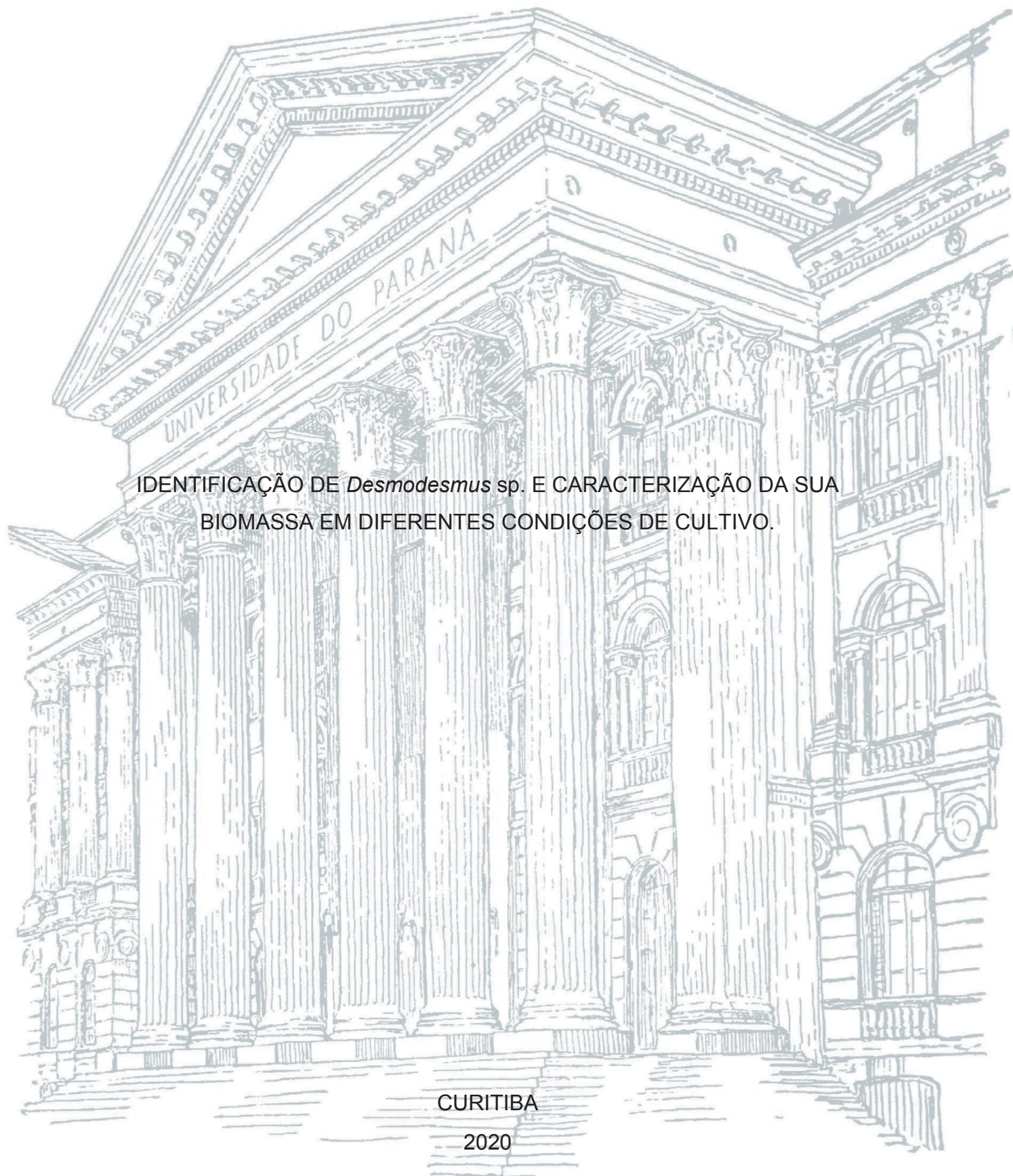


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
GUILHERME BURGEL



IDENTIFICAÇÃO DE *Desmodesmus* sp. E CARACTERIZAÇÃO DA SUA  
BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

CURITIBA  
2020

GUILHERME BURGEL

IDENTIFICAÇÃO DE *Desmodemus* sp. E CARACTERIZAÇÃO DA SUA  
BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Kava

Co-orientadora: Profa. Dra. Daiani Cristina Savi.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Burgel, Guilherme

Identificação de *Desmodesmus* sp. e caracterização da sua biomassa em diferentes condições de cultivo. / Guilherme Burgel. – Curitiba, 2020. 57 p.: il.

Orientadora: Vanessa Merlo Kava.

Coorientadora: Daiani Cristina Savi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Biocombustível. 2. Álcool como combustível. 3. Bioprospecção. 4. Microalga. I. Título. II. Kava, Vanessa, 1968-. III. Savi, Daiani Cristina, 1987-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 579.839  
333.9539



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -  
40001016006P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GUILHERME BURGEL** intitulada: **Identificação de *Desmodemus* sp. e caracterização da sua biomassa em diferentes condições de cultivo**, sob orientação da Profa. Dra. VANESSA MERLO KAVA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 14:00:16.0

VANESSA MERLO KAVA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/06/2020 22:34:41.0

JOAO ALENCAR PAMPHILE

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA)

Assinatura Eletrônica

15/06/2020 14:15:00.0

LISANDRA SANTOS FERREIRA MABA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Kava pela oportunidade de participar deste projeto e orientado a progressão dele, como também pelos conselhos.

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiani Savi pela disponibilidade em sempre ajudar da melhor forma.

Ao NPDEAS pôr disponibilizar o Laboratório de Biotecnologia e Cromatografia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thelma Veiga Ludwig e a Paula Carolina Ferreira pela preciosa contribuição neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e disposição e apoio técnico.  
Principalmente a Beatriz e ao Gustavo.

À Dr.<sup>a</sup> Lisandra Santos Ferreira-Maba pela ajuda em diversos momentos.

À Paloma pelo apoio e ajuda em todos os momentos deste trabalho.

À minha mãe pelo incentivo e apoio em todas as etapas da vida.

Ao Fred Hiro Takeuchi pelo apoio emocional.

## RESUMO

Microalgas apresentam um grande potencial para suprir demandas como energia e produtos de interesse biotecnológico. Apesar de já serem conhecidas milhares de espécies de microalgas, estima-se que ainda existem muitas desconhecidas, e que possam ser promissoras em diversos aspectos. No intuito de buscar novas espécies, trabalhos de bioprospecção têm sido realizados nos mais diversos ambientes. As microalgas têm potencial para aplicação na indústria energética substituindo os combustíveis fósseis, de diferentes formas, desde pela produção de biodiesel e biohidrogênio e até mesmo para a produção de etanol, quando a sua biomassa é rica em carboidratos. Outros produtos obtidos a partir do cultivo de microalgas, como pigmentos e ácidos graxos, tem alto valor agregado, são de grande importância para a indústria farmacêutica. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, a avaliação do potencial biotecnológico da microalga LGMM13, isolada na Represa do Iraí – Paraná e depositada na coleção do LabGeM. Também foi realizada a identificação taxonômica desta microalga, por meio de análises morfológicas e de sequências de DNA. Foi possível identificar este isolado como pertencente ao gênero *Desmodesmus* por meio de microscopia de luz e eletrônica. Não foi possível identificar a espécie pois, apesar de morfologicamente este isolado ser semelhante a outras três espécies, *D. asymmetricus*, *D. spinosus* e *D. subspicatus*, foram observadas características divergentes dessas espécies. Considerando-se a análise filogenética, baseada em sequências ITS, este isolado poderia ser uma nova espécie. Considerando que a taxonomia de microalgas ainda é suportada principalmente por dados morfológicos e nem todas as espécies do gênero *Desmodesmus* têm sequências depositadas, novos estudos deverão ser conduzidos no intuito de comprovar se este isolado é uma nova espécie. Para avaliar a produção de biomassa total, lipídeos, proteínas e carboidratos, diferentes condições de cultivo foram ensaiadas, restringindo nitrogênio e adicionando Bicarbonato de Sódio. Para a produção de biomassa seca, *Desmodesmus* sp. LGMM13 atingiu 1,50 g/L após 22 dias em meio CHU. Nas mesmas condições de cultivo, o isolado de *Tetradismus obliquus* utilizado nos fotobiorreatores do NPDEAS produziu 0,98g/L de biomassa seca. Ainda comparando estes dois gêneros, *Desmodesmus* sp. LGMM13 produziu mais carboidratos, proteínas, lipídeos e clorofila que *T. obliquus*. Variando as condições de cultivo, a produção de carboidratos totais de *Desmodesmus* sp LGMM13 atingiu 66,58% da biomassa seca em meio CHU com privação de nitrogênio, valor superior ao descrito na literatura para condições de cultivo semelhantes, indicando que esta microalga possui grande potencial para a produção de bioetanol.

Palavras-chave: Biocombustíveis; Bioetanol; *Desmodesmus*; Bioprospecção.

## ABSTRACT

Microalgae show great potential to supply demands such as energy and products of biotechnological interest. Although thousands of microalgae species are already known, it is estimated there are still many undiscovered species, and that they can be promising in several aspects. In order to search for new species, bioprospection has been carried out in the most diverse environments. Microalgae have the potential to meet energy demand by replacing fossil fuels in different ways, from the production of biodiesel, biohydrogen and even to the production of ethanol, when its biomass is rich in carbohydrates. Other products obtained from the cultivation of microalgae, such as pigments and fatty acids, have high value, are of great importance to the pharmaceutical industry. In this context, this work has for objective to evaluate the biotechnological potential for the production of lipids, carbohydrates, pigments and proteins of the microalgae LGMM13, deposited in the collection of LabGeM and isolated in Iraí Dam - Paraná. Taxonomic identification of this microalgae was also carried out by means of morphological and DNA sequences analysis. It was possible to identify this isolate as belonging to the *Desmodesmus* genus by identifying characteristics using light and electron microscopy. It was unable to identify the species because, despite this isolate being morphologically similar to other three species, *D. asymmetricus*, *D. spinosus* and *D. subspicatus*, divergent characteristics of these species were observed. By phylogenetic analysis, based on ITS sequences, this isolate could be a new species. Considering that the taxonomy of microalgae is still supported mainly by morphological data and not all species of the genus *Desmodesmus* have deposited sequences, further studies shall be conducted in order to prove whether this isolate is a new species. To evaluate the production of total biomass, lipids, proteins, pigments and carbohydrates, different cultivation conditions were tested, by restricting nitrogen and adding sodium bicarbonate. For the production of dry biomass, *Desmodesmus* sp. (LGMM13) went up to 1,50g/L after 22 days in CHU medium. Under the same cultivation conditions, the isolate of *Tetradesmus obliquus* used in the NPDEAS photobioreactors produced 0.98 g/L of dry biomass. Still comparing these two genera, *Desmodesmus* sp. LGMM13 produced more carbohydrates, proteins, lipids and chlorophyll than *T. obliquus*. By varying the cultivation conditions, the production of total carbohydrates from *Desmodesmus* sp LGMM13 reached 66.58% of the dry biomass in CHU medium with nitrogen deprivation, a value higher than that described in the literature for similar cultivation conditions, indicating that this microalgae has great potential for the production of bioethanol.

Keywords: Biofuels; Bioethanol; *Desmodesmus*; Bioprospection.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO POTENCIAL DE FOTOBIORREATORES NO CULTIVO DE MICROALGAS.....21
- FIGURA 2 - DIFERENTES METABOLISMOS PRESENTES NAS MICROALGAS.....23
- FIGURA 3 - MICROSCOPIA ÓPTICA DA LINHAGEM LGMM13.....33
- FIGURA 4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ISOLADO LGMM13.....33
- FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Desmodesmus* POR INFERÊNCIA BAYESIANA UTILIZANDO SEQUÊNCIAS ITS. VALORES DE PROBABILIDADE POSTERIORI EM NEGRITO E BOOTSTRAP, QUANDO DISPONÍVEL, ESTÃO À ESQUERDA DOS NÓS.....35
- FIGURA 6 - CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO EM MEIO CHU.....37
- FIGURA 7 - CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPRODUTOS DA BIOMASSA SECA EM PORCENTAGEM DOS ISOLADO LGMM01 E LGMM13 EM MEIO CHU APÓS 22 DIAS.....38

FIGURA 8 - PRODUÇÃO DOS BIOPRODUTOS (mg/L) DE MEIO CHU, APÓS 22 DIAS DE CULTIVO DAS LINHAGENS LGMM01 E LGMM13.....39

FIGURA 9 - PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS, CLOROFILA, CAROTENÓIDES E CARBOIDRATOS NA BIOMASSA SECA DO ISOLADO LGMM13 PARA CADA TRATAMENTO APÓS 16 DIAS.....41

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: CONTEÚDO LIPÍDICO (% DA BIOMASSA) DE DIFERENTES ALGAS VERDES EM MEIOS DE CULTIVO DISTINTOS.....18

QUADRO 2: CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA SECA DE DIFERENTES LINHAGENS DE MICROALGAS.....19

QUADRO 3: ISOLADOS UTILIZADOS NO ESTUDO COM SUAS RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÕES E LOCALIZAÇÃO DE COLETA.....25

QUADRO 4: TRATAMENTOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE VARIAÇÃO DE NITROGENIO E BICARBONATO DE SÓDIO COM AS CONCENTRAÇÕES DAS MESMAS.....28

QUADRO 5: RELAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DO ISOLADO LGMM13 E OUTRAS *Desmodesmus* MORFOLOGICAMENTE PRÓXIMAS.....34

QUADRO 6: RELAÇÃO DOS BIOPRODUTOS POR TRATAMENTO DO ISOLADO LGMM13 APÓS 22 DIAS.....41

## LISTA DE SIGLAS

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

NaNO<sub>3</sub> - Nitrato de Sódio

NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio

NPDEAS - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia  
Autossustentável

