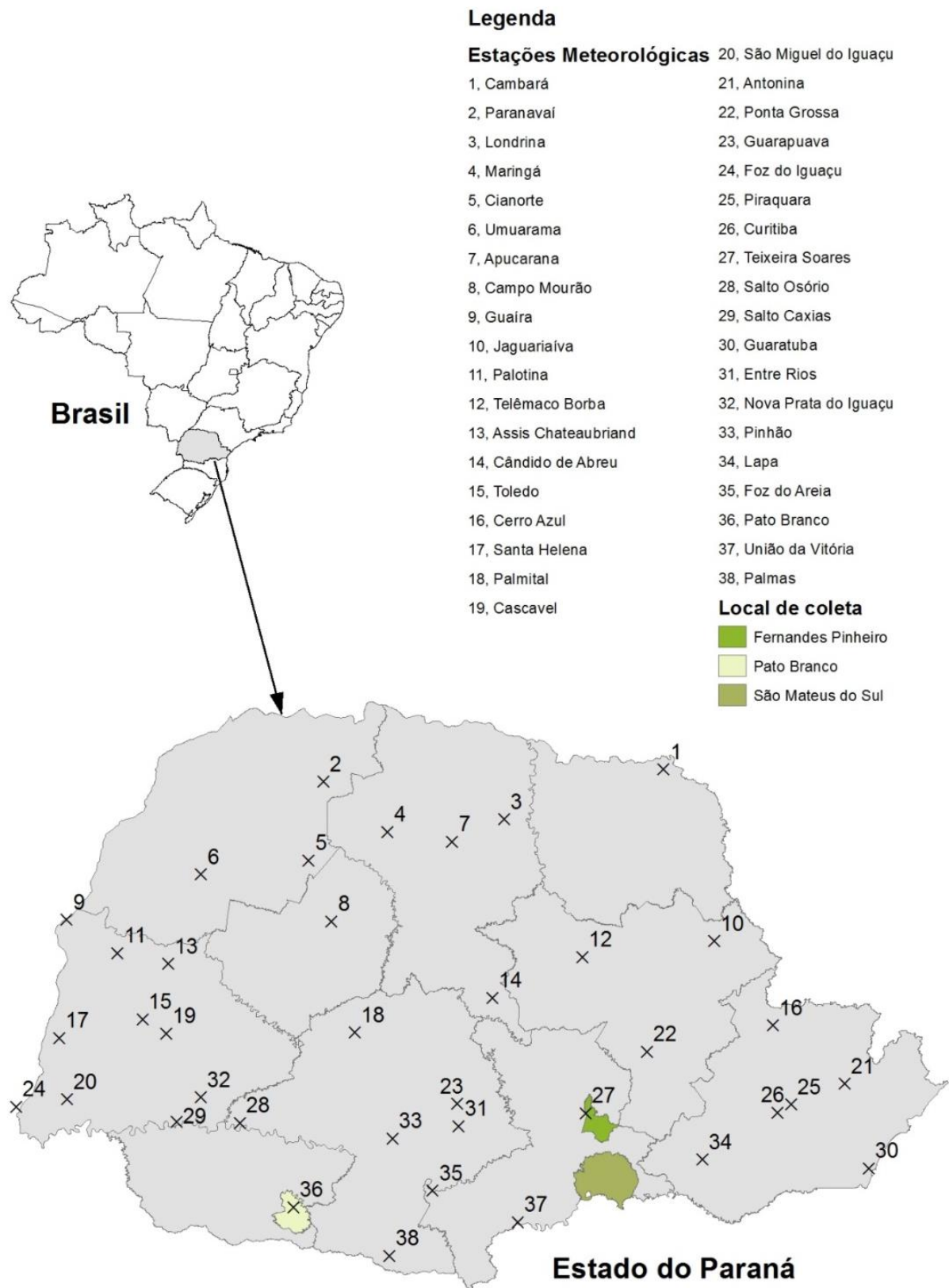
Para todas as condições de temperatura, o fotoperíodo foi definido 12h/12h de claro/escuro, sendo que, em cada condição, as temperaturas eram diferentes entre os períodos de claro e de escuro (Tabela 3).

Tabela 3 – Definição das temperaturas para o cultivo das estirpes de microalgas.

Condição de temperatura	Temperatura (°C)	
	Claro (12h)	Escuro (12h)
W	15	08
X	19	15
Y	25	19
Z	39	35

A Figura 5 indica a localização das estações meteorológicas das quais foram obtidos os dados de temperatura, bem como o local de coleta destas estirpes, com exceção da estirpe de *N. oleoabundans*.

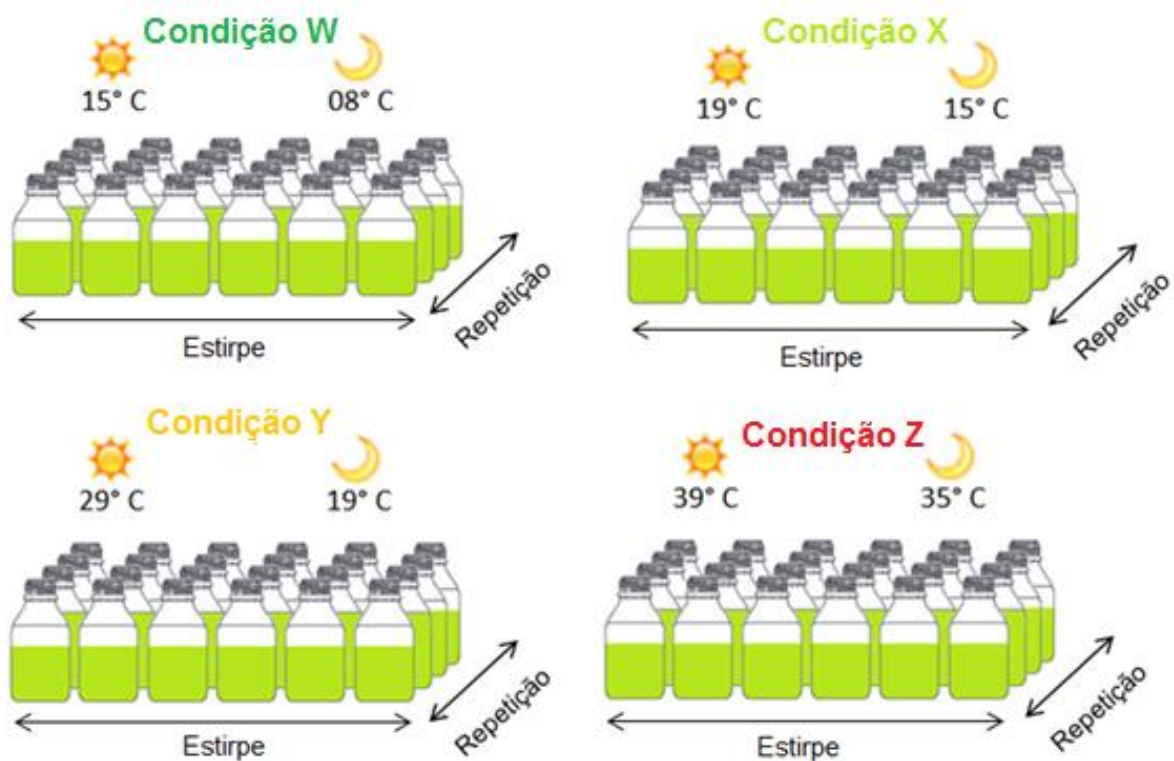
Figura 5 – Localização das estações meteorológicas e dos locais de coleta das microalgas.



4.1.3 Delineamento Experimental

O delineamento adotado foi de parcelas subdivididas, com 4 tratamentos primários (condições de temperatura) como parcelas, 6 tratamentos secundários (estirpes de microalgas) como subparcelas, e 4 repetições, em um delineamento inteiramente ao acaso (Figura 6).

Figura 6 – Esquema do delineamento experimental.



4.1.4 Preparo dos Inóculos

O preparo dos inóculos foi conduzido em duas etapas, em uma única câmara de crescimento. Na primeira etapa, foram utilizados tubos de vidro (30 mL) para o cultivo das estirpes e, na segunda etapa, foram utilizados frascos Schott (500 mL). As condições de cultivo dos inóculos eram as mesmas para ambas as fases, conforme disposto a seguir.

- Temperatura: $28,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$
- Fotoperíodo claro/escuro: 12/12 h

- Intensidade de luz fotossinteticamente ativa: $100 \pm 20,0 \mu\text{mol f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (medido com por\u00f4metro Licor Inc, mod. LI 1600)
- Tempo de incubação: 7 dias
- Meio de cultivo: *Bold's Basal Medium* (BBM) (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição do meio BBM utilizado na preparação de in\u00f3culo.

Nutriente	Concentração final (mg L ⁻¹)
NaNO ₃	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
EDTA	50
KOH	31
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄ (concentrado)	1mL L ⁻¹
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49

Fonte: Bold (1949).

4.1.4.1 Etapa 1

Uma al\u00edquota de 500 μL de cada estirpe de microalga foi transferida dos tubos da cole\u00e7\u00e3o IPR para um microtubo (2 mL), onde foi realizada a lavagem das c\u00e9lulas da seguinte maneira: centrifuga\u00e7\u00e3o da amostra por 10 min, a 6.000 rpm (Eppendorf, mod. 5415D); descarte do sobrenadante; adi\u00e7\u00e3o de BBM (500 μL); agita\u00e7\u00e3o em agitador de tubos (Fanem, mod. 251) por aproximadamente 15 s; repeti\u00e7\u00e3o da lavagem e do descarte do sobrenadante e, por \u00faltimo, ressuspens\u00e3o do *pellet* em 300 μL de meio BBM.

Com aux\u00edlio de uma al\u00e7a de platina, as estirpes lavadas foram inoculadas em meio BBM s\u00f3lido contido em placas de Petri. Ap\u00f3s incubação nas condi\u00e7\u00f5es de cultivo supracitadas, foram preparados 100 mL de in\u00f3culo de cada estirpe, por meio da transfer\u00eancia das microalgas crescidas em placas para o meio BBM l\u00edquido contido em tubos de vidro. Os tubos foram levados \u00e0 c\u00e2mara de crescimento para incubação, conforme condi\u00e7\u00f5es de cultivo descritas acima.

4.1.4.2 Etapa 2

Foram preparados 600 mL de inóculo de cada estirpe, por meio da transferência dos inóculos obtidos da Etapa 1 para o meio BBM líquido contido em frascos Schott, na proporção de 16,6% (volume volume⁻¹) de inóculo em relação ao meio de cultivo. Em seguida, os frascos foram levados à câmara de crescimento para incubação.

4.1.5 Condução do Experimento

O inóculo de cada estirpe obtido ao final da Etapa 2 foi distribuído em 16 frascos Schott (250 mL) de modo que em cada frasco se obtivesse uma concentração de 15% de inóculo (volume volume⁻¹) em relação ao meio de cultivo. Em seguida, todos os frascos, de todas as estirpes, foram levados às câmaras de crescimento (Ethik, mod. 411 FPD) para incubação por 15 dias, conforme delineamento descrito no item 4.1.3.

Todas as câmaras de crescimento estavam equipadas com duas lâmpadas fluorescentes de 30 W (Philips, mod. TLD 75 extra luz do dia) que forneciam uma intensidade luminosa de 35 a 37 $\mu\text{mol f\u00f3tons s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (medido com por\u00f4metro Licor Inc, mod. LI 1600).

O meio de cultivo empregado constituiu-se de nitrato de c\u00e1lcio (CaNO_3), fosfato monoam\u00f4nico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), formulado de N/P/K/Mg/S, micronutrientes e extrato de levedura, nas concentra\u00e7\u00f5es descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composi\u00e7\u00e3o do meio de cultivo utilizado na condu\u00e7\u00e3o do experimento.

Nutriente	Concentra\u00e7\u00e3o final (g L ⁻¹)
Fosfato Monoam\u00f4mico (MAP) - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,50
CaNO_3	4,00
N / P / K / Mg / S (8,0 / 10,0 / 40,0 / 1,8 / 2,4) %, respectivamente	1,00
Micronutrientes – Zn / Mo / Mg / S / B / Cu / Fe (10,0 / 1,0 / 5,0 / 11,0 / 1,0 / 0,5) %, respectivamente	0,50
Extrato de levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2,00

Os materiais (meios de cultivo, vidrarias, soluções, ponteiras e pipetas) utilizados durante a preparação dos inóculos e a condução do experimento foram previamente autoclavados à temperatura de 121 °C, pressão de 1 atm, por 21 min.

4.1.6 Determinações

Após o período de incubação, foram determinados os seguintes parâmetros:

- Produção de biomassa seca (mg L^{-1});
- Teor lipídico (% massa massa⁻¹); e
- Teor de clorofilas *a*, *b* e *c* ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Os procedimentos para determinação de cada parâmetro estão descritos a seguir.

4.1.6.1 Produção de biomassa seca

Sacos plásticos de 50 mL foram submetidos à estufa (Fanem, mod. 315 SE) para secagem a 60 °C por 24 h. Após a secagem, estes sacos foram armazenados em dessecador e encaminhados à determinação de massa em balança analítica (Shimadzu, AUY 220 D).

Em seguida, foram transferidos 30 mL de cada amostra para um saco plástico previamente seco e pesado, o qual foi introduzido em um tubo Falcon (45 mL) e submetido à centrifugação (Hermle, mod. Z 383 K) durante 10 min, a 6.000 rpm. Após descarte do sobrenadante, os sacos plásticos contendo a biomassa úmida concentrada foram colocados em estufa (Fanem, mod. 315 SE) para secagem a 60 °C por 48 h. Após este período, os sacos foram transferidos para o dessecador e pesados em balança analítica (Shimadzu, AUY 220 D).

A biomassa seca foi determinada por meio da Equação 1:

$$BS = \frac{(B_2 - B_1)}{V} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

BS = biomassa seca (mg L^{-1});

B_1 = massa do saco plástico (mg);

B_2 = massa do saco plástico + massa da biomassa seca (mg);

V = volume da amostra centrifugada (L).

