



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

“BIOPROSPECCIÓN DE *Arthrospira platensis* NATIVA DEL CHACO PARAGUAYO COMO PROPUESTA ALTERNATIVA PARA FINES ALIMENTARIOS”

AUTOR: ING. AGRO AMB. CLARA INÉS VILLALBA ALDERETE

DIRECTOR: PROF. MSC. TOMÁS LÓPEZ ARIAS

CO-DIRECTORA: MSC. MÓNICA ALBRECHT

CO-DIRECTOR: DR. GUSTAVO BICH

Encarnación-Paraguay

2018

Dedicatoria

A Dios

Al Padre Pio y al Padre Daniel

A mis padres, María y Tomás

A mi hermana Aura

A mi sobrina Areli

*“Tanta belleza hay en la vida,
que Dios continúa creando
aunque la tierra esté dormida
y sigue brindando aliento y su amor es comida”*

Clara Inés.

Agradecimientos

A CONACYT, por posibilitar e incentivar el desarrollo académico de los investigadores en Paraguay.

A la Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Ciencias y Tecnología, por brindar el apoyo y el espacio necesario para la formación en esta área de estudio.

Al Instituto de Biotecnología Misiones Dra. María Ebe Reca (InBioMis), Universidad Nacional de Misiones-Argentina, especialmente al Dr. Pedro Darío Zapata por su ayuda y nobleza.

A la Msc. Mónica Albrecht, por su predisposición y la asistencia constante en todos los trabajos realizados.

A la Ing. Agr. Karina Morínigo y Bioq. Cinthia Burgos por la paciencia y la incansable colaboración.

Al Dr. Gustavo Bich y la Dra. Lorena Castrillo por guiarme y por la valiosa contribución al desarrollo de la investigación.

Al Msc. Tomás López por el acompañamiento en la culminación del trabajo de investigación.

A Christian Alderete por su vital e incondicional apoyo.

A Silvio Meza por el acompañamiento y ayuda constante.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a Alfredo Schmidt.

Al Centro de Alevinaje de Eusebio Ayala por su predisposición.

Y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, colaboraron en la realización de esta investigación.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	XIV
OBJETIVOS.....	XVI
CAPÍTULO I. REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LITERATURA.....	- 1 -
1. Generalidades.....	- 1 -
1.1. Bioprospección.....	- 1 -
1.2. Microalgas y Cianobacterias.....	- 1 -
1.3. Clasificación de las microalgas.....	- 3 -
1.4. Importancia de los cultivos de microalgas.....	- 3 -
1.5. Microalgas fotoautótrofas.....	- 4 -
1.6. Cianobacterias-Clasificación taxonómica.....	- 5 -
2. Spirulina.....	- 6 -
2.1. Antecedentes.....	- 8 -
2.2. Experiencia del uso de <i>Arthrospira</i> en algunos países.....	- 9 -
2.2.1 <i>Arthrospira</i> en México.....	- 10 -
Fuente: Instruction manual for the cultivation of spirulina for personal consumption (IIMSAM, ONU, 2017).....	
2.2.2. <i>Arthrospira</i> en la India.....	- 11 -
2.2.4. <i>Arthrospira</i> en Burkina Faso.....	- 11 -
2.2.6. <i>Arthrospira</i> en España.....	- 11 -

2.2.7. <i>Arthrospira</i> en Ecuador	- 12 -
2.2.8. Antecedentes de <i>Arthrospira</i> en Paraguay	- 12 -
3. Usos de la <i>Arthrospira</i>	- 13 -
3.1. Medicina	- 13 -
3.2. Medio ambiente	- 14 -
3.3. Biocombustibles	- 14 -
3.4. Alimentos.....	- 15 -
3.4.1.	- 15 -
<i>Arthrospira</i> como alimento animal.....	- 15 -
3.4.2. <i>Arthrospira</i> como alimento humano.....	- 16 -
3.4.3. Ejemplos de alimentos elaborados con <i>Arthrospira</i>	- 18 -
4. Propiedades bioquímicas de la <i>Arthrospira</i>	- 18 -
5. Metabolitos de interés biotecnológico presentes en <i>Arthrospira platensis</i>	- 20 -
5.1. Carotenoides y Betacaroteno	- 20 -
5.2. Exopolisacáridos (EPS)	- 20 -
5.3. Lípidos	- 21 -
5.4. Minerales	- 21 -
5.5. Proteínas y vitaminas.....	- 21 -
6. Aspectos de seguridad	- 21 -
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	- 23 -
1. Descripción del área de estudio.....	- 23 -
2. Colecta de la muestra	- 24 -
3. Identificación morfológica	- 24 -
3.1. Tinción de Gram	- 24 -
4. Aislamiento e inoculación	- 25 -
5. Conservación de la cepa.....	- 25 -
5.1. Conservación en refrigeración.....	- 26 -