TAG - Triacilglicerol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1. MICROALGAS	14
2.2. IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS	14
2.2. ALGAS VERDES	15
2.3. FAMÍLIA SCENEDESMACEAE (CHLOROPHYCEAE)	15
2.3.1. Gênero <i>Desmodesmus</i> (Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald, 1999.	16
2.4. BIOPRODUTOS DE MICROALGAS	17
2.4.1 Lipídeos	17
2.4.2 Carboidratos	19
2.4.3 Pigmentos	20
2.4.4 Proteínas	20
2.5. CULTIVOS DE MICROALGAS	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	25
4.2. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM13	25
4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	26
4.3.1. Curva de crescimento	27
4.3.2. Cultivo com variação de nitrogênio e bicarbonato de sódio	27
4.4. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES CELULARES	28
4.4.1. Determinação da biomassa seca	28
4.4.2. Recuperação da biomassa	29
4.4.3. Quantificação de lipídeos totais	29
4.4.4. Quantificação de carboidratos	30
4.4.5. Quantificação de pigmentos	30
4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
5.1 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM13	32
5.1.1. Identificação morfológica	32
5.1.2. Identificação molecular	36
5.2. CURVA DE CRESCIMENTO	36

5.3. CULTIVO COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO E BICARBONATO DE SÓDIO	39
<b>6.0. CONCLUSÃO</b>	42
<b>REFERÊNCIAS</b>	43
<b>ANEXO</b>	53

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são um grupo de organismos fotossintéticos microscópicos de origem polifilética (BALDAUF, 2008), unicelulares ou coloniais. São principalmente aquáticos, podem habitar águas doces ou salgadas e produzem biomassa por meio da luz solar, água, sais e dióxido de carbono (DEMIRBAS, 2010). As microalgas têm potencial para suprir a demanda energética substituindo os combustíveis fósseis, pela produção de biocombustíveis. Além de não precisarem ocupar terras cultiváveis, o cultivo de microalgas tem vantagens como a velocidade na produção de biomassa e a escala de produção sem depender de sazonalidade (CHISTI, 2007). Podem ser cultivadas em fotobiorreatores utilizando diversas fontes nutricionais, incluindo dejetos orgânicos e efluentes provenientes de atividades agrícolas e industriais, com o máximo de aproveitamento de água e produzindo outros produtos de interesse humano, permitindo a completa utilização dessa biomassa, o que aplicaria o conceito de biorrefinaria (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

A queima de combustíveis fósseis é a principal matriz energética para a civilização humana. Sendo que esses combustíveis fósseis são fonte de energia pouco renovável, e um dos responsáveis por produzir gases que causam o efeito estufa. Além de ser uma *commodity* finita, seus preços podem subir quando a demanda ultrapassar a oferta. Visando um futuro com as mesmas comodidades proporcionadas pelo consumo energético, fontes de energia renováveis que possam competir economicamente com as fontes de energia tradicionais têm sido pesquisadas. Uma das principais fontes de energia renovável é a biomassa de microalgas, que pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de óleos vegetais ou animais, porém quando produzido a partir de óleos vegetais compromete larga quantidade de terra cultivável, competindo com a produção de alimentos (CHISTI, 2007; GEORGIANNA e STEPHEN 2012).

O uso de espécies endêmicas de microalgas traz como vantagem uma grande competitividade em cultivos como em fotobiorreatores, uma vez que estas estão adaptadas às condições climáticas regionais (DUONG et al., 2012). A bioprospecção de novas espécies pode favorecer a produção de biocombustíveis, pela seleção de linhagens mais competitivas, com crescimento mais rápido, maior produção de

lipídeos, além da possibilidade de trazer novos produtos de alto valor agregado (HADI et al., 2016). Neste sentido, este trabalho visa avaliar o isolado LGMM13, obtidos na Represa do Iraí, região metropolitana de Curitiba, para a produção de bioprodutos e biomassa, bem como comparar o desempenho destes isolados com a microalga *Tetradismus obliquus* já utilizada em fotobiorreatores pelo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MICROALGAS

O termo alga é utilizado para designar uma enorme variedade de organismos, o qual não é preciso do ponto de vista taxonômico. Neste grupo são designados como algas os talófitos, microrganismos eucariontes clorofilados e cianobactérias (BICUDO e MENEZES, 2005; TOMASELLI, 2004).

Microalgas são um grupo artificial e extremamente heterogêneo de organismos. São seres fotoautotróficos, ou seja, capazes de realizar fotossíntese, podendo ser procariotas ou eucariotas. São os principais produtores primários do planeta, possuindo assim uma elevada relevância ambiental (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018). Além de serem organismos com grande capacidade de adaptação e desenvolvimento em diversos ambientes aquáticos e terrestres (MATA et al., 2010)

### 2.2. IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS

A identificação de espécies de microalgas ocorre, tradicionalmente, na observação da morfologia e pigmentos. Entretanto, a biologia molecular vem ganhando espaço nos estudos de taxonomia, tornando-se uma poderosa ferramenta para a discriminação de espécies de microalgas (EBENEZER et al., 2012; LARKUM et al., 2012).

A identificação por sequenciamento de DNA é considerada a metodologia mais segura para uma identificação precisa, devido à dificuldade de observar diferentes características morfológicas e a grande plasticidade morfológica (CHEN et al., 2010). Para uma correta classificação é importante a escolha de uma região informativa do DNA, como as do DNA ribossomal (rDNA). Os nucleotídeos do rDNA são responsáveis pelos genes que codificam os rRNAs (LEE, 2008). Em algas verdes a utilização da região ITS, principalmente ITS2, do rDNA tem sido utilizada com sucesso em análises filogenéticas para espécies próximas (AN et al., 1999; HEGEWALD e BRABAND, 2017).

Várias abordagens podem ser aplicadas, como a utilização de genes que apresentam maior variabilidade como COI (*Cytochrome oxidase I*) e ITS1 e 2 (*Internal*

*Transcribed Spacer*) do rDNA. Regiões com variação moderada como *rbcL* (*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO*) e *tufA* (*elongation factor Tu*). Inclusive regiões altamente conservadas como 18S rDNA e UPA (*Universal Plastid Amplicon*) (CHEN et al., 2010; HALL et al., 2010). Fučíková et al. (2011) demonstrou que a utilização de COI em algas verdes não é eficaz para a identificação de espécies, devido à alta variabilidade desta região.

## 2.2. ALGAS VERDES

As algas verdes são um grupo de algas eucariontes com uma enorme variedade de níveis de organização, podendo ser flagelados ou aflagelados, unicelulares ou coloniais, compondo grupos morfológicos complexos (EBENEZER et al., 2012).

As algas verdes possuem um cloroplasto de duas membranas, dentro deste é formado e armazenado amido em associação com um pirenóide, se presente. Seus tilacóides são agrupados em bandas de três a cinco tilacóides sem grana. No cloroplasto estão presentes as clorofilas *a* e *b*. Estes organismos são principalmente encontrados em ambientes aquáticos de água doce, sendo estas geralmente cosmopolitas (LEE, 2008; LELIAERT et al., 2012)

Este grupo é dividido em dois subgrupos, Chlorophyta e Charophyta. O filo Charophyta contém sete classes, enquanto Chlorophyta contém três classes diferentes, sendo Scenedesmaceae a maior família dentro das clorofíceas (KRIENITZ e BOCK, 2012).

## 2.3. FAMÍLIA SCENEDESMACEAE (CHLOROPHYCEAE)

Scenedesmaceae é a maior família de algas verdes cocoides de águas continentais, com ampla distribuição, sendo reportadas nos mais diversos ambientes aquáticos continentais do Brasil (MENEZES et al. 2014). A família possui 13 gêneros, incluindo *Tetrademus*, *Scenedesmus* e *Desmodesmus*, sendo os dois últimos gêneros com o maior número de espécies. Em Scenedesmaceae a parede celular é constituída por uma camada interna de celulose e uma ou mais camadas externas de esporopolenina. Frequentemente possuem ornamentações na forma de espinhos

costelas ou granulações (ATKINSON et al, 1972; COMAS, 1984, englobando indivíduos unicelulares e/ou cenóbios em um ou mais planos (KRIENITZ e BOCK, 2012).

### 2.3.1. Gênero *Desmodesmus* (Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald, 1999

Inicialmente pertencente ao gênero *Scenedesmus*, caracterizado como algas cocóides, autospóricas e com cenóbios (MEYEN, 1829), o qual foi dividido em três subgêneros: *Scenedesmus*, *Acutodesmus* e *Desmodesmus*, baseando-se na ornamentação e forma dos polos das células. Posteriormente, An et al. (1999) elevou o grupo para categoria de gênero *Desmodesmus* por meio de estudos moleculares usando sequências de ITS, também mostrando que o grupo é monofilético. Segundo o banco de dados AlgaeBase, o gênero possui 63 espécies aceitas taxonomicamente (GUIRY, 2019).

Entre outras características, o gênero *Desmodesmus* é caracterizado pela presença de indivíduos unicelulares ou em grupos (cenóbios) e uma quarta camada de esporolenina na parede celular, que possibilita a formação de espinhos e outras ornamentações, bem característico do gênero (AN et al, 1999; HEGEWALD, 2000). Pode ser considerado cosmopolita e possuir mecanismos para sobreviver a uma grande variedade de climas. (HENTSCHKE et al., 2010).

Em estudo recente Hu et al. (2019) aumentaram a produção de lipídeos de *Desmodesmus* sp. a partir da criação de um mutante utilizando a técnica CRISPR/Cas9, promissora técnica de engenharia genética (RAN et al., 2013). Eles conseguiram elevar a produção de lipídeos da biomassa seca em 20%, com este novo mutante, sendo que a linhagem selvagem tinha uma produção total de 50% de lipídios em sua biomassa seca.

Abinandan et al. (2019) demonstrou que o isolado *Desmodesmus* sp. (MAS1) consegue crescer em cultivos com pH ácido de 3,5 e com a adição de metais pesados como Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn). Conseguindo nestas condições, remover os metais pesados, como também acumular ácidos-graxos para a produção de biodiesel.

## 2.4. BIOPRODUTOS DE MICROALGAS

A grande variedade de microalgas faz delas fonte de uma vasta gama de bioprodutos, com diversas aplicações industriais. Atualmente, a principal utilização de microalgas é direcionada ao consumo humano. Sua biomassa rica em proteínas e vitaminas permite sua utilização como alimento ou suplemento alimentar para humanos e também para o consumo animal. Oferecem vantagens significativas de cultivo significativas em comparação com leveduras e bactérias, porque estas requerem adição de algum tipo de fonte de carbono como glicose e acetato no meio de cultura (WASE et al., 2018).

### 2.4.1 Lipídeos

Microalgas podem acumular até 70 % de sua biomassa na forma de lipídeos (CHISTI, 2007). Os lipídeos produzidos por elas podem ser classificados em dois tipos, ácidos graxos que podem ser utilizados para a produção de biodiesel, e ácidos graxos poli-insaturados que tem alto valor agregado e podem ser comercializados para aplicações farmacêuticas ou terapêuticas (YEN et al., 2013).

Triacilglicerol (TAG) é uma das principais formas de armazenamento citoplasmática de energia em microalgas e é uma das matérias primas para a produção de biodiesel (GRAMA et al., 2014).

Os fatores conhecidos que mais influenciam a eficiência na produção de lipídeos das microalgas são o tipo e intensidade luminosa; a temperatura; a disponibilidade de nutrientes, como o nitrogênio; o pH do meio; a aeração do cultivo; e a disponibilidade de CO<sub>2</sub> (YEN et al., 2013; COSTA et al. 2014).

O acúmulo de lipídeos em microalgas tende a ocorrer quando estão sendo cultivadas em condições de estresse. A privação de nitrogênio é a principal estratégia de estresse para aumentar a quantidade de lipídeos nas microalgas. A acumulação chega a ser 10-20% superior em condições de déficit de nitrogênio em algas verdes, diatomáceas e algumas outras espécies (HU et al., 2008; YEN et al., 2013).

QUADRO 1: CONTEÚDO LIPÍDICO (% DA BIOMASSA) DE DIFERENTES ALGAS VERDES EM MEIOS DE CULTIVO DISTINTOS

<b>Algas Verdes</b>	<b>Conteúdo Lipídico (% da Biomassa Seca)</b>
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	71%
<i>Tetraselmis suecica</i>	23%
<i>Chlorella sorokiniana</i>	22%
<i>Chlorella protothecoides</i>	58%
<i>Ettlia oleoabundans</i>	42%
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	32%
<i>Nannochloris</i> sp.	56%
<i>Neochloris oleabundans</i>	65%
<i>Scenedesmus</i> sp.	21%
<i>Chlamydomonas</i> sp.	43%
<i>Desmodesmus</i> sp.	50%

FONTE: ADAPTADO DE HESS et al. (2017)

O biodiesel é produzido a partir da transesterificação de lipídeos de cadeia longa com o uso de um solvente orgânico na presença de um catalisador. É uma fonte alternativa de energia renovável com maior taxa de renovação, baixa toxicidade e maior biodegradabilidade comparado com combustíveis fósseis (TER VELD, 2012).

O Brasil possui metas internacionais para a redução de emissões de gases do efeito estufa. Com isso, a lei N° 13.263, de 23 de março de 2016 (BRASIL, 2016), estabelece que em 2019 pelo menos 10 a 15% de biodiesel seja adicionado ao diesel comum. Segundo o consumo de diesel em 2017, a quantidade de litros necessária para a meta seria de até 77 mil litros de biodiesel (BRASIL, 2017). Em 2018, o Conselho Nacional de Política Energética – CNPE autorizou a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP a fixar o percentual de adição de até 15% (quinze por cento), em volume, de biodiesel ao óleo diesel comum (CNPE, 2018). Segundo Chisti (2007) um hectare de soja plantada pode produzir 446 L de biodiesel, totalizando até 63 mil hectares de terra somente para produzir a meta de biodiesel de 2019, competindo com a produção de alimentos.