4.1.6.2 Teor lipídico

O teor de lipídeos foi determinado de acordo com adaptações do método Bligh e Dyer (1959) realizadas por Ryckebosch, Muylaert e Foubert (2012). Foram pesados 50 mg de biomassa seca de cada estirpe em tubo Falcon (20 mL). Em seguida, foram adicionados 3 mL de metanol e submetido em agitador de tubos (Fanem, mod. 251) por 30 s. Após agitação, foram adicionados 4 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 2,4 mL de água destilada. Em seguida, o tubo foi deixado em repouso por 1 h para separação das fases e então foi realizada centrifugação por 10 min a 2.000 rpm (Hermle, mod. Z 383 K). A parte inferior (clorofórmio) foi pipetada e transferida para um novo tubo Falcon (20 mL). O conteúdo resultante foi re-extraído adicionando-se 2 mL de metanol seguido de agitação por 30 s. Após agitação, foram adicionados 3 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 2,4 mL de água destilada. Novamente o tubo foi deixado em repouso por 1 h, centrifugado nas mesmas condições e a parte inferior foi transferida para o tubo Falcon (20 mL) combinando-se com a amostra da primeira extração.

As fases de solvente combinadas foram filtradas através de uma camada de sulfato de sódio anidro depositada ao fundo de um papel filtro (Whatman, nº 1) que envolvia um funil. Em seguida, foram adicionados 2 mL do filtrado em microtubos secos em estufa (Fanem, mod. 315 SE) e previamente pesados em balança analítica (Shimadzu, AUY 220 D). Estes microtubos contendo as amostras foram encaminhados novamente à estufa (Fanem, mod. 315 SE) para secagem a 60 °C até que estes adquirissem peso constante. A porcentagem de lipídeos foi determinada conforme a Equação 2.

$$L = \frac{mpe \cdot v_{total} \cdot 100}{v_{amostra} \cdot bs} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

L = Teor lipídico em relação à biomassa seca (%);

mpe = massa de lipídeo da amostra após evaporação (g);

v_{total} = volume total de clorofórmio utilizado para extração de 0,05 g de biomassa seca de microalga (mL);

$v_{amostra}$ = volume de amostra com clorofórmio à evaporar (mL);

bs = biomassa seca utilizada (0,05 g).

4.1.6.3 Teor de clorofilas a , b e c

A concentração de clorofilas a , b e c foi estimada por método colorimétrico, por meio da substituição dos valores de absorbâncias das amostras lidas em diferentes comprimentos de ondas nas Equações 3, 4 e 5, descritas no trabalho de Jeffrey e Humphrey (1975).

$$\text{Clorofila } a \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(11,85 E_{664} - 1,54 E_{647} - 0,08 E_{630}) \cdot v}{V \cdot c} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Clorofila } b \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(-5,43 E_{664} + 21,03 E_{647} - 2,66 E_{630}) \cdot v}{V \cdot c} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Clorofila } c_1 + c_2 \ (\mu\text{g } L^{-1}) = \frac{(-1,67 E_{664} + 7,60 E_{647} - 24,52 E_{630}) \cdot v}{V \cdot c} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

E_n = absorbância no comprimento de onda n nm (abs);

v = volume de acetona utilizada para extração (mL);

V = volume de cultivo utilizado (L);

c = distância do caminho óptico (largura da cubeta) (cm).

Para a realização das leituras de absorbâncias, alíquotas de 2 mL dos cultivos foram centrifugadas (Eppendorf, mod. 5415D) por 10 min a 6.000 rpm.

Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e as amostras precipitadas (*pellets*) foram armazenadas em ultrafreezer (Freeztec, mod. 342) a -80 °C por 24 h, para facilitar o rompimento da parede celular. Após este período, as amostras foram descongeladas e os *pellets* foram ressuspensos adicionando-se 2 mL de acetona 90% aos microtubos e agitando-os em agitador (Fanem, mod. 251), em ambiente abrigado de luz. As amostras foram armazenadas a 4 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente (Eppendorf, mod. 5415D) por 10 min a 6.000 rpm e os sobrenadantes foram submetidos às leituras em espectrofotômetro (Thermo Scientific, mod. Genesys 10S UV-VIS) nos comprimentos de onda: 480, 510, 630, 647, 664 e 750 nm.

4.1.7 Análises Estatísticas

Foi realizada Análise de Componentes Principais (ACP) com base na matriz de correlação de Pearson das variáveis analisadas (biomassa, lipídeos, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *c*). Os tratamentos (n=24) foram agrupados de acordo com os autovalores da matriz de covariância e com a distância euclidiana entre os tratamentos, pelo método de ligação completa (*CLUSTER Procedure - Complete Linkage Cluster Analysis*).

Na análise de agrupamento, os tratamentos foram codificados por um conjunto de dois algarismos, sendo o primeiro algarismo referente à condição de temperatura (variando de 1 a 4 para as condições de W, X, Y e Z, respectivamente) e o segundo algarismo referente à estirpe de microalga (variando de 1 a 6 para as estirpes IPR7104, IPR7115, IPR7116, IPR7117, IPR7151, UTEX1185, respectivamente). As correlações entre os tratamentos foram representadas graficamente por meio de um dendrograma.

Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos resultados de cada variável e quando as variâncias eram significativas, os resultados eram submetidos ao teste de comparação de médias (Tukey), em nível de 5% de significância.

Os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias foram apresentados por fatores, sendo o Fator 1 correspondente às condições de temperatura e o Fator 2, às estirpes.

Todas as análises estatísticas foram executadas no *software* SAS (*Statistical Analysis System*), versão 9.

4.2 POTENCIAL PRODUTIVO DE MICROALGAS NO PARANÁ

O potencial produtivo de microalgas foi avaliado com base na distribuição espacial da temperatura no Paraná. Para tanto, foram gerados mapas das temperaturas médias diurnas e noturnas ocorrentes em cada estação climática do ano (verão, outono, inverno e primavera), conforme procedimento descrito a seguir.

Inicialmente foram obtidas regressões múltiplas dos dados de temperatura média das 38 estações meteorológicas (mencionadas no item 4.1.1) com as coordenadas geográficas e altitude das estações. As regressões obtidas estão expressas nas Equações de 6 a 13.

$$\text{TDV} = 23,384 + 0,5353 \cdot \text{LAT} - 0,3493 \cdot \text{LON} - 0,004668 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9447) \quad \text{(Equação 6)}$$

$$\text{TNV} = 18,963 + 0,5191 \cdot \text{LAT} - 0,3581 \cdot \text{LON} - 0,005171 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9300) \quad \text{(Equação 7)}$$

$$\text{TDO} = 39,709 + 0,9623 \cdot \text{LAT} - 0,1509 \cdot \text{LON} - 0,004197 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9363) \quad \text{(Equação 8)}$$

$$\text{TNO} = 25,985 + 0,7063 \cdot \text{LAT} - 0,2332 \cdot \text{LON} - 0,004992 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,8362) \quad \text{(Equação 9)}$$

$$\text{TDI} = 35,663 + 1,2127 \cdot \text{LAT} - 0,2888 \cdot \text{LON} - 0,003277 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9056) \quad \text{(Equação 10)}$$

$$\text{TNI} = 22,723 + 0,9264 \cdot \text{LAT} - 0,3441 \cdot \text{LON} - 0,004425 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,8015) \quad \text{(Equação 11)}$$

$$\text{TDP} = 29,852 + 1,1039 \cdot \text{LAT} - 0,4499 \cdot \text{LON} - 0,003700 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9432) \quad \text{(Equação 12)}$$

$$\text{TNP} = 23,125 + 0,9745 \cdot \text{LAT} - 0,4504 \cdot \text{LON} - 0,004634 \cdot \text{ALT} \quad (R^2 = 0,9348) \quad \text{(Equação 13)}$$

Em que:

TDV = Temperatura média Diurna de Verão (em °C);

TNV = Temperatura média Noturna de Verão (em °C);

TDO = Temperatura média Diurna de Outono (em °C);

TNO = Temperatura média Noturna de Outono (em °C);

TDI = Temperatura média Diurna de Inverno (em °C);

TNI = Temperatura média Noturna de Inverno (em °C);

TDP = Temperatura média Diurna de Primavera (em °C);

TNP = Temperatura média Noturna de Primavera (em °C);

LAT = Latitude (em graus decimais);

LON = Longitude (em graus decimais); e

ALT = Altitude (em metros).

A seguir, as regressões foram submetidas ao modelo digital de elevação do *Shuttle Radar Topography Mission* (SRTM) (FARR et al., 2007) para espacialização das informações de temperatura. Os mapas gerados foram classificados, sendo as classes definidas pelo ponto médio entre as temperaturas das condições adotadas no cultivo das microalgas (W, X, Y e Z) (Tabela 3).

As temperaturas de cada classe estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Classificação adotada nos mapas das temperaturas médias diurnas e noturnas de cada estação climática do ano.

Classe	Temperatura diurna (°C)	Temperatura noturna (°C)
Classe 1	≤ 17,0	≤ 11,5
Classe 2	17,0 a 22,0	11,5 a 17,0
Classe 3	22,0 a 32,0	17,0 a 27,0
Classe 4	≥ 32,0	≥ 27,0

Os mapas de temperatura média diurna e noturna de cada estação do ano foram combinados por sobreposição, gerando novos mapas. A distribuição espaço-temporal destas combinações foi confrontada com os resultados da produção de biomassa, lipídeo e clorofilas *a*, *b* e *c* pelas microalgas nas condições de temperaturas testadas (W, X, Y e Z).

Foi avaliada a influência da temperatura do ar sobre a temperatura do cultivo de microalgas cultivadas em três períodos distintos em sistema aberto (tanque de 3.000 L, com profundidade útil de 43 cm). O cultivo das estirpes ocorreu em meio descrito na Tabela 5, sob condições climáticas naturais por 10 dias, com exposição natural da radiação solar e da temperatura do ar, porém com aeração artificial (sem controle do fluxo de entrada e de saída de ar). As temperaturas do cultivo e do ar foram aferidas com auxílio de três sensores de temperatura (HOBO, TMC6-HD) posicionados a 5 cm, a 15 cm e a 30 cm abaixo da superfície líquida e mais um posicionado ao lado do tanque, na parte externa. Todos estes sensores mantinham-se conectados a um registrador de dados (HOBO, U12 Outdoor) que registrava as temperaturas a cada 30 minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO

5.1.1 Análises de Componentes Principais e de Agrupamento

Por meio dos autovetores da matriz de correlação das variáveis (Tabela 7) obtida pela análise multivariada aplicada (ACP), foram identificados três componentes principais (CP), sendo que as clorofilas *a*, *b* e *c* se correlacionaram melhor ao primeiro componente (55,3%, 59,3% e 51,9%, respectivamente), a biomassa ao segundo componente (78,4%) e o lipídeo ao terceiro componente (83,3%).

Tabela 7 – Autovetores da matriz de correlação das variáveis.

Variável	CP1	CP2	CP3
Biomassa	0,1926	0,7838	0,4230
Lipídeo	0,1883	-0,5174	0,8333
Clorofila <i>a</i>	0,5532	-0,1933	-0,2865
Clorofila <i>b</i>	0,5931	-0,1305	-0,1984
Clorofila <i>c</i>	0,5193	0,2520	0,0728

CP: Componente Principal (1: primeiro; 2: segundo; e 3: terceiro).

Os autovalores da matriz de correlação (Tabela 8) indicaram que estes três componentes principais representaram juntos 92,8% da variação. Esses autovalores são acumulativos e representam a participação de cada componente principal.

Tabela 8 – Autovalores da matriz de correlação das variáveis.

CP	Autovalor	Diferença	Proporção	Cumulativo
1	2,6481	1,5281	0,5296	0,5296
2	1,1200	0,2479	0,2240	0,7536
3	0,8722	0,5304	0,1744	0,9281

CP: Componente Principal.

Foram observadas correlações entre as variáveis clorofila *a* e clorofila *b* ($r=0,956$, $p<0,0001$), entre clorofila *b* e clorofila *c* ($r=0,732$, $p<0,0001$) e entre clorofila *a* e clorofila *c* ($r=0,570$, $p<0,005$). As variáveis biomassa e lipídeo não se correlacionaram entre si e nem com as demais variáveis (Tabela 9).

Tabela 9 – Coeficientes da correlação de Pearson das variáveis e das componentes principais.

	Lipídeo	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c	CP1	CP2	CP3
Biomassa	-0,045ns	0,070ns	0,132ns	0,403ns	0,313ns	0,830**	0,395ns
Lipídeo		0,187ns	0,229ns	0,155ns	0,306ns	-0,548ns	0,778**
Clorofila a			0,956**	0,570*	0,900**	-0,205ns	-0,268ns
Clorofila b				0,732**	0,965**	-0,138ns	-0,185ns
Clorofila c					0,845**	0,267ns	0,068ns

CP: Componente Principal (1: primeiro; 2: segundo; e 3: terceiro).

* $p < 0,005$; ** $p < 0,0001$; ns: não significativo.