5.2. Criopreservación.....	- 26 -
6. Cultivo y escalado	- 26 -
6.1. Instalación del biorreactores de cultivo	- 26 -
6.2. Preparación de medios de cultivo	- 26 -
6.3. Escalado del cultivo.....	- 28 -
7. Evaluación de parámetros fisicoquímicos	- 29 -
8. Determinación de la cinética de crecimiento	- 29 -
9. Cosecha, filtrado y secado de la biomasa.....	- 30 -
10. Determinación de coliformes totales	- 31 -
11. Ensayo de toxicidad de <i>Arthrospira platensis</i> con el cladóceros <i>Daphnia magna</i>	- 31 -
12. Caracterización molecular <i>Arthrospira platensis</i> por técnicas de ADN	- 34 -
12.1. Protocolo de Extracción de ADN 1: Método Chelex.....	- 34 -
12.2. Protocolo de extracción de ADN 2: utilizado para algunas especies de <i>Arthrospira sp</i>	- 34 -
12.3. Protocolo de extracción de ADN 3: Kit ADN PuriPrep-S. InBio Highway ®.....	- 35 -
12.4. Evaluación del ADN extraído.....	- 35 -
13. Descripción de las propiedades nutricionales de la biomasa, mediante la caracterización bioquímica.	- 37 -
13.1. Determinación de proteínas	- 37 -
13.2. Grasas totales	- 37 -
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 38 -
1. Descripción del área de estudio.....	- 38 -
2. Colecta de la muestra	- 40 -
3. Identificación morfológica	- 42 -
4. Aislamiento e inoculación.....	- 44 -
5. Conservación de la cepa.....	- 45 -
6. Cultivo y escalado	- 45 -
7. Evaluación de parámetros físicoquímicos.....	- 47 -

