

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**ANDRESSA RIBAS BARRETO**

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, GENOTÓXICA E ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DE BIOMASSA MICROALGAL**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2020**

**Andressa Ribas Barreto**

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, GENOTÓXICA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA  
DE BIOMASSA MICROALGAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Oliveira Linton

Santa Maria, RS, Brasil

2020

Barreto, Andressa Ribas  
Avaliação nutricional, genotóxica, e atividade  
antiproliferativa de biomassa microalgal / Andressa  
Ribas Barreto.- 2020.  
36 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Angélica Oliveira Linton  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2020

1. Alimento 2. Allium cepa 3. Euglena 4. Spirulina  
platensis I. Oliveira Linton, Maria Angélica II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

© 2020

Todos os direitos reservados a Andressa Ribas Barreto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Av. Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105-900.

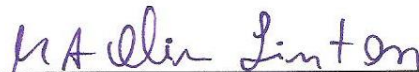
E-mail: ribas.arb@gmail.com

**Andressa Ribas Barreto**

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, GENOTÓXICA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA  
DE BIOMASSA MICROALGAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

**Aprovado em 31 de janeiro de 2020:**



**Maria/Angélica Oliveira Linton, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



**Luciana Dapieve Patias, Dr<sup>a</sup>. (UFN)**  
(Examinador)



**Joceli Augusto Gross, Dr. (UFSM)**  
(Examinador)

Santa Maria, RS, Brasil

2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida!

À Universidade Federal de Santa Maria e a Universidad de Carabobo pela possibilidade da execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior com a concessão da Bolsa de Mestrado, recurso essencial para condução e incentivo à pesquisa acadêmica.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Maria Angelica Oliveira Linton pelo incentivo, dedicação e principalmente sua amizade e profissionalismo.

À professora Solange Bosio Tedesco e ao Labcitogen pelo treinamento proporcionado.

Ao meu esposo, Luis Guillermo por toda paciência. Sem seu amor, companheirismo e conselhos esta caminhada não seria tão bonita.

A minhas filhas, Zara e Eva María pela felicidade de compartilharem comigo esse momento.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra, permitiram que este trabalho fosse possível.

Muito obrigada!

## RESUMO

Projeto de Pesquisa  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, GENOTÓXICA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE BIOMASSA MICROALGAL**

Autor: Andressa Ribas Barreto  
Orientadora: Maria Angélica Oliveira Linton

O aumento no consumo de microalgas como alimentos trouxe a necessidade de garantir produtos nutritivos e livres de elementos tóxicos. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a qualidade nutricional, genotoxicidade e a atividade antiproliferativa da biomassa de *Spirulina platensis* e *Euglena* sp sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. A composição centesimal e o perfil de aminoácidos foram determinados mediante análises químicas e cromatográficas, os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A avaliação genotóxica e antiproliferativa foi realizada empregando o teste *Allium cepa*. Foram utilizados cinco bulbos de cebola para cada controle e concentração. A partir da biomassa de *Spirulina* e *Euglena* foram preparadas três concentrações 0,15, 0,3, 0,6 g L<sup>-1</sup> com água destilada. Os bulbos foram enraizados em água e submetidos aos tratamentos por 24h. Posteriormente, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e armazenadas sob refrigeração com etanol 70% até o preparo das lâminas. Os dados obtidos a partir do teste *Allium cepa* foram analisados utilizando o teste Qui-quadrado. Os resultados apresentam que *Spirulina platensis* e *Euglena* possuem aceitável qualidade nutricional com altos níveis de proteína e presença de todos os aminoácidos essenciais. Os resultados do teste *Allium cepa* demonstraram que *Spirulina platensis* e *Euglena* possuem efeito antiproliferativo e não genotóxico em todas as concentrações avaliadas. Ambas biomassas podem ser utilizadas como alimento e suplemento alimentício para humanos e animais.

**PALAVRAS CHAVE:** Alimento, *Allium cepa*, *Euglena*, *Spirulina platensis*.

## ABSTRACT

### NUTRITIONAL EVALUATION, GENOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF MICROALGAL BIOMASS

Autor: Andressa Ribas Barreto  
Orientadora: Maria Angélica Oliveira Linton

The increase in the consumption of microalgae as food has led to the need to guarantee nutritious products and free of toxic elements. Thus, this study aims to evaluate the nutritional quality, genotoxicity and antiproliferative activity of the biomass of *Spirulina platensis* and *Euglena* sp on the cell cycle of *Allium cepa*. The proximate composition and the amino acid profile were determined by chemical and chromatographic analysis; the data were analyzed by ANOVA followed by the Tukey test. The genotoxic and anti-proliferative evaluation were performed using the *Allium cepa* test. Five onion bulbs were used for each control and concentration. From the *Spirulina* and *Euglena* biomass, three concentrations 0.15, 0.3, 0.6 g L<sup>-1</sup> were prepared with distilled water. The bulbs were rooted in water and subjected to treatments for 24 hours. Subsequently, the roots were collected and fixed in ethanol: acetic acid (3:1) and stored under refrigeration with 70% ethanol until the slides were prepared. The data obtained from the *Allium cepa* test were analyzed using the Chi-square test. The results show that *Spirulina platensis* and *Euglena* sp have an acceptable nutritional quality with high levels of protein and the presence of all essential amino acids. The results of the *Allium cepa* test showed that *Spirulina platensis* and *Euglena* sp have an antiproliferative and non-genotoxic effect in all evaluated concentrations. Both biomasses can be used as food and food supplement for humans and animals. alimento e suplemento alimentício para humanos e animais.