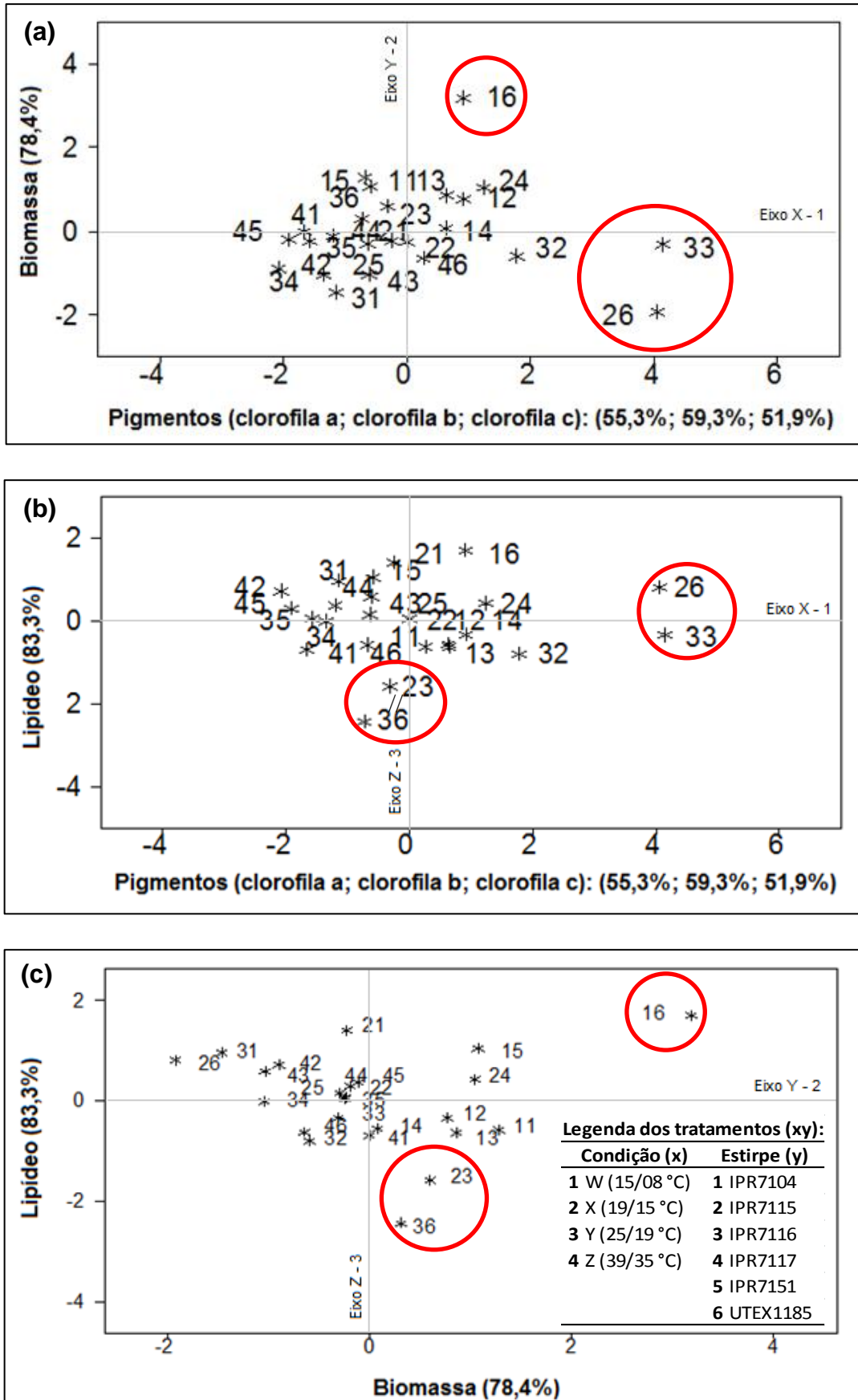
As Figuras 7a, 7b e 7c apresentam os gráficos de dispersão dos tratamentos de acordo com a ACP, representando o primeiro componente (CP1) no eixo X-1, o segundo (CP2) no eixo Y-2 e o terceiro (CP3) no eixo Z-3.

A estirpe UTEX1185 na condição de temperatura X (19/15 °C, 12h/12h de claro/escuro) e a estirpe IPR7116 na condição de temperatura Y (25/19 °C) formaram um grupo avulso nos gráficos de dispersão que envolvem o CP1 (Figuras 7a e 7b). Isto ocorreu devido ao fato de que estas estirpes, nestas condições, apresentaram os maiores valores de clorofilas a, b e c em relação a todos os demais tratamentos (8.251,48; 1.714,98 e 616,62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para a UTEX1185; e 7.622,63; 1.796,81 e 722,99 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para a IPR7116).

As Figuras 7a e 7c, que envolvem o CP2, mostram que a estirpe UTEX1185 na condição de temperatura W (15/08 °C) ocupou uma posição isolada quando comparada aos outros tratamentos. Este comportamento se explica devido a esta estirpe, quando cultivada na condição de temperatura citada, ter apresentado o maior valor de biomassa seca em relação aos demais tratamentos (2.900,12 mg L^{-1}).

A estirpe UTEX1185 na condição de temperatura Y (25/19 °C) e a estirpe IPR7116 na condição de temperatura X (19/15 °C) apresentaram-se em posição separada dos demais tratamentos nos gráficos que envolvem o CP3 (Figuras 7b e 7c). Essas estirpes nestas condições apresentaram os menores valores de teores lipídico em relação aos demais (18,23 e 23,63% para as estirpes UTEX1185 e IPR7116, respectivamente).

Figura 7 – Dispersão dos tratamentos, de acordo com Análise de Componentes Principais (ACP): **(a)** primeiro e segundo; **(b)** primeiro e terceiro; e **(c)** segundo e terceiro componentes.



O dendrograma da análise de agrupamento (Figura 8) mostra que os tratamentos foram divididos em quatro principais grupos:

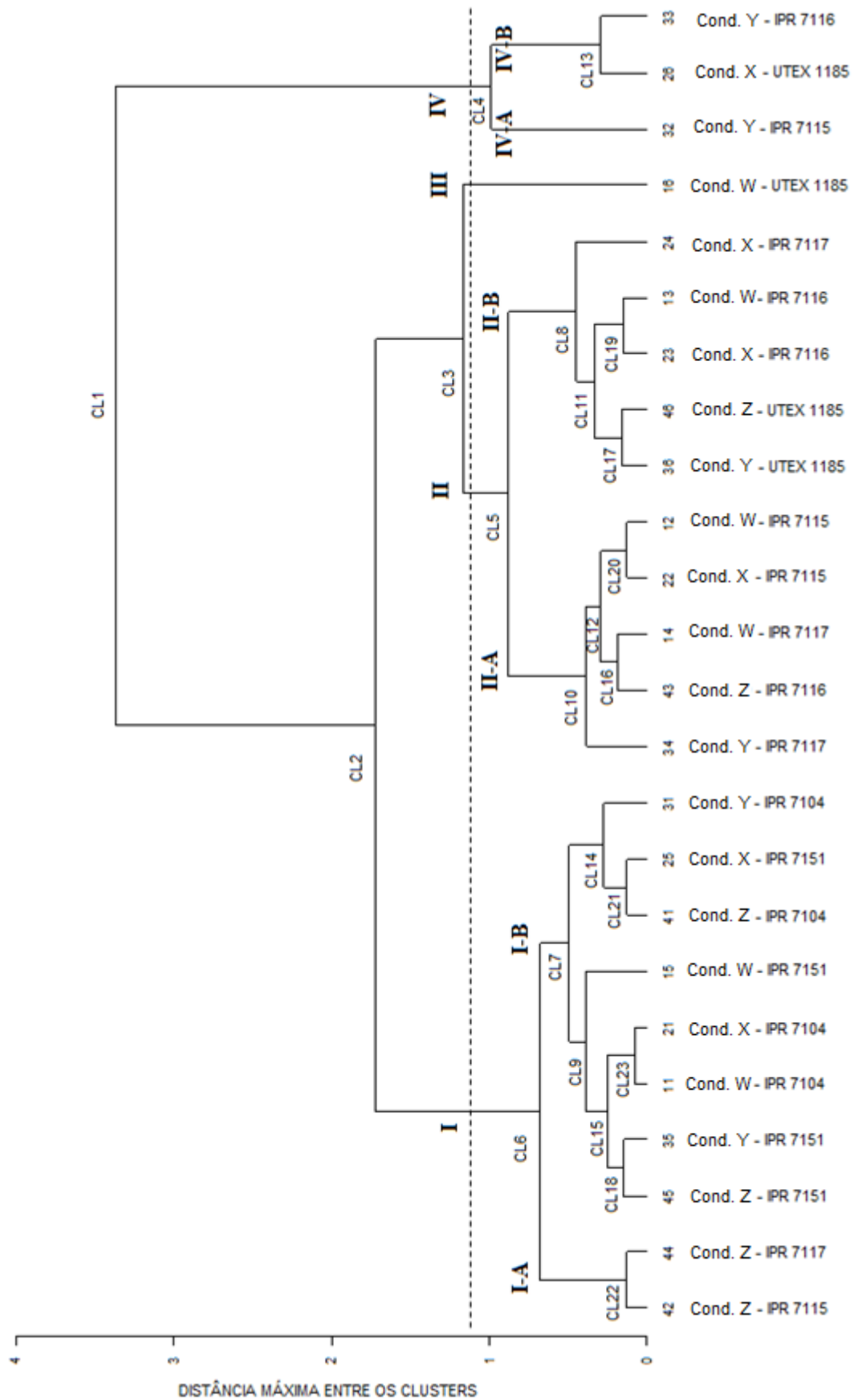
- o grupo I, que foi composto por 10 tratamentos, reuniu quatro estirpes isoladas de águas continentais no Paraná, sendo eles: todos os tratamentos que envolveram o cultivo das estirpes IPR7104 e IPR7151, independentemente das condições de temperatura a que foram submetidas, além dos tratamentos que envolveram o cultivo das estirpes IPR7115 e IPR7117 na condição de temperatura Z (39/35 °C);
- o grupo II, que também se compôs por 10 tratamentos, sendo três com a IPR7116, três com a IPR7117, dois com a IPR7115 e dois que envolveram a estirpe UTEX1185, independentemente das condições de temperatura a que foram submetidas;
- o grupo III, que foi composto por um único tratamento, que representa o cultivo da estirpe UTEX1185 na condição de temperatura W (15/08 °C); e
- o grupo IV, que foi composto por três tratamentos, sendo dois que envolveram o cultivo das estirpes IPR7115 e IPR7116 na condição de temperatura Y (25/19 °C) e um que envolveu o cultivo da UTEX1185 na condição X (19/15 °C).

Pela associação de técnicas de análise multivariada (ACP) e de análise de agrupamento, notou-se que a estirpe UTEX1185 na condição de temperatura X (19/15 °C) e a IPR7116 na condição de temperatura Y (25/19 °C) se agruparam e se destacaram dos demais tanto nos gráficos de dispersão que envolvem o CP1, que representa as variações nos valores de teor de clorofilas (Figuras 7a e 7b), quanto no dendrograma (Figura 8), no grupo IV-B.

Notou-se também que a estirpe UTEX1185 na condição de temperatura W (15/08 °C) ocupou posição isolada tanto nos gráficos de dispersão que envolvem o CP2, que representa as variações nos valores de biomassa seca (Figuras 7a e 7c), como no dendrograma (Figura 8), formando o grupo III.

A estirpe UTEX1185 na condição de temperatura Y (25/19 °C) e a IPR7116 na condição de temperatura X (19/15 °C) se agruparam tanto nos gráficos de dispersão que envolvem o CP3, que representa as variações nos valores de teor lipídico (Figuras 7b e 7c), quanto no dendrograma (Figura 8), ambos dentro do grupo II-B.

Figura 8 – Dendrograma da análise de agrupamento dos tratamentos.



CL: *Cluster* (Grupo). Cond.: Condição de Temperatura (W: 15/08 °C; X: 19/15 °C; Y: 25/19 °C; e Z: 39/35 °C).

5.1.2 Análise de Variância e Teste de Médias

5.1.2.1 Produção de biomassa seca

Entre as condições de temperatura (Fator 1), as microalgas, independentemente das estirpes, apresentaram o maior valor médio de biomassa seca na condição W (1.472,06 mg L⁻¹) e os menores valores médios nas condições Y e Z (736,04 e 743,84 mg L⁻¹, respectivamente), sem diferença significativa entre si (Tabela 10).

Apenas as estirpes IPR7115 e IPR7116 não apresentaram diferenças significativas ao serem cultivadas nas diversas condições de temperatura. A estirpe IPR7104 apresentou menor produção de biomassa na condição Y (437,95 mg L⁻¹). A estirpe IPR7117 apresentou maior produção na condição X (1.657,58 mg L⁻¹) e as estirpes IPR7151 e UTEX1185, na condição W (1.627,60 e 2.900,12 mg L⁻¹, respectivamente).

Entre as estirpes (Fator 2), independentemente das condições de temperatura, a IPR7116, a IPR7117, a IPR7151 e a UTEX1185 apresentaram maiores valores de biomassa seca (1.056,32; 962,67; 1.005,37; e 1.268,55 mg L⁻¹, respectivamente), sem diferença significativa entre si.

Na condição de temperatura W houve maior produção de biomassa pela estirpe UTEX1185 (2.900,12 mg L⁻¹). Na condição X, pelas estirpes IPR7104, IPR7116 e IPR7117 (1.657,58; 963,72; e 1.657,58 mg L⁻¹, respectivamente). Na condição Y, a estirpe que menos produziu biomassa foi a IPR7104 (437,95 mg L⁻¹). Na condição Z, todas as estirpes se desenvolveram similarmente em relação à produção de biomassa, sem diferença significativa entre si.

Tabela 10 – Biomassa seca (mg L⁻¹) após 15 dias de cultivo das estirpes.

Estirpe	Condição de temperatura (claro/escuro, 12h/12h)								Média da estirpe
	W (15 °C / 08 °C)		X (19 °C / 15 °C)		Y (25 °C / 19 °C)		Z (39 °C / 35 °C)		
IPR7104	1.142,92	BC a	1.049,52	A ab	437,95	B b	766,33	A ab	849,18 B
IPR7115	1.034,72	BC a	899,17	B a	836,04	AB a	615,47	A a	846,35 B
IPR7116	1.248,67	BC a	963,72	AB a	1.168,75	A a	844,15	A a	1.056,32 AB
IPR7117	878,35	C b	1.657,58	A a	614,99	AB b	699,75	A b	962,67 AB
IPR7151	1.627,60	B a	805,83	B b	736,45	AB b	851,59	A b	1.005,37 AB
UTEX1185	2.900,12	A a	866,24	B b	622,08	AB b	685,75	A b	1.268,55 A
Média da condição	1.472,06	a	1.040,34	b	736,04	c	743,84	c	

Média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade. Diferença Mínima Significativa (DMS) = 200,68 (Fator 1 - na linha); 359,50 (Fator 2 - na coluna); 614,90 (Fator 1 dentro do Fator 2 - na linha); 718,45 (Fator 2 dentro do Fator 1 - na coluna). Coeficiente de Variação (CV) = 34,60%.

