

## **Potencial de la Espirulina (*Arthrospira* spp. Y *Spirulina* spp.) en la Producción de Biocombustibles: Una Revisión de Técnicas y Avances.**

Coronado-Tovar Ariadnel, Herrera-Monroy Sonia<sup>2</sup>,  
Lopez-Perez Pablo Antonio<sup>3</sup>

DOI: 10.56643/rcia.v4i1.204

Como citar este artículo: Coronado-Tovar et al. (2025). Potencial de la espirulina (*Arthrospira* spp. y *Spirulina* spp.) en la producción de biocombustibles: una revisión de técnicas y avances. *Revista Científica de Ingenierías y Arquitectura*. 4(1). 40-58. DOI: <https://doi.org/10.56643/rcia.v4i1.204>

### **Resumen**

Las cianobacterias son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos que destacan por su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y por la producción de compuestos biotecnológicos de alto valor. Entre estas, la Espirulina (*Arthrospira* spp. y *Spirulina* spp.) ha captado la atención de la industria debido a su potencial como materia prima para biocombustibles de nueva generación. Su uso se basa en la alta productividad de biomasa y su capacidad para acumular lípidos, propiedades esenciales en la producción de biodiesel. Este trabajo aborda una revisión exhaustiva de las técnicas de edición genética aplicadas a microalgas, identificando los métodos más efectivos, como la biobalística, electroporación, transformación mediada por *Agrobacterium*, conjugación y transformación de protoplastos. Estas metodologías permiten la manipulación precisa del ADN de estos organismos, mejorando características como la resistencia a condiciones adversas y la acumulación de metabolitos de interés. En conclusión, los avances recientes destacan la relevancia de marcadores metabólicos y sistemas basados en resistencia a antibióticos como herramientas clave en la optimización de Espirulina para aplicaciones industriales.

**Palabras clave:** Algas, biocombustibles, Espirulina, genética, industria.

### **Abstract**

Cyanobacteria are a diverse group of photosynthetic microorganisms that stand out for their ability to adapt to different environmental conditions and for the production of high-value biotechnological compounds. Among these, Spirulina (*Arthrospira* spp. and *Spirulina* spp.) has captured the attention of the industry due to its potential as a raw material for new generation biofuels. Its use is based on its high biomass productivity and its capacity to accumulate lipids, essential properties in biodiesel production. This work addresses an exhaustive review of gene editing techniques applied to microalgae, identifying the most effective methods, such as biobalistics, electroporation, *Agrobacterium*-mediated transformation, conjugation and protoplast transformation.

<sup>1</sup>Estudiante de Ingeniería en Biociencias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, escuela Superior de Apan. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5446-7373>. Correo de correspondencia: [ariadne08coro@gmail.com](mailto:ariadne08coro@gmail.com)

<sup>2</sup>Doctora en Ciencias en Horticultura, Profesor en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0275-2831>.

<sup>3</sup>Doctor en Biotecnología, Profesor en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan. ORCID: <https://orcid.org/00001-7534-2142>.

Recibido:09/12/2024 | Aceptado:20/03/2025 | Publicado:15/06/2025

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés. La investigación fue financiada con recursos de los autores.

These methodologies allow the precise manipulation of the DNA of these organisms, improving characteristics such as resistance to adverse conditions and the accumulation of metabolites of interest. In conclusion, recent advances highlight the relevance of metabolic markers and antibiotic resistance-based systems as key tools in the optimization of Spirulina for industrial applications.

**Key words:** Algae, biofuels, genetics, industry, Spirulina

## **Introducción**

El mundo enfrenta dos grandes problemas energéticos: el agotamiento de las reservas petroleras y la contaminación causada por los combustibles fósiles (Castells, 2012). Durante décadas, el petróleo ha sido la principal fuente de energía, pero su explotación implica graves impactos ambientales (Fernández-Linares et al., 2012). Ante esto, los biocombustibles, como el biodiesel, han emergido como alternativas sostenibles.

Las microalgas, incluidas las del género Spirulina, son particularmente atractivas debido a su eficiencia fotosintética, alta capacidad de asimilación de CO<sub>2</sub> y su potencial para acumular triglicéridos (Demirbas y Demirbas, 2010).

La producción de biodiesel a partir de microalgas representa una alternativa prometedora para resolver estos problemas. Las microalgas destacan por su capacidad para crecer en medios no aptos para la agricultura tradicional y su alta tasa de conversión de dióxido de carbono en biomasa rica en lípidos. En este contexto, el género Spirulina, en particular, ha mostrado características únicas que la hacen adecuada para este propósito. Entre estas características se encuentran su rápida tasa de crecimiento, alta concentración de proteínas y lípidos, y su capacidad para prosperar en condiciones extremas.

La producción de biodiesel a partir de microalgas ha sido objeto de investigación durante más de 20 años y, en la última década, ha cobrado gran relevancia. Actualmente, científicos de diversas partes del mundo han demostrado el potencial de varias especies de microalgas, como *Chlorella minutissima*, *Thalassiosira fluviatilis* y *Thalassiosira pseudomona* como fuentes de materia prima (Loera-Quezada, M., & Olguín, E. J., 2010). Sin embargo, el uso de *Espirulina* (*Spirulina* spp y *Arthrospira* spp) no ha sido ampliamente considerado, ya que en México su explotación se enfoca principalmente en la producción de suplementos alimenticios (*Espirulina*, s. f.)

A pesar de su potencial, el uso de *Espirulina* para producir biocombustibles enfrenta retos como costos de producción no competitivos y dificultades en los procesos de extracción de lípidos. Sin embargo, mediante el uso de la biotecnología, se están desarrollando estrategias innovadoras para optimizar tanto la producción de biomasa como el contenido lipídico. Estas estrategias incluyen la manipulación genética y el diseño de sistemas de cultivo eficientes, como los fotobiorreactores cerrados, que permiten un control más preciso de las condiciones de crecimiento.

Este trabajo se centra en una revisión detallada de las técnicas de edición genética aplicadas a la *Espirulina*, abordando los avances tecnológicos que han permitido mejorar sus características para la producción de biocombustibles. Además, se discuten las implicaciones económicas y medioambientales de estas innovaciones, destacando la necesidad de seguir investigando para superar las barreras actuales y hacer de la *Espirulina* una opción viable para la producción de energía sostenible.

## Materiales y métodos

Se trata de una búsqueda y revisión sistemática (también llamada “Systematic search and review” por Grat & Booth, 2009), donde se relacionaron diversos tipos de estudio procedentes de distintas fuentes para delinear un objeto de estudio, construir premisas de partida y hacer relaciones entre trabajos (Valencia-López, 2016; Jurado-Rojas, 2005) con el fin de mostrar una visión sistemática y panorámica de la prevalencia de investigaciones sobre las distintas técnicas de edición genética empleadas sobre algas *Espirulina* (*Arthrospira* spp y *Spirulina* spp) para incrementar la cantidad de biomasa y lípidos con la finalidad de obtener biodiesel.