Microalgas são uma fonte capaz de substituir os combustíveis fósseis. Elas apresentam crescimento rápido em comparação com vegetais, também são ricas em óleos e oferecem a vantagem de não comprometer o fornecimento de alimentos (CHISTI, 2007). Porém a extração dos lipídeos da biomassa gera um custo elevado que inviabiliza sua aplicação econômica (LAM e LEE, 2012). Portanto, bioprospectar novas espécies de microalgas é uma das estratégias para viabilizar economicamente a produção de biodiesel. Além de ser possível encontrar algas com diversas

aplicações complementares à produção de biodiesel (CHISTI, 2007; ROSALINE et al., 2012).

#### 2.4.2 Carboidratos

Algumas microalgas podem chegar a possuir 50% de carbono em sua biomassa seca, e grande parte deste carbono é proveniente da captura de CO<sub>2</sub> atmosférico (CHISTI, 2007; YEN et al., 2013). Geralmente, os carboidratos que compõe as microalgas verdes são amido, glucose, celulose/hemicelulose e outros polissacarídeos. Desses, amido e glucose são utilizados para a produção de bioetanol e biohidrogênio (YEN et al., 2013). Isto é possível graças ao teor baixo de lignina e alto teor de açúcares fermentáveis nos carboidratos de microalgas. Outras aplicações incluem produção de ágar gelatinoso, espessante, estabilizador e aditivos de alimentos (KOLLER, MUHR e BRAUNEGG, 2014).

Quando cultivadas em meios com restrição de nitrogênio a alga tende a acumular carboidratos e lipídeos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ E BALLESTEROS, 2012). *Spirulina platensis* cultivada por Sassano et al. (2010) em privação de nitrogênio teve ganho de carboidratos de 8-14% para 55-65% de sua biomassa seca.

Rizza et al. (2016) conseguiu uma produção de 53,5% de carboidratos na biomassa seca (0,7 g/L) em *Desmodesmus* sp. Foi testado a eficiência na produção de bioetanol, apresentando 81,4% de eficiência na conversão de açúcar para o combustível.

QUADRO 2: CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA SECA DE DIFERENTES LINHAGENS DE MICROALGAS

Microalga	Conteúdo de Carboidrato (% Biomassa seca)	Referência
<i>Chlamydomonas</i> sp.	17	González-Fernández e Ballesteros, 2012; Markou et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	9 - 41	Dragone et al., 2011; González-Fernández e Ballesteros, 2012
<i>Tetradesmus obliquus</i>	10 - 47	
<i>Spirulina maxima</i>	13-16	González-Fernández e Ballesteros, 2012
<i>Scenedesmus ecosystem</i>	42-53	
<i>Porphyridium cruentum</i>	57	
<i>Desmodesmus</i> sp.	53,5	Rizza et al. (2016)

FONTE: O autor (2020).

### 2.4.3 Pigmentos

Microalgas são uma importante fonte de pigmentos, principalmente de clorofilas *a* e *b*, que se encontram de 0,5 – 4% da biomassa seca. Também produzem carotenóides como anteraxantina, astaxantinas, betacaroteno, luteína, neoxantina e zeaxantina. Os pigmentos possuem várias aplicações, sendo comumente utilizados pela indústria farmacêutica, na área de cosméticos e na indústria alimentícia (SPOLAORE et al., 2006; KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018). Num cultivo otimizado, *Chlorella vulgaris* consegue atingir níveis de 1,67% de clorofilas em sua biomassa seca (MOHSENPOUR et al, 2019). Rammuni et al. (2018) conseguiu 13% de carotenóides na biomassa seca de *Dunaliella salina*, microalga já conhecida pela produção de carotenóides.

A astaxantina é principalmente requisitada pela indústria de alimentação animal para a ração de salmão. É uma molécula de alto valor agregado, seu preço em média é US\$ 2500 por quilograma. Este pigmento é comumente produzido de forma industrial devido ao baixo custo, contudo, outros segmentos da agroindústria então buscando astaxantina produzida naturalmente devido a deposição desses pigmentos no tecido animal, regulamentações legais e demanda por produtos naturais pelos consumidores (SPOLAORE et al., 2006).O acúmulo de carotenóides ocorre em situações de deficiência de nitrogênio, alta irradiação e salinidade.

### 2.4.4 Proteínas

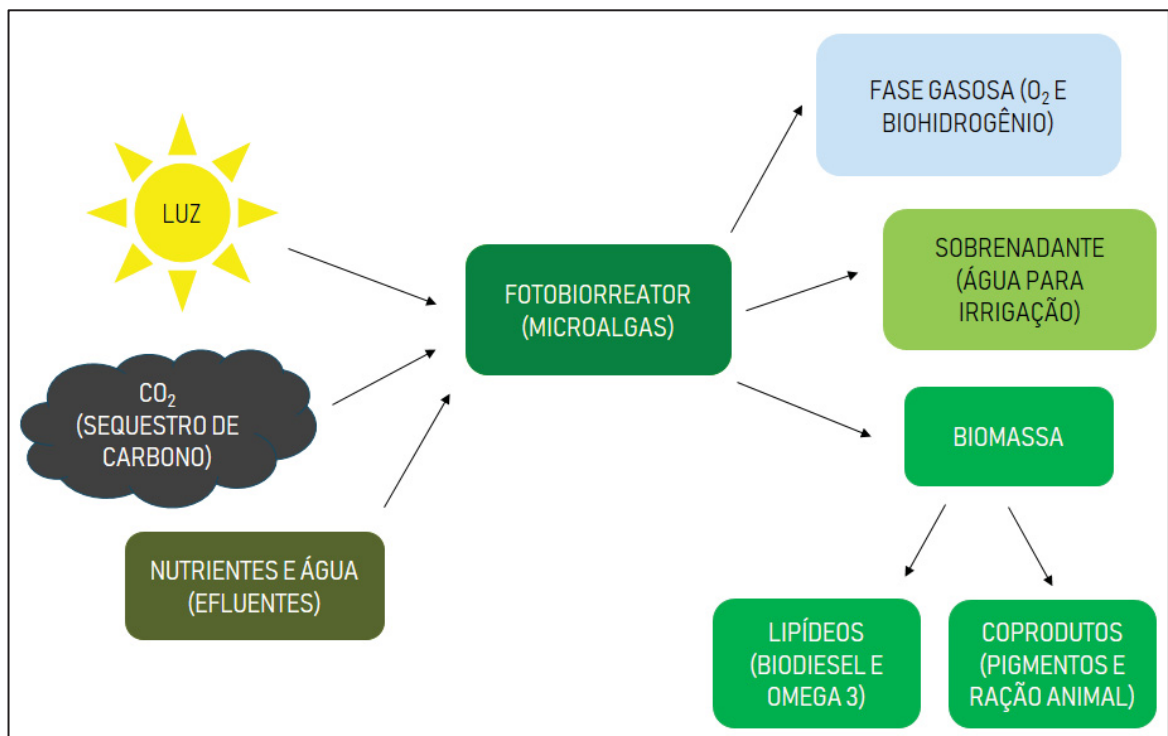
A alta concentração de proteínas em várias espécies de microalgas é uma das razões para serem consideradas uma fonte de proteína não convencional. As células das microalgas são capazes de produzir todos os aminoácidos, podendo suprir os aminoácidos essenciais em humanos e animais. Também, o perfil proteico de microalgas é igual ou melhor do que o de plantas (SPOLAORE et al., 2006).

## 2.5. CULTIVOS DE MICROALGAS

As microalgas apresentam grande capacidade de adaptação, facilitando o cultivo delas em ambientes controlados de laboratórios. No campo podem crescer em regimes fechados como em fotobiorreatores, já empregado no NPDEAS (GRACIANO

et al. 2015), ou em regimes abertos, como tanques e lagoas (TREDICI, 2004). Sistemas fechados permitem maior controle das condições de cultivo como temperatura, nutrientes e CO<sub>2</sub>. Entretanto, o custo energético elevado de manutenção ainda torna este processo inviável economicamente (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

FIGURA 1: DESENHO ESQUEMÁTICO DO POTENCIAL DE FOTOBIOREATORES NO CULTIVO DE MICROALGAS



FONTE: Adaptado de PASSOS (2018).

Cultivos autotróficos de microalgas tem como fonte de carbono o CO<sub>2</sub> dissolvido na água. Este CO<sub>2</sub> pode ser obtido por meio de emissões industriais ou motogeradas (BURKHOLDER et al., 2008). Assim, as microalgas podem reduzir a emissão de CO<sub>2</sub> por meio do sequestro de carbono (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

As microalgas podem ser cultivadas em cultivos heterotrófico utilizando fontes de carbono orgânico, sendo altamente produtivos (CHENG et al., 2009). Entretanto, requerem o fornecimento direto de fonte de carbono no cultivo, tornando dependente da produção primária de alimentos (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018). Também crescem em cultivos mixotróficos que utilizam tanto a atividade fotossintética como

captação de energia por meio de compostos orgânicos externos (CHOJNACKA e MARQUEZROCHA, 2004).

Devido à natureza fotossintética das microalgas, a luminosidade é um importante fator que pode limitar a escala de cultivo. Buscando uma produtividade máxima de biomassa, a faixa de saturação luminosa deve ser homogênea em todo o cultivo (OGBONNA e TANAKA, 2000). Contudo, o aumento na concentração de células no cultivo gera autosombreamento, impossibilitando que algumas células recebam luz necessária para a atividade fotossintetizante (SOARES et al., 2010)

A temperatura exerce influência direta nos cultivos de microalgas. Afeta o metabolismo e as necessidades nutricionais. Geralmente espécies nativas tem melhor adaptação graças a um metabolismo adequado na faixa de temperatura da região. O isolamento de microalgas que resistam a temperaturas altas é um importante critério para a bioprospecção de novas microalgas (ONO; CUELLO, 2007)

Para uma melhor disponibilidade de nutrientes para as algas o pH do meio de cultura deve ser mantido próximo a neutralidade (SCHMIDT, 2007). A variação do pH ocorre com a metabolização de substratos, solubilização, consumo e concentração de CO<sub>2</sub> no meio (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

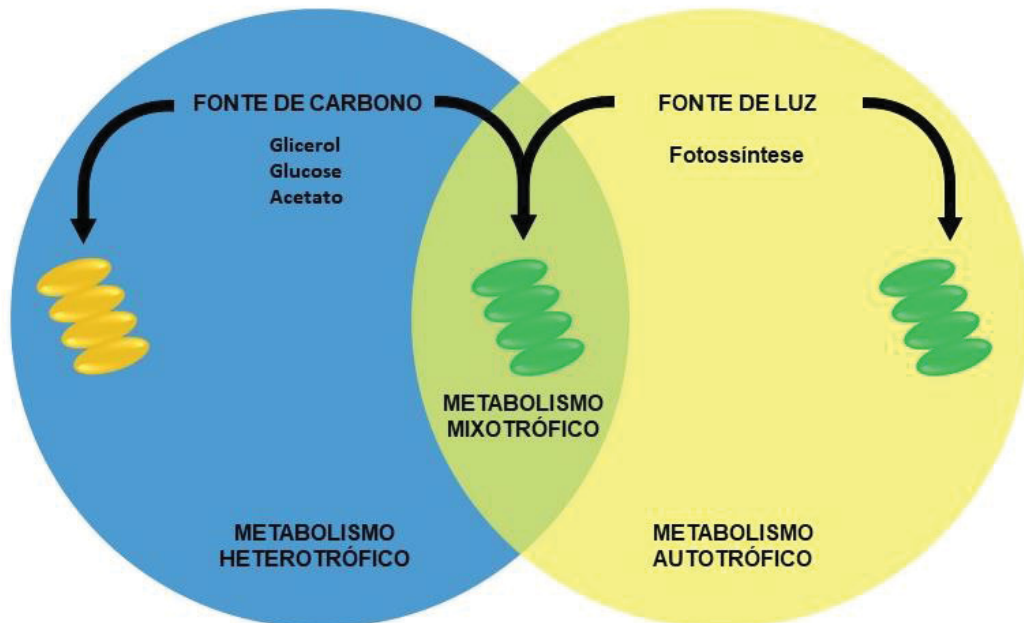
O meio de cultivo influencia diretamente no crescimento celular e na composição química das células. Os elementos mais importantes são carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibdênio. O carbono em cultivos fotoautotróficos vem do CO<sub>2</sub> para a demanda fotossintética. Em alguns cultivos é necessário a adição de CO<sub>2</sub> gasoso, devido à baixa concentração na atmosfera (LOURENÇO, 2006; KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

O nitrogênio é um importante constituinte da biomassa, chegando até 10% do peso seco. Compostos nitrogenados podem ser utilizados como fonte de nitrogênio nos cultivos. A ausência deste composto acarretaria uma diminuição dos aminoácidos e no teor proteico (KAVA, VARGAS e MARIANO, 2018).

Gardner et al. (2012) mostrou que a adição de Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>) pode provocar a acumulação de TAG em *Scenedesmus* sp. e *Phaeodactylum tricorutum*. Entretanto, a adição em demasia de NaHCO<sub>3</sub> pode suspender a replicação celular. White et al. (2013) testou várias concentrações de NaHCO<sub>3</sub> em cultivos, correlacionando maior crescimento celular com 1 g/L de NaHCO<sub>3</sub> adicionado nos cultivos de *Tetraselmis suecica* e *Nannochloropsis salina*. Suplementação de

Bicarbonato de Sódio em conjunto com a restrição de nitrato aumentam o acúmulo de carboidratos e lipídeos nas células de *Scenedesmus* sp. (PANCHÁ et al., 2015).