Uma explicação para estes resultados de maior crescimento das estirpes nas condições mixotróficas de menores temperaturas pode ser a baixa intensidade luminosa nas câmaras de crescimento, que variou entre 35 a 37 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em cultivo mixotrófico, no geral, as microalgas requerem menor intensidade luminosa para o crescimento, conforme relatado em um trabalho de revisão (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). Segundo Bouterfas, Belkoura e Dauta (2002), em temperaturas mais elevadas, as microalgas geralmente toleram altas intensidades de luz, mais do que em temperaturas menores. Estes autores determinaram a taxa de crescimento de duas esp\u00e9cies de microalgas clor\u00f3fitas sobre uma vasta gama de intensidade de luz (30 a 456 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (15 a 35 °C), usando fotoper\u00edodo de 15/9 h (claro/escuro). As m\u00e1ximas taxas de crescimento e intensidades luminosas \u00f3timas foram encontradas \u00e0 temperatura de 35 °C, sendo 1,73 d⁻¹ e 420 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Selenastrum minutum*; e, 1,64 d⁻¹ e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Coelastrum microporum*.

Em temperaturas mais altas, como nas condi\u00e7\u00f5es Y e Z, altas intensidades luminosas provavelmente seriam toleradas e, embora talvez n\u00e3o promovessem maior desenvolvimento das estirpes, a inibi\u00e7\u00e3o do crescimento seria devido a fatores como a concentra\u00e7\u00e3o de composto org\u00e2nico, por exemplo, e n\u00e3o devido \u00e0 luminosidade.

De acordo com Yang et al. (2010), que avaliaram o cultivo de microalgas do g\u00eanero *Chlorella* em temperaturas que variaram de 5 a 35 °C, as microalgas podem

crescer normalmente entre 5 e 30 °C. No estudo destes autores, foi observado a taxa média de incremento celular variou de $8,6 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$ a 20 °C para $12,0 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$ a 25 °C, apresentando decréscimo significativo a partir desta temperatura.

Ugwu, Aoyagi e Uchiyama (2007) reportaram que a faixa ótima de temperatura para o cultivo de *Chlorella sorokiniana* é de 20 a 38 °C. A produtividade em biomassa foi reduzida significativamente quando a temperatura excedeu a 40 °C.

Para outros gêneros de clorófitas, alguns autores relatam uma ampla faixa de temperaturas. Segundo Singh e Singh (2015), a clorófitas *Scenedesmus* pode crescer de 10 a 30 °C, sendo 20 °C a temperatura ótima de crescimento (XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011). No estudo de Yoshimura, Okada e Honda (2013), o rendimento máximo da taxa de crescimento específico de *Botryococcus braunii* ocorreu a 30 °C ($0,496 \text{ d}^{-1}$), com tempo de duplicação de células de 1,4 dias. Valores superiores a esta temperatura não proporcionaram crescimento da estirpe, assim como valores muito inferiores (5 °C). Em outra clorófitas, *Haematococcus pluvialis*, foi observado máxima taxa de crescimento a 27 °C com irradiação de $260 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (EVENS; NIEDZ; KIRKPATRICK, 2008). Em estudo realizado por Andrade et al. (2014c) com 109 estirpes de clorófitas cultivadas a 28 °C em meio de cultura BBM e com fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro, foi verificado que 95% delas apresentaram valor médio de biomassa inferior a $28,92 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

5.1.2.2 Teor lipídico

Entre as condições de temperatura (Fator 1), as microalgas, independentemente das estirpes, apresentaram os maiores valores de teor lipídico nas condições X, Y e Z (41,17; 37,56; e 38,80%, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 11).

As estirpes IPR7115, IPR7117 e IPR7151 não apresentaram diferenças significativas ao serem cultivadas nas diversas condições. A estirpe IPR7104 apresentou menor teor lipídico na condição W (26,65%), a IPR7116 apresentou menor teor na condição X (23,63%) e a UTEX1185 apresentou maior teor na condição X (58,63%).

Não houve diferença significativa entre as estirpes (Fator 2) quanto ao teor lipídico, independentemente das condições de temperatura a que foram submetidas.

Todas as estirpes responderam de igual forma quando submetidas às condições W e Z. Na condição X, a estirpe IPR7116 apresentou menor teor lipídico (23,63%) e na condição Y, foi a estirpe UTEX1185 que apresentou menor valor (18,23%).

Tabela 11 – Teor lipídico (% , massa massa⁻¹) após 15 dias de cultivo das estirpes.

Estirpe	Condição de temperatura (claro/escuro, 12h/12h)								Média da estirpe
	W (15 °C / 08 °C)		X (19 °C / 15 °C)		Y (25 °C / 19 °C)		Z (39 °C / 35 °C)		
IPR7104	26,65	A b	48,10	A a	49,10	A a	30,35	A ab	37,30 A
IPR7115	33,00	A a	39,23	AB a	37,68	AB a	43,50	A a	38,35 A
IPR7116	30,55	A ab	23,63	B b	43,28	A a	45,88	A a	35,83 A
IPR7117	34,28	A a	38,35	AB a	40,40	AB a	38,60	A a	37,90 A
IPR7151	39,60	A a	39,08	AB a	36,70	AB a	37,78	A a	38,29 A
UTEX1185	37,65	A b	58,63	A a	18,23	B b	36,68	A b	34,05 A
Média da condição	33,62	b	41,17	a	37,56	ab	38,80	ab	

Média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade. Diferença Mínima Significativa (DMS) = 6,70 (Fator 1 – na linha); 11,34 (Fator 2 – na coluna); 19,51 (Fator 1 dentro do Fator 2 – na linha); 22,67 (Fator 2 dentro do Fator 1 – na coluna). Coeficiente de Variação (CV) = 28,84%.

Comumente os níveis de lipídeos de microalgas estão entre 20 a 50% da biomassa seca (CHISTI, 2007; HU et al., 2008), podendo alcançar 75%, dependendo da espécie (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Autores mais otimistas como Arceo (2012) e Spolaore et al. (2006) chegam a afirmar que, se as microalgas forem cultivadas sob certas condições que considerem as variações das propriedades físico-químicas como, por exemplo, concentração de nutrientes, pH, intensidade luminosa e temperatura, podem atingir níveis lipídicos de 85% a 90%. Becker (2004) aponta que, em *Chlorella vulgaris*, o conteúdo lipídico pode variar de 14 a 22% em relação à biomassa seca.

Patterson (1970) estudou a composição de ácidos graxos em *Chlorella sorokiniana* cultivada em temperaturas que variaram de 14 a 38 °C e observou que, para temperaturas entre 14 e 22 °C, a elevação da temperatura resultou no aumento do grau de insaturação e na diminuição do comprimento da cadeia e, para temperaturas superiores a 22 °C, ocorreu decréscimo na instauração. A predominância de ácidos graxos saturados ocorreu a 38°C (46 % do total), de tri-insaturados a 22 °C (40% do total) e de di-insaturados a 14 °C (47% do total). No estudo de Patterson (1970), a produção de ácidos graxos totais foi maior em

temperaturas extremas (50 a 60% dos lipídeos totais) e menor em 26 °C (13% dos lipídeos totais). Uma vez que a concentração de lipídeos totais foi constante na *Chlorella sorokiniana* em todas as temperaturas, aproximadamente 10% do peso seco, o autor sugere que alguns outros componentes da fração lipídica como, por exemplo, a clorofila, pudessem ter sofrido alterações.

Aleya, Dauta e Reynolds (2011) cultivaram *Chlorella minutissima* variando as temperaturas entre 10 e 35 °C e as intensidades luminosas entre 30 a 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em fotoperíodo claro/escuro. A máxima taxa de crescimento específico aumentou de 0,12 d^{-1} a 10 °C até 0,66 d^{-1} a 30 °C e decresceu em 35 °C.

Han et al. (2013) observou que, para *Chlorella pyrenoidosa*, a temperatura ótima diurna foi de 30 °C para máxima produção de biomassa e lipídeo ($141 \pm 1,22$ e $61,7 \pm 2,19 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente). O autor constatou ainda que o aumento da temperatura diurna e a diminuição da temperatura noturna reduzem a perda de biomassa durante a noite e estimulam a acumulação de lipídeo. Com base nestas verificações, uma estratégia de cultivo em sistema aberto foi otimizada por estes pesquisadores e os levou a concluir que, mantendo a temperatura diurna do cultivo superior a 30°C e a noturna entre 20 e 23 °C, as produtividades de biomassa e de lipídeo aumentam em 37,8% e 44,9%, respectivamente, quando comparadas com temperaturas diurnas inferiores.

Em espécies de *Chlamydomonas* (clorófita), o perfil de ácidos graxos tem demonstrado sofrer impacto quando as microalgas são cultivadas a 20 °C. A relação entre ácidos graxos insaturados e saturados, bem como entre ácidos graxos insaturados e ésteres metílicos de ácidos graxos, é significativamente menor a 20 °C quando comparada a 8 °C (POERSCHMANN; SPIJKERMAN; LANGER, 2004).

5.1.2.3 Teor de clorofila a

Entre as condições de temperatura (Fator 1), as microalgas, independentemente das estirpes, apresentaram maiores valores de clorofila a nas condições X e Y ($3.597,99$ e $3.738,76 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si. Nas condições W e Z, apresentaram os menores valores ($2.328,52$ e $1.639,14 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), também não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 12).

As estirpes IPR7104 e IPR7151 não apresentaram diferenças significativas ao serem cultivadas nas diferentes condições. A IPR7115 e a IPR7116 apresentaram maiores valores de clorofila *a* na condição Y (5.899,54 e 7.622,63 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) e a UTEX1185 na condição X (8.251,48 $\mu\text{g L}^{-1}$). A IPR7117 apresentou menor teor de clorofila *a* na condição Z (386,72 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Entre as estirpes (Fator 2), independentemente das condições de temperatura, a UTEX1185 e a IPR7116 apresentaram os maiores valores de clorofila *a* (4.621,43 e 4.439,91 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), sendo estatisticamente iguais entre si. Os menores valores foram os das estirpes IPR7104 e IPR7151 (1.281,41 e 1.241,31 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), que também não diferiram estatisticamente entre si.

Todas as estirpes responderam de igual forma quando submetidas à condição de temperatura W. Na condição X, a estirpe que mais se destacou foi a UTEX1185 (8.251,48 $\mu\text{g L}^{-1}$). Na condição Y, as estirpes IPR7116 e IPR7115 foram as que apresentaram os maiores teores de clorofila *a* (7.622,63 e 5.899,54 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Na condição Z, as estirpes que mais se destacaram foram a UTEX1185, a IPR7116 e a IPR7104 (3.776,52; 3.046,52; e 1.616,40 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), sem diferenças significativas entre si.

Tabela 12 – Teor de clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.

Estirpe	Condição de temperatura (claro/escuro, 12h/12h)								Média da estirpe	
	W (15 °C / 08 °C)		X (19 °C / 15 °C)		Y (25 °C / 19 °C)		Z (39 °C / 35 °C)			
IPR7104	1.017,24	A a	1.187,98	C a	1.304,02	D a	1.616,40	ABC a	1.281,41	C
IPR7115	2.585,13	A b	2.626,97	BC b	5.899,54	AB a	232,74	C b	2.836,10	B
IPR7116	3.611,87	A b	3.478,60	BC b	7.622,63	A a	3.046,52	AB b	4.439,91	A
IPR7117	3.099,73	A a	4.220,25	B a	2.439,21	CD ab	386,72	C b	2.536,48	BC
IPR7151	1.258,11	A a	1.822,68	BC a	1.108,51	D a	775,95	BC a	1.241,31	C
UTEX1185	2.399,04	A b	8.251,48	A a	4.058,66	BC b	3.776,52	A b	4.621,43	A
Média da condição	2.328,52	b	3.597,99	a	3.738,76	a	1.639,14	b		

Média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade. Diferença Mínima Significativa (DMS) = 1.210,90 (Fator 1 – na linha); 1.315,20 (Fator 2 – na coluna); 2.405,87 (Fator 1 dentro do Fator 2 - na linha); 2.628,44 (Fator 2 dentro do Fator 1 – na coluna). Coeficiente de Variação (CV) = 44,71%.

5.1.2.4 Teor de clorofila *b*

Entre as condições de temperatura (Fator 1), as microalgas, independentemente das estirpes, apresentaram o menor valor para a variável clorofila *b* na condição Z (487,02 $\mu\text{g L}^{-1}$), sendo que nas demais condições não apresentam diferença significativa entre si (Tabela 13).

As estirpes IPR7104 e IPR7151 não apresentaram diferenças significativas ao serem cultivadas nas diferentes condições de temperatura. As estirpes IPR7115 e IPR7117 apresentaram menores teores de clorofila *b* na condição Z (284,44 e 354,02 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). A IPR7116 apresentou maior valor na condição Y (1.796,81 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a UTEX1185, na condição X (1.714,98 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Entre as estirpes (Fator 2), independentemente das condições de temperatura, a IPR7116 e a UTEX1185 apresentaram os maiores valores médios de clorofila *b* (1.030,76 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1.017,22, respectivamente), sendo estatisticamente iguais entre si. Os menores valores foram os das estirpes IPR7104 e IPR7151 (480,25 e 416,50 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si.

Todas as estirpes responderam de igual forma quando submetidas à condição de temperatura W. A estirpe UTEX1185 se destacou das demais nas condições X e Z (1.714,98 e 941,22 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Na condição Y, a estirpe IPR7116 apresentou maior teor de clorofila *b* em relação às demais (1.796,81 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 13 – Teor de clorofila *b* ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.