De este modo, los pasos seguidos para la sistematización y análisis de la información fueron los recomendados por Reyes-Ruíz y Carmona Alvarado (2020). Es decir, se inició con un arqueo de fuentes seguido por la revisión, cotejo, interpretación y elaboración de conclusiones.

Para el arqueo se utilizó el motor de búsqueda de Google Académico y Google convencional filtrando los resultados con base a la importancia de la información, así como por antigüedad (14 años máximo pues en los motores de búsqueda no existía suficiente información de antigüedad menor), además de utilizar los criterios “ordenar por relevancia”, “Cualquier idioma”, “Artículos de revisión”, “Con todas las palabras”, “En todo el artículo” y las siguientes oraciones clave escritas; *Espirulina*, microalgas, cianobacterias, biocombustibles, modificaciones genéticas, cultivo de microalgas, obtención de biocombustibles a partir de microalgas.

Después en la etapa de revisión y cotejo se seleccionaron trabajos de diversa índole mediante la lectura del resumen y la introducción, discriminando aquellos que no abordaran los temas con las palabras clave ya descritas o que abordaran conceptos repetidos. Se consultaron cincuenta artículos y una tesis para la investigación. Para las etapas restantes se analizó la información consultada, de la que derivaron temas comunes los cuales fueron seccionados para su interpretación y posterior conclusión. A continuación, se presentan en forma de subtemas, los temas comunes encontrados y su análisis.

## Generalidades de la *Espirulina*

*Espirulina*, una cianobacteria perteneciente al filo Cyanobacteria, incluye a los géneros *Spirulina* y *Arthrospira*. Estos microorganismos se destacan por su contribución a la producción de oxígeno y su aplicación en diversas áreas biotecnológicas, como la producción de biocombustibles y la biorremediación (Avalos-Flores et al., 2017). Gracias a su adaptabilidad, la *Espirulina* puede cultivarse en condiciones controladas que garantizan una alta productividad y calidad. El primer aislamiento de un miembro del género *Arthrospira* fue realizado por el naturalista francés Turpin, quien estableció la clasificación taxonómica del género (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Arthrospira*

Jerarquía	Clado
Dominio:	Prokaryota
Reino:	Eubacteria
Subreino:	Negibacteria
Filo:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Oscillatoriales
Orden:	Microcoleaceae
Familia:	<i>Arthrospira</i>
Genero:	

**Nota:** Clasificación taxonómica de *Espirulina* (Guiry & Guiry. 2015).

Tiempo después, el biólogo Jean Leonard en el Instituto Francés del Petróleo investigó y determino el contenido y composición proteica de *Arthrospira* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Contenido y composición proteica de *Arthrospira* spp.

Proteínas	Aminoácido	Contenido (%)
50-70%	Leucina	5.9-6.5
	Valina	7.5
	Isoleucina	6.8
	Lisina	2.6-3.3
	Fenilalanina	2.6-3.3
	Metionina	1.3-2.0
	Triptófano	1.0-1.6
	Tirosina	2.6-3.3
	Acido glutámico	7.3-9.5
	Acido aspártico	5.2-6.0
	Cisteína	0.5-0.7

**Nota:** Porcentaje de los principales aminoácidos contenidos en *Espirulina* del género *Arthrospira* (Cohen, 1997; Sasson, 1997; Sánchez et al., 2003; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006).

Una de las principales ventajas de la *Espirulina* es su alta eficiencia fotosintética, que la posiciona como un recurso prometedor para aplicaciones industriales. Estos organismos no solo generan una biomasa rica en nutrientes, sino que también poseen la capacidad de acumular compuestos de interés biotecnológico, como proteínas y lípidos. Estas propiedades han motivado el desarrollo de técnicas avanzadas de cultivo y manipulación genética para optimizar su rendimiento.

Estos organismos habitan principalmente en lagos alcalinos (pH entre 8-10.2, según Muñoz Puetate 2021), sin embargo, pueden crecer en agua dulce, además debido a su alto contenido nutricional y a su alta tasa de producción de biomasa se cultivan en ambientes acuáticos controlados, utilizando ingeniería genética y otras técnicas para asegurar su calidad e inocuidad (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Tarazona-Díaz, 2018). La ingeniería genética de microalgas representa un campo fascinante dentro de la biotecnología y se ha desarrollado de manera intensiva, especialmente con el objetivo de optimizar la producción de biocombustibles (Porta, 2021)

### ***Cultivo de Espirulina***

Los sistemas de cultivo o biorreactores se suelen clasificar según su configuración, tipo de funcionamiento y aplicación. Dependiendo del destino de la producción se pueden elegir las mejores características de temperatura, pH, nutrientes, intensidad luminosa, entre otros, para un cultivo óptimo (Acién-Fernández et al., 2017; Gonzales, 2017; Muñoz-Puetate et al., 2021). Para el caso de la obtención de biocombustibles, se priman aquellos factores que beneficien la obtención de biomasa y lípidos.

El cultivo puede realizarse en sistemas abiertos o cerrados, conocidos como fotobiorreactores (PBR) (Fig. 1). Los sistemas abiertos suelen ser estanques al aire libre expuestos a las condiciones ambientales, como la luz solar y la temperatura. Aunque son menos costosos de construir y operar, su eficiencia es menor debido a la falta de control sobre factores externos, lo que puede llevar a la contaminación por otros microorganismos y a pérdidas de agua por evaporación. Sin embargo, son comunes en la producción comercial a gran escala debido a su simplicidad.



**Figura 1.** Fotobiorreactor cerrado. Elaboración propia. Son fotobiorreactores en donde se cultiva la microalga *Espirulina* en los laboratorios de la Escuela Superior de Apan

Por otro lado, los sistemas cerrados, o fotobiorreactores cerrados, están diseñados para proporcionar un entorno controlado que optimiza las condiciones de cultivo. Estos sistemas utilizan estructuras como tubos transparentes o tanques sellados que permiten ajustar parámetros como la intensidad de la luz, el flujo de nutrientes y la temperatura. Este control preciso no solo aumenta la eficiencia en la producción de biomasa, sino que también reduce el riesgo de contaminación y permite un uso más eficiente de los recursos. A pesar de su mayor costo inicial, los fotobiorreactores cerrados son ideales para investigaciones científicas y aplicaciones industriales que requieren alta pureza del producto (Ramírez-Mérida et al., 2013).

Para la obtención de biomasa de espirulina, se han encontrado diversas fuentes de nutrientes para su cultivo, destacándose por su fácil producción los medios Schlosser, Zarrouk y Zarrouk Modificado o MZM (Huaman, 2021; Muñoz-Puetate et al., 2021; Rojas, Vargas & Saénz, 2017), además de otro medio propuesto por Pablo Antonio López-Pérez (autor de este trabajo), que además de biomasa favorece la producción de lípidos (Tabla 3) el cual se obtuvo a partir de modificar las concentraciones del MZM con resultados satisfactorios.