**Keywords:** *Allium cepa*, *Euglena*, Food, *Spirulina platensis*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
3.1 PROCESSO PRODUTIVO DE BIOMASSA MICROALGAL.....	10
3.2 <i>SPIRULINA</i> .....	11
3.3 EUGLENOIDES, CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	12
3.4 MICROALGAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA COMO FONTE DE ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	13
3.5 ESTUDO GENOTÓXICO UTILIZANDO O TESTE <i>ALLIUM CEPA</i> .....	14
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	15
<b>5 ARTIGO: EVALUATION OF THE NUTRITIONAL, GENOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF <i>EUGLENA SP</i> AND <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> BIOMASSES</b> .....	21
ABSTRACT.....	23
INTRODUCTION.....	24
MATERIAL AND METHODS .....	25
RESULTS AND DISCUSSION .....	27
CONCLUSION .....	32
REFERENCES.....	33



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o cultivo industrial de microalgas tem aumentado devido ao interesse por aplicações comerciais. Atualmente as microalgas são empregadas em muitas atividades e para fins diversificados, tais como: biopigmentos e antioxidantes, marcadores fluorescentes, enzimas, fármacos, exopolissacarídeos (usados como gelificantes, emulsificantes, floculantes e hidratantes), e diferentes nutrientes, como algumas vitaminas, proteínas, alguns minerais, lipídios e carboidratos, aditivos em cosméticos e ração para animais (STEPHENS et al., 2013).

O consumo de microalgas como fonte na alimentação humana remonta ao século XIV no Império Pré-colombiano. Porém, a experiência comercial destas tem algumas décadas de antiguidade, desde o princípio da década de 1950, quando devido ao aumento incipiente da população mundial, as fontes alternativas de proteína apareceram visando equilibrar a possível escassez de alimentos (FAO, 2008).

A microalga apareceu então como uma boa fonte de proteína e continuou como tal, mas também, com um interesse crescente devido aos ingredientes bioativos encontrados nesses pequenos microrganismos, o que lhes dá um grande potencial como fonte de alimento e como fonte de moléculas funcionais (DA SILVA VAZ et al., 2016). As avaliações nutricionais demonstraram que a biomassa das microalgas é benéfica como suplemento dietético ou substituto de fontes convencionais de proteína (BECKER, 2007).

Nas últimas três décadas, inúmeras tentativas foram feitas por pesquisadores e empresas que buscam comercializar a produção de microalgas. Algumas dessas empresas estão no mercado há muitos anos e têm produzindo com sucesso a biomassa desses organismos e comercializando-os na forma de cápsulas, tabletes e em pó (GANTAR & SVIRCEV, 2008).

A biomassa microalgal é classificada como "outro suplemento dietético" segundo o Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada da FDA (*Food and Drug Administration*) americana. No Brasil, *Spirulina* tem sido incorporadas na lista dos novos ingredientes aprovados pelas Comissões Técnico-Científicas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), desde que o produto final, ao qual o

micro-organismo tenha sido adicionado, seja devidamente registrado (ANVISA, 2017).

Algumas perturbações durante a produção industrial de microalgas podem acontecer, como contaminação do produto, variações nas cepas cultivadas, problemas no controle de qualidade. Por exemplo no caso de microalgas verdes produzidas pela empresa Crane Beauty nos Estados Unidos, onde a FDA está aconselhando os consumidores a não comprarem ou usarem estes produtos por possuírem lorcaserina que produz efeitos colaterais adversos (FDA, 2015).

Visando diminuir essas possíveis ações tóxicas, e ratificar o alcance nutricional das microalgas, diferentes métodos de detecção foram desenvolvidos, incluindo a detecção rápida. Vários estudos mostraram que os testes toxicológicos em plantas são adequados para detectar o potencial genotóxico de diferentes contaminantes. *Allium cepa* é uma das espécies mais utilizadas para o estudo da toxicidade geral, cito e genotoxicidade. Ele também fornece resultados comparáveis a uma série de outros sistemas de teste, utilizando muitos organismos diferentes, tanto eucarióticos quanto procarióticos (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). A utilidade do teste de *A. cepa* para produtos alimentares já foi utilizada com sucesso em diversos casos (PALANI KUMAR & PANNEERSELVAM, 2007). O presente estudo procura aportar conhecimento sobre a qualidade nutricional, genotoxicidade e a capacidade proliferativa das microalgas *Euglena* sp e *Spirulina platensis*, baseando-se no fato de que essa última tem sido muito utilizada com fins alimentícios, nutracêuticos e cosméticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade nutricional e a atividade genotóxica e antiproliferativa da biomassa de *Euglena* sp e *Spirulina platensis* sobre ciclo celular de *Allium cepa*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição centesimal da biomassa de *Euglena* sp e de *Spirulina platensis*.
- Determinar o perfil de aminoácidos presentes na biomassa de *Euglena* sp e de *Spirulina platensis*.
- Avaliar células em divisão celular, alterações morfológicas celulares e danos cromossômicos em *Allium cepa* submetidos a diferentes concentrações de biomassa de *Euglena* sp e de *Spirulina platensis*.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 PROCESSO PRODUTIVO DE BIOMASSA MICROALGAL

As microalgas têm um grande potencial na geração de produtos de interesse biotecnológico e industrial. Entre estes, a produção de biomassa e subprodutos destinados à alimentação, suplementos alimentícios, nutracêuticos, produtos químicos e farmacêuticos tem feito com que muito investidores vejam a indústria microalgal como um grande potencial de investimento (PRIYADARSHANI & RATH, 2012).

Os sistemas de cultivo utilizados para manter o crescimento das microalgas são de dois tipos: sistemas abertos ou fechados. Entre os diferentes tipos de design de sistema aberto, os mais populares são o tanque *raceway* e o tanque circular, enquanto os sistemas fechados populares incluem o fotobiorreator, que pode ser do tipo tubular, placa plana e híbrido (RAMÍREZ-MÉRIDA et al., 2013). A compreensão dos aspectos hidrodinâmicos e da tecnologia dos fotobiorreatores escaláveis são aspectos que devem ser levados em consideração para obter bons rendimentos (RAMÍREZ-MÉRIDA et al., 2015).

