
Características nutraceuticas, herramientas de cultivo y estudio genotóxico de *Spirulina*

Andressa Ribas Barreto, Maria Angélica Oliveira Linton

<https://doi.org/10.4322/mp.2020.001.05>

Resumen

La *Spirulina* como producto o suplemento alimenticio ha permanecido en la dieta de muchas sociedades por siglos. En los últimos años se ha evidenciado un auge en el consumo de microalgas como alimento en países occidentales, lo que trajo la necesidad de garantizar productos libres de elementos tóxicos. El cultivo de *Spirulina* puede ser muy variado, siendo los sistemas abiertos los más utilizados para producción de biomasa. Diversos medios de cultivo se han propuesto para el mantenimiento y desarrollo de *Spirulina*, buscando aumentar la producción y rendimientos tanto en biomasa como en bioproductos, y disminuir los costos. Así, medios de cultivo con adición de fertilizantes inorgánicos del tipo NPK pueden servir como una fuente alternativa importante, ya que tienen altas concentraciones de los nutrientes requeridos por la microalga para generar biomasa. *Spirulina* posee una composición química que la acredita como un alimento altamente nutritivo, esto por la alta proporción de proteínas, aminoácidos esenciales y otros compuestos de importancia alimentaria. Además, *Spirulina* contiene compuestos bioactivos que le proporcionan características para ser catalogada como un alimento funcional. Productos con estas condiciones, deben tomar en consideración efectos colaterales por sustancias tóxicas. Pruebas simples, específicas y económicas, como la prueba de *Allium cepa*, se presenta como una metodología que garantiza la evaluación genotóxica y la actividad antiproliferativa de la biomasa de *Spirulina* con fines de alimentación.

Palabras clave: Alimento funcional, *Allium cepa*, biomasa, microalgas.

1. Introducción

En las últimas décadas, el cultivo industrial de microalgas ha aumentado debido al potencial que estos microorganismos poseen para desarrollar aplicaciones comerciales. Actualmente, las microalgas se usan en muchas actividades y para diversos propósitos, tales como producción de: biopigmentos y antioxidantes, marcadores fluorescentes, enzimas, medicamentos, exopolisacáridos (utilizados como agentes gelificantes, emulsionantes, floculantes y humectantes) y diferentes nutrientes, como vitaminas, proteínas, minerales, lípidos, carbohidratos y compuestos químicos de interés cosmético / farmacéuticos [1].

El consumo de microalgas como fuente de alimento humano se remonta al siglo XIV en el Imperio Precolombino. Sin embargo, su experiencia comercial tiene algunas décadas, desde principios de la década de 1950, cuando debido al aumento incipiente

de la población mundial, aparecieron fuentes alternativas de proteínas con el objetivo de equilibrar la posible escasez de alimentos [2].

Luego, las microalgas aparecieron como una buena fuente de proteínas y continuaron como tales, pero también con creciente interés debido a los ingredientes bioactivos que se encuentran en estos microorganismos, lo que les da un gran potencial como fuente de alimento y moléculas funcionales [3]. Las evaluaciones nutricionales han demostrado que la biomasa de microalgas es beneficiosa como suplemento dietético o sustituto de las fuentes convencionales de proteínas [4].

En las últimas tres décadas, aumentó el número de investigaciones y empresas relacionadas con producción de productos y derivados microalgales. Algunas de estas empresas han estado en el mercado durante muchos años y han producido con éxito la biomasa de estos organismos comercializándolos en forma de cápsulas, tabletas y polvo [5].

La biomasa de microalgas se clasifica como "suplemento dietético" según el Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos de Norteamérica. En Brasil, las microalgas se han incluido en la lista de nuevos ingredientes aprobados por los Comités Asesores Técnico-Científicos sobre Alimentos Funcionales y Nuevos Alimentos (CTCAF), Anvisa (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria), siempre que el producto final para el cual sea agregado la microalga, esté debidamente registrado [6].

Para reducir posibles acciones tóxicas, se han desarrollado diferentes métodos de detección, incluida la detección rápida. Varios estudios han demostrado que las pruebas en plantas son adecuadas para detectar el potencial genotóxico de diferentes contaminantes. *Allium cepa* es una de las especies más utilizadas para el estudio de toxicidad general, de citotoxicidad y genotoxicidad. También proporciona resultados comparables a otros sistemas de prueba, utilizando muchos organismos diferentes, tanto eucariotas como procariontes [7]. La utilidad de la prueba de *A. cepa* para productos alimenticios ya se ha demostrado con éxito [8]. El cultivo de microalgas para fines alimentarios debe tener una calidad nutricional y toxicológica adecuada a las reglamentaciones nacionales e internacionales que garanticen la seguridad del consumidor para el consumo del producto. Esta revisión persigue mostrar características generales del potencial de la *Spirulina* a nivel de la industria de alimentos, sistemas de producción y la prueba de *A. cepa* como alternativa para evaluaciones tóxicas y antiproliferativa en la biomasa con fin comercial.