**Tabla 3**

*Composición del medio de cultivo MZM modificado*

Compuesto	Concentración (g*L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	16
NaNO <sub>3</sub>	2.5
NaCl	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.20
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeSO <sub>4</sub>	0.01
EDTA	0.08

**Nota:** Las concentraciones se obtuvieron mediante experimentación con datos de Rojas, Vargas & Saénz, 2017.

## Obtención de Biocombustibles a partir de *Espirulina*

La producción de biodiesel a partir de microalgas ha despertado un interés creciente en diversos grupos de investigación. Un ejemplo destacado es la empresa española AlgaEnergy (García, 2015b).

Este enfoque presenta múltiples ventajas energéticas, como la capacidad de fijar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y nitrógeno (N) (Fig. 2), contribuyendo significativamente a mitigar el efecto invernadero. Entre sus beneficios se encuentra también el hecho de que no compite con las actividades agrícolas tradicionales y posee una productividad de biomasa entre 30 y 100 veces superior a otras materias primas (De Medio Ambiente y Recursos Naturales, s. f.). Además, su reproducción es extremadamente rápida, duplicando la producción de biomasa, lo que a su vez incrementa la obtención de biodiesel. Este tipo de cultivo requiere menos superficie que los cultivos agrícolas y no depende de herbicidas ni pesticidas. Los derivados de las microalgas encuentran aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y agrícola (García, 2015).

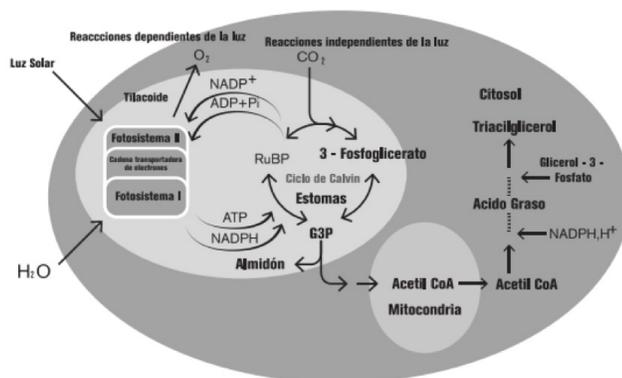


Figura 2. Esquema de la fotosíntesis, fijación de CO<sub>2</sub> y acumulación de células microalgales. Fuente: Zeng et al., 2011.

Sin embargo, existen desventajas en la producción de biodiesel a partir de microalgas. La concentración de biomasa en los cultivos y el contenido lipídico de las células afectan los costos de extracción y transformación. Cuanto mayor sea el contenido deseado de lípidos, más elevados serán los costos de producción (Demirbas, 2010). Cabe mencionar que, en la actualidad, no se han establecido plantas comerciales masivas dedicadas exclusivamente a la producción de biodiesel a partir de microalgas, lo que limita la evaluación precisa de su potencial.

A pesar de las limitaciones, el uso de *Espirulina* podría representar avances innovadores para la sociedad. Entre estos se incluyen el tratamiento eficiente de aguas residuales, la biorremediación de suelos, la obtención de pigmentos naturales y la producción de biocombustibles (Avalos-Flores et al., 2017). Por otra parte, la biotecnología ha logrado avances notables en la generación de biocombustibles líquidos a partir de biomasa, los cuales representan una fuente renovable y abundante en regiones donde los combustibles fósiles no son accesibles (Stephanopolus et al., 2014).

En años recientes, se han evaluado los impactos económicos y ambientales de biocombustibles como etanol, metano, hidrógeno y biodiesel. El biodiesel, en particular, se destaca como la tecnología más prometedora para sustituir combustibles derivados del petróleo, especialmente en el sector transporte. Además, reduce las emisiones de GEI (Gases de Efecto Invernadero) hasta en un 70-90% en comparación con el diésel convencional (Younes Dautor, 2014).

Los gastos de producción de biodiesel pueden compensarse mediante la comercialización de coproductos derivados de la biomasa. Las microalgas contienen proteínas, carbohidratos y compuestos de gran importancia, como astaxantina, carotenos, clorofila, ácidos grasos libres y ácido linoleico (Rashid et al., 2014). Estos componentes tienen aplicaciones industriales en biorrefinerías, consideradas industrias de doble propósito (Castillo et al., 2017).

Estudios recientes indican que la producción industrial de biodiesel es económicamente viable si se optimiza la estrategia de refinado basada en la biomasa (Younes Dautor, 2014). Según Castillo et al. (2017), el proceso consta de tres fases principales: 1) cultivo de cepas para generar biomasa, 2) recolección de biomasa y ruptura celular, y 3) reacción de esterificación para transformar los compuestos en biodiesel (Koller et al., 2012). Diversas tecnologías pueden mejorar estos procesos, como el uso de sustratos ricos en azúcares específicos (xilosa, arabinosa) involucrados en el ciclo de las pentosas fosfato para aumentar la acumulación de lípidos (Cho et al., 2015). Otros enfoques incluyen tratamientos de hidrólisis o el enriquecimiento de medios de cultivo con mioinositol, lo cual favorece la acumulación de lípidos y biomasa en microalgas (Mu et al., 2015; Gui et al., 2014).

La reducción del nitrógeno y la adición de iones metálicos y sales, como el EDTA, también inducen estrés en las microalgas, incrementando la producción de lípidos (Ren et al., 2014; Liu et al., 2016). Adicionalmente, diversas técnicas biotecnológicas se enfocan en maximizar la cantidad de lípidos y biomasa, mejorando así la eficiencia en la obtención de biodiesel.

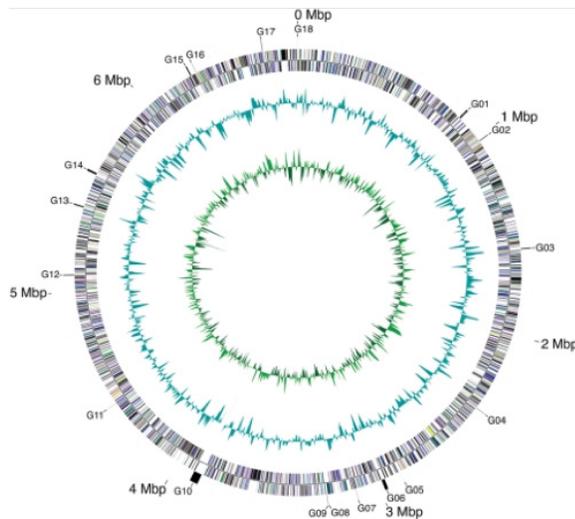
### ***Modificación genética de *Espirulina****

La ingeniería genética, conocida también como modificación genética, comenzó a formar parte de nuestro vocabulario durante la década de 1970 para referirse a las innovadoras técnicas de recombinación de ADN. Este proceso emplea herramientas de laboratorio que permiten modificar la composición genética de un organismo de manera controlada. Una de sus principales ventajas es que no requiere transferir numerosos genes, algunos de los cuales podrían presentar características no deseadas, sino que permite introducir únicamente uno o pocos genes que aportan propiedades específicas de interés (Ingeniería Genética, s. f.).