A rápida taxa de crescimento juntamente com a alta produtividade faz com que a produção de biomassa de microalgas possua um futuro promissor. Várias

pesquisas sobre o uso de microalgas para obter produtos com aplicabilidade industrial foram realizadas com sucesso (STEPHENS et al., 2013; ZHU, 2015; CHEN, et al., 2016; ZHU & HILTUNEN, 2016). O processo produtivo de biomassa microalgal pode ser dividido em duas fases: *upstream processing* (USP) e *downstream processing* (DSP). O USP corresponde aos passos prévios ao sistema de cultivo envolvendo quatro áreas: (i) a estirpe de microalgas, (ii) fornecimento de carbono, (iii) fonte de nutriente (nitrogênio/fósforo) e (iv) fonte de iluminação. O DSP inclui todos os processos envolvidos logo na saída do reator ou sistema de cultivo. Eles envolvem a colheita e técnicas de biorrefinaria para se obter diferentes tipos de produtos a partir da biomassa, que podem ser comercializados (JACOB-LOPES et al., 2015).

### 3.2 SPIRULINA

As espécies de *Spirulina* são organismos procarióticos fotossintetizantes de morfologia filamentosa que pertencem ao filo Cyanobacteria. As espécies mais comumente utilizadas na indústria de alimentos são *S. maxima*, *S. platensis* e *S. fusiformis* (MARLES et al., 2011).

O gênero *Spirulina* possui um destacado valor comercial na indústria alimentar sendo classificada como um organismo com alto valor nutricional devido ao elevado teor de proteínas que apresenta (SONI et al., 2017). O valor nutricional da *Spirulina* já era conhecido pelos astecas, que coletavam essa microalga no lago Texcoco, perto da Cidade do México; igualmente, na África, perto do lago Chad os Kanembou coletam *Spirulina* e processam para consumo e venda no mercado local (FAO, 2008).

*Spirulina* é rica em vitaminas, minerais,  $\beta$ -caroteno, ácidos graxos essenciais e antioxidantes, tem sido utilizada como suplemento alimentício humano e animal na última década (CAPELLI & CYSEWSKI, 2010). Além disso, apresenta aplicações terapêuticas extremamente diversificadas como atividade antitumoral, redução da hiperlipidemias, efeito antidiabetogênico, efeito anti-hipertensivo, modulador do sistema imunológico, entre outros (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014).

Existe um crescente interesse pela *Spirulina* com fins alimentícios. Muitos países a utilizam como ração animal e complemento alimentar vendido na forma de

cápsulas e tabletes, além de ser utilizada na indústria cosmética e de alimentos por ser fonte de ficocianina, corante natural.

### 3.3 EUGLENOIDES, CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os euglenoides flagelados são um grupo parafilético de organismos unicelulares flagelados, de vida livre, relacionados a outros flagelados heterotróficos (Symbiontida, Diplonemea e Kinetoplastida), que juntos compõem a ordem dos Euglenozoa, que compartilham a presença de dois corpos basais e três raízes microtubulares dispostas assimetricamente, assim como a presença de uma haste paraxial em um ou ambos dos flagelos (BREGLIA et al., 2010).

O gênero *Euglena* caracteriza-se por possuir células não achatadas que sofrem movimentação dinâmica, caracterizada pela presença de pequenos paramilos e grandes cloroplastos, agrupando 164 espécies aceitas até o momento (GUIRY e GUIRY, 2018). A classificação taxonômica é a seguinte segundo Zakryš et al., (2017):

**Filo:** Euglenozoa, **Classe:** Euglenophyceae, **Ordem:** Euglenales, **Família:** Euglenaceae, **Gênero:** *Euglena*.

*Euglena* pode ser cultivado em condições autotróficas, mixotróficas ou heterotróficas, pode crescer sobre uma ampla gama de pH e também em águas residuais contendo vários poluentes (SANTEK et al., 2012). *Euglena* é uma fonte adequada de numerosos compostos, tais como  $\alpha$ -tocoferol, paramilo, ácidos graxos poliinsaturados, biotina e aminoácidos usados para produzir nutracêuticos, alimentos e cosméticos. Assim, este microrganismo pode ser utilizado para a biorremediação e produção biotecnológica de produtos para a alimentação humana e animal (WINTERS et al., 2016; KRAJČOVIČ et al., 2015).

A produtividade fotossintética de *Euglena* pode ser 60 vezes maior do que a planta de arroz, e a eficiência de conversão de CO<sub>2</sub> para O<sub>2</sub> é duas vezes maior do que em *Chlorella* (OGAWA et al., 2015).

A biomassa de *E. gracilis* tem uma qualidade nutricional mais elevada que, por exemplo, a biomassa de *Chlorella* ou *Spirulina* (NAKANO et al., 1995). A digestibilidade in vitro de *E. gracilis* é ligeiramente superior à da caseína, sugerindo que pode ser utilizada como suplemento alimentar para animais (OGBONNA et al.,

1999). Tomadas em conjunto, estas observações demonstram claramente a utilidade da biomassa de *Euglena* como matéria prima.

Inclusive, o crescimento de *Euglena* em esgoto purifica a água e produz uma biomassa a partir da qual os lipídios podem ser extraídos para biocombustíveis, sendo a biomassa restante usada como suplemento nutricional na alimentação animal e como fonte de alimento na aquicultura (GRIMM et al., 2015).

### 3.4 MICROALGAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA COMO FONTE DE ALIMENTOS FUNCIONAIS

Um alimento funcional esta constituído por alimentos que além de proporcionar nutrientes, apresentam um benefício para uma ou mais funções do organismo humano, melhorando seu estado de saúde e reduzindo o risco de futuras enfermidades. Em um nível de classificação química, os compostos com atividade biológica podem-se agrupar em ácidos graxos, proteínas, peptídios, aminoácidos, esteróis, pigmentos, vitaminas, alcalóides e outros compostos não incluídos nestas classes (RAPOSO et al., 2013).

Em termos gerais o conteúdo de proteínas em microalgas é elevado, a maioria das espécies apresentam quantidades acima dos 50% de proteína em peso seco (KIM Y KANG, 2011).

Os peptídios se liberam das proteínas parentais por ação de uma enzima (em geral a protease); quando são consumidos como peptídios puros ou hidrolisados, eles exercem uma função de moduladores da estrutura e função das enzimas metabólicas, que implicam em certas enfermidades, depois da absorção no sistema circulatório sanguíneo (NGO et al., 2011).