2. Proceso de producción de biomasa microalgal

Las microalgas tienen un gran potencial en la generación de productos de interés biotecnológico e industrial. Entre estos, la producción de biocombustibles y energía es de gran repercusión debido a su naturaleza como fuente renovable. Asimismo, la producción de biomasa y subproductos destinados a alimentos, suplementos alimenticios, nutraceuticos, productos químicos y farmacéuticos ha hecho que muchos inversores vean a la industria de las microalgas como un gran potencial de inversión [9].

Los sistemas de cultivo utilizados para mantener el crecimiento de microalgas son de dos tipos: sistemas abiertos o cerrados. Entre los diferentes tipos de diseño de sistemas abiertos, los más populares por lo relativamente fácil de construir, más económicos y simples en relación al sistema cerrado son el tanque de canalización (*raceway*) y el tanque circular, mientras que los sistemas cerrados incluyen el fotobiorreactor, que puede ser de tipo tubular, de placa plana e híbrido [10]. La

comprensión de los aspectos hidrodinámicos y la tecnología de los fotobiorreactores escalables son aspectos que deben tenerse en cuenta para obtener buenos rendimientos [11].

En el sistema abierto, la superficie es iluminada con el sol, por lo que el cultivo de microalgas es impactado con la intensidad de iluminación. Esto en la práctica hace con que en los países donde se proporcione un clima tropical se mejoren los rendimientos de producción en relación a los que poseen periodos estacionales [12]. La profundidad de estos tanques de cultivo debe estar entre 35 y 40 cm para garantizar el paso de la luz al fondo del reactor. Sin embargo, el uso de sistemas abiertos para el secuestro de CO₂ no es ventajoso debido al corto tiempo de residencia del gas en el cultivo, lo que ofrece poco tiempo para la fijación de CO₂ proveniente de los gases de combustión por parte de las microalgas. Una de las desventajas de los sistemas abiertos es la pérdida de agua por evaporación y posibles problemas de contaminación [13].

Por otro lado, los sistemas cerrados proporcionan mejores rendimientos de biomasa, con algunas ventajas, como la reducción de la contaminación lo que genera un cultivo axénico, permitiendo el control de parámetros como son temperatura, pH, luz, concentración de CO₂, así como evita la pérdida de CO₂, evaporación del agua, proporcionando altos rendimientos de bioproductos. Los sistemas cerrados que se utilizan actualmente son fotobiorreactores tubulares verticales u horizontales e híbridos [14]. Los fotobiorreactores tubulares y de placa plana son los más utilizados para el cultivo de microalgas a escala piloto y de laboratorio. Estos fotobiorreactores se basan en el principio de tener una gran relación superficie/volumen (S/V), uso óptimo de CO₂ y una mezcla adecuada. Los fotobiorreactores tubulares (*airlift* o columna de burbujas) parecen ser los más adecuados para el secuestro de CO₂, debido a la mezcla homogénea, mayor transferencia de gas, menos estrés hidrodinámico, fácil de construir y altamente productivos. Los fotobiorreactores de placa plana son costosos de construir, por lo que no son factibles para uso industrial. Los fotobiorreactores híbridos son la combinación de al menos dos tipos diferentes de fotobiorreactores, por lo que las desventajas de uno se cubren con las ventajas del otro y viceversa. Se han estudiado muchas configuraciones que muestran resultados convenientes [15-17].

Hay un proceso complejo de transferencia de CO₂ en los fotobiorreactores. En el proceso de aireación de gas en el fotobiorreactor, su rendimiento de transferencia de masa y la velocidad de la reacción bioquímica dependen de factores como el tipo y la configuración del fotobiorreactor, el rango diferente de las condiciones de operación, la influencia de las propiedades fisicoquímicas en la hidrodinámica debido a la alta viscosidad, el medio de cultivo, el comportamiento reológico, el método de medición utilizado, el tamaño de las burbujas, el tiempo de retención de gases, la concentración de CO₂, el área de contacto y la relación gas-líquido [13].

El desarrollo de fotobiorreactores es uno de los principales pasos que deben entenderse para obtener una producción eficiente de biomasa de microalgas y bioproductos. Se deben tener en cuenta algunas consideraciones al configurar el sistema durante su instalación para la producción de bioproductos y el cultivo de ciertas microalgas. Los fotobiorreactores cerrados son esenciales para producir compuestos con alto valor agregado.

La rápida tasa de crecimiento junto con una alta productividad, significa que la producción de biomasa de microalgas tiene un futuro prometedor. Se han llevado a cabo varias investigaciones sobre el uso de microalgas para obtener productos con aplicabilidad industrial [18-20]. El proceso de producción de biomasa de microalgas se puede dividir en dos fases: procesamiento ascendente (USP) y procesamiento descendente (DSP). USP corresponde a los pasos anteriores del sistema de cultivo

que involucra cuatro áreas: (i) la cepa de microalgas, (ii) suministro de carbono, (iii) fuente de nutrientes (nitrógeno / fósforo) y (iv) fuente de iluminación. El DSP incluye todos los procesos involucrados directamente desde el reactor o sistema de cultivo. Implican técnicas de cosecha y biorefinería para obtener diferentes tipos de productos a partir de biomasa, que pueden comercializarse [21].

3. Sistemas de cultivos de microalgas

El cultivo exitoso de microorganismos fotosintéticos depende de varios factores como la iluminación, la temperatura, la transferencia de gases, el pH, la agitación y la disponibilidad de nutrientes, estos se suministran adecuadamente a través de los recipientes de reacción [22].