A lo largo del tiempo, la investigación biotecnológica de las microalgas ha despertado un gran interés, particularmente en la producción de biomasa destinada a la alimentación de peces, ganado y humanos. Más recientemente, este interés se ha extendido a otros campos, como la generación de biocombustibles, obtención de pigmentos como ficocianina y aloficocianina, carotenoides (como el caroteno o las xantofilas) y compuestos como el almidón (Porta, H., 2021).

El genoma de la *Espirulina*, tomando como referencia la cepa NIES-39, está compuesto por un cromosoma circular de 6.8 Mb. Este contiene 6,630 genes codificantes de proteínas, además de dos conjuntos de genes de ARN ribosomal (RNAr) y 40 genes de ARN de transferencia (RNAt). Cabe destacar que el 78% de estos genes se consideran constitutivos, lo que significa que se comparten con otros organismos (Figura 3) (Spirulina: El Potencial Biotecnológico y Alternativo de un Alimento Poco Convencional, 2017).

La modificación genética de las cianobacterias, como la *Espirulina*, resulta relativamente sencilla. Esto se debe a que algunas cianobacterias tienen la capacidad natural de ser transformadas, mientras que otras han sido manipuladas mediante sistemas no biológicos, como el uso de electroporación (Koksharova y Wolk, 2002).



**Figura 3.** Representación esquemática del cromosoma circular de *Espirulina* (*Arthrospira platensis*). Tomada del programa Blast Databases a partir de la Cepa NIES-39w Pryan et al., (2019).

**Nota:** La escala indica las coordenadas en pares de Mb. De fuera a dentro: círculo 1, los huecos en el genoma; círculos 2 y 3, genes predichos codificadores de proteínas en las cadenas directa e inversa; círculo 4, contenido de G+C; círculo 5, proporción de GC. Se han numerado dieciocho contig gaps (G01-G18) en el sentido de las manecillas del reloj, empezando por el final del contig más largo. Las categorías funcionales se codificaron por colores según los colores estándar utilizados por los COG.

### ***Técnicas para la transformación de microalgas***

Para insertar una secuencia de DNA en el genoma de una célula huésped, existen diversas técnicas que incluyen métodos físicos, químicos (denominados no biológicos) y biológicos. Independientemente del sistema utilizado, es importante considerar factores como la eficiencia de transformación, el costo, la reproducibilidad y la capacidad para generar múltiples eventos de transformación (Porta, 2021).

Los métodos no biológicos más comunes para transformar microalgas incluyen la biobalística, la electroporación y la transformación con partículas de vidrio o de carburo de silicio. En cuanto a los métodos biológicos, se emplean sistemas como la transformación mediante *Agrobacterium*, conjugación y el uso de protoplastos (Qin et al., 2012; Ortiz-Matamoros, 2018, p. 40). A continuación, se describen estas técnicas.

### ***Sistemas de transformación mediados con agentes no biológicos***

Estos sistemas emplean procedimientos químicos, fisicoquímicos o mecánicos para transferir genes. Muchas de estas técnicas se basaron en métodos empleados previamente para transformar células animales (Díaz et al., 2004; Gutiérrez et al., 2002; Danilova, 2007; Rao et al., 2009).

#### **Sonicación**

Descrito por Brown y Bischof en 1962, este método se utiliza para transferir genes en tejidos vegetales, células intactas y protoplastos mediante ultrasonidos de frecuencias superiores a 20 kHz. Estas frecuencias generan poros transitorios en las membranas celulares, permitiendo la

entrada del DNA foráneo (Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

El proceso de sonicación se basa en el fenómeno de cavitación acústica, donde burbujas de vapor colapsan, generando ondas de choque y pequeños chorros líquidos que rompen estructuras celulares. En el contexto de la modificación de algas para la producción de biocombustibles, la sonicación juega un papel clave en varios aspectos del procesamiento de las algas y la extracción de compuestos útiles, como los lípidos, que se utilizan para producir biocombustibles como el biodiésel, este método facilita la extracción de lípidos en algas, aumentando su producción en un rango del 10-30%, lo cual es crucial en la producción de biocombustibles como el biodiésel (Me-hier-Humberta et al., 2005; Miller et al., 2002).

Las células de las algas tienen paredes celulares resistentes, lo que dificulta la extracción de los lípidos que se encuentran dentro de ellas y la sonicación se utiliza para romper o debilitar estas paredes celulares mediante la generación de pequeñas burbujas de vapor que producen fuerzas mecánicas intensas, este proceso es el que facilita la liberación de los lípidos (Fig 4)



**Figura 4.** Homogeneizadores ultrasónicos UPI00H y UP400St: Sonicación para lisis y extracción celular. Tomada de Feng, Hao & Barbosa-Canovas, Gustavo & Weiss, Jochen. (2011)

### ***Ventajas y desventajas del método***

La sonicación permite introducir ADN foráneo de manera eficiente y trabajar con diversos tipos de células. Sin embargo, puede causar daños en la pared celular y alteraciones en la permeabilidad de la membrana (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

#### **Electroporación**

La electroporación no es más que, un aumento significativo de la conductividad eléctrica mediante un campo eléctrico aplicado externamente, en la que se afecta la permeabilidad de la membrana plasmática celular (Rathod et al. 2017). Las membranas celulares se desestabilizan temporalmente, lo que provoca una pérdida momentánea de su permeabilidad. Esto da lugar a la formación de poros transitorios que permiten el paso de macromoléculas, la fuga de iones, la salida de metabolitos y una mayor captación de ADN por parte de las células (Krassowska & Filev, 2007; Fox et al., 2006).

Este mecanismo se lleva a cabo con un equipo conocido como electroporador (Fig. 5), el cual utiliza descargas de capacitores para producir pulsos de alto voltaje. Dichos pulsos generan una corriente eléctrica que atraviesa la suspensión que contiene las células, permitiendo la permeabilización de las membranas y facilitando la incorporación de ADN externo, el cual se utiliza para transformar las células (Granados y Chaparro-Giraldo, 2012).