O conteúdo e composição dos lipídios em microalgas varia entre as espécies, condições do habitat e de cultivo. Os compostos lipídicos mais estudados nas microalgas são os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5  $\omega$ -3), docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3), araquidônico (ARA, 20:4  $\omega$ -6), gamma-linolênico (GLA, 18:3  $\omega$ -6). A importância desses compostos se baseia na incapacidade do ser humano de sintetizar alguns ácidos graxos, por esse motivo são chamados de ácidos graxos essenciais (RAPOSO et al., 2013).

Em relação aos pigmentos, as cianobactérias particularmente sintetizam altos níveis de ficobiliproteínas, com porcentagens que alcançam até 8% de seu peso seco. Estes pigmentos são utilizados como marcadores de fluorescência em radioativos quando unidos covalentemente com anticorpos, proteínas A, biotina, lecitina e hormônios (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011).

Os carotenóides são outra classe importante de pigmentos encontrados de forma abundante em microalgas. São bem conhecidos pela atividade pro-vitamina A e  $\beta$ -caroteno e seu efeito sobre a visão e sistema imunológico. A atividade antioxidante dos carotenóides esta associada com a prevenção do câncer, o envelhecimento e as enfermidades degenerativas (RODRIGUES et al., 2015).

### 3.5 ESTUDO GENOTÓXICO UTILIZANDO O TESTE *ALLIUM CEPA*

O sistema teste *Allium cepa* tem por objetivo identificar possíveis efeitos tóxicos, pela avaliação de genotoxicidade, citotoxicidade e atividade antimutagênica, servindo como bioindicador. O teste *A. cepa*, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como sendo considerado um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (BALDONI, 2017; FACHINETTO et al., 2007;).

O teste de *A. cepa* foi utilizado pela primeira vez por Levan (1938) para detecção da genotoxicidade. As primeiras adaptações nesse teste foram desenvolvidas por Fiskesjö (1985), para utilização em monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água e também na avaliação de efeitos de misturas complexas.

Segundo Matsumoto et al., (2006), a cebola é um bioindicador eficiente para observação da ocorrência de citotoxicidade e genotoxicidade, e seus cromossomos são fáceis de analisar em termos de tamanho, número e morfologia.

O teste de *A. cepa* é um método direto que pode ser utilizado para medir os danos nos sistemas que estão expostos aos agentes mutagênicos ou potenciais agentes cancerígenos, e que permite a avaliação dos efeitos através da observação de alterações cromossômicas. Para isso é necessário que o organismo em estudo permaneça em divisão mitótica constante, sendo possível assim, identificar os

efeitos tóxicos e alterações ao longo do ciclo celular (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm)>.

AYRES, M. BioEstat 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. Ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq. 2007.

BALDONI, M.B. Genotoxicidade, atividade proliferativa e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana* L., 2017. 49 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2017.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnol Adv**, v. 25, p.207-210, 2007.

BREGLIA, S.A. et al. Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel euglenozoan with extrusive epibiotic bacteria: *Bihospites bacati* n. gen. et sp. (Symbiontida). **BMC Microbiology**, v. 10, p. 145, 2010.

CAPELLI, B.; CYSEWSKI, G.R. **Potential Health Benefits of *Spirulina* Microalgae: A Review of the Existing Literature**. Cyanotech Corporation: Kailua-Kona, HI, USA, 2010.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. **Fascicula Biologie**, XVI, n. 2, p.43-48, 2009.



CHEN, J. et al. Microalgal industry in China: challenges and prospects. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 715-725, 2016.

DA SILVA VAZ, B.; MOREIRA, J.B.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73-77, 2016.

FACHINETTO, J.M. et al. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.17, p.49-54, 2007.

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. n.1034, 33 p. 2008.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375-392, 2014.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, Reino Unido, v. 102, n. 1, p. 99-112, mar. 1985.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Public Notification: Green Algae Combination by Crane Beauty contains hidden drug ingredient. 2015.

<https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/MedicationHealthFraud/ucm440000.htm>

GANTA, R M.; SVIRCEV, Z. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. **J Phycol**, v. 44, p. 260–268, 2008.

GRIMM, P. et al. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of  $\alpha$ -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, v. 215, p. 72–79, 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: **FUNPEC**, 2002.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available online at <http://www.algaebase.org>, 2018.

JACOB-LOPES, E. et al. Microalgal Biorefineries. Em: Jacob-Lopes y Queiroz (ed.) *Biomass Production and Uses*. Rijeka: **InTech**, pp 81-106, 2015.

KIM, S.K, KANG, K.H. Medicinal effects of peptides from marine microalgae. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 64, p. 313–323, 2011.

KRAJČOVIČ, J.; VESTEG, M.; SCHWARTZBACH, S. Euglenoid flagellates A multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, v. 202, p. 135–145, 2015.

MARLES, R.J. et al. United States pharmacopeia safety evaluation of *Spirulina*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 7, p. 593-604, 2011.

NAKANO, Y. et al. A protist, *Euglena gracilis* Z, functions as a sole nutrient source in a closed ecosystem. *Jpn. J. CELSS*, v. 8, p. 7–12, 1995.

NGO, D.H., WIJESEKARA, I., VO, T.S., TA, Q.V., KIM, S.K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. *Food Research International*, v. 44, p.523–529, 2011.

OGBONNA, J.C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Production of  $\alpha$ -tocopherol by sequential heterotrophic–photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 213–221, 1999.

OGAWA, T. et al. Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. **Biotechnology for Biofuels**, v.8 p. 80, 2015.

PALANI KUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Cytogenetic studies of food preservative in allium cepa root meristem cells. Facta Universitatis. **Series: Medicine and Biology**, v.14, n. 2, p. 60 – 63, 2007.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v.45, n.1, p.11–36, 2011.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

RAMÍREZ-MÉRIDA, L.G.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. Current Status, Future Developments and Recent Patents on Photobioreactor Technology. **Recent Patents on Engineering**, v. 9, n. 2, p. 80-90, 2015.

RAMÍREZ-MÉRIDA, L.G.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias. **Ciencia y Tecnología**, v. 6, n. 2, p. 9-19, 2013.

RAPOSO, M.F.J.; MORAIS, R.M.S.C.; MORAIS, A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**, 93, 479-486, 2013.