El cultivo fotosintético de microalgas depende esencialmente del suministro de energía luminosa a las células. Los fenómenos de foto limitación y foto inhibición son frecuentes en cultivos con poca iluminación, lo que causa pérdidas significativas del rendimiento cinético en los biorreactores [23]. Además de los aspectos cuantitativos, debe considerarse la naturaleza cualitativa de la luz incidente en los sistemas. Se puede utilizar iluminación natural o artificial dependiendo de las características requeridas en los sistemas de cultivo. Aspectos como la ubicación, las variaciones estacionales, las variaciones sobre el fotoperíodo son los principales problemas de los sistemas con luz natural [24].

La composición de la biomasa microalgal se compone básicamente de carbono, nitrógeno y fósforo, en proporciones aproximadas de 50, 8 y 1%, respectivamente [25]. En consecuencia, la disponibilidad de estos nutrientes es esencial para la multiplicación celular en biorreactores. A nivel del cultivo fotosintético, el dióxido de carbono es la principal fuente de carbono utilizado en los cultivos [26]. Después del carbono, el nitrógeno es el segundo elemento limitante de los cultivos de microalgas. El nitrato es la fuente habitual, aunque la urea, el amoníaco y las fuentes orgánicas son asimiladas por innumerables especies [27]. Finalmente, el fósforo es el tercer elemento de mayor demanda en estos sistemas. El fósforo reactivo es fácilmente asimilable, aunque el fósforo hidrolizable con ácido y el fósforo orgánico se usan de manera eficiente [28].

4. Cultivo de microalgas y fertilizantes agrícolas

Durante las últimas décadas, se han realizado varios estudios para desarrollar formulaciones de medios para el cultivo de diferentes especies de microalgas. Así, las variaciones en las proporciones de las sales [29,30] y la sustitución de sales inorgánicas de pureza analítica por fertilizantes agrícolas como nutrientes [31-34] son dispositivos que tienen como objetivo mejorar el rendimiento de la biomasa y los productos de microalgas, así como reducir los costos en el proceso.

Cultivos de *Spirulina platensis* utilizando superfosfato simple (P_2O_5CaS), cloruro de potasio (KCl), nitrato de sodio ($NaNO_3$), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) mostró la misma producción de biomasa y clorofila en comparación con el medio Zarrouk, utilizado tradicionalmente para este género. Desde el punto de vista de la escala, el medio alternativo era muy económico en relación con el medio Zarrouk [35].

Bajo diferentes condiciones de cultivo y diferentes concentraciones de bicarbonato y nitrato de sodio, el crecimiento y la productividad de la biomasa de *Arthrospira platensis* aumentó con las concentraciones más altas de bicarbonato de sodio

utilizadas (16 g L^{-1}) lo que indica que el bicarbonato de sodio es el factor con mayor influencia en la producción de biomasa [29].

Las modificaciones realizadas en el medio Zarrouk con la eliminación de cinco micronutrientes (boro, manganeso, cobre, zinc y molibdeno) y con la sustitución de nitrato de sodio por nitrato de potasio, mostraron un alto rendimiento para el crecimiento de *Spirulina platensis*, aumentando la tasa de crecimiento biomasa y clorofila-a. Este medio Zarrouk modificado puede usarse como una variante de bajo costo para el cultivo de cepas de *Spirulina platensis* [30].

Ramírez-López et al. [36] desarrollaron un nuevo medio para el cultivo de *Chlorella vulgaris* con el fin de aumentar la concentración de biomasa y lípidos. La composición del medio mostró una disminución en las concentraciones de nitrógeno de hasta un 50% en comparación con los medios de cultivo convencionales (BBM, medio basal de Bold y HAMGM, medio de crecimiento mínimo altamente asimilable). El nuevo medio formulado en este trabajo demostró ser una alternativa prometedora para el cultivo de microalgas a gran escala, lo que resultó en un aumento en la concentración de biomasa y lípidos en un 40% y 85%, respectivamente. Las variaciones y modificaciones de nutrientes en el medio de cultivo se reflejan en las características bioquímicas de las células de microalgas. Por lo tanto, Chia et al. [37], al evaluar tres medios de cultivo comerciales (LC Oligo, Chu 10 y WC) en crecimiento, contenido de biomasa y composición bioquímica de *Chlorella vulgaris*, encontraron una mayor densidad celular en el medio LC Oligo, siendo menor en el medio Chu 10, mientras que las concentraciones y los rendimientos de carbohidratos, lípidos y proteínas fueron mayores en el medio Chu 10 y LC Oligo.

La limitación de nutrientes es un factor eficiente para aumentar el contenido de lípidos en la biomasa de microalgas. Bajo condiciones de nitrógeno (2.5 mg L^{-1}) y fósforo (0.1 mg L^{-1}), las cepas de *Scenedesmus* sp acumulan 30 y 53% de los lípidos respectivamente en su biomasa [38]. Las altas concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio que tienen los fertilizantes inorgánicos, hacen que se puedan utilizar como una fuente alternativa en la formulación de medios para el cultivo de microalgas, con el objetivo de mejorar el rendimiento [33].