FIGURA 2: DIFERENTES METABOLISMOS PRESENTES NAS MICROALGAS



FONTE: Adaptado de KAVA, VARGAS e MARIANO (2018)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Explorar o potencial biotecnológico para a produção de lipídeos, carboidratos, pigmentos e proteínas da microalga LGMM13, depositada na coleção do LabGeM e isolada na Represa do Iraí - Paraná.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a microalga LGMM 13 por análise morfológica e molecular.
- Avaliar o crescimento do isolado e a produção de lipídeos, carboidratos, pigmentos e proteínas do isolado LGMM13.
- Fazer uma análise comparativa de crescimento e obtenção dos produtos elencados anteriormente com a linhagem de *Tetrademus obliquus* utilizada nos fotobiorreatores do NPDEAS.
- Investigar possíveis alterações na produção de lipídeos, carboidratos, pigmentos e proteínas pelo isolado LGMM13, em diferentes condições de cultivo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os isolados utilizados neste trabalho (QUADRO 3) pertencem à coleção de microalgas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM).

QUADRO 3: ISOLADOS UTILIZADOS NO ESTUDO COM SUAS RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÕES E LOCALIZAÇÃO DE COLETA.

Isolados	Identificação	Local de Coleta
LGMM01	<i>Tetradesmus obliquus</i>	Curitiba – PR
LGMM13	Não identificada	Represa do Iraí – PR

FONTE: O autor (2020).

O isolado LGMM13 foi coletado por Passos (2018) na Represa do Iraí, localizada na região metropolitana de Curitiba entre os municípios de Pinhais e Piraquara no estado do Paraná, coordenadas S25° 25' 31,1" W49° 06' 22,7". Além desta linhagem, o trabalho utilizará uma cepa da microalga *Tetradesmus obliquus* (LGMM01). Esta cepa é tradicionalmente cultivada em fotobiorreatores para a produção de biomassa pelo NPDEAS na Universidade Federal do Paraná.

### 4.2. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM13

A identificação morfológica foi feita por meio de imagens obtidas por microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, os isolados cresceram por 4 dias em meio TAP. As amostras foram coletadas e foi adicionado lugol para a preservação. Para a microscopia ótica foram preparadas lâminas semipermanentes adicionando gelatina-glicerinada nas lâminas com a amostra, a observação foi feita em microscópio ótico Olympus BX40 e as fotos capturadas pela câmera acoplada Olympus DP71.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi adicionado CTAB 1:1 na amostra e deixado descansar por 12 horas. Na lamínula foi adicionada Poli-L-lysina e uma gota de amostra foi pingada sobre. Posteriormente, foi feita a desidratação em série crescente com álcool etílico de 50% a 100 %. A amostra foi

levada para o ponto crítico e colada a lamínula em um stub com fita de cobre. A metalização foi feita com ouro e a observação em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6360 (Centro de microscopia eletrônica da UFPR) (RAMOS et al. 2017).

Para a identificação molecular, a biomassa foi recuperada do mesmo cultivo anterior, centrifugada e liofilizada. Em seguida foi feita a extração por fenol:clorofórmio adaptado de Raeder e Broda (1985). Foi verificada a integridade do DNA genômico obtido por eletroforese em gel de agarose 1,5% com marcador de peso molecular ladder 1 Kb (Invitrogen, 1Kb Plus DNA Ladder), o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

A reação de PCR foi conduzida utilizando o Kit TopTaq Master Mix (*Qiagen*) utilizando ITS VG9 e LS266 (HOOG, GERRITS VAN DEN ENDE, 1998). A amplificação foi feita em Termociclador Biorad modelo T100™ (*ThermalCycler*). O sequenciamento foi realizado com bigdye em sequenciador automático ABI3500, método de Sanger.

O alinhamento das sequências foram realizados nos programas BioEdit 7.1 e Mega10.0. As sequências foram obtidas no banco de dados AlgaeBase e GenBank, buscando dar prioridade para sequências confiáveis quando disponíveis (ANEXO 1). A criação da árvore filogenética, pelo método Inferência Baysiana, foi feita no software MrBayes utilizando o modelo evolutivo de Kimura 2 parâmetros com distribuição em gama 5 categorias. A árvore de máxima verossimilhança foi criada utilizando o software GARLI 2.01, através da plataforma CIPRES. Para a visualização das árvores foi utilizado o Figtree v1.4.3 e para edição Adobe Photoshop versão 21.0.

#### 4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o CHU Líquido (CHU, 1942), composto de: NaNO<sub>3</sub> 0,0025 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,00025 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,00075 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,00075 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,00175 g/L, NaCl 0,00025 g/L, EDTA–Na<sub>2</sub> 0,00005 g/L, KOH 0,000031 g/L, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,00000498 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,00001142, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,0000000882 g/L, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,0000000144 g/L, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,0000000157 g/L, Co.(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,0000000049 g/L, NaMoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,0000000119 g/L. Os cultivos foram incubados em câmara de cultivo a 25°C e luz contínua (400 lux), com aeração de 500 mL por minuto.

#### 4.3.1. Curva de crescimento

A cinética de crescimento dos isolados foi avaliada por meio da construção de uma curva de crescimento, considerando a biomassa seca.

Foi utilizado um pré-inóculo crescido por 14 dias. A partir deste cultivo os isolados foram inoculados e mantidos em Erlenmeyer de 2 L com 1,5 L de meio em triplicata. Todos os cultivos iniciaram com concentração de 0,01 g/L de biomassa celular. A avaliação do crescimento dos cultivos foi feita a cada 48 horas ao longo de 22 dias, por meio da determinação da biomassa seca (ver item 4.4.1).

#### 4.3.2. Cultivo com variação de nitrogênio e bicarbonato de sódio

Devido a variação de produção dos componentes celulares por microalgas utilizando o Bicarbonato de Sódio (GARDNER et al. 2012; WHITE et al. 2013; PANCHA et al., 2015). ), bem como pelo fato do déficit de Nitrogênio no meio de cultura acarretar o acúmulo de pigmentos e lipídeos nas células (SPOLAORE et al., 2006; HU et al., 2008; YEN et al., 2013), este experimento testou o crescimento e produção de bioprodutos em diferentes concentrações de nitrogênio e bicarbonato de sódio. No meio CHU o nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) é o composto nitrogenado e se encontra na concentração de 0,0025 g/L. O delineamento deste experimento visou a utilização de três concentrações de cada nutriente ( $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$ ), para que todas as condições pudessem ser analisadas (QUADRO 4).

Os cultivos foram inoculados em Erlenmeyers de 2 L contendo 1,5 L de meio em aerção. O experimento iniciou com 0,05 g/L de biomassa, proveniente de uma alíquota do pré-inóculo em meio CHU, e o cultivo seguiu por 16 dias. Após este período, foi calculada a biomassa seca de cada tratamento em triplicata (ver item 4.4.1). A biomassa total obtida foi utilizada para quantificar a produção de lipídeos totais, carboidratos, proteínas e pigmentos.

QUADRO 4: TRATAMENTOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO E BICARBONATO DE SÓDIO COM AS CONCENTRAÇÕES DAS MESMAS.

Tratamento	Bicarbonato de sódio (g/L)	Nitrato de sódio (g/L)
Controle	0	0,0025
2	0	0,00125
3	0	0,000625
4	1	0,0025
5	1	0,00125
6	1	0,000625
7	1,5	0,0025
8	1,5	0,00125
9	1,5	0,000625

FONTE: O autor (2020).

#### 4.4. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES CELULARES

##### 4.4.1. Determinação da biomassa seca

Para a quantificação da biomassa seca, uma alíquota do inóculo de cada condição de cultivo é filtrada em microfiltros de fibra de vidro, do tipo GF1, pelo método gravimétrico. Os filtros são previamente secos em uma estufa a 60 °C e posteriormente pesados em uma balança analítica modelo SHIMADZU AUW220D. Após a filtragem da cultura os filtros são novamente secos e pesados. Com os dados obtidos é aplicado a seguinte equação:

$$BS = \frac{M_2 - M_1}{V}$$

Onde:

BS = biomassa seca (g/L);

M<sub>1</sub> = massa do microfiltro vazio (g);

M<sub>2</sub> = massa do microfiltro com biomassa de microalga (g);

V = alíquota filtrada (L).

#### 4.4.2. Recuperação da biomassa

Ao final de cada experimento a biomassa foi obtida por meio do método de floculação pelo floculador Tanfloc (SELESU, 2015). Inicialmente o pH do meio é ajustado para um valor entre 7,0 e 7,5. O meio é levado a um agitador em velocidade de rotação alta e é adicionado o floculador em uma concentração de 210 mg para cada litro de cultivo. Logo após a adição do floculador a rotação do agitador é diminuída para a menor rotação possível e permanece por 10 minutos. Posteriormente é cessada a agitação e o cultivo floculado é filtrado em panos de tecido comum. A biomassa retida no tecido é retirada e armazenada em tubos de polipropileno de 15 ml. A biomassa é então liofilizada e armazenada para testes futuros.

#### 4.4.3. Quantificação de lipídeos totais

Para a extração de lipídeos totais foi utilizada a metodologia de Bligh e Dyer (1959). A biomassa seca dos isolados a partir dos diferentes cultivos será inserida num tubo de polipropileno de 15 mL (tubo 1). Adiciona-se 3 mL de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1) se procede à sonicação em três ciclos de 15 minutos. Em seguida, são mantidas em 4° C ao abrigo da luz durante 24 horas.

Após as 24 horas, as amostras são submetidas novamente ao ciclo de sonicação e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante com a fase lipídica será recuperado e armazenado em outro tubo de polipropileno (tubo 2). O restante do material não recuperado do tubo 1, é adicionado 1,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1) para uma nova extração. Onde é centrifugado novamente e o sobrenadante recuperado e reservado no tubo 2.

No tubo 2 é adicionado 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio. O tubo é agitado e centrifugado para a recuperação da fase inferior que contém clorofórmio e lipídeos e reservada em um novo tubo (tubo 3). O restante do tubo 2 é lavado novamente com 1 mL de clorofórmio e centrifugado. A fase inferior é novamente recuperada e adicionada no tubo 3.

O tubo 3 permanece numa capela de exaustão para que o clorofórmio evapore. Sobrando apenas a massa lipídica que é mensurada por meio da equação abaixo:

$$LT = m_f - m_0 \times 100 / m_b$$

Onde:

LT = lipídeos totais da amostra seca utilizada (%);

$m_0$  = massa do frasco de vidro vazio (g);

$m_f$  = massa do frasco de vidro contendo lipídeos (g);

$m_b$  = biomassa seca utilizada na extração de lipídeos.

#### 4.4.4. Quantificação de carboidratos

A metodologia utilizada para a quantificação de carboidratos foi descrita por Dubois et al. (1956), utilizando fenol e ácido sulfúrico. Em um tubo, 20 mg de biomassa liofilizada são adicionados junto com 1 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 80% e então repousado por 20 horas. Nas primeiras 4 horas, os frascos são mantidos no gelo e nas horas seguintes em temperatura ambiente.

Após o descanso, a amostra é diluída em 9 mL de água destilada. Uma alíquota de 1,5 mL é retirada e centrifugada a 8.000x g por 10 minutos. Do sobrenadante é removido 50 µL e colocado em um tubo de ensaio, então são adicionados 500 µL de solução fenol 5% e 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A amostra é lida no espectrofotômetro com absorvância de 490 nm.

#### 4.4.5. Quantificação de pigmentos

Em um tubo de ensaio será colocado 5 mg de biomassa liofilizada e misturado com 3 ml de etanol absoluto, então é aquecido a 60°C por 40 min e depois resfriado a 0°C por 15 minutos. Logo, é medida a absorvância nos comprimentos 665 nm, 649 nm e 470 nm (LOURENÇO, 2006). Os dados de cada clorofila e carotenoides são dados nas seguintes fórmulas:

$$Clorofila_a = (13,95 \cdot A_{665} - 6,88 \cdot A_{649}) \cdot \text{fator de diluição} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$$

$$Clorofila_b = (24,96 \cdot A_{649} - 7,32 \cdot A_{665}) \cdot \text{fator de diluição} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$$

$$Clorofila_{tot} = Clorofila_a + Clorofila_b \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{Carotenóides}_{tot} \\
 & = \frac{\text{fator de diluição} \cdot 1000 \cdot A_{470} - 2.05 \cdot \text{Clorofila}_a - 114,8 \cdot \text{Clorofila}_b}{245} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}
 \end{aligned}$$

#### 4.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para os dados obtidos foi utilizado médias aritméticas de cada experimento, com o acompanhamento dos erros (desvio padrão) das amostras:

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x)^2 / (n - 1)}$$

Onde:

S = desvio padrão;

$x_i$  = valor individual das amostras;

$x$  = média aritmética dos valores das amostras;

$n$  = número de amostras.

Para verificar a normalidade dos dados obtidos o método de Shapiro foi aplicado. Comprovando a normalidade das amostras, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey utilizando o GraphPad Prism 8.2.1.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM13

#### 5.1.1. Identificação morfológica

O isolado LGMM13 foi identificado como pertencendo ao gênero *Desmodesmus* (FIGURA 3, 4 e 5), por apresentarem células cocóides, de polos arredondadas, formando cenóbios e possuindo ornamentações (espinhos) (AN et al, 1999; HEGEWALD, 2000).

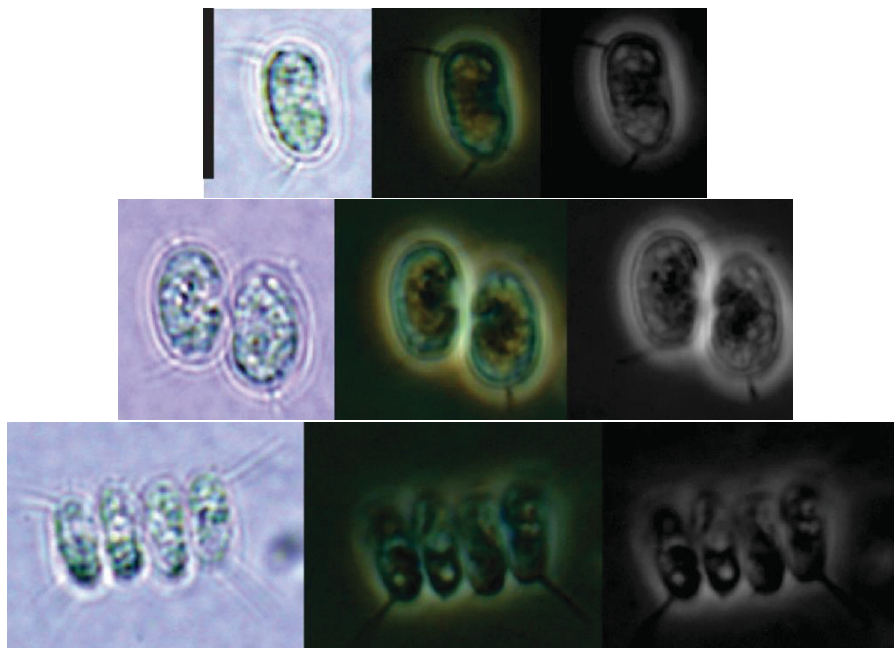
Com base nas imagens obtidas foi feito um quadro com as características do isolado LGMM13e as outras espécies do gênero com características semelhantes (QUADRO 5).