RODRIGUES, D.B.; MENEZES, C.R.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273-279, 2015.

SANTEK, B. et al. Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic growth of *Euglena gracilis* on potato liquor in fed-batch and repeated-batch mode of cultivation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 89–94, 2012.

SONI, R.A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R.S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, In press, 2017.

STEPHENS, E; ROSS, I.L.; HANKAMER, B. Expanding the microalgal industry – continuing controversy or compelling case?, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, p. 444-452, 2013.

TEDESCO, S. B.; e LAUGHINGHOUSE H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test In: SRIVASTAVA, J. Environmental Contamination. Rijeka: InTech, 2012. Cap. 8, p. 137-157.

WINTERS, C.; GUEGUEN, C.; NOBLE A. Equilibrium and kinetic studies of Cu(II) and Ni(II) sorption on living *Euglena gracilis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, 2016.

ZAKRYŚ, B.; MILANOWSKI, R.; KARNKOWSKA, A. Evolutionary Origin of *Euglena*. Em: Schwartzbach S., Shigeoka S. (eds.) *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 979. **Springer**, Cham, pp 3-17, 2017.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

ZHU, L.D.; HILTUNEN, E. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 1285-1290, 2016.

## 5 ARTIGO

EVALUATION OF THE NUTRITIONAL, GENOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF *EUGLENA* SP AND *SPIRULINA PLATENSIS* BIOMASSES

**Evaluation of the nutritional, genotoxic and antiproliferative effect of *Euglena* sp and *Spirulina platensis* biomasses**

Andressa Ribas Barreto<sup>1</sup>, Luis G. Ramirez-Mérida<sup>2</sup>, Maria Angélica Oliveira Linton<sup>1</sup>

1. Postgraduate Program in Agrobiology, Federal University of Santa Maria, UFSM, Roraima Avenue 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.
2. Applied Biotechnology Center, Department of Biology, University of Carabobo, Universidad Avenue, 2002, Valencia, Edo. Carabobo, Venezuela.

Corresponding author

E-mail: luisguillermolgrm@gmail.com

Declarations of interest: none

Artigo redigido conforme as normas da revista *Algae Research*.

### **Abstract**

The consumption of microalgae for food purposes has increased in recent decades, prompting the need for assessment studies regarding the safety of such consumption. This study, therefore, aims at the evaluation of the nutritional quality and also to genotoxic and antiproliferative effect of biomass of *Euglena* sp and *Spirulina platensis* by the *Allium cepa* test. The centesimal composition and amino acid profile by chemical and chromatographic tests was evaluated in the microalgae biomass. Five onion bulbs were used for each control and concentration. The cell cycle of 1000 cells per bulb was analyzed, totaling 5000 cells for each treatment. The mitotic index (MI) was calculated, the number of aberrant cells was quantified and these data were statistically analyzed by Chi-squared analysis ( $p < 0.05$ ). The biochemical analysis of both the *Euglena* and *Spirulina* biomasses showed high percentages of protein, lipids and carbohydrates and possesses all the essential amino acids. Similarly, it was observed that the three concentrations evaluated for each of the biomasses analyzed have an antiproliferative and non-genotoxic effect on meristematic cells of *A. cepa*. Therefore, under the conditions studied we can affirm that both *Euglena* and *Spirulina* biomass contain an acceptable nutraceutical level to be used in food formulations for humans and animals.

**Key words:** *Allium cepa*, Amino acids, Microalgae, Nutrition.



## 1. Introduction

In recent decades, microalgae industrial cultivation has increased due to interest in commercial applications. Microalgae are currently employed in many commercial activities, with the food and feed industry being one of the main [1]. The consumption of microalgae as a source in human food dates back to the fourteenth century in the Pre-Columbian Empire. However, their use for commercial purposes is only a few decades old, since the early 1950s, when due to the incipient increase of the world population, alternative sources of protein appeared to balance the possible food shortage [2].

Microalgae then appeared as a good source of protein and bioactive compounds giving them great potential as a food source and as a source of functional molecules [3]. Nutritional assessments have shown that microalgae biomass is beneficial as a dietary supplement or substitute for conventional protein sources [4].

In the last three decades, numerous attempts have been made by researchers and companies seeking to commercialize the production of microalgae. Some of these companies have been on the market for many years and have successfully produced the biomass of these organisms and marketed them in capsule, tablet and powder form [5].

The microalgae biomass for food purposes must have a nutritional and toxicological quality appropriate to national and international standards that ensure the consumer safety for the consumption of the product. In order to mitigate these possible toxic actions, different detection methods have been developed, including rapid detection [6]. Several studies have shown that plant testing is adequate to detect the genotoxic potential of different contaminants [7]. *Allium cepa* is one of the most commonly used species for the study of general toxicity, cytotoxicity and genotoxicity. It also provides results comparable to a number of other test systems using many different eukaryotic and prokaryotic organisms [8]. Therefore, the

present study aims to evaluate the nutritional quality, genotoxicity and antiproliferative capacity of the microalgae *Spirulina platensis* and *Euglena* sp. using the *A. cepa* test based on the fact that these microalgae have been widely used for food, nutraceutical and cosmetic purposes.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Microorganism and culture medium**

Two microalgae strains were used. *Spirulina platensis* (Brasil Vital, Anápolis, GO) and *Euglena* sp originally isolated from a pond on the campus of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (29°43'16.8"S 53°42'55.6"W). Stock cultures were propagated and maintained in solidified agar–agar (16 g L<sup>-1</sup>) containing inorganic fertilizers NPK 20:10:15 (50 g L<sup>-1</sup>) and sodium bicarbonate (1.5 g L<sup>-1</sup>). The incubation conditions used were 25 °C, photon flux density of 1 klux and a photoperiod of 12h.

### **2.2. Microalgal biomass production**

The biomass production was carried out in tubular photobioreactors with a maximum column height/diameter (h/D) ratio of 1.5 [9], in discontinuous operation, fed with 2.0 L of medium consisting of inorganic fertilizers NPK 20:10:15 (50 g L<sup>-1</sup>) and sodium bicarbonate (1.5 g L<sup>-1</sup>). The experimental conditions were as follows: initial cell concentration 200 mg L<sup>-1</sup>, isothermal reactor operating at 25 °C, continuous aeration of 3 Lmin<sup>-1</sup>, light intensity of 1 klux, light cycle of 24:0 (day:night) and a residence time of 168 h and 37 days for *Spirulina platensis* and *Euglena* sp respectively.