5. *Spirulina*, características generales

Las especies de *Spirulina* son organismos procariotas fotosintéticos con morfología filamentosa que pertenecen al filo Cyanobacteria. Las especies más utilizadas en la industria alimentaria son *S. maxima*, *S. platensis* y *S. fusiformis* [39]. El género *Spirulina* tiene un valor comercial excepcional en la industria alimentaria y está clasificado como un organismo con alto valor nutricional debido al alto contenido de proteínas que presenta [40]. El valor nutricional de la *Spirulina* ya era conocido por los aztecas, quienes recolectaron estas microalgas del lago Texcoco, cerca de la Ciudad de México; asimismo, en África, cerca del lago Chad, donde los miembros de la población de Kanembou recolectan *Spirulina* y la procesan para su consumo y venta en el mercado local [2].

Spirulina es rica en vitaminas, minerales, β -caroteno, ácidos grasos esenciales y antioxidantes; se ha utilizado como suplemento alimenticio para humanos y animales en la última década [41]. Además, presenta aplicaciones terapéuticas extremadamente diversas como la actividad antitumoral, la reducción de la hiperlipidemia, el efecto antidiabético, el efecto antihipertensivo, el modulador del sistema inmune, entre otros [42].

Hay un creciente interés en la *Spirulina* para fines alimentarios. Muchos países lo usan como alimento para animales y suplemento alimenticio vendido en forma de cápsulas y tabletas, además de ser utilizado en la industria cosmética y alimentaria, ya que es una fuente de ficocianina, utilizado como tinte natural [43].

Spirulina con un 60-70% de contenido proteico en peso seco, es considerado un alimento altamente proteico, superior a cualquier otra fuente alimentaria Tabla 1. Las proteínas presentes son de alta calidad con presencia balanceada de aminoácidos esenciales lo que trae ventajas al consumidor en términos de mejoras profilácticas para mantener un buen estado de salud [44]. Algunos autores describen un comportamiento, del perfil de aminoácidos, en varias microalgas con altas proporciones de leucina y ácido glutámico, y bajas tasas de cisteína, metionina y triptófano [45-47]. El consumo diario para suplir las necesidades nutricionales mediante biomasa de *Spirulina* es de 25 g d⁻¹ [48].

Producto	Proteínas	Carbohidratos	Lipídios
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>S. platensis</i>	51	14	7

Tabla 1. Composición general de diferentes fuentes de alimentos (% de materia seca) Modificado de Ramírez [49].

La pared celular está conformada por polisacáridos digeribles, por lo que *Spirulina* presenta alta digestibilidad. Los polisacáridos extracelulares pueden presentar gran potencial para utilizarse en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética como estabilizante, espesantes, emulsificantes [50]. Presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados esenciales para mantener un buen estado de salud entre los que se destacan el ácido γ -linolénico, α -linolénico y el ácido araquidónico. Algunos estudios han demostrado el potencial de estos carbohidratos y lípidos para generar biocombustible para el desarrollo de tecnologías limpias y sustentables [51].

Los pigmentos presentes en *Spirulina* son de importancia comercial a diferentes niveles industriales. El β -caroteno es abundante en *Spirulina*, siendo bien conocido por la actividad pro-vitamina A y sus efectos sobre la visión y el sistema inmunológico. Además, la actividad antioxidante de los carotenoides se asocia con la prevención del cáncer, la arteriosclerosis, las enfermedades degenerativas y el envejecimiento [52].

Además de los carotenoides y clorofilas, otros pigmentos accesorios, como ficobiliproteínas, ficoeritrina y ficocianina son sintetizados por *Spirulina*. Estos pigmentos se han utilizado como marcadores de fluorescencia no radiactivos cuando se unen de forma covalente a anticuerpos, proteínas A, biotina, lecitina y hormonas. Además de esta aplicación, las ficobiliproteínas tienen una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria. Debido a la estabilidad de las moléculas, la ficocianina se usa en la formulación de cosméticos como perfumes y maquillaje de ojos [53].

Spirulina también posee cantidades importantes de vitaminas del complejo B, E, biotina, ácido fólico, inositol, estas estructuras tienen sus aplicaciones consolidadas a nivel del sistema inmunitario, a través de la actividad antioxidante, la formación de células y la coagulación de la sangre.

6. Composición química como fuente de alimentos funcionales o nutraceuticos

Un alimento funcional o nutraceutico está formado por elementos que, además de proporcionar nutrientes, tienen un beneficio para una o más funciones del organismo humano, mejorando su estado de salud y reduciendo el riesgo de futuras enfermedades. Dichos productos pueden variar desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos en forma de cápsulas; hasta productos de diseño beneficioso, productos a base de hierbas y alimentos procesados como cereales, sopas y bebidas. A nivel de clasificación química, los compuestos con actividad biológica se pueden clasificar en grupos como probióticos y prebióticos, compuestos fenólicos, alimentos sulfurados y nitrogenados, pigmentos y vitaminas, fibras y ácidos grasos poliinsaturados [54].

