

## Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual

### Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater

Fabiano Cleber Bertoldi<sup>I\*</sup> Ernani Sant'Anna<sup>I</sup> Jorge Luiz Barcelos Oliveira<sup>II</sup>

#### RESUMO

O cultivo de microalgas representa uma potencial fonte de biomassa rica em clorofila e sais minerais como: fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio. Este experimento teve como objetivo avaliar a composição de minerais, bem como determinar o teor de clorofila a e b da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual em três diferentes concentrações comparadas com um cultivo controle. Os resultados mostraram que os teores de clorofila a e b da microalga não apresentaram diferença significativa entre os cultivos. Com relação à composição dos sais minerais, a *Chlorella* cultivada na solução residual mais concentrada apresentou valores superiores quando comparada com a cultivada nos demais cultivos. Dessa forma, a biomassa da *Chlorella vulgaris* demonstrou ser uma potencial fonte de clorofila e de sais minerais, quando cultivada em solução hidropônica residual, possibilitando a utilização desse resíduo de forma sustentável.

**Palavras-chave:** microalgas, hidroponia, efluentes.

#### ABSTRACT

The microalgae cultivate represents a potential source of biomass rich in chlorophyll and minerals as: P, Fe, Mn, Cu, Zn, Mg and Ca. This research was aimed at evaluating the composition of minerals, as well as, determining the content of chlorophyll a and b from the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater in three different concentrations compared with the control cultivate. The results showed that the contents of chlorophyll a and b of the microalgae did not show significant difference between the cultivates. In relation to the composition of the minerals, the *Chlorella* cultivated in the most concentrated wastewater, showed higher values when compared with the one cultivated in the others cultures. In this manner, the *Chlorella vulgaris* biomass

demonstrated to be a potential source of chlorophyll and minerals, when cultivated in hydroponic wastewater, allowing the use of this residue in a sustainable way.

**Key words:** microalgae, hydroponic, effluents.

#### INTRODUÇÃO

A técnica de hidroponia utiliza uma solução nutritiva que alimenta as plantas substituindo o solo. Entretanto, essa solução precisa ser trocada periodicamente, gerando uma solução hidropônica residual, rica em nutrientes, tendo o nitrogênio em maior concentração e predominantemente na forma de nitrato. Dessa forma, o descarte direto ao meio ambiente dessa solução, pode vir a causar problemas ambientais como, por exemplo, a eutrofização.

Meios de cultura alternativos vêm sendo avaliados para o cultivo de *Chlorella*, entre eles estão os efluentes industriais, efluentes de biodigestores, lodo digerido, esgoto doméstico e resíduos de suinocultura (PIPES & GOTAAS, 1960; WONG & LAY, 1980; JUSSIÁK et al., 1984; RODRIGUES, 2000; SÁNCHEZ et al., 2001).

A utilização de microalgas como fonte de alimento, tanto para humanos como para animais, vem se destacando por apresentar potencial fonte de proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas, sais minerais, pigmentos, enzimas, antibióticos e outros metabólitos biologicamente ativos (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988; GOUVEIA et al., 2006). No caso

<sup>I</sup>Laboratório de Biotecnologia Alimentar, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: fabianobertoldi@hotmail.com. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Laboratório de Hidroponia, Departamento de Engenharia Rural, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

da microlaga *Chlorella*, além de ser excelente fonte de proteínas, é uma boa fonte de sais minerais como fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio (BECKER & VENKATARAMAN, 1981).

Dentre os metabólitos microalgais, a clorofila foi muito pouco investigada. São os únicos pigmentos naturais de coloração verde em abundância, mas sua instabilidade ao isolamento tem restringido a sua utilização como corante natural na indústria de alimentos (TAYLOR, 1984; HENDRY, 1996). Além disso, sabe-se que a ingestão de clorofila promove efeitos estimulantes no crescimento de tecidos, atuando como uma substância promotora da multiplicação de fibroblastos, células do tecido conjuntivo responsáveis pelo processo de cicatrização (TANAKA et al., 1997; YAMAGISHI et al., 1997).

Este trabalho teve como finalidade avaliar a composição de sais minerais e o teor de clorofila *a* e *b* presentes na microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual.

## MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Chlorella vulgaris* foi cedida pelo Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos. O meio de cultura para a manutenção da microalga foi o *Bold's Basal Medium* (BBM) contendo em mg.L<sup>-1</sup>: NaNO<sub>3</sub>, 250; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 175; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 25; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 75; NaCl, 25; EDTA, 50; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 4,98; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 11,42; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 8,82; NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,72; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,38; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1,44; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 1,57; tiamina, 10; biotina, 0,1; vitamina B12, 0,01 e pH ajustado em 6,8.