8. Determinación de la cinética de crecimiento	- 47 -
9. Cosecha, filtrado y secado.....	- 48 -
10. Determinación de coliformes totales	- 49 -
11. Ensayo de toxicidad de Spirulina con el cladóceros <i>Daphnia magna</i>	- 50 -
12. Protocolos de extracción de ADN <i>Arthrospira platensis</i>	- 52 -
12.1. Identificación molecular y análisis bioinformático.....	- 55 -
13. Descripción de las propiedades nutricionales de la biomasa, mediante la caracterización bioquímica analizada.	- 57 -
CAPÍTULO IV. CONCLUSIÓN	- 59 -
RECOMENDACIONES	- 61 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 62 -
ANEXOS.....	- 75 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las microalgas según su requerimiento nutricional.	- 3 -
Tabla 2. Ubicación taxonómica de <i>A. platensis</i>	- 6 -
Tabla 3. Identificación de especies de <i>A. platensis</i>	- 7 -
Tabla 4. La Información de Atención y Volúmenes de producto en los Programas Alimentarios del IIMSAM / DIF Chiapas, República de México: La Cobertura de Atención y Volúmenes de Productos.	- 10 -
Tabla 5. Composición bioquímica de la <i>A. platensis</i>	- 19 -
Tabla 6. Composición del medio de cultivo	- 27 -
Tabla 7. Composición del medio PIV, solución de metales (en 1 litro de agua destilada) -	- 27 -
Tabla 8. Composición del medio CHU, solución de micronutrientes (en 1 litro de agua destilada)	- 28 -
Tabla 9. Escalado del cultivo.	- 28 -
Tabla 10. Protocolos de extracción de ADN	- 36 -
Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos de la Laguna Yaragui. Colonia Lolita.....	- 41 -
Tabla 12. Cinética de crecimiento.	- 47 -
Tabla 13. Resultados de mortalidad	- 50 -
Tabla 14. Análisis cuantitativo del ADN extraído de <i>A. platensis</i> . Valores medios.....	- 53 -
Tabla 15. Secuencia nucleotídica consenso de <i>A. platensis</i> aislada de Paraguay.	- 56 -
Tabla 16. Determinaciones fisicoquímicas de la muestra de <i>Arthrospira</i>	- 57 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Arthrospira platensis</i>	- 8 -
Figura 2. Diagrama de flujo de la identificación de posibles lugares.	- 23 -
Figura 3. Escalado del cultivo.	- 29 -
Figura 4. <i>Daphnia magna</i> , Centro de Alevinaje Eusebio Ayala.....	- 32 -
Figura 5. Procedimiento de la prueba para el ensayo de toxicidad aguda	- 33 -
Figura 6. Puntos de muestreo. Laguna Capitán (Primera expedición).....	- 38 -
Figura 7. Puntos de muestreo. Laguna Yaragui (Segunda expedición).	- 39 -
Figura 8. Toma de muestra Laguna Capitán. Primera expedición	- 40 -
Figura 9. Punto de muestreo Laguna Capitán. Segunda expedición.....	- 40 -
Figura 10. Utilización de la red de fitoplancton. Laguna Yaragui. Colonia Lolita.....	- 41 -
Figura 11. Colecta de las muestras en recipientes estériles.	- 41 -
Figura 12. Toma de muestra de la Laguna Yaragui. Colonia Lolita.....	- 42 -
Figura 13. Formación de nata verde.....	- 42 -
Figura 14. Microfotografía de <i>Arthrospira platensis</i> . observada al microscopio óptico. Aumento 10x	- 43 -
Figura 15. Microfotografía de <i>Arthrospira platensis</i> . observada al microscopio óptico. Aumento 40x	- 43 -
Figura 16. Tableta de color de referencia.....	- 43 -
Figura 17. Medición de la <i>Arthrospira</i> Aumento 100X.....	- 44 -
Figura 18. Microfotografía de la Tinción de Gram.	- 44 -
Figura 19. Transferencias de las células.....	- 44 -
Figura 20. Iniciación de la inoculación.	- 44 -
Figura 21. Viales con las cepas conservadas.....	- 45 -
Figura 22. Biorreactores utilizados para los cultivos bancos	- 46 -
Figura 23. Instalación del módulo de cultivo.	- 46 -
Figura 24. Aspecto superficial del biorreactor de 50 litros	- 46 -
Figura 25. Registro de Temperatura.....	- 47 -

Figura 26. Curva de crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> en el sistema de cultivo desarrollado.	- 48 -
Figura 27. Flujograma del proceso de reciclado de medio de cultivo.....	- 49 -
Figura 28. Determinación de Coliformes totales por el método de tubos múltiples.....	- 49 -
Figura 29. Preparación de las diluciones para el ensayo con <i>D. magna</i>	- 51 -
Figura 30. Disposición de <i>Daphnia magna</i> en las diferentes diluciones.	- 51 -
Figura 31. Visualización de <i>Daphnia</i>	- 51 -
Figura 32. Evaluación cualitativa del protocolo de extracción de ADN de <i>A. platensis</i> ...	- 52 -
Figura 33. Evaluación cualitativa de la amplificación del gen 16S extraído.....	- 54 -

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FACEN: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

g: Gramo/s

h: Hora

H: Humedad

ha: Hectáreas

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

IIMSAM: *Intergovernmental Institution for Use of Micro-Algae Spirulina Against Malnutrition-United Nations*

L: Litro/s

m: Metro/s

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

mg: Miligramos

min: Minuto/s

mL: Mililitros

mm: Milímetros

ng: nanogramo

NMP: Número más probable

ONU: Organización de las Naciones Unidas

pb: pares de bases

pH: Potencial de hidrógeno

pmol: picomol por litro

RP-HPLC: *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography*

spp.: Especies

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
(electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