LGMM13 caracteriza-se por possuir células solitárias elípticas, colônias com 2-4 células, com arranjo linear, células marginais e medianas elípticas, com parede lisa ornamentada por tubos, costela e por 2-6 espinhos longos dispostos desordenadamente sobre a superfície celular. Possui pólos arredondados com uma seta por polo marginal, 2,2-6,2 µm de comprimento e 1,5-4 µm de largura celular.

Morfológicamente as espécies mais próximas do isolado LGMM13 são *Desmodesmus asymmetricus* (Schröder) E. Hegewald C., *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E. Hegewald C. e *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt C., no entanto algumas diferenças foram observadas entre o isolado e as três espécies. *D. asymmetricus* apresenta maiores medidas celulares do que o isolado LGMM13, maior número de espinhos, observa-se a ausência de costelas e tubo e a presença de crista. *D. spinosus* apresenta maiores medidas celulares do que o isolado LGMM13, espinhos ordenados nos polos ou sobre a superfície celular e as costelas e tubos são ausentes. *D. subspicatus* também apresenta maiores medidas celulares do que o isolado LGMM13, maior número de espinhos, os espinhos são ordenados nos polos, nas margens ou sobre a superfície celular, observa-se a ausência de costelas e tubos (QUADRO 5).

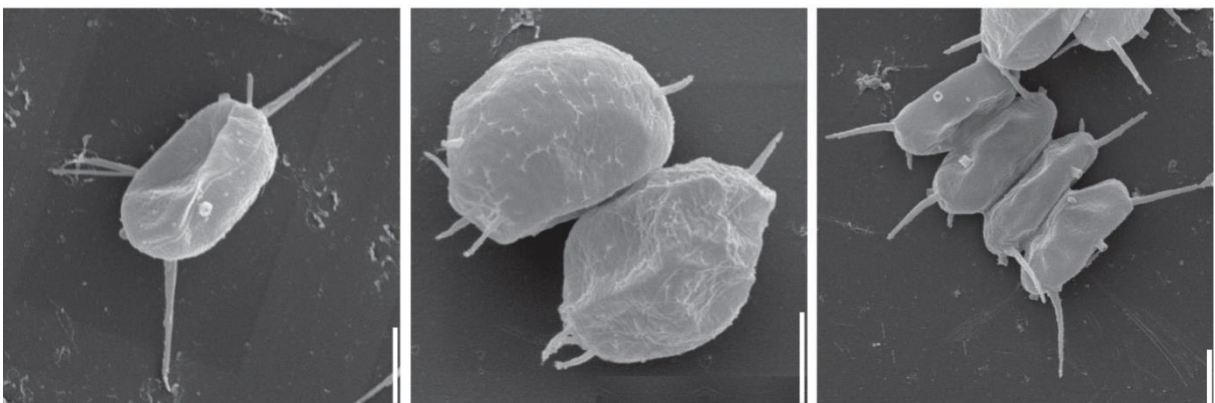
Nota-se que a morfologia comparada destas espécies não é exatamente igual, mas muitos outros fatores podem modificar a morfologia dos indivíduos. As condições do ambiente podem alterar a morfologia celular. No caso do isolado LGMM13, a coleta foi realizada dois anos atrás e desde então cultivada em meio sintético (PASSOS, 2018). Assim, a morfologia destas células pode ter sido levemente alterada ao passar do tempo. Contudo, isto não inviabiliza a identificação morfológica.

FIGURA 3: MICROSCOPIA ÓPTICA DA LINHAGEM LGMM13.



Barra de escala (preta) equivalente a 10  $\mu\text{m}$ . Primeira fileira: célula única. Segunda fileira: cenóbio com duas células. Terceira fileira: cenóbio com quatro células. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 4: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ISOLADO LGMM13.



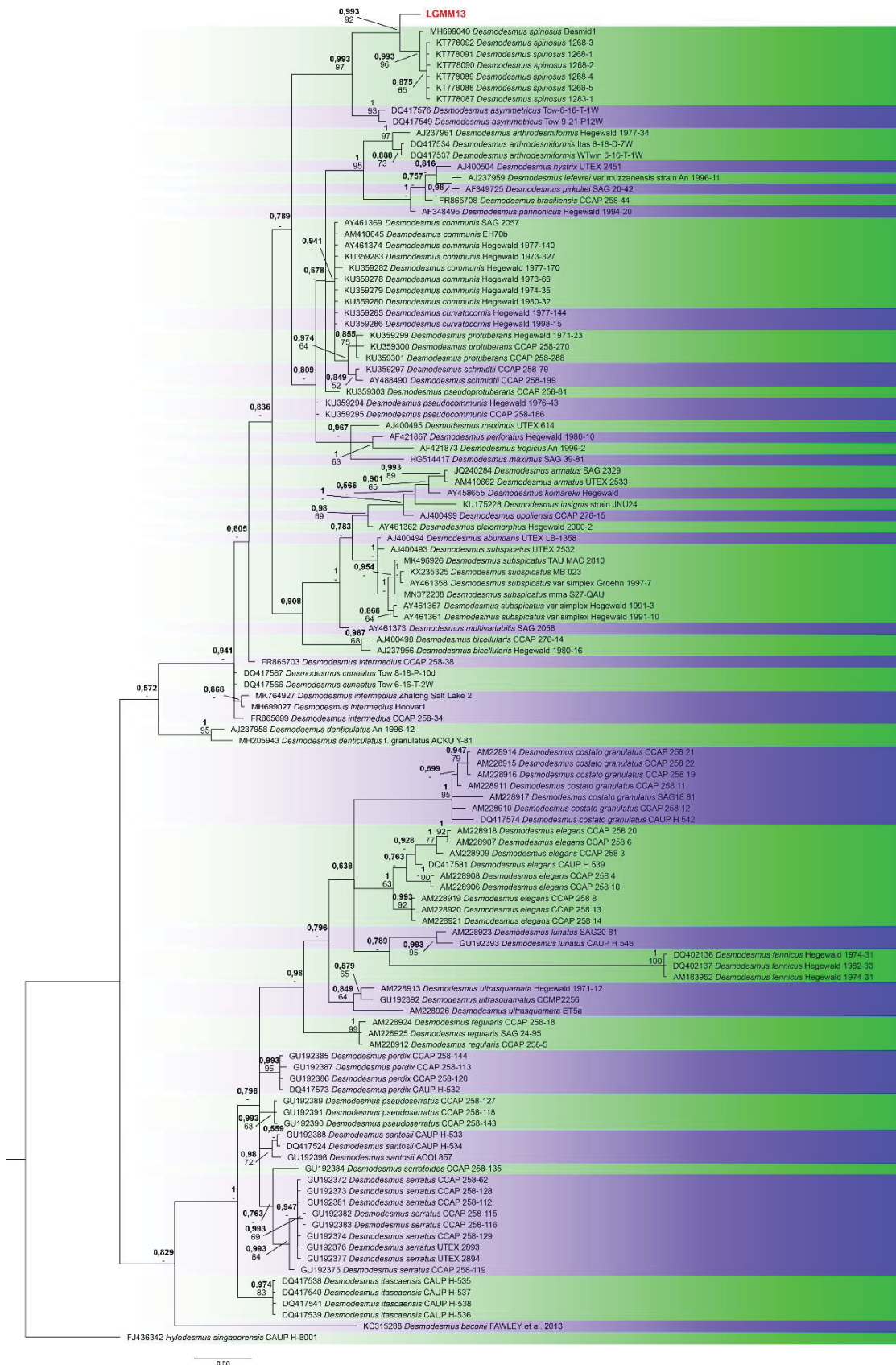
Barra de escala equivalente a 5  $\mu\text{m}$ . Primeira foto: Célula única, presença de espinhos e tubos. Segunda foto: Cenóbio com duas células, presença de espinhos. Terceira foto: Cenóbio com quatro células, presença de espinhos e tubos. FONTE: O autor (2020).

QUADRO 5: RELAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DO ISOLADO LGMM13 E OUTRAS *Desmodesmus* MORFOLOGICAMENTE PRÓXIMAS.

	<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>Desmodesmus asymmetricus</i>	<i>Desmodesmus spinosus</i>	<i>Desmodesmus subspicatus</i>
<b>Cenóbios</b>	Linear	Linear	Linear	Linear, Levemente Alternada
<b>Nº. Células</b>	1-4	2-4-8	2-4 (8)	(1) 2-4-8
<b>Formato Célula Marginal</b>	Elíptica	Retas arqueadas, Elíptica, Cilíndrica	Oblonga, Elíptica, Cilíndrica, Ovíde longa	Oblonga, Elíptica, Oval
<b>Formato Célula Mediana</b>	Elíptica	Oblonga, Elíptica	Oblonga, Elíptica, Cilíndrica	Oblonga, Elíptica, Oval
<b>Polos</b>	Arredondada	Obtusamente arredondada	Arredondada e Cônica	Arredondada
<b>Comprimento (µm)</b>	2,2-6,2	(5-7) 12-15	5-20	4,5-12
<b>Largura (µm)</b>	1,5-4	(2,2) 2,5-4,5	2-8	2,4-7
<b>Seta</b>	Presente	Presente	Presente	Presente
<b>Seta - nº/Cel.</b>	2	2	2	2
<b>Espinhos - nº</b>	2-6	Muitos	2-4	1-10
<b>Espinhos - Medida</b>	Longo	Curto para Longo	Curto para Longo	Curto para Longo
<b>Espinhos - Posição</b>	Sobre a superfície da célula	Sobre a superfície da célula	Sobre a superfície da célula	Nos polos, margens e sobre a superfície da célula
<b>Espinhos - Disposição</b>	Desordenado	Desordenado	Em série ou apical	Em série ou apical
<b>Costela</b>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Crista</b>	Ausente	Presente	Presente ou Ausente	Ausente
<b>Roseta</b>	Ausente	Não Informado	Não Informado	Presente
<b>Verruga</b>	Ausente	Não Informado	Não Informado	Ausente
<b>Ornamentações</b>	Ausente	Não Informado	Não Informado	Ausente
<b>Tubo</b>	Presente	Não Informado	Não Informado	Ausente
<b>Brasil</b>	Presente	Presente	Presente	Presente
<b>Referencia</b>	Este trabalho	Chodat, 1926; Hindak, 1990; Komarek & Fott, 1983; Korshikov, 1953	Comas, 1996; Godinho et al. 2010; Rosini et al. 2013; Chodat, 1926; Komarek & Fott, 1983; Hindak, 1990; Kim, 2015; Hentschke & Torgan, 2010; Moresco & Bueno, 2007; Oliveira, 2015; Patil, 2013; Rosini et al., 2013	Comas, 1996; Hentschke & Torgan, 2010; Correa et al. 2019; Chodat, 1926; Komarek & Fott, 1983; Hindak, 1990; Hentschke & Torgan, 2010; Shubert et al., 2014; Tsarenko et al., 2005

FONTE: O autor (2020).

FIGURA 5: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Desmodesmus* POR INFERÊNCIA BAYESIANA UTILIZANDO SEQUÊNCIAS ITS. VALORES DE PROBABILIDADE POSTERIORI EM NEGRITO E BOOTSTRAP, QUANDO DISPONÍVEL, ESTÃO À ESQUERDA DOS NÓS.



Nota: Em vermelho o isolado deste trabalho. FONTE: O autor (2020).

### 5.1.2. Identificação molecular

Após a obtenção da sequência consenso do isolado LGMM13, foi feita uma pesquisa por sequências do gênero *Desmodesmus* no GenBank, dando preferência para sequências publicadas em artigos de taxonomia. Entretanto, das 63 espécies do gênero aceitas, não foi possível encontrar sequências para 21 espécies.