### **2.3 Harvesting and drying biomass**

The microalgal biomass was separated from the culture by decantation. It was subsequently dried on a tray dryer, into which air was blown at a constant speed of 1.5 m/s in a parallel flow at 60 °C and a thickness of 7 mm [10].

### **2.4 Chemical analysis and amino acid profile**

The centesimal composition of the biomass was characterized according to AOAC [11], being verified levels of proteins, lipids, carbohydrates, minerals, crude fiber and humidity. The amino acid profile, except for tryptophan, was analyzed in a gas chromatography equipped with a flame ionization detector (GC-FID) VARIAN-3400 CX (CA, USA). 1  $\mu$ L of samples were introduced into injection port operating in splitless mode (splitter port off for 1 min; 30:1) at 320 °C. The separation was performed in a RTX-5MS (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) (30 m  $\times$  0.25 mm id  $\times$  0.25  $\mu$ m). The programming temperature of the oven column was initially 100 °C for 2 min, then increased to 180 °C with a rate of 6 °C min<sup>-1</sup>, then increased for 200 °C for 1 min and was up to 320 °C with a rate 15 °C min<sup>-1</sup>, maintaining isothermal for 5 min. Hydrogen was the carrier gas used at constant pressure of 15 psi. The temperature detector was maintained at 280 °C. The identification was held in a gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS) Shimadzu, QP-2010 Plus (Tokyo, Japan) at same chromatographic conditions described for GC/FID. GC/MS interface and ion source were held at 280 °C. Tryptophan was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC, LC-20AD, Shimadzu, Co. Ltd., Japan; Column, CAPCELL PAK C18 AQ, 4.6 mm ID  $\times$  250 mm, Shiseido Co. Ltd., Japan; adetector, Flourospectro photometer, RF-20Axs, Shimadzu, Co. Ltd., Japan).

### **2.5 Preparation and obtaining of samples for cytogenetic analysis of meristematic cells.**

Three concentrations were prepared from the *Euglena* and *Spirulina* biomass with distilled water 0.15, 0.3 and 0.6 g L<sup>-1</sup> of which, 0.3 g L<sup>-1</sup> is considered the most common and recommended by The Food and Agriculture Organization of the United Nations as the maximum consumption dose [2]. *Allium cepa* bulbs were obtained from a rural farmer in the city of Valencia, Venezuela, were placed to root in flasks with distilled water, at room temperature ( $\pm$  26°C) for 72h, constantly aerated and a 12 h dark/light photoperiod, until roots with about 1.0cm of length were obtained. Five bulbs were placed for each treatment. Next,

the bulbs were subjected to the different treatments for 24 h. Then, the roots were collected and fixed in ethanol: acetic acid (3: 1) for 24 h and subsequently stored in 70% ethanol under refrigeration until the production of slides.

## **2.6 Preparation and evaluation of the slides**

An average of two slides were prepared per bulb and 1,000 cells per bulb were analyzed, totaling 5000 cells for each control and concentration. The roots were hydrolyzed in 1N HCl per 5 min, subsequently washed in distilled water and colored with 2% acetic orcein [12]. The meristematic region was smashed with the help of a small glass stick and placed on top a cover slip and observed microscopically at 40X. The calculation of the mitotic index (MI) was performed based on the percentage of dividing cells in addition, of cellular aberrations were evaluated.

## **2.7 Statistical analyzes**

The results for the chemical composition and amino acid profile were submitted to the normality test (Kolmogorov-Smirnov), with parametric data being compared by ANOVA followed by the Tukey test and non-parametric by the Kruskal-Wallis test using the PAST program version 3.14. Data were considered with significant variation for the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

The results obtained in the *A. cepa* test were evaluated using Chi-square ( $\chi^2$ ), with  $p < 0.05$ , through the statistical software Biostat 5.3 [13].

## **3. Results and Discussion**

The chemical analysis of the microalgae biomass shows high percentages of protein, lipids and carbohydrates (Table 1). The proximal composition determined for the microalgae was similar to that found by other authors, considering the differences resulting from the type of cultivation and other abiotic variables [14, 15]. As can be seen, the microalgae studied are basically constituted of proteins and carbohydrates. The ash content observed can be product

of the composition of the culture medium used. Although there is a significant difference in the proximal composition between *Euglena* and *Spirulina*, it does not counteract the fact that both microalgae provide high nutritional quality, in terms of protein, lipids and carbohydrates comparable to plant-based foods [16], being this is a normal cellular variability between species [17].

Analysis	Mean values (%)	
	<i>Euglena</i> sp	<i>Spirulina platensis</i>
Humidity	5,73 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,38 ± 0,4 <sup>b</sup>
Ashes	22,72 ± 1,9 <sup>a</sup>	21,88 ± 1,3 <sup>a</sup>
Protein	23,03 ± 2,5 <sup>a</sup>	51,21 ± 1,8 <sup>b</sup>
Lipids	2,86 ± 0,9 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,5 <sup>b</sup>
Carbohydrates	44,23 ± 3,7 <sup>a</sup>	14,07 ± 3,1 <sup>b</sup>
Crude fiber	1,43 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,3 <sup>b</sup>
Calcium	1,56 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,1 <sup>a</sup>

Table 1. Chemical composition of the *Euglena* and *Spirulina platensis* biomass

The different letters in the row represent a significant difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey tests

Table 2 shows amino acid profiles of *Euglena* sp and *S. platensis*. The presence of all essential and non-essential amino acids is evident. This infers us that these proteins are of high nutritional quality and digestible, which provides advantages to the consumer in terms of prophylactic improvements to maintain a good state of health [18].