Estirpe	Condição de temperatura (claro/escuro, 12h/12h)								Média da estirpe
	W (15 °C / 08 °C)		X (19 °C / 15 °C)		Y (25 °C / 19 °C)		Z (39 °C / 35 °C)		
IPR7104	531,86	A a	547,74	B a	413,51	C a	427,88	AB a	480,25 C
IPR7115	856,50	A a	795,57	B ab	1.279,39	AB a	284,44	B b	803,98 BA
IPR7116	874,30	A b	811,79	B b	1.796,81	A a	640,15	AB b	1.030,76 A
IPR7117	985,37	A a	854,04	B ab	504,19	C ab	354,02	AB b	674,40 BC
IPR7151	472,84	A a	595,78	B a	322,96	C a	274,43	B a	416,50 C
UTEX1185	721,74	A b	1.714,98	A a	690,93	BC b	941,22	A b	1.017,22 A
Média da condição	740,43	a	886,65	a	834,63	a	487,02	b	

Média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade. Diferença Mínima Significativa (DMS) = 203,48 (Fator 1 – na linha); 308,95 (Fator 2 – na coluna); 536,84 (Fator 1 dentro do Fator 2 – na linha); 617,43 (Fator 2 dentro do Fator 1 – na coluna). Coeficiente de Variação (CV) = 40,27%.

5.1.2.5 Teor de clorofila c

Entre as condições de temperatura (Fator 1), as microalgas, independentemente das estirpes, apresentaram o menor valor de clorofila c na condição Z (257,87 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 14). As estirpes IPR7104 e IPR7151 não apresentaram diferenças significativas nas condições de temperaturas em que foram cultivadas.

A estirpe IPR7115 apresentou menor teor de clorofila c na condição Z (180,82 $\mu\text{g L}^{-1}$); a IPR7116, nas condições X e Z (310,22 e 197,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente); e as estirpes IPR7117 e UTEX1185, na condição Y (146,75 e 268,96 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente).

Entre as estirpes (Fator 2), independentemente das condições de temperaturas, não houve diferença significativa quanto ao teor de clorofila c. Apenas na condição Y houve um teor significativamente maior nas estirpes IPR7116 e IPR7115 (722,99 e 456,89 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 14 – Teor de clorofila c ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 15 dias de cultivo das estirpes.

Estirpe	Condição de temperatura (claro/escuro, 12h/12h)								Média da estirpe	
	W (15 °C / 08 °C)		X (19 °C / 15 °C)		Y (25 °C / 19 °C)		Z (39 °C / 35 °C)			
IPR7104	476,22	A a	454,68	A a	299,33	B a	202,13	A a	358,09	A
IPR7115	655,03	A a	382,95	A ab	456,89	AB ab	180,82	A b	418,92	A
IPR7116	477,45	A ab	310,22	A b	722,99	A a	197,00	A b	426,91	A
IPR7117	483,33	A a	518,78	A a	146,75	B b	420,10	A ab	392,24	A
IPR7151	369,12	A a	354,60	A a	274,70	B a	201,69	A a	300,03	A
UTEX1185	483,05	A ab	616,63	A a	268,96	B b	345,50	A ab	428,53	A
Média da condição	490,70	a	439,64	a	361,60	ab	257,87	b		

Média de 4 repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade. Diferença Mínima Significativa (DMS) = 129,81 (Fator 1 – na linha); 192,37 (Fator 2 – na coluna); 335,21 (Fator 1 dentro do Fator 2 – na linha); 384,45 (Fator 2 dentro do Fator 1 – na coluna). Coeficiente de Variação (CV) = 47,70%.

No presente estudo as maiores produtividades de teores de clorofilas a e b foram 550,10 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ e 119,79 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente, valores similares aos encontrados por Bertoldi, Sant'Anna e Oliveira (2008) em *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BBM, 424,90 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ e 181,43 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ para clorofilas a e b,

respectivamente. De acordo com Yang et al. (2010), o máximo incremento no teor de clorofila total para microalgas do gênero *Chlorella* foi de 0,080 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 25 °C.

Evens, Niedz e Kirkpatrick (2008) observaram que, para a clorófito *Haematococcus pluvialis*, a máxima concentração de clorofila *a* foi atingida quando a estirpe foi cultivada a 27 °C e irradiação de 35 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maiores teores de clorofila *b* foram observados a 28 °C e 33 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Em estudo realizado por Andrade et al. (2014d) com 73 estirpes de clorófitas cultivadas a 28 °C com fotoperíodo claro/escuro de 12/12h, 78% delas apresentaram valor médio de produtividade de clorofila *a* inferior a 100 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, sendo que 29% das estirpes apresentaram teores menores que 12,32 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

Estudos de Ugwu, Aoyagi e Uchiyama (2007) reportam que a fluorescência de clorofila foi reduzida drasticamente quando a temperatura excedeu a 40 °C. Em termos de clorofilas totais, no geral, as cianobactérias apresentam maiores valores do que as clorófitas. Por exemplo, Danesi et al. (2011) encontraram concentrações entre 397,86 e 1.046,43 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ em *Spirulina platensis* cultivada por 14 dias em meio descrito por Paoletti et al. (1975) com KNO_3 como fonte de nitrogênio e entre 431,79 e 1.240,00 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ com ureia em substituição ao KNO_3 .

5.2 POTENCIAL PRODUTIVO DE MICROALGAS NO PARANÁ

No estado do Paraná foram identificadas cinco combinações de classes de temperaturas que podem ocorrer independentemente da estação climática do ano (Tabela 15).

Tabela 15 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no Paraná.

Combinação	Temperatura diurna (°C)	Temperatura noturna (°C)
1	< 17,0 (classe 1)	< 11,5 (classe 1)
2	< 17,0 (classe 1)	11,5 a 17,0 (classe 2)
3	17,0 a 22,0 (classe 2)	11,5 a 17,0 (classe 2)
4	17,0 a 22,0 (classe 2)	17,0 a 27,0 (classe 3)
5	22,0 a 32,0 (classe 3)	17,0 a 27,0 (classe 3)

Durante o inverno no Paraná ocorrem todas as combinações identificadas (Figura 9). Nesta estação climática, no extremo sul do estado ocorrem temperaturas diurnas inferiores a 17 °C e noturnas inferiores a 11,5 °C (combinação 1); no centro-

sul, temperaturas diurnas inferiores a 17 °C e noturnas entre 11,5 e 17 °C (combinação 2); no centro, temperaturas diurnas entre 17 e 22 °C e noturnas entre 11,5 e 17 °C (combinação 3); no noroeste, temperaturas diurnas entre 17 e 22 °C e noturnas entre 17 e 27 °C (combinação 4); e no extremo noroeste, temperaturas diurnas entre 22 e 32 °C e noturnas entre 17 e 27 °C (combinação 5).

Na primavera, ocorrem a combinação 3, no sul do estado; a combinação 4, em uma pequena parte do centro-sul; e a combinação 5, no central e no norte (Figura 10).

No verão, ocorre a combinação 4 em duas pequenas regiões do sul do estado, sendo que, nesta estação climática, a combinação 5 é predominante em praticamente todo o estado (Figura 11).

No outono, ocorrem a combinação 2, em uma pequena área ao extremo-sul do estado; a combinação 3, no centro-sul; a combinação 4, no centro; e a combinação 5, no noroeste (Figura 12).

Figura 9 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no inverno.

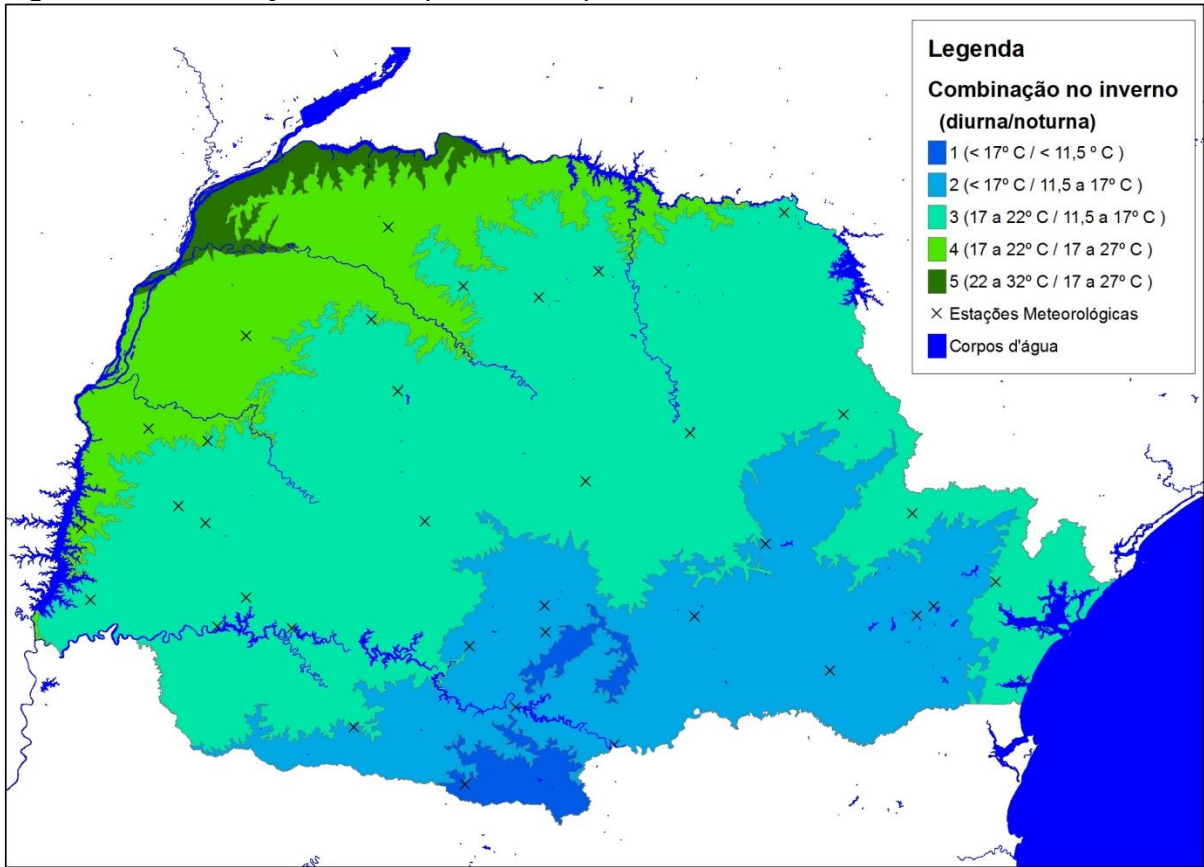


Figura 10 – Combinações de temperatura de possível ocorrência na primavera.

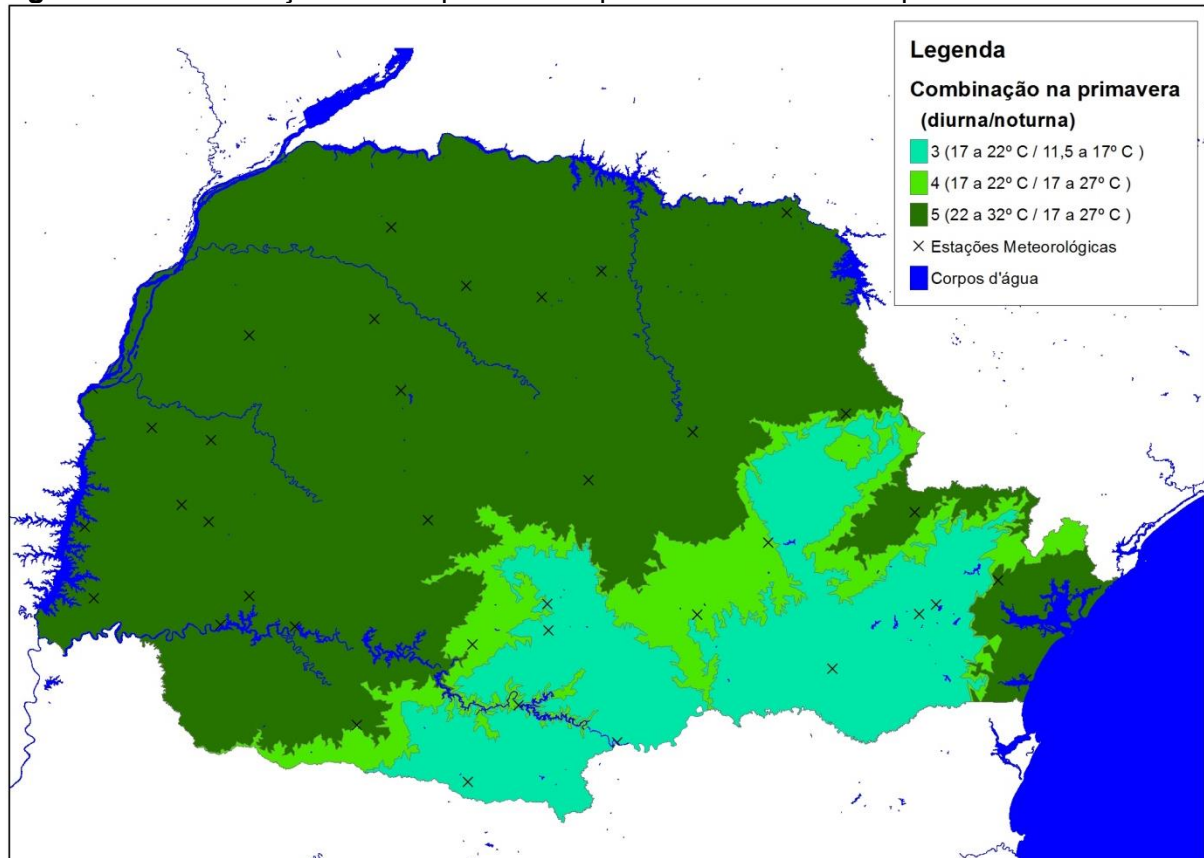


Figura 11 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no verão.