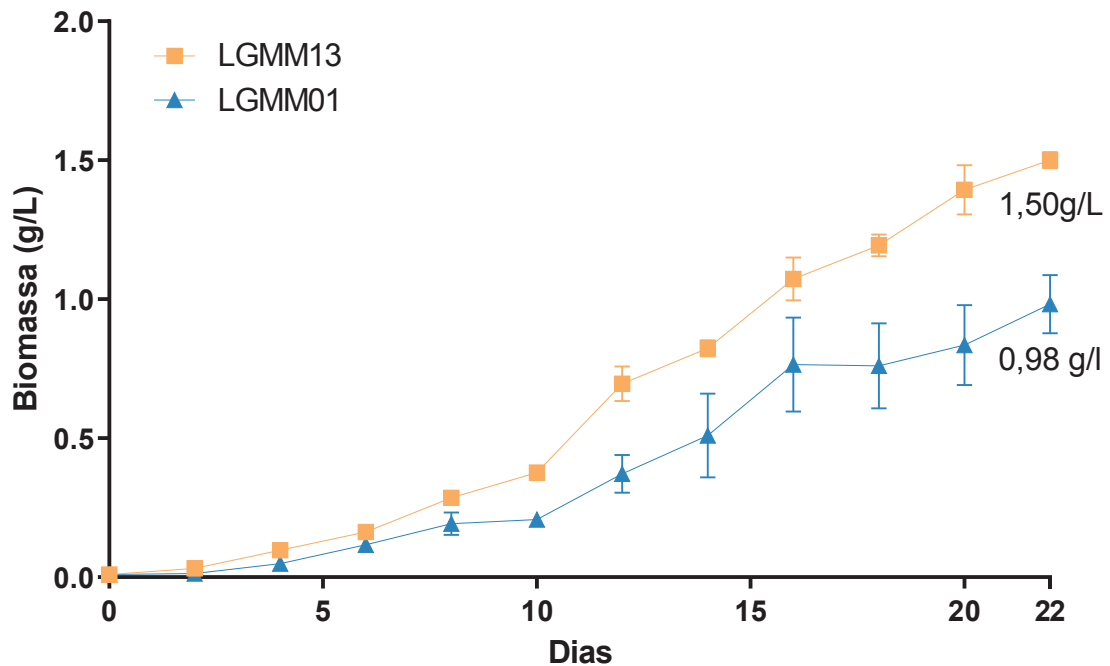
Com base na árvore filogenética utilizando a sequência parcial da região ITS (FIGURA 5) o isolado LGMM13 está localizado próximo as espécies *D. spinosus* e *D. asymmetricus*. Morfologicamente, estas espécies também são similares ao isolado. Nos dados moleculares *D. subspicatus* se encontra mais afastada do isolado que as outras duas mencionadas. Devido a este distanciamento na árvore filogenética, LGMM13 provavelmente não pertença a espécie *D. subspicatus*. O isolado LGMM13 representa provavelmente uma nova espécie devido o distanciamento desta em relação as outras espécies próximas, e baseado nas diferenças morfológicas citadas acima.

### 5.2. CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento dos isolado LGMM13 e da microalga *Tetradismus obliquus* LGMM01 em meio sintético CHU pode ser observada na Figura 6. O cultivo foi iniciado com 0,01 g/L de biomassa seca, a partir do décimo dia ocorreu o início da fase exponencial, porém não está evidente o início da fase estacionária. O valor de biomassa seca do cultivo no 22° dia foi de 1,50 g/L para LGMM13 e 0,98 g/L para LGMM01 ( $p < 0,05$ ).

A partir da biomassa liofilizada foram obtidos os valores de lipídeos totais, clorofila total, carotenóides e carboidratos das amostras (FIGURA 7). O isolado LGMM13 apresentou resultados promissores em relação a *T. obliquus* na produção de carboidratos, com 44,3% de carboidratos em sua biomassa seca ( $p < 0,05$ ). Adicionado o alto crescimento desta microalga comparado com LGMM01, o isolado LGMM13 produziu 66,45 mg/L de carboidrato ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 8). Este isolado tem grande potencial para a produção de etanol a partir destes açúcares, como já foi demonstrado por Rizza et al. (2016) num outro isolado do mesmo gênero.

FIGURA 6: CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO EM MEIO CHU.



FONTE: O autor (2020).

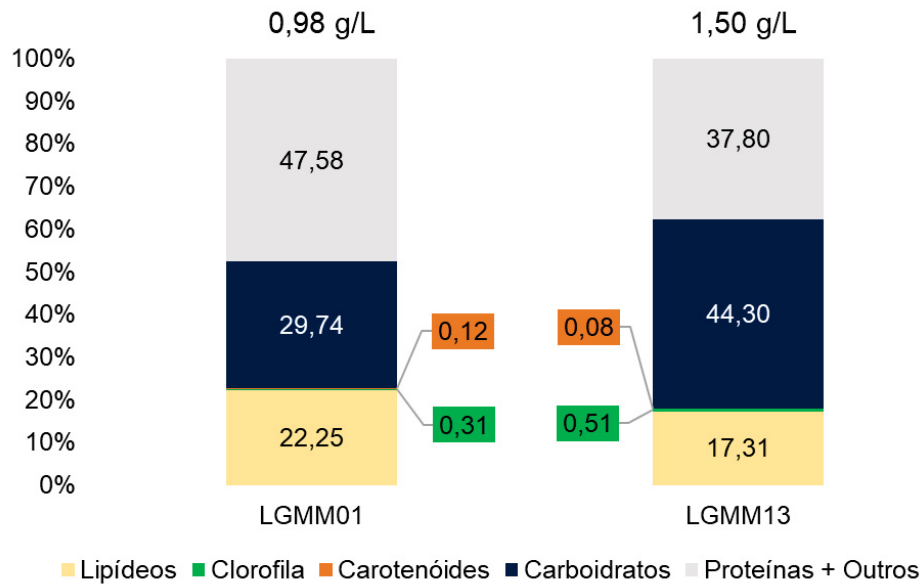
O isolado LGMM01 obteve maior porcentagem de lipídeos totais em sua biomassa, 22,25% ( $p < 0,05$ ). Entretanto, como observado, a obtenção de biomassa no final do experimento pelo isolado LGMM13 foi superior ao obtido em *T. obliquus* (FIGURA 9). Assim, no final do cultivo a produção de lipídeos em mg/L é similar nas duas microalgas ( $p > 0,05$ ). Mesmo assim, os valores encontrados na literatura para a porcentagem de lipídeos na biomassa seca chegam a 71% em *Dunaliella tertiolecta*. Para uma linhagem de *Desmodesmus* sp. citada por Hess et al. (2017), o acúmulo de lipídeos chegou a 50% da biomassa seca. Entretanto, estes valores são com condições de cultivo otimizadas, o que não ocorreu neste experimento.

A produção de clorofila total nos isolados LGMM01 e LGMM13 foi de 0,31% (0,29 g/L) e 0,51% (0,76 g/L) ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a microalga *Chlorella vulgaris* consegue atingir níveis de 1,67% de clorofilas em sua biomassa seca em cultivo otimizado, sendo uma taxa muito maior que a obtida nos isolados (MOHSENPOUR et al, 2019).

Ambos os isolados atingiram 0,12% de sua biomassa em carotenóides. Entretanto, esses ainda não apresentam a eficiência de *Dunaliella salina*, microalga

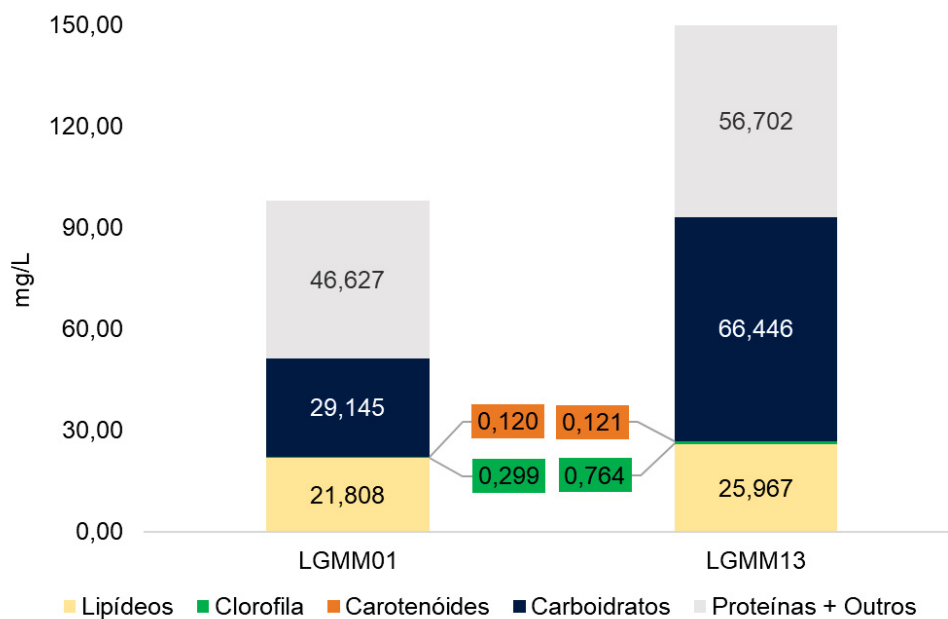
já conhecida pela produção de carotenóides, equivalente a 13% de sua biomassa seca (RAMMUNI et al, 2018).

FIGURA 7: CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPRODUTOS DA BIOMASSA SECA EM PORCENTAGEM DOS ISOLADO LGMM01 E LGMM13 EM MEIO CHU APÓS 22 DIAS.



Acima da coluna estão os valores de biomassa seca obtidos. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 8: PRODUÇÃO DOS BIOPRODUTOS (mg/L) DE MEIO CHU, APÓS 22 DIAS DE CULTIVO DAS LINHAGENS LGMM01 E LGMM13.



FONTE: O autor (2020).

### 5.3. CULTIVO COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO E BICARBONATO DE SÓDIO

Neste experimento, o isolado LGMM13 cresceu em 9 tratamentos distintos incluindo o controle (QUADRO 4). Os cultivos variavam concentração de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  no cultivo.

Até o 16º dia o tratamento com maior recuperação de biomassa foi o tratamento 2 (tratamento com redução de 50% de  $\text{NaNO}_3$ ) com 1,034 g/L ( $p < 0,05$ ). Uma das maiores porcentagens de carboidratos na biomassa seca foi obtida neste tratamento, 66,58% (QUADRO 6). A redução em 50% de  $\text{NaNO}_3$  no início do cultivo em seu meio de cultura pode ter sido a causa do acúmulo de carboidratos na célula (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ E BALLESTEROS, 2012). Outros tratamentos, também apresentaram altas taxas de acúmulo de carboidratos ( $p < 0,05$ ): tratamento 4 – 69,01%; tratamento 6 – 60,23%; tratamento 7 – 65,96%; tratamento 9 – 62,58%. Superando valores que se encontram na literatura (QUADRO 2). Os carboidratos de microalgas já são visados para a produção de bioetanol. O tratamento 2 pode chegar a 0,688 g/L de carboidratos totais no cultivo, superando os valores de Rizza et al. (2016) com 0,371 g/L. A mesma autora conseguiu atingir conversão de 81.4% de açúcares para bioetanol num isolado de *Desmodesmus*, mostrando a viabilidade deste gênero para a produção deste biocombustível.

Para a produção de lipídeos totais os melhores resultados foram o controle (22,05%), tratamento 6 (23,42%), tratamento 8 (22,72%) e tratamento 9 (22,69%). Como não houve um aumento de acúmulo de lipídeos nesses tratamentos, a estratégia de disponibilizar  $\text{NaHCO}_3$  ou de reduzir o  $\text{NaNO}_3$ , estratégia mais utilizada, não seja interessante para este isolado. Principalmente, devido a resultados mais promissores de produção de lipídeos por outras algas (QUADRO1).

A clorofila obteve as suas maiores concentrações no controle (1,94%) e no tratamento 3 (1,78%) ( $p < 0,05$ ), tratamento com redução de 75% de  $\text{NaNO}_3$  no meio de cultura. Nessas condições, LGMM13 obteve resultados superiores a *Chlorella vulgaris*, já em cultivo otimizado, com 1,67% de clorofilas em sua biomassa seca (MOHSENPOUR et al, 2019). Esta é uma indicação de que esta linhagem seja interessante para a produção de clorofila totais. Visto que essas moléculas estão

ganhando importância para a indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (LEVASSEUR et al. 2020).

Os carotenóides tiveram um decréscimo de acumulação em todos os tratamentos. O controle continuou com o maior valor de acúmulo, 1,34% ( $p < 0,05$ ). Entretanto, outras microalgas apresentam maior concentração deste grupo de biomoléculas, como *Dunaliella salina* com 13% de carotenóides na biomassa seca (RAMMUNI et al. 2018).

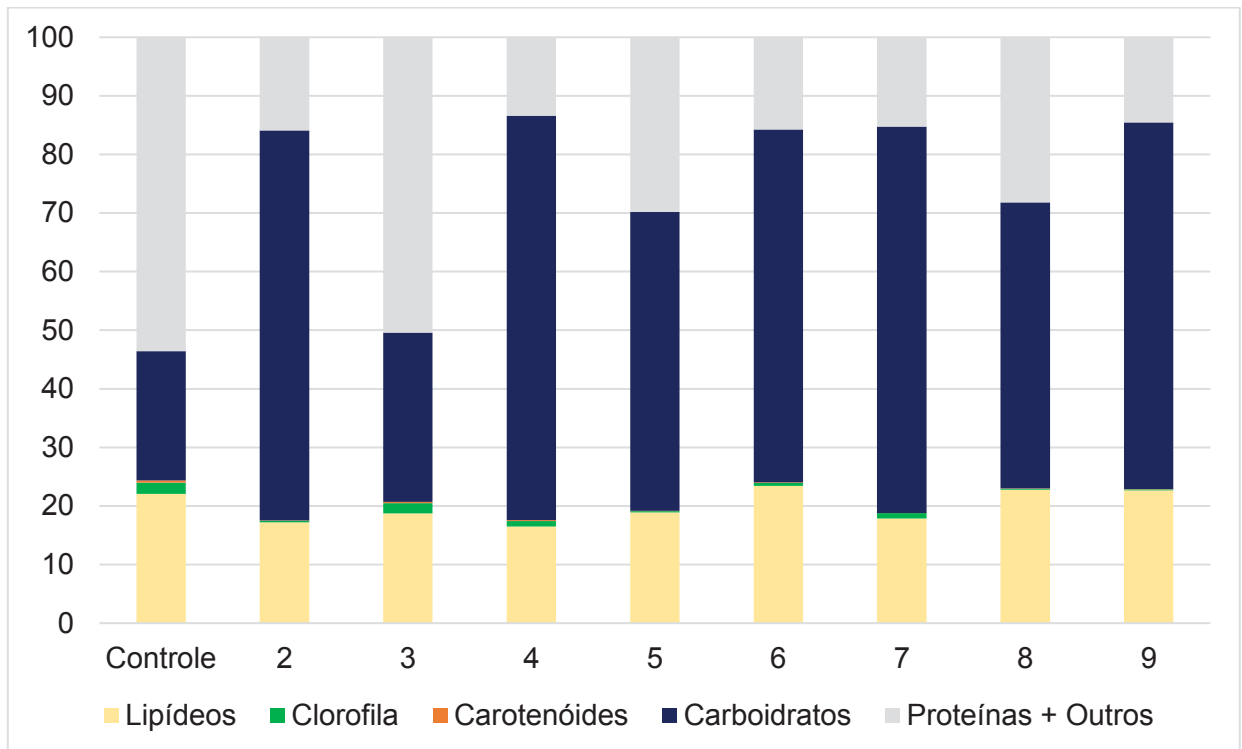
Estes resultados ainda podem ser melhorados, visto que o trabalho se limitou a melhorar a produção dos bioprodutos modificando condições de cultivo. A utilização de técnicas de engenharia genética, como CRISPR/Cas9, pode elevar a eficiência desta alga, principalmente para a produção de biomassa e carboidratos (HU et al. 2019).