Amino acids	g of amino acids per 16 g N	
	<i>Euglena</i> sp	<i>S. platensis</i>
Alanine	10.1	9,9

Glycine	6.4	3,3
Valine	6.6	8,1
Tyrosine	1.9	2,4
Leucine	6.3	8,1
Isoleucine	3.9	3,6
Proline	5.2	2,4
Methionine	1.7	1,6
Serine	3.8	3,2
Threonine	4.1	4,0
Phenylalanine	3.7	4,3
Aspartic acid	7.6	8,9
Cysteine	0.9	0,7
Glutamic acid	10.2	10,3
Histidine	2.5	1,7
Lysine	6.5	4,9
Tryptophan	1.6	1,1
Total	83,0	78,5

Table 2. Amino acid profile of *Euglena* and *Spirulina platensis* biomass

Some authors describe a behavior, of the amino acid profile, in several microalgae with high proportions of leucine and glutamic acid, and low rates of cysteine, methionine and tryptophan [19-21]. This pattern is observed in this study, also reported in *Euglena gracilis* used for nutritional supplement purposes in ruminants [22], in *Spirulina platensis* and four commercially cultivated microalgae throughout the world [23] or in *Spirulina* and *Chlorella* to evaluate the antioxidant and nutritional effect [24]. The microalgal biomass evaluated, have

a balanced composition of amino acids, although the amount of amino acids in microalgae can be affected by the culture form [23, 25]. Therefore, these microalgae biomass, given their nutritional quality, can be used as a nutraceutical food or nutritional supplement for animal and / or human consumption.

The analysis of the cell cycle by the *Allium cepa* test can be observed in Table 3, where the total number of cells analyzed, interphase, dividing cells and the respective mitotic index for the biomass samples of *Spirulina platensis* and *Euglena* sp are presented.

Treatments	Number of cells analyzed	Cells in interfase	Dividing cells	Mitotic Index (%)
Distilled water (control)	5000	4733	267	5.34 <sup>a</sup>
<i>Spirulina</i> 0.15 g L <sup>-1</sup>	5000	4873	127	2.54 <sup>b</sup>
<i>Spirulina</i> 0.3 g L <sup>-1</sup>	5000	4901	99	1.98 <sup>b</sup>
<i>Spirulina</i> 0.6 g L <sup>-1</sup>	5000	4861	139	2.78 <sup>b</sup>
<i>Spirulina</i> 0.15 g L <sup>-1</sup>	5000	4891	109	2.18 <sup>b</sup>
<i>Euglena</i> 0.3 g L <sup>-1</sup>	5000	4879	121	2.42 <sup>b</sup>
<i>Euglena</i> 0.6 g L <sup>-1</sup>	5000	4852	148	2.96 <sup>b</sup>

Table 3. Cell cycle analyzes of *Allium cepa* root tips treated with biomass of *Spirulina platensis* and *Euglena* sp.

Means followed by the same letter do not differ significantly at the level of 0.05 by the  $\chi^2$  test.

It can be seen that the MI of all treatments differ statistically when compared to the control, showing a significant reduction in cell proliferation of *A. cepa*. When comparing the MI of the three aqueous extracts concentrations of *Spirulina platensis* and *Euglena* sp, no significant difference is evidenced. Similarly, there is no statistically significant difference between the mitotic indices when comparing the two species of microalgae with each other.

The antiproliferative activity of microalgal metabolites has been reported by Loch-Neckel et al. [26] evidencing that from the highest evaluated concentrations of carotenoid extracts obtained from *Haematococcus pluvialis*, the viability of B16F10 murine melanoma cells was reduced, in 66.58 and 82.91%, in periods of 72 and 96 h .

Similarly, omega-3 polyunsaturated fatty acids extracted from *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira pseudonana* could represent a new therapeutic strategy, as a dietary supplement, to overcome resistance to cisplatin (CDDP) in metastatic melanoma [27]. In turn, isolated peptides of *Chlorella vulgaris* have shown antiproliferative effect and inducer of post-G1 inhibition in gastric carcinoma cells [28].

Table 4 shows the data concerning the genotoxic behavior of the treatments. Glyphosate is used as a positive control since it has demonstrated its capacity as inducer of alterations in meristematic cells of *A. cepa* [29]. It is observed that the genotoxic effect on the *A. cepa* test was higher in the cells that came into contact with glyphosate, than in the cells treated with the microalgae biomass. Similarly, it can be evidenced that in relation to cellular chromosomal alterations, there is no significant difference between the microalgae species nor in the concentrations evaluated.

Treatments	Number of cells	Dividing cells	Aberrant cells
------------	--------------------	-------------------	-------------------



		analyzed		
Distilled water (control)		5000	267	2 <sup>a</sup>
	0.15 g L <sup>-1</sup>	5000	127	1 <sup>a</sup>
<i>Spirulina</i>	0.3 g L <sup>-1</sup>	5000	99	0 <sup>a</sup>
	0.6 g L <sup>-1</sup>	5000	139	2 <sup>a</sup>
	0.15 g L <sup>-1</sup>	5000	109	1 <sup>a</sup>
<i>Euglena</i>	0.3 g L <sup>-1</sup>	5000	121	1 <sup>a</sup>
	0.6 g L <sup>-1</sup>	5000	148	0 <sup>a</sup>
Glyphosate (control)			159	31 <sup>b</sup>

Table 4. Number of meristematic cells of *A. cepa* analyzed at the interface, cell division and total of aberrant cells treated with biomass of *Spirulina* and *Euglena*

Means followed by the same letter do not differ significantly at the level of 0.05 by the  $\chi^2$  test.

These results show that the microalgae biomass evaluated does not have a genotoxic effect on *A. cepa* cells. Although some alterations have been found in the concentrations evaluated, they are inferior and without statistical significance to those observed in the positive glyphosate control. These results support the idea of other studies on the use of microalgal biomass for beneficial and nutraceutical purposes [30-32].

#### 4. Conclusion

*Spirulina platensis* is presented as a possible food or nutritional supplement with more protein than *Euglena*, although the biomass of *Euglena* sp also contains adequate levels to be used as food and nutritional supplements. Both *Euglena* sp and *Spirulina platensis* have antiproliferative and non-genotoxic effects on meristematic cells of *A. cepa* in all the concentrations evaluated.