El ADN exógeno que se pretende introducir debe encontrarse presente en la solución junto con las células a transformar. Normalmente, este ADN, o genes de interés, está contenido en un plásmido (Fox et al., 2006; Chen et al., 2006). Para ello, las células son expuestas a pulsos eléctricos controlados de alto voltaje (estos oscilan entre los 200 200 V/cm y los 600 V/cm) y de corta duración, que van desde microsegundos hasta milisegundos (Tarek, 2005; Chen et al., 2006)

Cuando el voltaje aplicado a la membrana plasmática supera su rigidez dieléctrica, que es la capacidad del material para resistir la conducción eléctrica, se generan poros en la membrana. Si el campo eléctrico y la duración de la exposición se ajustan correctamente, estos poros se cierran después de un breve periodo, durante el cual los compuestos externos pueden ingresar a la célula. Sin embargo, una exposición prolongada o excesiva a estos campos eléctricos puede provocar daños irreversibles en las membranas y la muerte celular (Mohan Babua et al. 2003; Larik et al. 2004)



**Figura 5.** Electroporador. Tomada de BTX Sistema de Electroporación ECM 830, Con Soporte de Seguridad - Analizadores E Instrumentos Clínicos, Electroporadores, s. f.

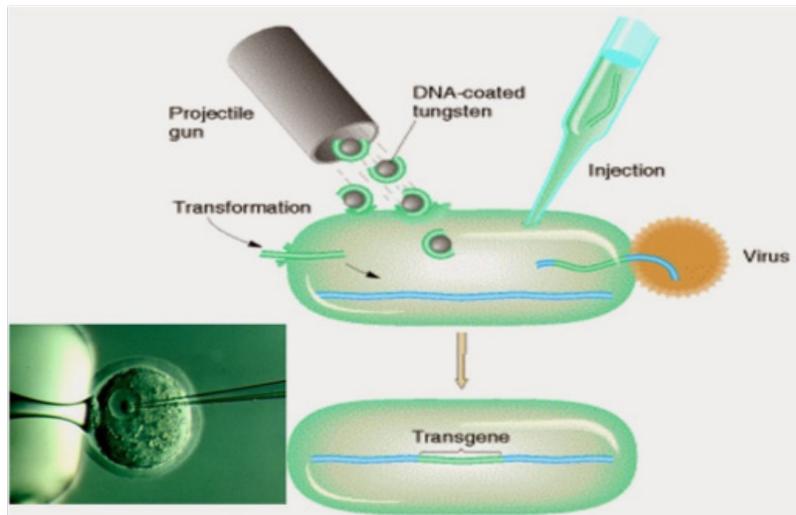
La electroporación es fundamental para la modificación genética de algas, permitiendo introducir mejoras que potencien la acumulación de lípidos y otras características que hacen que las algas sean más eficientes y viables para la producción de biocombustibles ya que estos son precursores del biodiésel. Mediante la electroporación, se pueden insertar genes que modifiquen las rutas metabólicas, como la acumulación de triglicéridos y la inhibición de rutas metabólicas competidoras que desvían energía y recursos de la síntesis de lípidos, esta técnica es medianamente efectiva ya que el porcentaje de aumento de lípidos esta entre el 30-50%.

### **Ventajas y desventajas del método**

Es más efectivo que la transformación por métodos químicos, también es eficiente y de fácil manejo; además, es el que con más frecuencia se utiliza, aunque, por otra parte, se emplean protoplastos lo cual hace que se implementen otras técnicas, y esto lo hace más caro en comparación con otros métodos (Porta, 2021)

### **Transformación mediada por partículas de vidrio o de carburo de silicio**

Es una metodología descrita recientemente, esta técnica utiliza fibras de carburo de silicio de entre 10 y 80  $\mu\text{m}$  de longitud y aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas fibras, al actuar como micro agujas, penetran las células vegetales, permitiendo la introducción del ADN foráneo al interior celular (Fig 6).



**Figura 6.** Transformación mediada por partículas de vidrio o de carburo de silicio. Tomada de Apuntes de Fisiología Vegetal, s. f.

El procedimiento se caracteriza por ser rápido, simple y relativamente económico en comparación con otros métodos de transformación. El proceso utiliza fibras de carburo de silicio que son notables a simple vista. A través de una intensa agitación de la suspensión celular en conjunto con el ADN plasmídico y las fibras de carburo de silicio, las fuerzas hidrodinámicas generadas permiten la introducción del ADN externo y de las fibras de carburo de silicio en las células.

Sin embargo, presenta limitaciones en términos de eficiencia, alcanzando tasas de éxito que varían entre el 20% y el 40%. Además, el material empleado, como el carburo de silicio, puede ser tóxico para las células y los operarios, lo que supone un riesgo añadido a considerar durante su implementación (Mizuno et al., 2005; Rao et al., 2009).

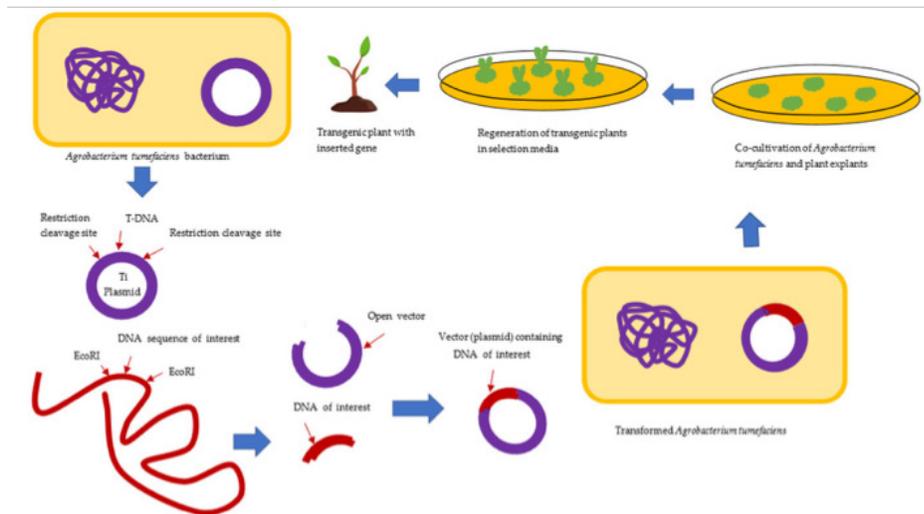
### **Sistemas de transformación mediados con agentes biológicos**

Se trata de métodos que aprovechan vectores biológicos, utilizando sus propiedades naturales de patogenicidad en plantas, para la insertar los genes de interés al genoma vegetal (Veluthambi et al., 2003; Rao et al., 2009).