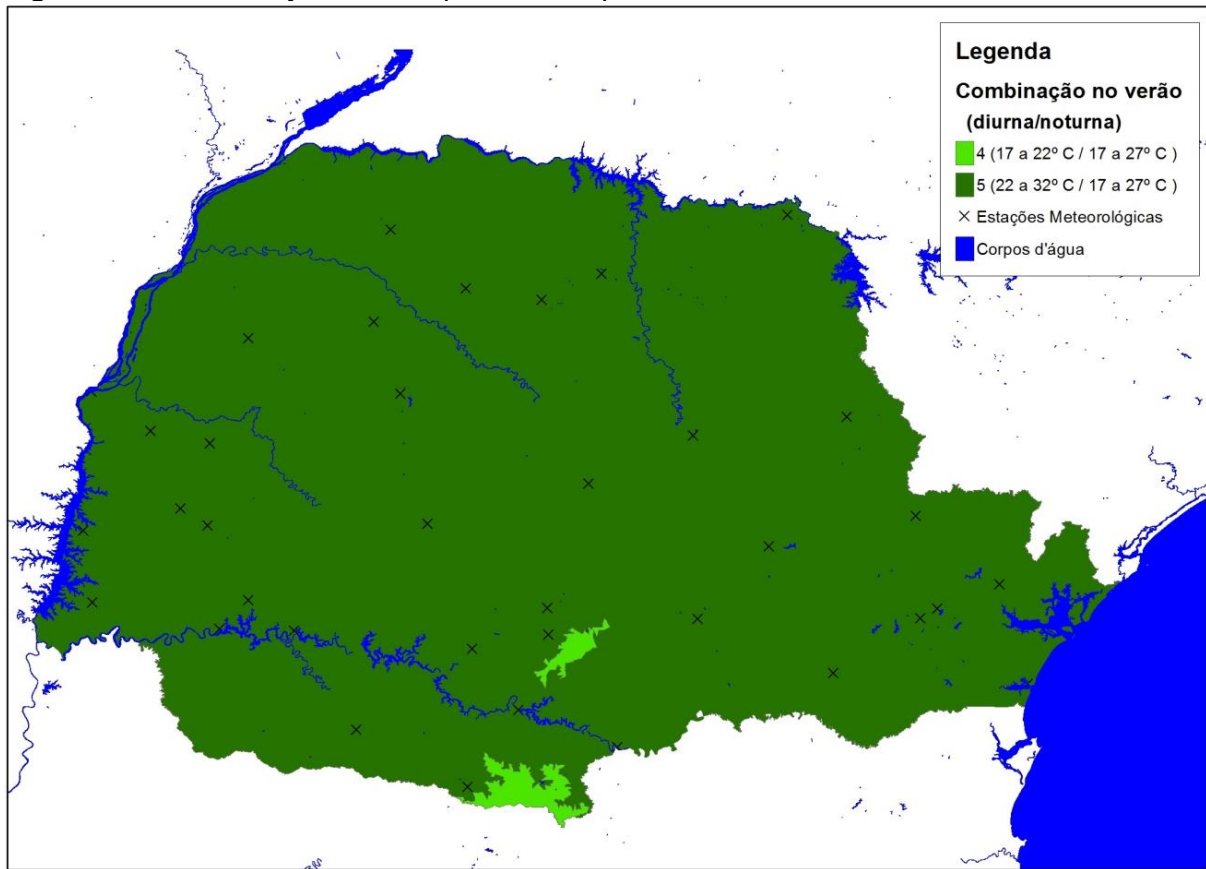
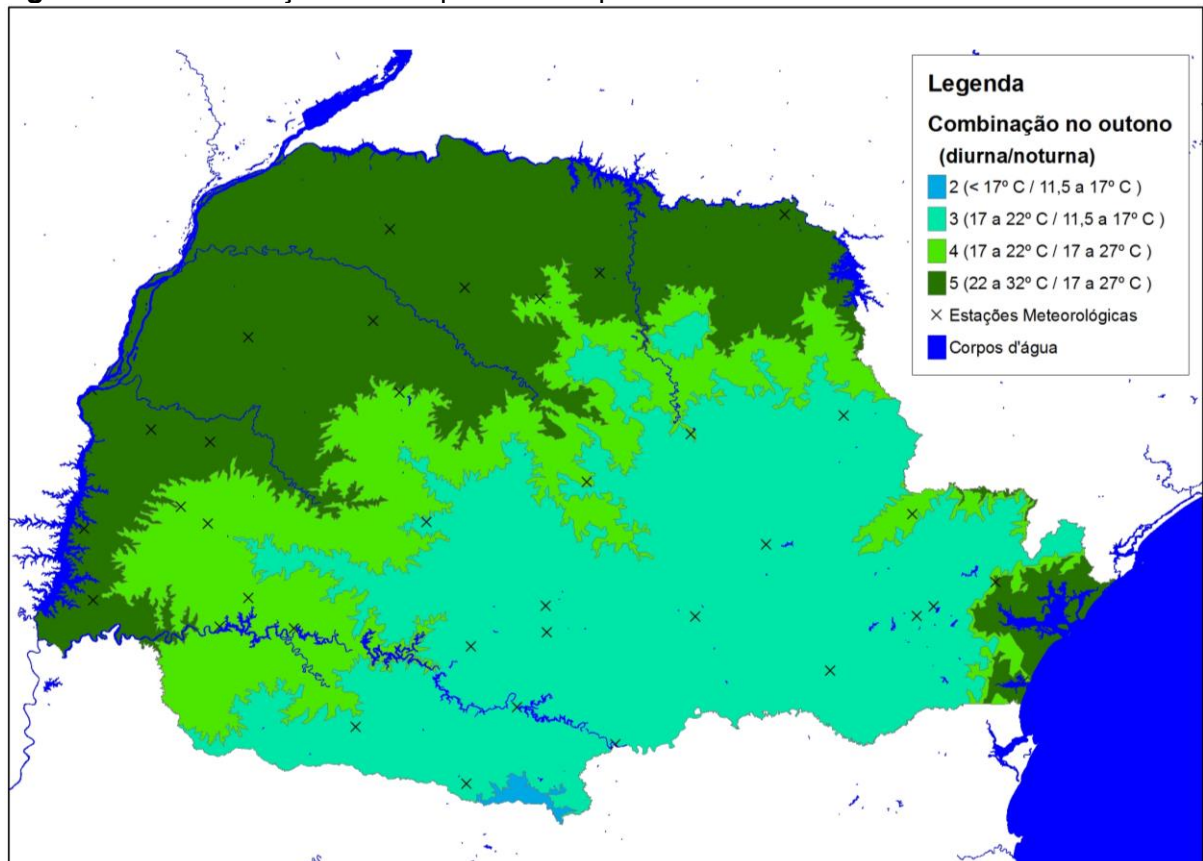


Figura 12 – Combinações de temperatura de possível ocorrência no outono.



Associando os resultados do cultivo das estirpes de microalgas nas diferentes condições de temperatura (item 5.1.1) com a ocorrência das temperaturas diurnas e noturnas no Paraná, pôde-se constatar que:

- A estirpe UTEX1185 apresenta potencial para cultivo em sistema aberto na região de ocorrência da combinação 1 (extremo sul, no inverno), tendo em vista que apresentou elevada produção de biomassa seca (2.900,12 mg L⁻¹) na condição de temperatura W (15/08 °C);
- A estirpe UTEX1185 apresenta baixo potencial para fins de produção de lipídeo nas regiões de ocorrência da combinação 5 (extremo noroeste, no inverno; centro e norte, na primavera; todo o estado, no verão; e noroeste, no outono), devido esta estirpe ter apresentado baixo teor lipídico (18,23%) quando cultivada na condição de temperatura Y (25/19 °C). Entretanto, apresenta potencial de cultivo para este fim, bem como para produção de clorofilas, nas regiões onde ocorre a combinação 3 (centro, no inverno; sul, na primavera; e centro-sul, no outono) pois, quando cultivada na condição X (19/15 °C), apresentou elevado teor de lipídeos (58,63%) e de clorofilas (*a*, *b* e *c*: 8.251,48; 1.714,98; e 6.16,62 µg L⁻¹, respectivamente); e
- A estirpe IPR7116 apresenta potencial para a produção de clorofilas nas regiões de ocorrência da combinação 5, pois apresentou elevado teor de clorofilas *a*, *b* e *c* (7.622,63; 1.796,81, e 722,99 µg L⁻¹, respectivamente) quando cultivada na condição de temperatura Y (25/19 °C).

Pelo ensaio que avaliou a influência da temperatura do ar sobre a temperatura do cultivo, notou-se que as temperaturas do cultivo não variaram de acordo com a profundidade do tanque, devido à agitação do cultivo nos tanques. Entretanto, dentro do período avaliado, a temperatura do cultivo apresentou uma amplitude diária média de 2,4 °C e a temperatura do ar, de 13,2 °C.

A temperatura do ar varia mais rapidamente que a da temperatura do cultivo (água). Este comportamento é determinado pela diferença entre o calor específico do ar e da água, que são 0,24 cal g⁻¹ °C⁻¹.e 1,00 cal g⁻¹ °C⁻¹, respectivamente.

Em geral, as temperaturas do ar e do cultivo se igualavam duas vezes dentro de um período de 24 horas, sendo que a primeira vez ocorria entre as primeiras 12 horas do dia e a segunda, nas últimas 12 horas.

Observou-se, portanto, que a temperatura do ar pode ser utilizada na indicação de cultivos de microalgas em sistemas abertos, devido à média das amplitudes diárias da temperatura do cultivo ser inferior à do ar.

6 CONCLUSÕES

Para produção de biomassa, a estirpe UTEX1185 apresenta potencial de cultivo em sistema aberto no extremo sul do Paraná, durante o inverno, onde as temperaturas médias diurnas ficam abaixo de 17 °C e as noturnas, abaixo de 11,5 °C. Porém, esta estirpe apresenta baixo potencial para produção de lipídeos nas regiões: extremo noroeste, no inverno; centro e norte, na primavera; todo o estado, no verão; e noroeste, no outono, onde as temperaturas médias diurnas variam entre 22 e 32° C e as noturnas, entre 17 e 27 °C. Entretanto, quer seja para produção de lipídeos ou para produção de clorofilas, o cultivo da UTEX1185 apresenta potencial nas regiões: centro, no inverno; sul, na primavera; e centro-sul, no outono, onde as temperaturas médias diurnas oscilam entre 17 e 22 °C e as noturnas, entre 11,5 e 17 °C.

O cultivo da estirpe IPR7116 demonstra potencial para a produção de clorofilas nas regiões: extremo noroeste, no inverno; centro e norte, na primavera; todo o estado, no verão; e noroeste, no outono, onde as temperaturas médias diurnas variam entre 22 e 32 °C e as noturnas, entre 17 e 27 °C.

A temperatura influencia na produção de biomassa, lipídeos e clorofilas *a*, *b* e *c* por algumas estirpes de microalgas clorófitas, sendo possível indicá-las para cultivos em sistema aberto no Paraná, com base na ocorrência e distribuição da temperatura no estado.

REFERÊNCIAS

ALEYA, L.; DAUTA, A.; REYNOLDS, C. S. Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. **European Journal of Protistology**, v. 47, n. 4, p. 239–244, 2011.

AL-QASMI, M.; RAUT, N.; TALEBI, S.; AL-RAJHI, S.; AL-BARWANI, T. A Review of Effect of Light on Microalgae Growth. **Proceedings of the World Congress on Engineering**, v. I, p. 8–10, 2012.

ANDRADE, D. S.; SILVA, M. R. L.; SCHERER, A.; CARDOSO, J. D. Características dos principais grupos de microalgas de águas continentais. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, 2014a. v. 1. p. 22–71.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A.; GUEDES, C. L. B.; LIMA, F. A. F.; MANCHINESKI, G. S.; MATOS, M. A.; SILVA, H. R. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, 2014b. v. 1. p. 266–343.

ANDRADE, D. S.; MATOS, M. A.; GATTI, I. C. A.; LIMA, F. A. F.; MIYAZAWA, M. Produção de lipídeos pelas microalgas da coleção IPR. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Produção de biomassa e coprodutos**. Londrina: IAPAR, 2014c. v. 2. p. 366–386.

ANDRADE, D. S.; MATOS, M. A.; GÓES, K. C. G. P.; GATTI, I. C. A.; SILVA, M. R. L.; SCHERER, A. Produção de proteínas e pigmentos pelas microalgas da coleção IPR. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Produção de biomassa e coprodutos**. Londrina: IAPAR, 2014d. v. 2. p. 387–410.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais. Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, 2014. v. 1.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551–1556, 2008.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 125–136, 5 fev. 2014.

ANTUNES, R.; SILVA, I. C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis**: Cluster do Conhecimento Energias Renováveis. [s.l.: s.n.].

ARCEO, Á. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. 2012. 204 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2012.

BARBOSA, M. J. G. V. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation**. 2003. [s.l.] Wageningen University, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. Boca Ration: Taylor & Francis, 2006.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 312–351.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 54–58, 2008.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BJERK, T. R. **Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis**. 2012. Santa Cruz do Sul: Universidade Santa Cruz do Sul, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. (Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer). **Can. J. Biochem. Physiol.**, n. 37, p. 911–917, 1959.

BOLD, H. C. The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 76, n. 2, p. 101–108, mar. 1949.

BORGES, C. B. **Modelagem da produção de lipídios em microalgas**. 2010. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1-3, p. 207–217, dez. 2002.

BRASIL. **Balço Energético Nacional 2015. Ano Base 2014. Relatório Síntese**. Rio de Janeiro, 2015.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, fev. 2010.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina, IAPAR, 2000.

CAVIGLIONE, J. H.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Potencial climático para o cultivo de microalgas em sistemas aberto no estado do Paraná. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Produção de biomassa e coprodutos**. Londrina: IAPAR, 2014. p. 161–184.

CHEN, C.-Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, jan. 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHO, S. H.; JL, S.-C.; HUR, S. B.; BAE, J.; PARK, I.-S.; SONG, Y.-C. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. **Fisheries Science**, v. 73, n. 5, p. 1050–1056, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (Eds.). **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1996. v. 361. p. 7–48.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 362–373, 2011.

DEFANTI, L. S.; SIQUEIRA, N. S.; LINHARES, P. C. Produção de biocombustíveis a partir de algas fotossintetizantes. **Bolsista de Valor - Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 1, p. 11–21, 2010.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, dez. 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, dez. 2006.

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 215–225, 1989.