Algunas proteínas, péptidos y aminoácidos tienen funciones biológicas asociadas con los beneficios nutricionales y la salud humana. De esta manera, como la mayoría de las especies de microalgas, *Spirulina* tiene contenidos superiores al 50% de proteína en peso seco, estos biopolímeros pueden usarse como nutraceuticos o incluirse en formulaciones alimentarias funcionales. Además de las propiedades hipolipidémicas e hipoglicémicas, la ingesta de proteínas unicelulares se asocia con niveles reducidos de colesterol y triglicéridos. Finalmente, algunas proteínas están asociadas con la estimulación de la producción de la hormona colecistoquinina, que regula la supresión del apetito y, por lo tanto, se han considerado en la formulación de alimentos funcionales contra la obesidad. A nivel enzimático, se han identificado algunas metaloenzimas como la superóxido dismutasa en células microalgales, cuya actividad está asociada con la protección contra el daño oxidativo en las células [55].

Además del colesterol, algunas especies de microalgas producen esteroides no convencionales tales como brasicasterol, campesterol, estigmasterol y silosterol. Debido a los altos niveles de esteroides, estas especies se han utilizado en la formulación de dietas para el crecimiento de juveniles, especialmente las ostras. De manera controvertida, aunque se reconoce que los niveles altos de colesterol están asociados con riesgos para el sistema cardiovascular, los esteroides de las microalgas marinas parecen mostrar actividad hipocolesterolémica en humanos [56].

El contenido y la composición de los lípidos en las microalgas varían entre las especies y las condiciones del hábitat. Los compuestos lipídicos más estudiados en las microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como los ácidos eicosapentaenoicos (EPA, 20: 5 ω -3), docosahexaenoico (DHA, 22: 6 ω -3), araquidónico (ARA, 20: 4 ω -6) y gamma-linolénico (GLA, 18: 3 ω -6). La importancia de estos compuestos se basa en la incapacidad del ser humano para sintetizar algunos ácidos grasos, por lo que se denominan ácidos grasos esenciales [54].

Los carotenoides son otra clase importante de pigmentos que se encuentran abundantemente en las microalgas. Son bien conocidos por su actividad pro-vitamina A y β -caroteno y su efecto beneficioso sobre la visión y el sistema inmunológico. La actividad antioxidante de los carotenoides se asocia con la prevención de cualquier tipo de cáncer, envejecimiento y enfermedades degenerativas [57].

7. Estudio genotóxico utilizando la prueba *Allium cepa*

El sistema de prueba *Allium cepa* tiene como objetivo identificar posibles efectos tóxicos, evaluando la genotoxicidad, la citotoxicidad y la actividad mutagénica, sirviendo como bioindicador. La prueba de *A. cepa* está validada por el Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS, OMS) y por el Programa Ambiental de las

Naciones Unidas (PNUMA), y se considera una prueba eficiente para el análisis y el monitoreo *in situ* de la genotoxicidad de las sustancias ambientales [58].

La prueba *Allium cepa* ha sido utilizada por muchos investigadores principalmente como un bioindicador de contaminación medioambiental [59], para extractos crudos de cianobacterias [60], así como para evaluar el potencial genotóxico de plantas medicinales [61, 62], microalgas [63], aditivos y preservantes de alimentos [64, 65].

La prueba de *Allium cepa* es importante ya que es un excelente modelo *in vivo*, donde las raíces crecen en contacto directo con la sustancia de interés que permite predecir el posible daño al ADN celular. Por lo tanto, los datos se pueden extrapolar para toda la biodiversidad animal y vegetal. El análisis de las alteraciones cromosómicas puede ser igual a la prueba de mutagenicidad principalmente para la detección de alteraciones estructurales; sin embargo, también es posible observar alteraciones cromosómicas numéricas.

La prueba *Allium cepa* es uno de los pocos métodos directos que mide el daño en sistemas que están expuestos a mutágenos o carcinógenos potenciales, y permite la evaluación de los efectos de estos daños a través de la observación de alteraciones cromosómicas. Para esta tarea, es necesario que la muestra permanezca en división mitótica constante, buscando identificar los efectos tóxicos y las alteraciones durante un ciclo celular; y la prueba *Allium cepa* ha sido ampliamente utilizada para este propósito. Es ventajoso utilizar el sistema de prueba *Allium cepa*, ya que su componente principal es una planta vascular, convirtiéndolo en un excelente modelo genético para evaluar contaminantes ambientales, detectar mutágenos en diferentes entornos y evaluar desde mutaciones puntuales hasta alteraciones cromosómicas [66].

La prueba *Allium cepa* ha demostrado ser importante para la evaluación de la genotoxicidad celular en vista al sistema de enzima oxidasa capaz de metabolizar hidrocarburos policíclicos que poseen las células *Allium cepa*. Aunque se ha demostrado que otros sistemas de prueba son sensibles para esta detección, los resultados de la prueba *Allium cepa* deben considerarse como bioindicadores. Los estudios sobre sensibilidad y correlación entre los sistemas de prueba son fundamentales para una evaluación más precisa de los riesgos ambientales y para extrapolar los datos a otros grupos de organismos albos. Existe una alta sensibilidad y una buena correlación con las pruebas de mamíferos y la misma sensibilidad que los sistemas de prueba de algas y linfocitos humanos en comparación con *Allium cepa* [67].