#### ***Agrobacterium***

*Agrobacterium* funciona como mediador para la introducción de genes de interés (Hellens & Mullineaux, 2000; Tzfira et al. 2004). Fue el primer sistema de transferencia de genes en producir una planta modificada genéticamente en 1983 (Valentine, 2003; Vasil, 2007)

Este proceso inicia cuando se producen heridas en las células de la planta, se liberan al medio compuestos fenólicos y monosacáridos, que son reconocidos por *Agrobacterium*, induciendo una unión entre la bacteria y las células vegetales (Fig 7) (Citovsky et al. 2007; Escobar & Dandekar, 2003; Karami et al. 2009). Los compuestos fenólicos, monosacáridos y condiciones de pH que presenta el medio circundante son importantes para la activación del sistema de regulación (Valentine, 2003; Tzfira et al. 2004; Pitzschke & Hirt, 2010)



**Figura 7.** Transformación genética de la planta mediada por *Agrobacterium*. El diagrama esquemático muestra los pasos asociados con la clonación del gen de interés en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y su transferencia a células vegetales en cultivo para regenerar las plantas transgénicas con características deseables. Tomada de Ghimire, Bimal & Yu, Chang-Yuan & Kim, Won-Ryeol & Moon, Hee-Sung & Lee, Joohyun & Kim, Seung & Chung, Ill. (2023)

El sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* requiere el uso de cepas desarmadas, que son aquellas a las que se les ha eliminado el T-DNA. Este procedimiento implica modificar el plásmido residente a través de un proceso de recombinación que elimina los oncogenes, responsables de inducir tumores en las plantas, y los genes OPS relacionados con la síntesis de opinas presentes en la región del T-DNA (Gelvin, 2003b; Jacobs, 2003; Gelvin, 2010; Pitzschke & Hirt, 2010).

Para desarmar la cepa de *Agrobacterium*, se introduce un plásmido externo que contiene regiones homólogas al T-DNA y un gen que confiere resistencia a antibióticos. Mediante el proceso de recombinación entre ambos plásmidos, se logra eliminar el T-DNA original e integrar el gen de resistencia al plásmido. Esto facilita la identificación de bacterias desarmadas, ya que el plásmido externo que contenía la región T-DNA es eliminado durante el procedimiento (Gelvin, 2003b; Jacobs, 2003; Gelvin, 2010; Pitzschke & Hirt, 2010).

A continuación, se sintetiza el T-DNA gracias a la acción conjunta de las proteínas VirD1 y VirD2. La proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del T-DNA, mientras que la proteína VirE2 recubre la hebra completa. Este complejo es transferido a las células vegetales mediante un sistema de secreción tipo IV, compuesto por un pili y un canal de secreción formados por las proteínas VirB y VirD4. Una vez que el T-DNA alcanza la célula vegetal, las proteínas VirE2 y VirD2 lo dirigen hacia el núcleo, donde se integra al genoma de la planta (Tzfira & Cytosky, 2002; Tzfira et al., 2004; Citovsky et al., 2007; Escobar & Dandekar, 2003).

La transformación utilizando *Agrobacterium* implica un periodo de co-cultivo, en el cual la cepa portadora del vector con los genes de interés entra en contacto con el tejido vegetal a transformar. Durante este proceso, se facilita la transferencia del T-DNA a las células vegetales (Vasil, 2007; Sharma et al., 2002).

El co-cultivo debe realizarse en un medio específico que favorezca el proceso de transformación. Tras este período, el tejido vegetal es transferido a un medio de cultivo adecuado para la regeneración. Para obtener plantas completas, es necesario añadir hormonas vegetales o reguladores del crecimiento al medio. Además, se incluyen antibióticos para eliminar cualquier resto de *Agrobacterium*, ya que su función culmina tras el co-cultivo, y agentes selectivos para identificar las plantas transgénicas en función de los genes de selección utilizados (Bhat & Srinivasan, 2002; Filipecki & Malepszy, 2006).

*Agrobacterium* es utilizado como vehículo para introducir genes en plantas y algas. En el caso de *Espirulina*, se pueden incorporar genes que optimicen la producción de biomasa, aumenten la eficiencia fotosintética o mejoren la resistencia a condiciones adversas. Esto es que, incrementa la cantidad de lípidos producidos entre un 40-70% según lo reportado por Kroemer (2024)

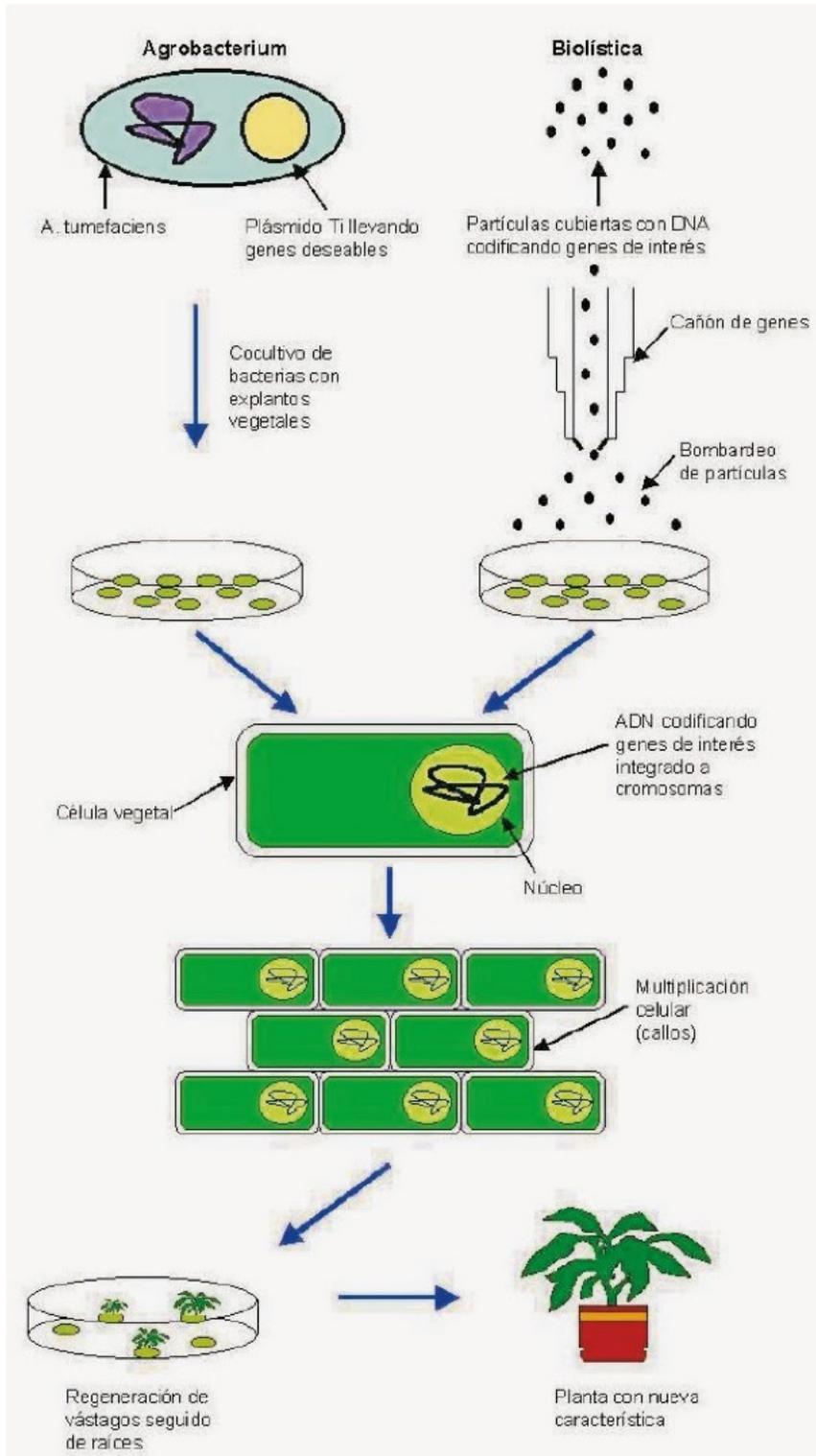
### **Ventajas y desventajas**

Este método asegura una alta expresión de los genes deseados. Sin embargo, requiere la eliminación de la bacteria mediante antibióticos y no siempre garantiza la integración efectiva en todos los casos (Guo et al., 2019)