UTM: Universal Trasversal de Mercator

V: Volumen

vvm: volumen de aire/volumen de medio por minuto

W: Watt

RESUMEN

En el trabajo se estudia la posibilidad del aislamiento, el cultivo y la caracterización de *Arthrospira platensis* (Spirulina), con el objeto de determinar los procedimientos de bioprospección de cepas nativas del Chaco paraguayo como propuesta alternativa para fines alimentarios. Primeramente, se obtuvo la muestra a ser estudiada de la Laguna Yaragui, Colonia Lolita (Coordenadas UTM X: 241188,705 Y: 7439984,23), Loma Plata, Paraguay. Luego, se optimizaron las condiciones de aislamiento y la preparación de los módulos de cultivo, que fueron realizados en recipientes de plástico transparente. Las condiciones adecuadas fueron de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad, temperaturas que oscilaron los 26 °C, pH 10, medio de cultivo Schlösser modificado (PIV y CHU). Posteriormente se escalaron a un módulo de cultivo tipo acuario de interior, llegando hasta la capacidad de 50 litros. Finalmente, se realizó el procedimiento de cosecha, filtrado y secado. El producto obtenido fue sometido a la determinación de proteínas (58,6 g/100 g bs) y grasas totales (0,4 g/100 g bs) por el método de Kjeldall y Twisselman, respectivamente. En el ensayo de toxicidad con *Daphnia magna* no se observaron mortalidad en las condiciones y concentraciones realizadas. Los resultados demostraron que las condiciones de aislamiento y cultivo fueron adecuadas, ya que se pudo replicar los procedimientos satisfactoriamente ajustándose a los recursos y materiales disponibles. La identificación morfológica y molecular fue fundamental para la confirmación de la especie, reconociendo la complejidad de los procedimientos de extracción de ADN. Se registró un alto porcentaje de proteínas presentes y un porcentaje bajo en grasas totales de la *Arthrospira platensis*. Estos hallazgos sugieren considerar la proyección hacia nuevos horizontes teniendo en cuenta el escaso conocimiento acerca de la *Arthrospira platensis* a nivel nacional y el potencial que ésta podría tener en el área de los alimentos.

Palabras Claves: *Arthrospira platensis*, bioprospección, aislamiento, cultivo.

ABSTRACT

The present work investigated the isolation, cultivation and characterization of *Arthrospira platensis* (Spirulina), under the objective of determining the bioprospecting procedures of *Arthrospira platensis* native of the Paraguayan Chaco as an alternative proposal for alimentary purposes. The sample to be studied was obtained from Yaragui Lake, Lolita Colony (Coordinates UTM X: 241188.705 Y: 7439984.23), Loma Plata, Paraguay. The isolation conditions and the preparation of the culture modules were optimized, which were carried out in transparent plastic containers, with the appropriate photoperiod conditions of 12 h light and 12 h of darkness at temperatures ranging from 26 °C to pH 10, medium of modified Schlösser culture (PIV and CHU) to subsequently scale them to an indoor aquarium-type culture module, reaching the capacity of 50 liters and perform the harvesting, filtering and drying procedure. The final product was subjected to the determination of proteins (58,6 g/100 g db) and total fats (0,4 g/100 g db) by the method of Kjeldall and Twisselman, respectively. In the toxicity test no mortality was observed in the conditions and concentrations carried out. The results showed that the conditions of isolation and culture were adequate, since the procedures could be replicated satisfactorily adjusting to the available resources and materials, while the morphological and molecular identification has been fundamental for the confirmation of the species, recognizing the complexity DNA extraction procedures. It is recognized the high percentage of proteins present and low in total fat in the *Arthrospira platensis* that makes it possible to project new horizons locally, taking into account the scarce knowledge about the *Arthrospira platensis* at a national level and the potential that this could have in the area of food.

Key words: *Arthrospira platensis*, bioprospecting, isolation, cultivation.

INTRODUCCIÓN

La inadecuada alimentación es una de las principales dificultades que atraviesa, el ser humano, donde se sigue evidenciando hambre, extrema pobreza, lo que en muchos casos imposibilita la completa y el eficaz consumo de nutrientes, desencadenando una inseguridad alimentaria y nutricional. Así también, este problema se puede presentar en animales de importancia económica, que requieren la ingesta de alimentos según la necesidad de cada especie zoogenética, para ello se requiere producir balanceados y suplementos dietarios que proporcionen un alto contenido en nutrientes. Por ello ha sido siempre una necesidad imperante, ya sea por organismos estatales como internacionales, la búsqueda de alimentos alternativos que puedan dar respuestas a estas problemáticas.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 2016), en la década de 1990 se impulsaron iniciativas para producir algas para el consumo humano, esto gracias a su alto contenido de macro. Destaca especialmente el aporte de proteínas, por tal razón se la considera como un superalimento que puede dar respuesta a múltiples necesidades alimenticias.