La cebolla es un bioindicador eficiente para observar la aparición de citotoxicidad y genotoxicidad, y sus cromosomas son fáciles de analizar según los tamaños, el número y las morfologías. La prueba de *Allium cepa* es un método directo que se puede usar para medir el daño a los sistemas que están expuestos a mutágenos o carcinógenos potenciales, y que permite evaluar los efectos mediante la observación de cambios cromosómicos. Para eso, es necesario que el organismo en estudio permanezca en división mitótica constante, lo que permite identificar los efectos tóxicos y las alteraciones a lo largo del ciclo celular [7].

Para la preparación de la prueba, los bulbos de *Allium cepa* se deben colocar en contacto a nivel de la raíz con un recipiente que contenga agua destilada, esto a temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) durante 72 h, aireados constantemente y con fotoperíodo claro/oscuras de 12 h, hasta que se obtengan raíces con aproximadamente 1,0 cm de longitud. Se recomienda realizar este procedimiento por quintuplicado. Luego, las raíces se recogen y se fijan en etanol: ácido acético (3:1) durante 24 h y posteriormente se almacenan en etanol al 70% en refrigeración hasta la preparación

de las láminas portaobjetos. La preparación y evaluación de las raíces en láminas portaobjetos, se realiza tomando en consideración un promedio de dos portaobjetos por bulbo y para su análisis 1,000 células por bulbo, al realizar por quintuplicado la evaluación de cada tratamiento, se totalizarán 5000 células para cada condición. Las raíces se hidrolizan en HCl 1 N cada 5 minutos, posteriormente se lavan en agua destilada y se colorean con orceína acética al 2% [68]. La región meristemática se rompe con la ayuda de un pequeño palo de vidrio y se coloca encima un cubreobjetos para luego observar microscópicamente a 40X. Al final se realiza el cálculo del índice mitótico (IM) con base en el porcentaje de células en división además de las aberraciones celulares evaluadas. Al momento de esta evaluación, es interesante evaluar controles tanto positivos como negativos. En el caso de control negativo, se emplea agua destilada, ya para el control positivo se puede utilizar glifosato, ya que este ha demostrado su capacidad como inductor de alteraciones en las células meristemáticas de *Allium cepa* [69].

8. Consideraciones finales

El uso de *Spirulina* como alimento y suplemento alimenticio representa una realidad que ha aumentado en los últimos años en el mercado comercial. A medida que aumenta la demanda del producto, nuevas estrategias de producción, tanto en el diseño y operaciones en el sistema de cultivo, como en la composición del medio, son fundamentales para generar mayores rendimientos de producción de biomasa a relativamente bajos costos que permitan ser competitivos en el mercado. Este tipo de productos busca generar alternativas nutritivas que además proporcionen efectos nutraceuticos, esto aprovechando la cantidad de compuestos bioactivos que presentan. Sin embargo, la evaluación toxicológica es fundamental para garantizar un producto adecuado para consumo. El proporcionar pruebas económicas y efectivas como las presentadas por la prueba *Allium cepa*, genera alternativas viables para realizar evaluaciones genotóxicas y estudios antiproliferativos en la biomasa de *Spirulina* destinada a consumo.

9. Referencias

- [1] Stephens E., Ross I., Hankamer B. Expanding the microalgal industry – continuing controversy or compelling case? *Current Opinion in Chemical Biology* 2013; 17: 444-452. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.030>.
- [2] FAO – Food and Aquaculture Organization of The United Nations. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture circular 2008; 1034(33).
- [3] Silva Vaz B., Moreira J., Morais M., Costa J. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science* 2016; (7):73-77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>.
- [4] Becker E. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 2007; (25):207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>.
- [5] Ganta R., Svircev Z. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *Journal of Phycology* 2008; (44):260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x>.
- [6] ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm. Acesso em: 04 mar. 2020.

[7] Tedesco S., Laughinghouse D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Srivastava J. (ed.). Environmental Contamination. InTech; 2012, p. 137-157. Rijeka, Croatia.

[8] Kumar L., Panneerselvam N. Cytogenetic studies of food preservative in *Allium cepa* root meristem cells. Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology 2007; 14(2): 60–63.

[9] Priyadarshani I., Rath B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. Journal of Algal Biomass Utilization 2012; 3(4):89–100.

[10] Ramírez-Mérida L., Zepka L., Jacob-Lopes E. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. Ciencia y Tecnología 2013; 6(2):9-19.

[11] Ramírez-Mérida L., Zepka L., Jacob-Lopes E. Current Status, Future Developments and Recent Patents on Photobioreactor Technology. Recent Patents on Engineering 2015; 9(2):80-90. <https://doi.org/10.2174/1872212109666150206235316>.

[12] Martínez L., Ramírez Mérida L. Estado actual de las empresas productoras de microalgas destinadas a alimentos y suplementos alimenticios en América Latina. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2017; 8(2):130-147.

[13] Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. Biotechnology Progress 2006; 22:1490–1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>.

[14] Singh R.M., Sharma S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2012; 16(4):2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>.

[15] Deprá M.C., Mérida L.G.R., de Menezes C.R., Zepka L.Q., Jacob-Lopes E. A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. Chemical Engineering Research and Design 2019; 144:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>.

[16] Gao F., Yang Z.H., Li C., Zeng G.M., Ma D.H., Zhou L. A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent. Bioresource Technology 2015; 179:8–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.10>.