### **Transformación de protoplastos**

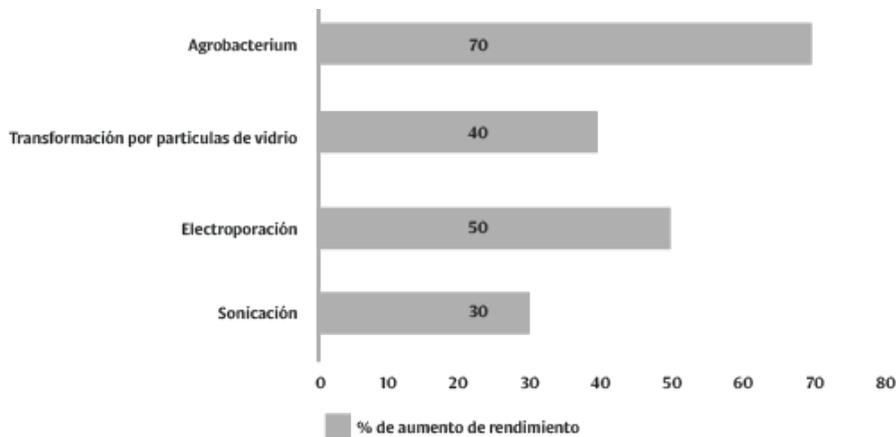
Los protoplastos han sido ampliamente empleados como una herramienta biotecnológica en procesos de transformación. Estas son células vivas que carecen de pared celular, tienen características homogéneas y una capacidad totipotencial. Existen diversos protocolos para la obtención de protoplastos en microalgas, los cuales consideran factores como el tipo de enzima utilizada para degradar la pared celular, el pH, tiempo de tratamiento. Y la presencia de azúcares para mantener el equilibrio osmótico y preservar la integridad celular (Reddy et al. 2010).

Al transformar los protoplastos, se pueden introducir genes que mejoren la producción de lípidos, compuestos esenciales para la producción de biodiésel. El proceso parece muy sencillo, ya que solo eliminamos las paredes celulares del alga para poder manipular su material genético, posteriormente introducimos el gen deseado; las células transformadas las cultivamos en condiciones controladas y por último extraemos los lípidos para procesarlos y convertirlos en biocombustible, este proceso nos da un rendimiento aproximado de 30-60%.



**Figura 8.** Comparación de técnicas de transformación directa e indirecta.

Tomada de Apuntes de Fisiología Vegetal, s. f



**Figura 9.** Comparación del aumento del rendimiento en cada técnica de transformación. Elaboración propia con base en los datos reportados en el artículo.

### Conclusiones

La disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por la quema de combustibles fósiles son dos problemas importantes en el mundo. La búsqueda de alternativas sostenibles, y la concientización ambiental como menciona Piñar-Alvarez (2024), nos ha llevado a buscar alternativas como el uso de microalgas para producir biodiesel, y esto a su vez, se ha convertido en una opción prometedora.

La revisión teórica realizada reveló que la modificación genética puede incrementar la productividad de la biomasa de *Espirulina*, lo que resultaría en bioproductos más competitivos en el mercado, especialmente en el contexto de los biocombustibles. Las técnicas de transformación, como la electroporación, la transformación mediada por *Agrobacterium* y la Sonicación ofrecen ventajas específicas, pero es fundamental considerar tanto las ventajas como las limitaciones de cada método para tomar decisiones informadas. La obtención de biocombustibles a partir de microalgas representa una solución prometedora, y la producción de biodiésel a partir de microalgas ha atraído un interés significativo en la comunidad científica.

A pesar de los retos, las microalgas son consideradas como una de las alternativas para la obtención de biodiésel, y en particular la *Espirulina* ya que su cultivo se ha hecho desde hace muchos años en México y es considerado como un super alimento, además de presentar una rápida producción de biomasa en comparación con otros cultivos. Aunque hay información de como cultivarla a gran escala, se considera que hay que desarrollar nuevas tecnologías nacionales para la obtención de biodiesel.

Este tipo de desarrollo evitará en un futuro la dependencia energética, y será una respuesta más ecológica y sustentable.

La importancia del tema radica en la necesidad de productos energéticos sostenibles y amigables con el medio ambiente, así como nos mencionan Velazquez-Cigarroa y Castro-Martinez (2024). La modificación genética de las microalgas y las técnicas para la introducción de secuencias de ADN son áreas de estudio para mejorar la producción de biomasa y lograr bioproductos más competitivos en el mercado.

## Referencias

- Acién-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., y Molina-Grima, E. (2017). Contribución de las microalgas al desarrollo de la bioeconomía. *Mediterráneo Económico*, 31, 309-331. ISSN: 1698-3726 | ISBN-13: 978-84-95531-89-6
- Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50(7), 1834-1840.
- Arias Peñaranda, M. T., Martínez Roldán, A. D., y Cañizares Villanueva, R. O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68.
- Avalos-Flores, H., Cázares-Álvarez, E. E., y Rodríguez-Valdovinos, K. Y. (2017). Spirulina: El potencial biotecnológico y alternativo de un alimento poco convencional. Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. México. 216 pág. ISBN 978-607-9442-59-0.
- BBVA Noticias. *Communications* (2024), ¿Qué es la energía? Concepto y tipologías
- Beranova, M., Rakousky, S., Vařvová, Z., y Skalický, T. (n.d.). Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Brennan, L., y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- Castells, X. E. (2012). Energía, agua, medioambiente, territorialidad y sostenibilidad. Ediciones Díaz de Santos.
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., y Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., y Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., y Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., y Das, K. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101(9), 3097-3105.
- Cho, K., Kim, K., Lim, N., Kim, M., Ha, J., Ho, H., y Woon, S. (2015). Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Biomass and Bioenergy*, 72, 1-7.
- Conceptos Básicos y avances de la transformación ... Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas. (2021).
- Cruz Woo, G. (2022). Manual para el cultivo artesanal de espirulina (*Arthrospira* spp.) en San Salvador Atenco, México. [Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26746/1/250170.pdf>
- Demirbas, A. (2019). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50(1), 14-34.
- Díaz Granados, C., y Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 15(1), 131-140.
- Feng, H., Barbosa-Canovas, G., y Weiss, J. (2011). Ultrasound technologies for food and bioprocessing.
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., y Badillo-Corona, J. A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *\*Ra Ximhai\**, 8(3b), 101-115.
- García, C. M. (2015, 13 de noviembre). Biodiesel a partir de microalgas: ventajas y desventajas. *AINEnergía*
- García, C. M. (2015, 7 de diciembre). Viabilidad de las microalgas: estudio energético y económico. *AINEnergía*
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.