A cultura foi mantida sob aeração constante, temperatura controlada a 25±2 °C, pH 6,8 e iluminação contínua de 150 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40w. Um cultivo contendo densidade celular de 2,5x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> de *Chlorella vulgaris* em meio BBM serviu de inóculo. Alíquotas de 180mL da cultura estoque foram transferidas para fotobiorreatores de vidros cônicos invertidos de 4L contendo 3,7L dos seguintes meios de cultura: BBM, que foi considerado como controle; solução hidropônica residual (SHR), solução hidropônica residual na proporção de 1:1 com água deionizada (SHR50) e solução hidropônica residual na proporção de 1:3 (25% de resíduo e 75% de água deionizada), denominada de SHR25, totalizando, desta forma, quatro tratamentos experimentais (BBM, SHR, SHR50 e SHR25), que foram realizados em quatro repetições independentes e cada parâmetro analisado em triplicata.

A solução hidropônica residual foi obtida após sete dias de uso no cultivo de alface hidropônica no Laboratório de Hidroponia da Universidade Federal de Santa Catarina, com caracterização físico-química

expressa na tabela 1, determinada conforme metodologia da APHA (1998). A solução residual foi filtrada e esterilizada em autoclave por 20 minutos, à temperatura de 121°C, com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos contaminantes.

A densidade celular da microalga *Chlorella vulgaris* foi avaliada, em todos os tratamentos, através da contagem do número de células em câmara Neubauer. Já a determinação de proteína da biomassa algal foi realizada pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando aproximadamente 10mg de amostra liofilizada, conforme metodologia da AOAC (1984).

O conteúdo de clorofila *a* e *b* foi extraído da biomassa fresca com acetona 90% e determinado por método espectrofotométrico, segundo metodologia desenvolvida por STRICKLAND & PARSONS (1972).

Os minerais foram determinados conforme a AOAC (1984), submetendo-se primeiramente as amostras liofilizadas a uma digestão com solução nitro-perclórica (2:1). Os minerais foram então, quantificados por espectrofotometria de absorção atômica, com as leituras feitas em aparelho da marca Perkin Elmer modelo 3300, usando-se lâmpada específica para cada mineral e padrões da Merck para construção das curvas analíticas. A determinação de fósforo foi realizada por método espectrofotométrico, segundo metodologia da AOAC (1984).

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância e teste Tukey em nível de 5% de significância, visando-se a examinar diferenças entre as médias de cada tratamento para densidade celular, conteúdo de proteínas e teores de clorofila *a* e *b*.

Tabela 1 - Características físico-químicas da solução hidropônica residual

Parâmetros	Valor médio
pH	5,0
Condutividade	1,9mS cm <sup>-1</sup>
Demanda química de oxigênio	23,94mg L <sup>-1</sup>
Demanda bioquímica de oxigênio	5,40mg L <sup>-1</sup>
Amônia	26,60mg L <sup>-1</sup>
Nitrato	226,50mg L <sup>-1</sup>
Nitrito	0,27mg L <sup>-1</sup>
Fósforo total	35,00mg L <sup>-1</sup>
Cálcio	99,17mg L <sup>-1</sup>
Magnésio	22,12mg L <sup>-1</sup>
Ferro	1,95mg L <sup>-1</sup>
Manganês	0,26mg L <sup>-1</sup>
Cobre	0,04mg L <sup>-1</sup>
Zinco	0,11mg L <sup>-1</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 mostra os valores médios da densidade celular, percentagem de proteína bruta e teores de clorofila *a* e *b* da *Chlorella vulgaris*, após sete dias de cultivo nos diferentes tratamentos analisados.

A densidade celular no cultivo SHR25 não apresentou diferença significativa em relação ao controle (BBM). Os demais cultivos (SHR e SHR50) foram significativamente inferiores ao cultivo controle, porém não apresentaram diferença estatística entre si.

Somente a biomassa obtida em SHR apresentou teor de proteína semelhante ao BBM, não apresentando diferença significativa. Os demais cultivos, SHR50 e SHR25, apresentaram conteúdos de proteína significativamente inferiores aos cultivos BBM e SHR.

O nitrato foi a fonte de nitrogênio predominante na composição da solução hidropônica residual (Tabela 1). Dessa forma, a diluição do resíduo (SHR50 e SHR25) ocasionou a diminuição da concentração desse nutriente no meio, fazendo com que a assimilação de nitrogênio pela microalga diminuísse, originando uma biomassa com menor teor protéico (SHR25).