[17] Genin S.N., Aitchison J.S., Allen D.G. Novel waveguide reactor design for enhancing algal biofilm growth. Algal Research 2015; 12:529–538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.013>.

[18] Zhu L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2015; 41:1376-1384. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.040>.

[19] Zhu L.D., Hiltunen E. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2016; 54:1285-1290. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.093>.

- [20] Chen J., Wang Y., Benemann J.R., Zhang X., Hu H., Qin S. Microalgal industry in China: challenges and prospects. *Journal of Applied Phycology* 2016; 28(2):715-725. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0720-4>.
- [21] Jacob-Lopes E., Ramírez Mérida L.G., Queiroz M.I., Zepka L.Q. Microalgal Biorefineries. In: Jacob-Lopes E., Zepka L.Q. (ed) *Biomass Production Uses*. InTech; 2015, p.81-106. Rijeka, Croatia. <https://doi.org/10.5772/59969>.
- [22] Ramírez-Mérida L., Zepka Q.L., Jacob-Lopes E. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Ciencia y Tecnología* 2013; 6(2):9-19.
- [23] Brindley C., Jiménez-Ruiz N., Acien F.G., Fernández-Sevilla J.M. Light regime optimization in photobioreactors using a dynamic photosynthesis model. *Algal Research* 2016; 16: 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.033>.
- [24] George B., Pancha I., Desai C., Chokshi K., Paliwal C., Ghosh T., Mishra S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology* 2014; 171: 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>.
- [25] Alassali A., Cybulska I., Brudecki G.P., Farzanah R., Hedegaard M. Methods for Upstream Extraction and Chemical Characterization of Secondary Metabolites from Algae Biomass. *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 2016; 4(1):163. <http://dx.doi.org/10.4172/2379-1764.1000163>.
- [26] Könst P., Mireles I.H., van der Stel R., van Os P., Goetheer E. Integrated system for capturing CO₂ as feedstock for algae production. *Energy Procedia* 2017; 114:7126-7132. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.1856>.
- [27] Shilova I.N., Mills M.M., Robidart J.C., Turk-Kubo K.A., Björkman K.M., Kolber Z., Rapp I., van Dijken G.L., Church M.J., Arrigo K.R., Achterberg E.P., Zehr J.P. Differential effects of nitrate, ammonium, and urea as N sources for microbial communities in the North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 2017; 62:6. <https://doi.org/10.1002/lno.10590>.
- [28] Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., Ibraheem I.B.M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2012; 19(3):257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>.
- [29] Castro G.F.P.S., Rizzo R.F., Passos T.S., Santos B., Dias D., Domingues J., Araújo K. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. *Food Science and Technology* 2015; 35(1):18-24. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6421>.
- [30] Rajasekaran C., Ajeesh C.P.M., Balaji S., Shalini M., Siva R., Das R., Fulzele D.P., Kalaivani T. Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different *Spirulina* Strains. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 2015; 13(1):67-75.
- [31] Simental J.A., Sánchez-Saavedra M.P. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 2003; 27:265-272. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00087-0).
- [32] Ashraf M., Javaid M., Rashid T., Ayub M., Zafar A., Ali S., Naeem M. Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers for Mass

Culture of Freshwater Algae, *Chlorella vulgaris*. International Journal of Agriculture & Biology 2011; 13:484–490.

[33] El Nabris K.J.A. Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine). Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences) 2012; 14:61-76.

[34] Sipaúba-Tavares L.H., Segali D.L.A.M., Berchielli-Morais F.A., Scardoeli-Truzzi B. Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. Acta Limnologica Brasiliensia 2017; 29:e5. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x3916>.

[35] Raouf B., Kaushik B.D., Prasanna R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass Bioenergy 2006; 30:537-542. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.09.006>.

[36] Ramírez-López C., Chairez I., Fernández-Linares L. A novel culture medium designed for the simultaneous enhancement of biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* UTEX 26. Bioresource Technology 2016; 212:207–216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.051>.

[37] Chia M., Lombardi A.T., Melão M.G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. Anais da Academia Brasileira de Ciências 2013; 85(4):1427-1438. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>.

[38] Xin L., Hong-Ying H., Ke G., Ying-Xue S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. Bioresource Technology 2010; 101(14):5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.

[39] Marles R.J., Barrett M.L., Barnes J., Chavez M., Gardiner P., Ko R., Mahady G., Dog T., Sarma N., Giancaspro G., Sharaf M., Griffiths J. United States pharmacopeia safety evaluation of *Spirulina*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011; 51(7):593-604. <https://doi.org/10.1080/10408391003721719>.

[40] Soni R.A., Sudhakar K., Rana R.S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. Trends in Food Science & Technology 2017; 69(A):157-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>.

[41] Capelli B., Cysewski G.R. Potential Health Benefits of *Spirulina* Microalgae: A Review of the Existing Literature. Cyanotech Corporation: Kailua-Kona, HI, USA, 2010. <https://doi.org/10.1007/BF03223332>.

[42] Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin. Journal of Functional Foods 2014; 11:375-392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>.

[43] Kamble S.P., Gaikar R.B., Padalia R.B., Shinde K.D. Extration and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2013; 3(8):149-153. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3826>.