EVENS, T. J.; NIEDZ, R. P.; KIRKPATRICK, G. J. Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 411–422, 2008.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H. Jr.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R.; RUSSEL, D. W.; SEYAMA, Y.; SHAW W.; SHIMIZU, T.; SPRENER, F.; van MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H. WITZTUM, J. L.; DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of lipid research**, v. 46, p. 839–861, 2005.

FARR, T. G.; ROSEN, P. A.; CARO, E.; CRIPPEN, R.; DUREN, R.; HENSLEY, S.; KOBRICK, M.; PALLER, M.; RODRIGUEZ, E.; ROTH, L.; SEAL, D.; SHAFFER, S.; SHIMADA, J.; UMLAND, J.; WERNER, M.; OSKIN, M.; BURBANK, D. ALSDORF, D. The Shuttle Radar Topography Mission. **Reviews of Geophysics**, v. 45, n. 2, 19 mai. 2007, 33 p.

FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; PEREZ-CAMACHO, A.; FERREIRO, M. J.; BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M. J.; LABARTA, U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, n. 1-2, p. 17–37, 1989.

FERRERO, I. **Produção de biodiesel a partir de microalgas como alternativa aos cultivos clássicos**. 2011. 20 f. Monografia (Engenharias Renováveis e Eficiência Energética) - Faculdade de Bioquímica e Ciências Biológicas, Universidad

Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina. 2011.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 7–20, 2007.

HAN, F.; WANG, W.; LI, Y.; SHEN, G.; WAN, M.; WANG, J. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 182–189, mar. 2013.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant journal**, v. 54, n. 4, p. 621–39, maio 2008.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanzen**, v. 167, n. 167, p. 191–194, 1975.

KHAN, S. A.; RASHMI; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S. BANERJEE, U. C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361–2372, 2009.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 696–701, abr. 2006.

LATALA, A. Effects of salinity , temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. **Oceanologia**, v. 31, n. 1991, p. 119–138, nov. 1991.

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

LEMOS, J. S. Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de efluente de cultivo de microalgas para produção de biodiesel. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MA, X.; ZHENG, H.; HUANG, H.; LIU, Y.; RUAN, R. Effects of Temperature and Substrate Concentration on Lipid Production by *Chlorella vulgaris* from Enzymatic

Hydrolysates of Lipid-Extracted Microalgal Biomass Residues (LMBRs). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 5, p. 1631–1650, 2014.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2. ed. Curitiba: Embrapa Florestas, 1981.

MARQUEZ, U. M. L.; BORRMANN, D. Chlorophylls. In: BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. (Eds.). **Handbook of Natural Colorants**. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd., 2009. p. 243–254.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource technology**, v. 99, n. 2008, p. 8137–8142, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA**, v. 36, n. 36, p. 39–73, 2007.

OLIVEIRA, O. S. B. C. **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. 2009. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa., 2009.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, F. L. **Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis***. In: Congr. Naz. Soc. It. Microbial, XVII. **Anais...** Padova: Anais de XVII Congr. Naz. Soc. It. Microbial, 1975.

PARKER, P. L.; VAN BAALEN, C.; MAURER, L. Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. **Science**, v. 155, n. 3763, p. 707–708, fev. 1967.

PATTERSON, G. W. Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. **Lipids**, v. 5, n. 7, p. 597–600, 1970.

POERSCHMANN, J.; SPIJKERMAN, E.; LANGER, U. Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 1, p. 78–89, 2004.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RAS, M.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 153–164, 2013.

REVIERS, B. Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo. In: FRANCESCHINI, I. M. (Ed.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 19–57.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 189–198, 2012.

SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 3, p. 263–272, 2003.

SANDNES, J. M.; KÄLLQVIST, T.; WENNER, D.; GISLERØD, H. R. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: Linking cellular responses to large-scale biomass production. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 515–525, 2005.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas - Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17–21, dez. 2003.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W.. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 1, p. 67–73, jul. 2002.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431–

444, 2015.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Biodiesel: o novo combustível do Brasil**, p. 91–96, 2006.

TINOCO, N. A. B.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; REZENDE, C. M. The Genus *Dunaliella*: Biotechnology and Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1421–1440, 2015.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. 1. ed. Oxford: Ed. Blackwell Science Ltd., 2004. p. 2–19.

TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Liquid Fuel Production Using Microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 48, n. 5, p. 251–259, 2005.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 309–311, 2007.

UTEX. **Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. UTEX 1185 - *Neochloris oleabundans***. Disponível em: <<https://utex.org/products/utex-1185>>. Acesso em: 3 mar. 2016.

VERMA, N. M.; MEHROTRA, S.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories : A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p. 1402–1411, 2010.

VIEIRA COSTA, J. A.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

VOLKMAN, J. K.; SMITH, D. J.; EGLINTON, G.; FORSBERG, T. E. V.; CORNER, E. D. S. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. **Journal**

of **Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 61, n. 2, p. 509–527, 1981.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3098–3102, 2011.

YANG, G.-J.; LUAN, Z.-Q.; ZHOU, X.-H.; MEI, Y. The Researching of the Effect of Temperature on Chlorella Growth and Content of Dissolved Oxygen and Content of Chlorophyll. **Mathematical and Physical Fisheries Science**, v. 8, p. 68–74, 2010.

YOSHIMURA, T.; OKADA, S.; HONDA, M. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 232–239, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabelas de análises de variância das variáveis

Tabela A1 – Análise de variância (ANOVA) da variável biomassa seca.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Condição de temperatura (1)	3	8.633.926,39	2.877.975,47	52,49	< 0,0001
(1)*repetição	12	657.926,52	54.827,21	0,46	0,9303
Estirpe (2)	5	1.968.730,53	393.746,11	3,30	0,0107
(1)*(2)	15	12.492.962,84	832.864,19	6,98	< 0,0001
Erro	60	71.584.985,76	119.307,32		

G.L.: Graus de Liberdade; S.Q.: Soma dos Quadrados; Q.M.: Quadrado Médio.

Tabela A2 – Análise de variância (ANOVA) da variável lipídeo.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Condição de temperatura (1)	3	716,33	238,78	3,91	0,0369
(1)*repetição	12	733,00	61,08	0,51	0,8973
Estirpe (2)	5	79,82	15,96	0,13	0,9838
(1)*(2)	15	5.860,66	390,71	3,29	0,0005
Erro	60	7.124,70	118,74		

G.L.: Graus de Liberdade; S.Q.: Soma dos Quadrados; Q.M.: Quadrado Médio.

Tabela A3 – Análise de variância (ANOVA) da variável clorofila *a*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Condição de temperatura (1)	3	74.045.427,8	24.681.809,3	12,36	0,0006
(1)*repetição	12	23.953.686,1	1.996.140,5	1,25	0,2721
Estirpe (2)	5	172.946.503,8	34.589.300,8	21,66	0,0001
(1)*(2)	15	156.529.305,6	10.435.287,0	6,53	< 0,0001
Erro	60	95.812.096,2	1.596.868,3		

G.L.: Graus de Liberdade; S.Q.: Soma dos Quadrados; Q.M.: Quadrado Médio.

Tabela A4 – Análise de variância (ANOVA) da variável clorofila *b*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Condição de temperatura (1)	3	2.266.249,85	755.416,62	13,40	0,0004
(1)*repetição	12	676.395,01	56.366,25	0,64	0,7999
Estirpe (2)	5	5.469.742,85	1.093.948,57	12,42	< 0,0001
(1)*(2)	15	7.078.856,33	471.923,76	5,36	< 0,0001
Erro	60	5.286.874,03	88.114,57		

G.L.: Graus de Liberdade; S.Q.: Soma dos Quadrados; Q.M.: Quadrado Médio.

Tabela A5 – Análise de variância (ANOVA) da variável clorofila *c*.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Condição de temperatura (1)	3	740.237,15	246.745,72	10,76	0,0010
(1)*repetição	12	275.267,76	22.938,98	0,67	0,7715
Estirpe (2)	5	204.219,52	40.843,90	1,20	0,3223
(1)*(2)	15	1.247.998,41	83.199,89	2,44	0,0077
Erro	60	2.049.746,01	34.162,43		

G.L.: Graus de Liberdade; S.Q.: Soma dos Quadrados; Q.M.: Quadrado Médio.

ANEXO

ANEXO A - Resumo expandido enviado para o 10º Congresso Internacional de Bioenergia

EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE MICROALGAS POTENCIALMENTE ENERGÉTICAS

Lucas Alves Maroubo¹, Udimara Erica Mattei Preilipper², João Henrique Caviglione³; Diva Souza Andrade⁴

¹ Mestrando em Bioenergia (lucas.maroubo@uel.br), ² Mestranda em Bioenergia (udimara_89@hotmail.com), ³ Doutor em Agronomia (caviglione@iapar.br), ⁴ Doutora em Ciências Biológicas (diva@iapar.br)

^{1,2} Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR 445) Km 380, Londrina - PR, <http://www.uel.br/pos/bioenergia>, bioenergia.parana@uel.br, (43) 3371- 4711

^{3,4} Instituto Agronômico do Paraná, Rod. Celso Garcia Cid (PR 445) Km 375, Londrina-PR <http://www.iapar.br>, iapar@iapar.br, (43) 3376-2000

RESUMO

O termo microalgas engloba grande diversidade de microrganismos que podem apresentar nutrição fotoautotrófica, heterotrófica ou mixotrófica e produzem metabólitos de interesse energético, representando uma fonte renovável de matéria-prima para produção de biocombustíveis. Embora as microalgas ocorram desde regiões frias a tropicais, trabalhos sobre os efeitos da temperatura do ar no desenvolvimento das diferentes espécies de microalgas ainda são escassos. Neste sentido, nesse trabalho o objetivo foi avaliar o efeito das temperaturas (20,0° C, 25,0° C, 35,0° C e 40,0° C) no crescimento de estirpes de microalgas oleaginosas. O delineamento experimental foi fatorial 4x6 com três repetições, tendo como variáveis-resposta do crescimento a densidade óptica (DO) e a contagem de células das estirpes IPR7104, IPR7115, IPR7116, IPR7117, IPR7151 e da *Neochloris oleoabundans* (UTEX1185). O estudo revelou que não houve correlação entre as variáveis DO e número de células. Pela análise da densidade óptica foi observado que houve melhor desenvolvimento das estirpes de microalgas na temperatura de 35,0° C. Entretanto, pela análise da contagem de células, houve menor densidade celular nesta mesma temperatura. De acordo com ambas análises, a estirpe que melhor se desenvolveu foi a IPR7104, mostrando potencial para cultivo em tanques abertos sem controle de temperatura.

Palavras Chave: densidade óptica, contagem de células, microrganismos fotossintetizantes.

ABSTRACT

EFFECT OF TEMPERATURE ON GROWTH OF POTENTIALLY ENERGY MICROALGAE

The microalgae term encompasses great diversity of microorganisms that perform oxygenic photosynthesis, may have photoautotrophic, heterotrophic or mixotrophic nutrition and produce energy metabolites interest, representing a renewable source of raw material for biofuel production. Although microalgae occur from cold to tropical regions, work on the effects of air temperature in the development of different species of microalgae are still scarce. In this sense, this work aimed to evaluate the effect of temperature (20.0° C, 25.0° C, 35.0° C and 40.0° C) on the growth of strains of microalgae oil. The experimental design was 4x6 factorial with three repetitions, with the growth response variable being the optical density (OD) and the cell count of IPR7104, IPR7115, IPR7116, IPR7117, IPR7151 and Neochloris oleoabundans (UTEX # 1185) strains. This study found no correlation between DO and number of cells variables. By analyzing the optical density, a better development of microalgae was at 35.0° C. However, the analysis of cell count, cell density was lower in this same temperature. According to both analyzes, IPR7104 was the strain has been best developed, showing potential for cultivation in open tanks without temperature control.

Keywords: optical density, cell count, photosynthetic microorganisms.

INTRODUÇÃO

Pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de tecnologias para a produção de combustíveis renováveis cuja obtenção e combustão não contribuam para o aumento das emissões de poluentes atmosféricos. Um exemplo que se enquadra neste contexto é o aproveitamento da biomassa proveniente das microalgas, organismos unicelulares ou coloniais clorofilados que, através do processo de fotossíntese, produzem grandes quantidades de metabólitos de interesse ecológico e industrial (FERRERO, 2011), como lipídeos, polissacarídeos, proteínas e hidrocarbonetos (ARCEO, 2012). Estes organismos estão presentes em todos os ecossistemas existentes na Terra, representando uma grande variedade de espécies vivendo em uma larga escala de condições ambientais. As microalgas podem fornecer matérias-primas para diferentes tipos de combustíveis renováveis como, por exemplo, metano, hidrogênio, etanol e, principalmente, biodiesel (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A produção de biodiesel a partir de microalgas possui vantagens sobre os cultivos agrícolas, das quais se destacam: potencial de produção de óleo superior por área equivalente de cultivo, desenvolvimento sem fortes restrições climáticas ou estacionais, tempo médio de cultivo reduzido, maior atividade fotossintética e capacidade de fixação de CO₂, além do cultivo em água salgada ou doce ou ainda em efluentes industriais ou urbanos (DEFANTI; SIQUEIRA; LINHARES, 2010; DEFANTI; SIQUEIRA; LINHARES, 2010; LEMOS, 2012; OHSE et al., 2007; SCRAGG et al., 2002). Apesar de a utilização de metabólitos extraídos de microalgas ser considerada como uma estratégia plausível para auxiliar a substituição das fontes de energia não renováveis e driblar uma futura escassez de combustíveis fósseis, existem certos aspectos biológicos, técnicos e econômicos que ainda não estão resolvidos. Portanto, é necessário compreender tais aspectos, com finalidade de alcançar um processo de produção de biocombustíveis de forma eficiente e sustentável (FERRERO, 2011).