Os resultados obtidos são coerentes com os encontrados em outros estudos citados na literatura, nos quais o teor de proteína de *Chlorella* cultivada em meios sintéticos variou de 40 a 55% (BECKER & VENKATARAMAN, 1981). Em outro experimento, esses valores são relativamente mais altos, variando entre 51 a 58% (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988). QUEVEDO et al. (1999) relatam que obtiveram aproximadamente 45% de proteína cultivando *Chlorella vulgaris* em um sistema autotrófico em meio sintético.

Em relação ao conteúdo de clorofila *a* e *b*, verificou-se que não houve diferença significativa entre os cultivos. Esperava-se que o teor de clorofila na microalga diminuísse com a diluição da solução hidropônica residual (SHR50 e SHR25). Entretanto, a taxa fotossintética não apresentou redução significativa, apesar da redução de nitrogênio no meio, como consequência da diluição. SYRETT (1992) observou comportamento semelhante e concluiu que as células algais podem se recuperar das baixas concentrações de nitrogênio no meio, e que o conteúdo de clorofila aumenta após adaptação.

Quando comparado com os resultados encontrados na literatura, observou-se que os valores de clorofila *a* e *b* foram superiores aos encontrados por RIOBOO et al. (2002), que obtiveram respectivamente 0,14 e 0,05pg cel<sup>-1</sup> em *Chlorella vulgaris* cultivada durante quatro dias em meio sintético similar ao do BBM.

A tabela 3 mostra o perfil dos sais minerais presentes na biomassa liofilizada da *Chlorella vulgaris*. Quando comparado com os resultados encontrados por outros autores, observou-se que a microalga cultivada na solução residual apresentou maior teor de Ca, Mn, Zn, Cu e K em relação à *Chlorella vulgaris* produzida em experimento realizado por DUARTE (2001), que obteve em mg 100g<sup>-1</sup> de biomassa seca os seguintes valores: 350,0 de Ca; 6,3 de Mn; 4,4 de Zn; 4,2 de Cu e 270,0 de K.

Em outro estudo, os valores encontrados por OH-HAMA & MIYACHI (1988) apresentaram menor quantidade de sais minerais quando comparados aos da *Chlorella vulgaris* cultivada na solução hidropônica residual (SHR, SHR50 e SHR25), com exceção para Mg e Zn, com 265,0 e 38,0mg 100g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da densidade celular, da percentagem de proteína bruta e do conteúdo de clorofila *a* e *b* da microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes cultivos.

Cultivos	Densidade celular (cel mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )	Proteína bruta (%)	Clorofila <i>a</i> (pg cel <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>b</i> (pg cel <sup>-1</sup> )
BBM	10,6 ± 2,3a*	52,4 ± 1,7a	0,28 ± 0,01a	0,12 ± 0,02a
SHR	5,7 ± 0,9b	50,5 ± 0,8a	0,29 ± 0,03a	0,12 ± 0,01a
SHR50	4,2 ± 0,4b	44,0 ± 2,3b	0,38 ± 0,04a	0,16 ± 0,02a
SHR25	10,1 ± 2,4a	40,0 ± 3,8b	0,29 ± 0,04a	0,09 ± 0,02a
Média geral	7,65	46,73	0,31	0,12
CV (%)	42,50	12,02	19,47	25,87

CV= Coeficiente de variação.

\*Médias não seguidas por mesma letra, nas colunas, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos teores de sais minerais da biomassa da *Chlorella vulgaris* nos diferentes cultivos.

Minerais	BBM	SHR	SHR50	SHR25
	(mg 100g <sup>-1</sup> )			
Ca	138,8 ± 1,9	2901,6 ± 7,3	2002,5 ± 24,3	1083,3 ± 25,8
P	1300,0 ± 2,5	3530,0 ± 3,2	3243,0 ± 1,0	1607,0 ± 2,0
Mg	227,6 ± 2,7	213,9 ± 2,3	152,9 ± 1,3	147,9 ± 3,2
K	562,6 ± 1,5	663,3 ± 2,3	546,6 ± 3,1	448,7 ± 1,8
Na	10,0 ± 0,4	19,1 ± 0,1	9,3 ± 0,2	6,1 ± 0,1
Fe	79,3 ± 1,5	320,0 ± 3,0	204,4 ± 12	174,4 ± 1,5
Mn	6,2 ± 0,9	37,5 ± 0,5	28,9 ± 0,2	17,2 ± 0,3
Cu	10,9 ± 0,2	9,4 ± 0,2	8,0 ± 0,1	5,3 ± 0,3
Zn	5,0 ± 0,2	23,6 ± 0,3	22,5 ± 0,2	21,1 ± 0,2