QUADRO 6: RELAÇÃO DOS BIOPRODUTOS POR TRATAMENTO DO ISOLADO LGMM13 APÓS 16 DIAS.

Tratamento	Lipídeos %	Clorofila %	Carotenóides %	Carboidratos %	Proteínas + Outros %	Biomassa Seca g/L
Controle	22,05	1,94	0,34	22,07	53,59	0,880
2	17,23	0,25	0,05	66,58	15,89	1,034
3	18,71	1,78	0,22	28,86	50,44	0,896
4	16,49	0,92	0,19	69,01	13,39	0,930
5	18,90	0,22	0,08	50,96	29,85	0,890
6	23,42	0,52	0,10	60,23	15,72	0,617
7	17,85	0,92	0,04	65,96	15,23	0,629
8	22,75	0,18	0,06	48,84	28,18	0,912
9	22,69	0,15	0,04	62,58	14,55	0,775

Em vermelho os melhores resultados ( $p < 0,05$ ). FONTE: O autor (2020).

FIGURA 9: PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS, CLOROFILA, CAROTENÓIDES E CARBOIDRATOS NA BIOMASSA SECA DO ISOLADO LGMM13 PARA CADA TRATAMENTO APÓS 16 DIAS.



(controle) = 0 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,0025g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (2) 0 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,00125g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (3) 0 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,000625g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (4) 1 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,0025g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (5) 1 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,00125g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (6) 1 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,000625g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (7) 1,5 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,0025g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (8) 1,5 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,00125g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; (9) 1,5 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,000625g/L de  $\text{NaNO}_3$ . FONTE: O autor (2020).

## 6.0. CONCLUSÃO

Por meio de análises morfológicas e por análises de sequências de DNA, foi confirmado que a microalga LGMM13 pertence ao gênero *Desmodesmus*. Para confirmar que se trata de uma nova espécie, novos estudos deverão ser conduzidos.

*Desmodesmus* sp. LGMM13 demonstrou ter boa produção de biomassa em cultivos com meio CHU, um meio de baixo custo, como também alta concentração de carboidratos, em comparação com outros trabalhos com este gênero. *Desmodesmus* sp. (LGMM13) maior produção de biomassa seca, e principalmente de carboidratos, comparada com o isolado de *Tetradasmus obliquus* (LGMM01) utilizado no NPDEAS. A privação de nitrogênio foi correlacionada com aumento na produção de biomassa e carboidratos em *Desmodesmus* sp. (LGMM13), denotando seu potencial para a produção de bioetanol.

## REFERÊNCIAS

- ABINANDAN, S. et al. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp. MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 9-16, 2019.
- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D. et al. Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. **Algal Research**, v. 24, p. 477–485, 2017.
- AN, S. S. FRIEDEL, T. HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparison. **Plant Biology**, V. 1, p.418–428, 1999.
- ATKINSON JR, A. W.; GUNNING, B. E. S.; JOHN, P. C. L. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures. **Planta**, v. 107, n. 1, p. 1-32, 1972.
- BALDAUF, S. L. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, n. 3, p. 263–273, 2008.
- BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Carlos: RiMa, 2005.
- BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959
- BRASIL. Lei Nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 mar. 2016. Seção 1. pt. 1.
- BRASIL. AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico 2017**.
- BURKHOLDER, J. M.; GLIBERT, P. M.; SKELTON, H. M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, v. 8, p. 77-93, 2008.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, Mar 2013

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy and Fuels**, v. 23, p. 4166 – 4173, 2009.

CHEN, S.; YAO, H.; HAN, J.; LIU, C.; SONG, J.; SHI, J. L.; ZHU, Y.; MA, X.; GAO, T.; PANG, X.; LUO, K.; LI, Y.; LI, X.; JIA, X.; LIN, Y.; LEON, C. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. **Plos One**. v.5, n.1, p. 8313, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, vol. 26/no. 3, pp. 126–131, 2007.

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

CHU, S. P. The Influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: Part I. Methods and culture media. **Journal of Ecology**, v. 30, n. 2, p. 284–325, 1942.

CHODAT, R. Monographies d'algues en culture pure. **Matériaux pour la flore cryptogamique Suisse**. Vol. 5, Fasc. 2 pp. i–xii, 1–266, 201 Fig., 9 pls. 1913

CHODAT, R. Scenedesmus: étude de génétique, de systématique expérimentale et d'hydrobiologie. **Zeitschrift für Hydrobiologie**, v. 3, p. 71-258, 1926.

CNPE. RESOLUÇÃO Nº 16, DE 29 DE OUTUBRO DE 2018. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. 29 de outubro de 2018.

COMAS, A.; KOMÁREK, J. Taxonomy and nomenclature of several species of *Scenedesmus* (Chlorellales). **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie**, supp. 67, p. 135-157, 1984.

COMAS, A. Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba. **Biblioteca Phycologica**, v. 99, 1996. 1-265 p.

CORRÊA, D. O. et al. Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 33, p. 21463–21475, 2017.

CORRÊA, D. O.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Biomass production and harvesting of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosanas flocculant agent. **Journal of Applied Phycology**, n. 31, p. 857–866, 2019.

COSTA, A.; BARBOSA, G. M. C.; MIYAZAWA, M.; GOMES, P. C.; GATT, I. C. A. Ambiente de Crescimento de Microalgas In: Microalgas de Águas Continentais: Potencialidades e Desafios do cultivo. Vol. 1, **Instituto Agrônomo do Paraná**, Londrina, p. 143 - 175. 2014.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuelsources, **Energy Conversion and Management**, vol. 51/no. 12, pp. 2738-2749, 2010.

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28(3), 350–356, 1956.

DUONG, et al. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. **Energies**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 1835–1849, 2012.

EBENEZER, V.; MEDLIN, L. K.; KI, J. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. **Marine Biotechnology** 2012;14: 129-42.

EMBRAPA. Embrapa Suínos e Aves. Brasília, DF – Brasil, 2019.

FLEURENCE, J.; MASSIANI, L.; GUYADER, O.; MABEAU, S. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilariaverrucosa* and *Palmariapalmata*. **Journal of Applied Phycology**, 1995.

FAWLEY, M. W.; FAWLEY, K. P.; HEGEWALD, E. Taxonomy of *Desmodesmus serratus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) and related taxa on the basis of morphological and DNA sequence data. **Phycologia**. v. 50, p. 23-56, 2011.

FAWLEY, M. W.; FAWLEY, K. P.; HEGEWALD, E. *Desmodesmus baconii* (Chlorophyta), a new species with double rows of arcuate spines. **Phycologia**. v. 52, p. 565-572. 2013.

FUČÍKOVÁ, K., RADA, J. C., LUKEŠOVÁ, A., LEWIS, L. A. Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella Hanagata* (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four Barcode markers. **Nova Hedwigia** 93:29-46, 2011.

GAFFRON, H. RUBIN, J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **The Journal of General Physiology**. v. 13, n.2, p. 52-58, 1942.

GARDNER, R. D. et al. Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Applied Phycology**. v. 24, p. 1311–1320, 2012.

GEORGIANNA, D. R.; STEPHEN, P. M. 'Exploiting Diversity and Synthetic Biology for the Production of Algal Biofuels', **Nature**, vol. 488/no. 7411, pp. 329, 2012.

GODINHO, L. R.; GONZÁLEZ A. A. C.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, v. 37, p. 513-553, 2010.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 1655-1661, 2012.

GRACIANO, V.; VARGAS, J. V. C.; ORDONEZ, J. C. Modeling and simulation of diesel, biodiesel and biogas mixtures driven compression ignition internal combustion engines. **Int. J. Energy Res.** (2015)

GRAMA, B. S. et al. Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 265–275, 2014.

GUIRY, M. D., GUIRY, G. M. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. **AlgaeBase**. <http://www.algaebase.org>. 2019.

HADI, S. I. I. A. et al. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–18, 2016.

HALL, J. D. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**. V. 3. p.529-555. 2010.

HEGEWALD E. Eine neueunterleitung der gattung Scenedesmus Meyen. **Nova Hedwigia** 30: 343-376. 1978.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Algological Studies** 96: 1-18. 2000

HEGEWALD, E. WOLF, M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. **Plant Systematics and Evolution**. n. 241: p. 185-191. 2003

HEGEWALD, E.; BOCK, C.; KRIENITZ, L. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Fottea, Olomouc**. n. 13(2), p. 149–164, 2013.

HEGEWALD, E. BRABAND, A. A taxonomic revision of *Desmodesmus* serie *Desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). **Journal of the Czech Phycological Society**. n. 17(2), p. 191-208, 2017.

HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, n. 61, p. 585-601, 2010.

HESS, S. K. et al. Production of chemicals from microalgae lipids – status and perspectives. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, 2017

HINDÁK, F. Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae), 5. **Biologické Prace**, v. 36, 1990. 1-225 p.

HU, Q.; SOMMERFELD, M. JARVIS, E. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS. A. Microalgae triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**. v. 54, p. 621 – 639. 2008.

HU, Q. et al. Photoprotection capacity of microalgae improved by regulating the antenna size of light-harvesting complexes. **Journal of Applied Phycology**. V. 23, p. 1027-1039, 2019

KAPLAN-LEVY, R. N. et al. Lake Kinneret phytoplankton: integrating classical and molecular taxonomy. **Hydrobiologia**. v. 764, p. 283-302, 2016.

KAVA, V. M.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B. Microalgas: possível solução para um mundo sustentável. In: AZEVEDO, J. L. et al., **Biotecnologia Microbiana Ambiental**. Maringá: Eduem. p.269-300. 2018.

KIM, H. C. *et al.* Treating high-strength saline piggy wastewater using the heterotrophic cultivation of *Acutodesmus obliquus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 51–58, 2016.

KIM, M. K. *et al.* Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2220-2228, Aug 2007

KIM, Y. Algal Flora of Korea. Chlorophyta: Chlorophyceae: Chlorococcales III: Scenedesmaceae. Freshwater Green Algae. **National Institute of Biological Resources**, v. 6, n. 8, 2015.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52 – 63, 2014.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Chlorophyceae (grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (org.). Das Phytoplankton des Süßwassers: Systematic und Biologie. E. **Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung** (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, v. 7, n 1, 1983.1044 p.

KORSHIKOV, O. A. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). **Viznačnik prisnovodnich vodorostej Ukrainskoj RSR**, v. 5, 1953. 1-439 p.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295-326, 2012.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–690, 2012.

LARKUM, Anthony W. D. ROSS, Ian L. KRUSE, Olaf. HANKAMER, Ben. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**. V. 30. p.198-205. 2012.

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

LELIAERT, F. *et al.* Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in PlantSciences**, 31:1–46, 2012.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**. Publicação online, 2020.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. **São Carlos: Rima**, 606 p. 2006.

MARKOU, I.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631–645, 2012.

MÁRQUEZ-REYES, L. A.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. Del P.; VALDEZ-VAZQUEZ, I. Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 23, p. 7291–7300, 2015.

MATA T. M., MARTINS A. A., CAETANO N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, 2010.

MENEZES, M.; TUCCI, A.; PERES, C.K.; FAJAR, A.; BRANCO, C.Z. 2014. Chlorophyceae. In: Forzza, R. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

MEYEN, F. J. F. Beobachtungenübereiniegeniedere Algenformen. **Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Akademie der Naturforscher** 14: 769-778. 1829.

MOHSENPOUR, S. F. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. **Bioresource Technology**. v. 125, p. 75-81, 2012.

MORESCO, C.; BUENO, N. C. Scenedesmaceae (Chlorophyceae - Chlorococcales) de um lago artificial urbano: Desmodesmus e Scenedesmus. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 289-296, 2007.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of process for efficient light utilization in photobioreactors. **q**, v. 12, p. 207-218, 2000.

OLIVEIRA, R. S. **Família Scenedesmaceae (Chlorophyceae, Sphaeropleales) no estado de Goiás: biodiversidade e distribuição geográfica**. 2015. 105 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal.

ONO, E; CUELLO, J. Carbon Dioxide Mitigation using Thermophilic Cyanobacteria. **BiosystemsEngineering**, Amsterdam, v. 96, no. 1, p. 129-134, 2007.

PASSOS, M. F. **Bioprospecção De Microalgas E Obtenção De Mutantes De *Tetrademusobliquus* Para A Produção De Lipídios**. 2018. 71 f. Tese (Mestrado). Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. Paraná 2018.

SCIUTO, K. et al. *Chodatodesmus australis* sp. Nov. (scenedesmaceae, chlorophyta) from antarctica, with the emended description of the genus *Chodatodesmus*, and circumscription of *flechtneria rotunda* gen. Et sp. Nov. **Journal of Phycology**. n. 51, p. 1172-1188, 2015.

SELESU, N. F. H. **Desenvolvimento do processo de produção de microalgas em fotobiorreator industrial usando efluente suíno biodigerido**. 2015. 96 f. Tese (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Paraná. Paraná. 2015

SHUBERT, E.; WILK-WOŹNIAK, E.; LIGEŹA, S. An autecological investigation of *Desmodesmus*: implications for ecology and taxonomy. **Plant Ecology and Evolution**, v. 147, n. 2, p. 202–212, 2014.