O crescimento das microalgas está intimamente relacionado com a temperatura, que é um fator físico que influi principalmente sobre os processos enzimáticos. A maioria das espécies de microalgas sobrevive em uma ampla faixa térmica porém, só há incremento na síntese orgânica em determinada faixa, considerada a faixa ótima de crescimento, a qual varia de acordo com a espécie (OHSE et al., 2007). Embora muitas pesquisas têm levantado abordagens específicas (biotecnológicas, econômicas e ambientais, por exemplo) sobre a utilização de microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis, ainda pouco se conhece sobre os efeitos da temperatura no desenvolvimento das espécies de microalgas. Neste sentido, nesse trabalho o objetivo foi avaliar o efeito das temperaturas (20,0° C, 25,0° C, 35,0° C e 40,0° C) no crescimento de estirpes de microalgas oleaginosas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microalgas

As estirpes de microalgas selecionadas para o estudo pertencem ao grupo das clorófitas e eram mantidas em meio de cultura líquido Bold's Basal Medium (BBM) (BOLD, 1949a), em câmara de crescimento a 20,0 ± 2,0° C, com fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro e fluxo de fótons entre 35 a 37 μmol fótons s⁻¹ m⁻² (Tabela 1).

Tabela 1. Características das estirpes selecionadas.

Table 1. Characteristics of selected strains.

Identificação	Local de coleta	Características das células				Produtividade (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	
		Estrutura do talo	Forma	Tamanho (μm)		Lipídeos	Biomassa
				Largura	Comprimento		
IPR7104 ¹	SMS	Cenobial	Elipsoide	5,30	14,43	685,38	21,13
IPR7115 ¹	FEP	Unicelular	Esférica	8,85	8,85	602,38	16,46
IPR7116 ¹	FEP	Unicelular	Esférica	ND	ND	628,54	5,00
IPR7117 ¹	FEP	Unicelular	Esférica	ND	ND	409,16	18,09
IPR7151 ¹	PTB	Unicelular	Esférica	9,00	13,50	302,04	38,14
UTEX1185 (<i>Neochloris oleoabundans</i>) ²	TEX	Unicelular	Esférica	5,0	5,0	38–133 ³	310-630 ³

Fonte: 1 Andrade e Colozzi Filho (2014a); 2 UTEX (2015); 3 Li et al. (LI et al., 2008)

FEP: Fernandes Pinheiro; PTB: Pato Branco; TEX: Texas (EUA); SMS: São Mateus do Sul.

NI: Não Identificado; ND: Não Determinado.

Delineamento experimental

O delineamento do experimento foi fatorial 4x6 com três repetições, em que os fatores foram as quatro temperaturas (20,0° C, 25,0° C, 35,0° C e 40,0° C) e as seis estirpes de microalgas (Tabela 1).

Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos foi conduzido em duas fases, em uma única câmara de crescimento. Na primeira fase, utilizou-se tubos de vidro (30 mL) para o cultivo das estirpes e o período de incubação foi de 11 dias. Na segunda fase, utilizou-se frascos Schott (250 mL) e as estirpes foram incubadas durante 14 dias. As demais condições de cultivo foram iguais para ambas as fases (Tabela 2).

Fase 1

Uma alíquota de 500 µL de cada estirpe foi transferida para um eppendorf e procedeu-se a lavagem das células da seguinte maneira: centrifugou-se a amostra por 10 min, a 5.000 rpm (Eppendorf, mod. 5415D); descartou-se o sobrenadante; adicionou-se um mesmo volume de meio de cultivo BBM; agitou-se em agitador tipo vórtex (Fanem, mod. 251) por aproximadamente 15 s; repetiu-se a lavagem; descartou-se o sobrenadante e, ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de meio BBM. Preparou-se 30 mL de inóculo de cada estirpe, por meio da transferência das suspensões lavadas para o meio BBM contido em tubos de vidro, na proporção de 1% (v/v). Os tubos foram levados à câmara de crescimento para incubação dos inóculos por 11 dias.

Fase 2

Foram preparados 300 mL de inóculo de cada estirpe, por meio da transferência dos inóculos obtidos da Fase 1 para o meio BBM contido em frascos Schott, na proporção de 10% (v/v). Os frascos foram levados à câmara de crescimento para incubação dos inóculos por 14 dias. Uma alíquota de 30 mL foi retirada dos inóculos obtidos após o término da incubação, para realização da leitura inicial de densidade óptica e para contagem de células.

Condução do experimento

A partir dos inóculos obtidos da Fase 2, preparou-se 3 L de suspensão de cada estirpe, por meio da transferência destes para meio BBM, na proporção de 9% (v/v). Cada suspensão foi distribuída em 12 erlenmeyers de 250 mL, que foram levados às câmaras de crescimento para incubação conforme o delineamento experimental, nas condições de cultivo expostas na Tabela 2. Os materiais (meios de cultivo, vidrarias, soluções, ponteiros e pipetas) utilizados durante a preparação dos inóculos e a condução do experimento foram previamente autoclavados à temperatura de 121°C, pressão de 1 atm, por 21 min.

Avaliação da densidade óptica

A densidade óptica das amostras de cada cultivo foi realizada por meio de espectrofotômetro (Thermo Scientific, mod. Genesys 10S UV-VIS), com comprimento de onda ajustado para 670 nm. Uma alíquota de 1,5 mL de cada amostra, inclusive do branco (meio BBM), foi transferida para uma cubeta, a qual foi submetida ao aparelho para leitura.

Avaliação da contagem de células

A contagem de células foi realizada por meio de microscópio (Nikon, mod. Eclipse E200), na lente objetiva de 40x, com auxílio de câmara melhorada de Neubauer. Uma pequena alíquota de cada amostra do cultivo de cada microalga foi depositada em um dos canais laterais ao campo central da câmara de Neubauer e, após a sedimentação (cerca de 1 minuto), procedeu-se a contagem das células. O cálculo do número de células por mL foi realizado com base no volume contido na seção da câmara onde foi feita a contagem.

Análise estatística

Foram executadas análise de variância e teste de médias (teste t) a partir do software SASM-Agri (CANTERIA et al., 2001), em delineamento fatorial 4x6 com 3 repetições, a um grau de 5% de significância.

Tabela 2. Condições de cultivos das microalgas.
Table 2. Conditions of microalgae cultivation.

	Preparo dos inóculos		Condução do experimento
	Fase 1	Fase 2	
Ambiente	Câmara de crescimento de alvenaria	Câmara de crescimento de alvenaria	Câmara de crescimento (Ethik, mod. 411 FPD)
Recipiente	Tubos de vidro (30 mL)	Frascos Schott (250ml)	Erlenmeyers (250 mL)
Temperatura	28,0 ± 2,0° C	28,0 ± 2,0° C	20,0° C, 25,0° C, 35,0° C e 40,0° C
Fotoperíodo (claro:escuro)	12h:12h	12h:12h	12h:12h
Intensidade luminosa	100 ± 20 μmol fótons s ⁻¹ m ⁻²	100 ± 20 μmol fótons s ⁻¹ m ⁻²	35 – 37 μmol fótons s ⁻¹ m ⁻²
Fonte de iluminação	Lâmpadas fluorescentes: 4 de 10W + 2 de 60W	Lâmpadas fluorescentes: 4 de 10W + 2 de 60W	Lâmpadas fluorescentes: 2 de 30 W por câmara
Tempo de incubação	11 dias	14 dias	14 dias
Meio de cultivo	Bold's Basal Medium (BBM)	Bold's Basal Medium (BBM)	Bold's Basal Medium (BBM)

RESULTADOS

O critério de seleção das estirpes de microalgas empregadas no estudo foi o potencial produtivo de biomassa e de lipídeos e também o local de origem da coleta nas diversas regiões do Estado do Paraná (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b). A escolha da estirpe de *N. oleoabundans* (UTEX1185) deveu-se à sua grande aplicabilidade nos estudos de produção energética, uma vez que esta espécie possui alta produtividade em biomassa e alto teor lipídico, além de boa adaptabilidade climática.

Densidade óptica

Comparando as estirpes entre si, verificou-se que, não houve diferença significativa entre os tratamentos T20, T25 e T35 quanto aos valores médios de densidade óptica. Porém, no tratamento T40, as estirpes IPR7116 e IPR7151 apresentaram valores médios de 0,098 e 0,100, respectivamente, ambos estatisticamente inferiores aos das demais estirpes que, por sua vez, apresentaram valores médios acima de 0,140 sem diferirem estatisticamente entre si.

Constatou-se que não houve variação significativa na densidade óptica das estirpes IPR7104, IPR7116 e UTEX1185 provocada pelas diferentes temperaturas empregadas no experimento. Entretanto, a variação da temperatura de crescimento influenciou para que houvesse diferença significativa nos valores médios de densidade óptica para as demais estirpes, porém, sem apresentar um comportamento padrão de variação, exceto quanto à temperatura de 40,0 °C que demonstrou ser a mais restritiva para o crescimento destas.

Em relação ao valor médio de densidade óptica entre todas as estirpes, o T35 apresentou a maior média (0,250 abs), seguido pelos tratamentos T25 (0,223 abs), T20 (0,195 abs) e T40 (0,135 abs), todos estatisticamente diferentes entre si.

Independente da temperatura de crescimento, as estirpes que apresentaram maiores médias de densidade óptica medidas em termos de absorbância (abs) foram: a IPR7104 (0,240 abs) e a IPR7115 (0,237 abs) não diferindo estatisticamente entre si. Em seguida, a UTEX1185 (0,205 abs), a IPR7117 (0,189 abs) e a IPR7151 (0,188 abs), estatisticamente iguais. Por último, a IPR7116 (0,144 abs).

Densidade celular

Quanto aos valores médios de densidade celular, tendo as temperaturas como fator de análise, verificou-se que, para cada estirpe, não houve diferença significativa entre os tratamentos T20 e T25. Entretanto, os tratamentos T35 e T40 se diferenciaram-se dos demais para as estirpes IPR7104, IPR7117 e IPR7151, sendo que não houve um comportamento padrão da variação de densidade celular entre estas estirpes.

Comparando as estirpes entre si, constatou-se que, apenas no T35 não houve diferença significativa quanto aos valores médios de densidade celular. Os tratamentos T20, T25 e T40 apresentaram valores médios de densidade celular diferentes para as estirpes, porém sem apresentar um comportamento padrão para cada uma delas.

Em relação ao valor médio de densidade celular entre todas as estirpes, o T35 apresentou a menor média ($6,25 \cdot 10^6$ células mL^{-1}), diferenciando-se das demais tratamentos de temperaturas que, por sua vez, não diferiram estatisticamente entre si: T20 ($7,67 \cdot 10^6$ células mL^{-1}), T25 ($7,56 \cdot 10^6$ células mL^{-1}) e T40 ($7,70 \cdot 10^6$ células mL^{-1}). A estirpe IPR7104 foi a que apresentou maior média de densidade celular independente da temperatura de crescimento ($9,24 \cdot 10^6$ células mL^{-1}). Em seguida, a estirpe IPR7117 ($7,95 \cdot 10^6$ células mL^{-1}); as IPR7151 ($7,13 \cdot 10^6$ células mL^{-1}) e IPR7116 ($7,05 \cdot 10^6$ células mL^{-1}), que são estatisticamente iguais; a IPR7115 ($6,83 \cdot 10^6$ células mL^{-1}); e a estirpe de *N. oleoabundans* (UTEX1185) ($5,56 \cdot 10^6$ células mL^{-1}).

DISCUSSÃO

O que pode explicar baixa densidade óptica para as estirpes IPR7116 e IPR7151 em relação às demais estirpes na temperatura de $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$ é o fato de elas serem isoladas de Fernandes Pinheiro e Pato Branco, respectivamente, regiões onde a temperatura média mensal varia entre $13,2 \text{ }^\circ\text{C}$ a $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante o ano (IAPAR, 2015). Acredita-se que esta faixa de temperatura seria mais favorável ao crescimento destas estirpes quando comparada à temperatura de $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$, que causou certa inibição no crescimento.

Verificou-se que o melhor crescimento de microalgas, tanto pela análise de densidade óptica quanto pela análise de densidade celular, foi da estirpe IPR7104. Isso pode ser explicado por sua característica de possuir alta produtividade em biomassa em relação às demais estirpes (Tabela 1).

CONCLUSÃO

Pela análise da densidade óptica observou-se que houve melhor desenvolvimento das microalgas na temperatura de $35,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Entretanto, a análise da contagem de células revelou haver menor densidade celular nesta temperatura. Ambas análises indicaram que a estirpe IPR7104 foi a que melhor se desenvolveu independente da temperatura, apresentando potencial para cultivo em sistemas abertos sem controle de temperatura.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas a L. A. Maroubo e U. Erica M. Preilipper, respectivamente. D. S. Andrade é grata a Fundação Araucária (Proc. 42306/2014).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais. Potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: IAPAR, 2014a. v. 1.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais. Coleção IPR de microalgas. Londrina: IAPAR, 2014b. v. 3.
- ARCEO, Á. A. Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. 2012. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- BOLD, H. C. The morphology of *Clamydomonas chlamydogama* sp. Bull. Torrey Bot. Club., n. 76, p. 101–108, 1949.
- CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, v. 1, n. 2, p. 18–24, 2001.
- DEFANTI, L. S.; SIQUEIRA, N. S.; LINHARES, P. C. Produção de biocombustíveis a partir de algas fotossintetizantes. Bolsista de Valor - Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense, v. 1, p. 11–21, 2010.

FERRERO, I. Produção de biodiesel a partir de microalgas como alternativa aos cultivos clássicos. 2011. Santa Fé, Argentina: Universidad Nacional del Litoral, 2011.

IAPAR . Médias históricas em estações do IAPAR. Disponível em:
<<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1070>>.

LEMOS, J. DE S. Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de mio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel. 2012. Curitiba: Universidade Federal do Paraná., 2012.

LI, Y. et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 629–636, dez. 2008.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

OHSE, S. et al. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *INSULA*, v. 36, n. 36, p. 39–73, 2007.

SCRAGG, A. H. et al. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, n. 1, p. 67–73, jul. 2002.

UDUMAN, N. et al. A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, v. 174, n. 1, p. 249–257, out. 2011.

UTEX . The Culture Collection of Alagae at the University of Texas at Austin. Disponível em:
<<http://www.utex.org/default.aspx>>.