Dentre os minerais presentes na composição da *Chlorella vulgaris*, convém ressaltar as concentrações de ferro em relação às principais fontes convencionais, como as carnes vermelhas e as vísceras, sendo o fígado o mais importante, com valores entre 8 a 10mg 100g<sup>-1</sup> (MARTÍNEZ et al., 1999). Já entre as fontes de origem vegetal, as leguminosas secas contêm os maiores valores, podendo variar entre 6,8 a 15,3mg 100g<sup>-1</sup> (CANNIATTI-BRAZAGA & SILVA, 1999).

Levando-se em consideração os conteúdos de clorofila e ferro da *Chlorella vulgaris*, pode-se observar um resultado interessante desses componentes numa única fonte nutricional. Segundo MATSUURA et al. (1991), a administração de clorofila de *Chlorella* em pacientes anêmicos, pode estimular a síntese de hemoglobina, presumivelmente pela clorofila prover uma maior concentração de precursores nas reações de formação de hemoglobina. Dessa forma, uma suplementação com *Chlorella*, conjuntamente com uma suplementação de ferro, pode acelerar a recuperação do paciente anêmico.

## CONCLUSÕES

O cultivo de *Chlorella vulgaris* em solução hidropônica residual representa uma opção atrativa para o desenvolvimento de complementos nutricionais em virtude do alto teor protéico e de substâncias biologicamente ativas presentes na biomassa celular obtidas no processo.

A solução hidropônica residual e suas respectivas diluições (SHR50 e SHR25) demonstraram ser uma boa opção como meio de cultura alternativo no cultivo da *Chlorella vulgaris*, possibilitando a reciclagem desse resíduo de forma sustentável.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da PETROBRAS (projeto nº 360-2002) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20.ed. New York: APHA, 1998. 1325p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14.ed. Arlington, 1984. 1141p.
- BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. **Biotechnology and Exploration of algae** – The India Approach. IGC/AICPA. Mangalore: Sharada, 1981. p.24-79.
- BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. **Micro-algal biotechnology**. Great Britain: Cambridge University, 1988. 466p.
- CANNIATTI-BRAZAGA, S.G.; SILVA, F.C. da. Avaliação do aproveitamento do ferro de leguminosas por diálise “in vitro”. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 1999, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBAN, 1999. p 258.
- DUARTE, I.C.S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella sp* (Chlorophyta, Chlorococcales)**. 2001. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- GOUVEIA, L. et al. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food and Research Technology**, v.222, p.362–367, 2006.
- HENDRY, G.A.F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food**

- colorants. 2.ed. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.131-155.
- JUSSIAK, M.P. et al. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v.18, p.1-7, 1984.
- MARTÍNEZ, C. et al. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v.49, n.2, p.106-113, 1999.
- MATSUURA, E. et al. Effect of *Chlorella* on rats with iron deficient anemia. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v.64, n.4, p.193-204, 1991.
- OH-HAMA, T.; MIYACHI, S. *Chlorella*. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. **Microalgae biotechnology**. Cambridge: University, 1988. p.3-26.
- PIPES, W.O.; GOTAAS, H.B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in seawage. **Applied Microbiology**, v.8, p.163-169, 1960.
- QUEVEDO, H.J.M. et al. Composición bioquímica y evaluación de la calidade proteica de la biomassa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, v.13, n.2, p.123-128, 1999.
- RIOBOO, C. et al. Physiological of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. **Aquatic Toxicology**, v.59, p.225-235, 2002.
- RODRIGUES, J.B.R. **Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – Valorização e tratamento**. 2000. 118f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.
- SÁNCHEZ, S. et al. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.443-449, 2001.
- SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In: \_\_\_\_\_. **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic, 1992. p.171-183.
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A practical handbook of seawater analysis. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, v.2, p.167, 1972.
- TANAKA, K. et al. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Medica**, v.63, n.5, p.465-466, 1997.
- TAYLOR, A.J. Natural colours in food. In: WALFORD, J. **Developments in food colours**. Manchester: Elsevier Applied Science, 1984. V.2, p.159-206.
- YAMAGISHI, Y. et al. Therapy for gastric ulcer with *Chlorella*. **Japanese Medical Journal**, v.32, p.25-27, 1997.
- WONG, M.H.; LAY, C.C. The comparison of soybean wastes using tea leaves and sewage sludge for growing *Chlorella pyrenoidosa*. **Environmental Pollution**, v.23, p.247-259, 1980.