- [44] Arsenault J.E., Brown K.H., Effects of protein or amino-acid supplementation on the physical growth of young children in low-income countries. *Nutrition Reviews* 2017; 75:699–717. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux027>.
- [45] Akgül R., Kızılkaya B., Akgül F., Erduğan H. Amino acid composition and crude protein values of some Cyanobacteria from Çanakkale (Turkey). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 28:1757-1761.
- [46] Radhakrishnan S., Bhavan P.S., Seenivasan C., Muralisankar T. Nutritional profile of *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* to novel protein source for aquaculture feed formulation. *Austin Journal of Aquaculture and Marine Biology* 2017; 2.
- [47] Lim A.S., Jeong H.J., Kim S.J., Ok J.H. Amino acids profiles of six dinoflagellate species belonging to diverse families: possible use as animal feeds in aquaculture. *Algae* 2018; 33:279-290. <https://doi.org/10.4490/algae.2018.33.9.10>.
- [48] Belay A., Ota Y., Miyakawa K., Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology* 1993; 5(2):235-41. <https://doi.org/10.1007/BF00004024>.
- [49] Ramírez L.G. Produção de biomassa de *Euglena* sp. utilizando fertilizantes inorgânicos tipo NPK como cultivos alternativos. Tesis Doctoral. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2019.
- [50] Braga V., Mastrantonio D., Costa J., Morais M. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. *Bioresource Technology* 2018; 269:221-226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.105>.
- [51] Markou G., 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* 2012; 96(3):631–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>.
- [52] Zuluaga M., Gueguen V., Pavon-Djavid G., Letourneur D. Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Bioimpacts* 2017; 7(1):1–3. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.01>.
- [53] Park W.S., Kim H.J., Li M., Lim D.H., Kim J., Kwak S.S., Kang C.M., Ferruzzi M.G., Ahn M.J. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules* 2018; 23:2065. <https://doi.org/10.3390/molecules23082065>.
- [54] Raposo M.F.J., Morais R.M.S.C., Morais A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 2013; 93:479-486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>.
- [55] Andrade L., Andrade C., Dias M., Nascimento C., Mendes M. *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology* 2018; 6(2):00144. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00144>.
- [56] Buono S., Langellotti A., Martello A., Rinna F., Fogliano V. Functional ingredients from microalgae. *Food & Function* 2014; 5:1669-1685. <https://doi.org/10.1039/c4fo00125g>.

- [57] Rodrigues D.B., Menezes C.R., Mercadante A.Z., Jacob-Lopes E., Zepka L.Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. Food Research International 2015; 77:273-279. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027>.
- [58] Baldoni M.B. Genotoxicidade, atividade proliferativa e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana* L. Dissertação (mestrado). Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS; 2017.
- [59] Artico L., Kommling G., Migita N., Menezes A. Toxicological Effects of Surface Water Exposed to Coal Contamination on the Test System *Allium cepa*. Water Air Soil Pollut 2018; 229:248. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3904-0>.
- [60] Laughinghouse IV, H.D. Efeitos citotóxicos e genotóxicos de extratos aquosos de cepas de *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria), Tesis Doctoral. Santa Maria: Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, RS; 2007.
- [61] Hister C., Pasqualli M., Trapp K., Stefanello R., Boligon A., Campos M., Tedesco S. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. Revista Brasileira de Biociências 2017; 15(1):43-48.
- [62] Lessa L.R., Silva, M.C.C., Cariello F. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais, 2017 10(3). <https://doi.org/10.22280/revintervol10ed3.294>.
- [63] Staykova T., Ivanova E., Panayotova G., Cvetkova I., Dzhoglov S., Dzhambazov B. General toxicity and genotoxicity of *Nodularia moravica* (Cyanoprokaryota, Nostocales). Biotechnology & Biotechnological Equipment 2010; 24(1):397-400. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2010.10817871>.
- [64] Nunes R., Sales I., Silva S., Sousa J., Peron A. Antiproliferative and genotoxic effects of nature identical and artificial synthetic food additives of aroma and flavor. Brazilian Journal of Biology 2017; 77(1):150-154. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.12115>.
- [65] Pandey H., Kumar V., Roy B. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. Toxicology Reports 2014; 1:300–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.06.002>.
- [66] Artico L., Kömmling G., Menezes A., Mazzocato A., Ferreira J. Análise de alterações cromossômicas no Sistema *Allium cepa* causadas pela exposição de sementes a extratos brutos de *Eragrostis plana*: a principal invasora do Bioma Pampa. In: XXVI Congresso Brasileiro de Zootecnia ZOOTEC 2016; 11-13 Maio 2016; Santa Maria. RS; 2016.
- [67] Fiskesjö G. The Allium-test as a standard in environmental monitoring, Hereditas 1985; 102:99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.
- [68] Fachinetto J.M., Tedesco S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Revista Brasileira de

Plantas Mediciniais 2009; 11:360-367. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400002>.

[69] Salazar S.A., Quintero C.J. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. Science of the Total Environment 2020; 700:134452.

Autores

Andressa Ribas Barreto*, Maria Angélica Oliveira Linton

Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor de correspondencia: ribas.arb@gmail.com