SMITH, G. M. *Tetradesmus*, a new four-celled coenobitic alga. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 40: 75-87, 1 pl. 1913.

SMITH, G. M. A monograph of the algal genus *Scenedesmus* based upon pure culture studies. **Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters**, 1916.

PATIL, S. A. Genus *Scenedesmus* Meyen from Mangrul Dam Dist Jalgaon, Maharashtra. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 3, n. 2, p. 204-210, 2013.

PANCHA, I. et al. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**. V. 193, p. 315–323, 2015.

PRANDINI, J. M. et al. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67–75, 2016.

RAEDER, U., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology** 1, 17-20, 1985.

RAMOS, G. J. P. *Cosmarium bahianum*, sp. nov. (Desmidiaceae), a new desmid species from a phytotelm habitat in the Brazilian restinga. **PHYTOTAXA**, v. 291, p. 066 – 072, 2017.

RAMMUNI, M. N. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**. v. 277, P. 128-134, 2019.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, p. 2281-2308, 2013.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.

RIZZA, L. S. et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140-147. 2016.

ROSALINE, X. D. et al. Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, suppl., p. S140–S146, 2012.

ROSINI, E. F. SANT' ANNA, C. L.; TUCCI, A. Scenedesmaceae (Chlocooccales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 661-678, 2013.

SASSANO, C. E. N. et al. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p.1732-1738, 2010.

SCHMIDT, C. J. B. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B. O. A. VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de labiomas microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p 1-16.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivos**. 107 f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação de Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN C.; DURAN E.; ISAMBERT A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 101, No. 2, 87–96, 2006.

TAHER, D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigeridos**. 2013. 2013. (Dissertação)

TER VELD, F. Beyond the fossil fuel era: On the feasibility of sustainable electricity generation using biogas from microalgae. **Energy and Fuels**, v. 26, n. 6, p. 3882–3890, 2012.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 178 – 2014.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, p. 178 – 214. 2004.

TSARENKO, P. M.; PETLOVANNY, O. A. Doploineniek Raznoobrazijuvodoroslej Ukrainy. [Addition to the “Diversity of algae in Ukraine”. – **Algologia Suppl.** 1–130. 2001.

TSARENKO, P. M.; HEGEWALD, E.; BRABAND, A. Scenedesmus-like algae of Ukraine. 1. Diversity of taxa from water bodies in Volyn Poissia. **Algological Studies**, v. 118, p. 1-45, 2005.

VANORMELINGEN, P. et al. THE SYSTEMATICS OF A SMALL SPINELESS DESMODESMUS SPECIES, D. COSTATO-GRANULATUS (SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYCEAE), BASED ON ITS2 rDNA SEQUENCE ANALYSES AND CELLWALL MORPHOLOGY. **Journal of Phycology**. v. 43, p. 378-396, 2007.

VIANCELLI, A. et al. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1539-1544, Jan 2013

WASE N., BLACK P., DIRUSSO C. Innovations in improving lipid production: Algal chemical genetics. **Progress in Lipid Research**. v. 71, p. 101–123, 2018.

WHITE, D. A. et al. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **Journal of Applied Phycology**. V. 25, p. 153-165, 2013.

WYNNE, M. J.; HALLAN, J. K. Reinstatement of *Tetradasmus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). **Feddes Repertorium**, v. 126, n. 3–4, p. 83–86, 2016.

YEN, H.; HU, I.; CHEN, C.; HO, S.; LEE, D.; CHANG, J. Microalgae-based biorefinery-from biofuels to natural products. **Bioresource technology**, 135, 166-74, 2013.

## ANEXO

## ANEXO 1: RELAÇÃO DAS ESPÉCIES E SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NO TRABALHO.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Código NCBI</b>	<b>Referência</b>
<i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchner) E.H.Hegewald C	UTEX LB 1358	AJ400494	-
<i>Desmodesmus aculeolatus</i> (Reinsch) P.M.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus ambuehlii</i> (Hindák) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus armatus</i> (Chodat) E.H.Hegewald C	UTEX2533	AM410662	Fawley et al. (2013)
	SAG 2329	JQ240284	Hegewald et al. (2013)
<i>Desmodesmus arthrodesmiformis</i> (Schröder) S.S.An, Friedl & E.Hegewald C	Hegewald 1977-34	AJ237961	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus asymmetricus</i> (Schröder) E.Hegewald C	Tow 9/21 P- 12W	DQ417549	Fawley et al. 2013
	Tow 6/16 T- 1W	DQ417576	Hegewald et al. (2013)
<i>Desmodesmus baconii</i> M.Fawley, K.Fawley & E.Hegewald C	Fawley et al. 2013	KC315288	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus bicaudatus</i> (Dedusenko) P.M.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus bicellularis</i> (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald C	Hegewald 1980-16	AJ237956	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 276/14	AJ400498	Fawley et al. (2013)
	KLL-G009	KP726230	Kaplan-Levy et al. (2016)
	KLL-G009	KP726231	Kaplan-Levy et al. (2016)
	KLL-G009	KP726232	Kaplan-Levy et al. (2016)
<i>Desmodesmus brasiliensis</i> (Bohlin) E.Hegewald C	CCAP 258/44	FR865708	-
	GS2L	AB917109	-
	GS2i	AB917106	-
	GS2n	AB917111	-
<i>Desmodesmus caudatoaculeatus</i> (Chodat) P.M.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus communis</i> (E.Hegewald) E.Hegewald C	EH70b	AM410645	Hegewald & Braband (2017)

	SAG 2057	AY461369	Sciuto et al. (2015)
	Hegewald 1977-140	AY461374	Hegewald & Braband (2017)
	Hegewald 1981-14	AY488490	Fawley et al. (2013)
	Hegewald 1973-66	KU359278	Hegewald & Braband (2017)
	Hegewald 1974-35	KU359279	Hegewald & Braband (2017)

<i>Desmodesmus communis</i> (E.Hegewald) E.Hegewald C	Hegewald 1980-32	KU359280	Hegewald & Braband (2017)
	Hegewald 1977-170	KU359282	Hegewald & Braband (2017)
	Hegewald 1973-327	KU359283	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus costato-granulatus</i> (Skuja) E.Hegewald C	CCAP 258/12	AM228910	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/11	AM228911	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/21	AM228914	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/22	AM228915	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/199	AM228916	Vanormelingen et al. (2007)
	SAG18.81	AM228917	Vanormelingen et al. (2007)
	CAUP H 542	DQ417574	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus cuneatus</i> (Skabichevskij) E.Hegewald C	Tow 8/18 P- 10d	DQ417567	-
	Tow 6/16 T- 2W	DQ417566	-
<i>Desmodesmus curvatocornis</i> (Proshkina- Lavrenko) E.Hegewald C	Hegewald 1977-144	KU359285	Hegewald & Braband (2017)
	Hegewald 1998-15	KU359286	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus denticulatus</i> (Lagerheim) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald C	An 1996-12	AJ237958	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus dispar</i> (Brébisson) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus echinulatus</i> (Dedusenko) P.M.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus elegans</i> (Hortobágyi) E.H.Hegewald & Vanormelingen C	CCAP 258/10	AM228906	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/6	AM228907	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/4	AM228908	Fawley et al. (2013)
	CCAP 258/3	AM228909	Vanormelingen et al. (2007)

	CCAP258/20	AM228918	Fawley et al. (2013)
	CCAP 258/8	AM228919	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/10	AM228920	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP 258/14	AM228921	Vanormelingen et al. (2007)
	CAUP H 539	DQ417581	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus eupectinatus</i> (Dedusenko) P.M.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui

<i>Desmodesmus fennicus</i> E.H.Hegew & Vanormelingen C	Hegewald 1974-31	AM183952	Fawley et al. (2013)
	Hegewald 1974-31	DQ402136	Vanormelingen et al. (2007)
	Hegewald 1982-33	DQ402137	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus flavescens</i> (Chodat) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus gracilis</i> (Matvienko) P.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus grahneisii</i> (Heynig) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus granulatus</i> (West & G.S.West) Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus hystricoides</i> (Massjuk) P.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus hystrix</i> (Lagerheim) E.Hegewald C	UTEX 2451	AJ400504	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus insignis</i> (West & G.S.West) E.Hegewald C	JNU24	KU175228	-
<i>Desmodesmus intermedius</i> (Chodat) E.Hegewald C	Zhalong Salt Lake 2	MK764927	-
	Hoover1	MH699027	-
	CCAP 258/38	FR865703	-
	CCAP 258/34	FR865699	-
<i>Desmodesmus itascaensis</i> M.Fawley, K.Fawley & E.Hegewald C	CAUP H 535	DQ417538	Fawley et al. (2011)
	CAUP H 536	DQ417539	Fawley et al. (2011)
	CAUP H 537	DQ417540	Fawley et al. (2011)
	CAUP H 538	DQ417541	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus kissii</i> (Hortobágyi) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus komarekii</i> (E.Hegewald) E.H.Hegewald C	Hegewald	AY458655	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus lefevrei</i> (Deflandre) S.S.An, T.Friedl & E.H.Hegewald C	An 1996-11	AJ237959	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus lunatus</i> (West & G.S.West) E.Hegewald C	SAG20.81	AM228923	Fawley et al. (2013)
	CAUP H 546	GU192393	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus magnus</i> (Meyen) Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui

<i>Desmodesmus maximus</i> (West & G.S.West) Hegewald C	SAG 39.81	HG514417 A	Sciuto et al. (2015)
<i>Desmodesmus maximus</i> (West & G.S.West) Hegewald C	UTEX 614	AJ400495	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus microspina</i> (Chodat) Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus multicauda</i> (Massjuk) P.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus multiformis</i> (E.Hegewald & Hindák) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus multivariabilis</i> E.Hegewald, A.Schmidt, A.Braband, & P.Tsarenko C	SAG 2058	AY461373 A	Sciuto et al. (2015)
<i>Desmodesmus opoliensis</i> (P.G.Richter) E.Hegewald C	CCAP 276/15	AJ400499	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus pannonicus</i> (Hortobágyi) E.Hegewald C	Hegewald 1994-20	AF348495	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus perdix</i> M.Fawley, K.Fawley & E.Hegewald C	CAUP H 532	DQ417573	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/144	GU192385	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/120	GU192386	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/113	GU192387	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus perforatus</i> (Lemmermann) E.Hegewald C	Hegewald 1980-10	AF421867	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus pirkollei</i> E.Hegewald C	SAG20.42	AF348496	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus pleiomorphus</i> (Hindák) E.Hegewald C	Hegewald 2000-2	AY461362	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodesmus polyspinosus</i> (Hortobágyi) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus protuberans</i> (F.E.Fritsch & M.F.Rich) E.Hegewald C	Hegewald 1971-23	KU359299	Hegewald & Braband (2017)
	CCAP 258/270	KU359300	Hegewald & Braband (2017)
	CCAP 258/288	KU359301	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus pseudocommunis</i> Hegewald C	Hegewald 1976-43	KU359294	Hegewald & Braband (2017)
	CCAP 258/166	KU359295	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus pseudodenticulatus</i> (E.Hegewald) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus pseudoprotuberans</i> Hegewald C	CCAP 258/81	KU359303	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus pseudoserratus</i> M.Fawley, K.Fawley & E.Hegewald C	CCAP 258/127	GU192389	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/143	GU192390	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/118	GU192391	Fawley et al. (2011)

<i>Desmodesmus regularis</i> (L.Péterfi) E.H.Hegewald & P.Vanormelingen C	CCAP 258/5	AM228912	Vanormelingen et al. (2007)
	CCAP258/18	AM228924	Vanormelingen et al. (2007)
	SAG24.95	AM228925	Vanormelingen et al. (2007)
<i>Desmodesmus santosii</i> E.Hegewald, K.Fawley & M.Fawley C	CAUP H 534	DQ417524	Fawley et al. (2011)
	CAUP H 533	GU192388	Fawley et al. (2011)
	ACOI 857	GU192398	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus schmidtii</i> Hegewald C	CCAP 258/199	AY488490	Hegewald & Braband (2017)

<i>Desmodesmus schmidtii</i> Hegewald C	CCAP 258/79	KU359297	Hegewald & Braband (2017)
<i>Desmodesmus schnepfii</i> (E.Hegewald & S.S.An) E.Hegewald C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus serratooides</i> M.Fawley, K.Fawley & E.Hegewald C	CCAP 258/135	GU192384	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus serrato-pectinatus</i> (Chodat) P.Tsarenko C	Não possui	Não possui	Não possui
<i>Desmodesmus serratus</i> (Corda) S.S.An, Friedl & E.Hegewald C	CCAP 258/62	GU192372	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/128	GU192373	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/129	GU192374	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/119	GU192375	Fawley et al. (2011)
	UTEX 2893	GU192376	Fawley et al. (2011)
	UTEX 2894	GU192377	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/112	GU192381	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/115	GU192382	Fawley et al. (2011)
	CCAP 258/116	GU192383	Fawley et al. (2011)
<i>Desmodesmus spinosus</i> (Chodat) E.Hegewald C	Desmid1	MH699040	-
	1268_3	KT778092	-
	1268_1	KT778091	-
	1268_2	KT778090	-
	1268_4	KT778089	-
	1268_5	KT778088	-
	1283_1	KT778087	-
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt C	mma-S27- QAU	MN372208	-
	TAU-MAC 2810	MK496926	-
	MB 023	KX235325	-
	Hegewald 1991-3	AY461367	-

	Hegewald 1991-10	AY461361	-
	Groehn 1997- 7	AY461358	-
<i>Desmodemus tropicus</i> (W.B.Crow) E.Hegewald C	An 1996-2	AF421873	Fawley et al. (2013)
<i>Desmodemus ultrasquamatus</i> E.H.Hegewald & Vanormelingen C	Hegewald 1971-12	AM228913	Fawley et al. (2013)
	ET5a	AM228926	Fawley et al. (2013)
	CCMP2256	GU192392	Fawley et al. (2011)