- Genome. Gov, 2023. Ingeniería genética. [www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ingenieria-genetica](http://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ingenieria-genetica).
- Ghimire, B., Yu, C.-Y., Kim, W.-R., Moon, H.-S., Lee, J., Kim, S., y Chung, I. (2023). Assessment of benefits and risk of genetically modified plants and products: Current controversies and perspective. *Sustainability*, 15, 1722. <https://doi.org/10.3390/su15021722>
- González, C. A. (2017). Cultivos de microalgas a gran escala: sistemas de reproducción. *Revista ADN Agro*, 18, 1-14.
- Gui, X., Wang, G., Li, X., y Yan, Y. (2014). Fungus-assisted mild acid pretreatment of *Glycyrrhiza uralensis* residues to enhance enzymatic hydrolysis and oil production by green microalgae *Chlorella protothecoides*. *Industrial Crops and Products*, 62, 466-473.
- Hernández Ramírez, V., Rosales Paredes, J. C., & Hernández Rodríguez, H. A. (2024). Análisis fisicoquímico de un biofertilizante hidrolizado para uso en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical*, 4(1), 1-11. <https://doi.org/10.5154/r.rchsat.2023.04.02>
- Hernández-Pérez, A., y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Janssen, M., de Winter, J., Tramper, J., Mur, L., Snel, J., y Wijffels, R. (2000). Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *Journal of Biotechnology*, 78, 123-137
- Jiménez Martínez, N. M. y García Barrios, R. (2022). La gestión de residuos para combatir el cambio climático. *Perspectivas Energéticas*, 6 (15), 19-28
- Koller, M., Salerno, A., Tuffner, P., Koinigg, M., Böchzelt, H., Schober, S., Pieber, S., Schnitzer, H., Mittelbach, M., y Braunegg, G. (2012). Characteristics and potential of microalgal cultivation strategies: A review. *Journal of Cleaner Production*, 37, 377-388.
- León Vaz, A. (2021). Aplicaciones biotecnológicas y medioambientales de la microalga *Chlorella sorokiniana*. Tesis de doctorado, Universidad de Huelva.
- Liu, T., Li, Y., Liu, F., y Wang, C. (2016). The enhanced lipid accumulation in oleaginous microalga by the potential continuous nitrogen-limitation (CNL) strategy. *Bioresource Technology*, 203, 150-159.
- Loera-Quezada, M., y Olguín, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*, 1(1), 91-116.
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., y Guy, R. (2005). Ultrasound-mediated gene delivery: Kinetics of plasmid internalization and gene expression. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 104(2), 203-211.
- Mu, J., Li, S., Chen, D., Xu, H., Han, F., Feng, B., y Li, Y. (2015). Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. *Bioresource Technology*, 185, 99-105.
- Navarro-Lopez (2011). Biotecnología de microalgas: Producción de biodiesel. Universidad de Almería
- Ortiz-Matamoros, M. F., Villanueva, M. A., e Islas-Flores, T. (2018). Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Briefings in Functional Genomics*, 17(1), 26-33.
- Piñar-Álvarez, M.A. y Mondragon de la Peña, I. L. (2024). Participación social y sensibilización ambiental para el manejo de residuos municipales en Banderilla, Veracruz, México. *Revista Electrónica en Educación y Pedagogía*, 8(14), 108-124. doi: <https://doi.org/10.15658/rev.electron.educ.pedagog24.02081407>
- Pralhad Rathod, J., Gad, R. M., Rathod, D. R., y Dudhare, M. (2017). A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12).
- Qin, S., Lin, H., y Jiang, P. (2012). Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1602-1613.
- Ramírez-Mérida, L. G., Queiroz-Zepka, L., y Jacob-Lopes, E. (2013). Photobioreactor: Tool for mass cultivation of cyanobacteria. *Ciencia y Tecnología*, 6(2), 9-19. ISSN 1390-4043.
- Ramos-Cruzate, L. A. (2020). Análisis de experiencias de mejora continua en la producción industrial de

- spirulina. Una revisión sistemática. Repositorio Institucional UPN
- Ren, H.-Y., Liu, B.-F., Kong, F., Zhao, L., Xie, G. J., & Ren, N.-Q. (2014). Enhanced lipids accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology*, 169, 763-767.
- Renovables, E. (n.d.). CO2 AlgaeFix continúa para desarrollar una biorrefinería e instalar el mayor fotobiorreactor del mundo. *Energías Renovables, el Periodismo de las Energías Limpias*.
- Repsol (2024). ¿Qué son los biocombustibles? Tipos y principales ventajas. <https://www.repsol.com/es/tecnologia-digitalizacion/technology-lab/reduccion-emisiones/biocombustibles/index.cshtml>
- Rojas, D., Vargas, G., y Saénz, A. (2017). Evaluación del crecimiento de *Spirulina platensis* UTEX 1926 cultivada en medios salinos, utilizando CO2 como fuente de carbono. Universidad EAFIT
- Sinche, D. Petroenergía. (2013). Cultivo de microalgas mediante el uso de fotobiorreactores. <https://www.petroenergia.info/post/biocombustibles-de-tercera-generaci%C3%B3n-el-potencial-de-las-microalgas>
- Sproles, A. E., Fields, F. J., Smalley, T. N., Le, C. H., Badary, A., y Mayfield, S. P. (2021). Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. *Algal Research*, 53, 102158.
- Tarek, M. (2005). Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 88(6), 4045-4053.
- Turiel, A. (2020). *Petrocalipsis: Crisis energética global y cómo (no) la vamos a solucionar*. Editorial Alfabeto.
- Velazquez-Cigarroa, E., y Castro-Martinez, O., (2024). *Educación ambiental y sustentabilidad: Aportaciones multidisciplinarias para el desarrollo*. Instituto de Investigaciones Socioambientales, Educativas y Humanísticas para el Medio Rural (IISHEMER)

Derechos de Autor© 2025 Coronado-Tovar, Ariadne; Herrera-Monroy, Sonia; López-Pérez, Pablo Antonio



Este texto está protegido por una licencia Creative Commons 4.0. Usted es libre para Compartir, copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato y adaptar el documento, remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de: Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.