*Euglena* and *Spirulina* biomass contain an acceptable nutraceutical level to be used in food formulations for humans and animals and as a coadjuvant in prophylactic therapies

## 5. References

- [1] F. Camacho, A. Macedo, F. Malcata, Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Mar. Drugs*. 17 (2019) 312.
- [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. n.1034, 33 p. 2008.
- [3] B. Vaz, J.B. Moreira, M.G. Morais, J.A.V. Costa, Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Curr. Opin. Food Sci.* 7 (2016) 73-77.
- [4] E. Becker, Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* 25 (2007) 207-210.
- [5] R.M. Ganta, Z. Svircev, Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *J Phycol.* 44 (2008), 260–268.
- [6] T. Weisse, V. Bergkemper, Rapid detection and quantification of the potentially toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* by in-vivo fluorometry and flow cytometry. *Water Res.* 138 (2018) 234-240.
- [7] G. Sponchiado, M.L. Adam, C.D. Silva, B.S. Soley, C. Mello-Sampayo, D. Cabrini, C. Correr, M. Otuki. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. Ethnopharmacol.* 178 (2016) 289-296.
- [8] S.B. Tedesco, H.D. Laughinghouse, Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test In: Srivastava, J. (Eds), Environmental Contamination. Rijeka: InTech, 2012, pp. 137-157.
- [9] L.G. Ramírez-Mérida, L.Q. Zepka, E. Jacob-Lopes, Current Status, Future Developments and Recent Patents on Photobioreactor Technology. *Recent Pat. Eng.* 9 (2015) 80-90.

- [10] L.Q. Zepka, E. Jacob-Lopes, R. Goldbeck, L. Souza-Soares, M. Queiroz, Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresour.Technol.* 101 (2010) 7107–7111.
- [11] AOAC. Official Method of Analysis. 16th Edition, Association of Official Analytical, Washington DC, 2002.
- [12] J.M. Fachinetto, S.B. Tedesco, 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*. *Ver. Bras. Pl. Med.* 11 (2009) 360-367.
- [13] M. Ayres, *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 2007.
- [14] H.K. Yilmaz, The proximate composition and growth of *Spirulina platensis* biomass (*Arthrospira platensis*) at different temperatures. *J. Anim. Vet. Adv.* 11 (2012) 1135-1138.
- [15] A. Gissibl, A. Sun, A. Care, H. Nevalainen, A. Sunna, Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotech.* 7 (2019) 108. doi:10.3389/fbioe.2019.00108.
- [16] G.L. Bhalamurugan, V. Orsat, M. Lefsrud, Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environ. Eng. Res.* 23 (2018) 229-241.
- [17] Z.V. Finkel, M.J. Follows, J.D. Liefer, C.M. Brown, I. Benner, A.J. Irwin, Phylogenetic Diversity in the Macromolecular Composition of Microalgae. *PLoS ONE* 11 (2016) e0155977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155977>.
- [18] J.E. Arsenault, K.H. Brown, Effects of protein or amino-acid supplementation on the physical growth of young children in low-income countries, *Nutrition Reviews*, 75 (2017) 699–717.

- [19] R. Akgül, B. Kızılkaya, F. Akgül, H. Erduğan, Amino acid composition and crude protein values of some Cyanobacteria from Çanakkale (Turkey). *Pak. J. Pharm. Sci.* 28 (2015) 1757-1761.
- [20] S. Radhakrishnan, P.S. Bhavan, C. Seenivasan, T. Muralisankar, 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* 2 (2017).
- [21] A.S. Lim, H.J. Jeong, S.J. Kim, J.H. Ok, Amino acids profiles of six dinoflagellate species belonging to diverse families: possible use as animal feeds in aquaculture. *Algae* 33(2018) 279-290.
- [22] A. Aemiro, S. Watanabec, K. Suzukic, M. Hanadab, K. Umetsua, T. Nishida, Effects of *Euglena* (*Euglena gracilis*) supplemented to diet (forage: concentrate ratios of 60:40) on the basic ruminal fermentation and methane emissions in in vitro condition. *Animal Feed Scienc. Technol.* 212 (2016) 129–135.
- [23] C. Safi, M. Charton, O. Pignolet, F. Silvestre, C. Vaca-Garcia, P.Y. Pontalier, Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 523-529.
- [24] A.R. Machado, C.S. Graça, L.M. Assis, L.A. Souza-Soares, Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. *Revista de Ciências Agrárias*, 40 (2017) 264-278. <https://dx.doi.org/10.19084/RCA16011>.
- [25] B.I.k Lee, S.K. Kim, J.H. Kim, H.S. Kim, J.I. Kim, W. Shin, J. Rho, W. Yih, Intraspecific variations in macronutrient, amino acid, and fatty acid composition of mass-cultured *Teleaulax amphioxeia* (Cryptophyceae) strains. *ALGAE*. 34 (2019) 163-175. doi:<https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.6.4>.

- [26] G. Loch-Neckel, F.E. Schutz, R.B. Derner, E. Lemos-Senna, Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). *Matéria (Rio J.)*, Rio de Janeiro, 23 (2018), e12221.
- [27] R.O. VASCONCELOS, S. SERINI, A.P. VOTTO, G. TRINDADE, C. FANALI, A. SGAMBATO, G. CALVIELLO, Combination of omega-3 fatty acids and cisplatin as a potential alternative strategy for personalized therapy of metastatic melanoma: an in-vitro study. *Melanoma Research*, 29 (2019) 270-280.
- [28] I.C Sheih, T. Fang, T.K. Wu, P.H. Lin, Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010)1202–1207.
- [29] S.A. Salazar, C.J. Quintero, Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Sci. Total Environ.* 700 (2020) 134452.
- [30] B. Vaz, J. Moreira, M. Morais, J.A. Costa, Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Curr. Opin. Food Sci.* 7 (2016) 73-77.
- [31] L. Ramírez-Mérida, Q.L. Zepka, E. Jacob-Lopes, Microalgas y cianobacterias Aplicación en Medicina. *Rev. Elect. PortalesMedicos.com.* 9 (2014) 149.
- [32] Nicoletti, Microalgae Nutraceuticals. *Foods*, 5 (2016) 54.