La *Arthrospira platensis* es una cianobacteria filamentosa no diferenciada, azul verdosas, multicelulares y habitante de lagos alcalinos, que se cultiva para consumo humano debido a su contenido nutricional (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez , 2006b).

Es importante el estudio de esta cianobacteria en regiones en donde sea propicia su crecimiento de forma natural. Partiendo de esta premisa, adquiere relevancia la bioprospección como una herramienta válida de búsqueda de información y posterior procedimiento de aislamiento y cultivo de la *A. platensis* para fines alimentarios.

Por lo expuesto anteriormente, es importante reconocer ciertas características de la *A. platensis* que sean conocidas a nivel nacional y así convertirse paulatinamente en una nueva alternativa que complemente a la nutrición ya sea humana como en animales, por ello, su uso se convierte en un medio innovador para alcanzar estos fines.

Actualmente es escasa la información que se tiene sobre la *A. platensis* en Paraguay, su uso, comercialización y más aún sobre las evidencias científicas sobre el aislamiento, cultivo y

caracterización de cepas nativas. Por ello, el objetivo de esta investigación es realizar la bioprospección de *Arthrospira platensis* nativas del Chaco Paraguayo, para fines alimentarios. Siendo la metodología utilizada experimental, abarcando las etapas de colecta, identificación, cultivo y caracterización bioquímica y genética de la misma.

Teniendo en cuenta la finalidad de esta investigación, a continuación, se detallarán los diferentes capítulos y los contenidos respectivos:

En el Capítulo I, se detalla los conceptos generales relacionados a la investigación, las experiencias en diferentes países y a nivel nacional como así también las propiedades y características resaltantes.

En el Capítulo II, se especifican los materiales y métodos utilizados para la obtención de información necesaria sobre la bioprospección realizada.

En el Capítulo III, se describen y analizan los resultados y discusión, en base a los objetivos específicos planteados en el trabajo.

Finalmente, en el Capítulo IV, se detalla las evidencias de aporte, teniendo en cuenta el objetivo general.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar la bioprospección de la *Arthrospira platensis* nativas del Chaco Paraguayo para fines alimentarios.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones adecuadas para el aislamiento y cultivo de *Arthrospira platensis*.
2. Identificar la especie presente en aguas del Chaco Paraguayo mediante la caracterización morfológica y molecular.
3. Diseñar el sistema de cultivos de *Arthrospira platensis* a escala de laboratorio.
4. Determinar las propiedades alimentarias de la *Arthrospira platensis* en base sus características bioquímicas más relevantes.

CAPÍTULO I. REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LITERATURA

1. Generalidades

1.1. Bioprospección

La bioprospección ha sido reconocida como el estudio de especies y de elementos que muestran ciertas características fisicoquímicas y biológicas peculiares que pueden aportar grandes contribuciones a diversas áreas. Resulta interesante si se considera el enfoque de bioprospección “como la exploración de la biodiversidad para fines comerciales, y como se ha convertido recientemente en una potencial estrategia mediante la cual los países ricos en biodiversidad pueden aumentar sus capacidades endógenas para realizar actividades de ciencia y tecnología, especialmente mediante la interacción con otros países de mayor desarrollo tecnológico” (Duarte Torres, 2009).

La bioprospección hace uso de técnicas biotecnológicas para lograr nuevos productos que están relacionados con las diferentes industrias, tanto farmacéutica, agricultura, medicina, alimentos, entre otros. Esto se desarrolla bajo procesos que tienen que ver con una amplia interacción desde el conocimiento tradicional local hasta el conocimiento científico y tecnológico (Moran *et al.*, 2001).

Las características particulares que se incluyen dentro del término de bioprospección se refieren a las potencialidades en el uso comercial y su interacción en la biodiversidad, es así que, “la bioprospección propiamente dicha, implica que a menudo se desarrolle en un contexto legal específico más restrictivo y regulado que el referido a otras actividades que también son parte de la prospección biológica en general” (Pastor y Sigüenza, 2008).

1.2. Microalgas y Cianobacterias

Al hablar de microalgas, se debe tener en cuenta a aquellos microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. “En esta categoría quedan agrupadas tanto las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) como las algas eucariotas (tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas). Las microalgas son generalmente

organismos fotoautótrofos, es decir, organismos que obtienen la energía de la luz proveniente del Sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies de microalgas son capaces de crecer empleando la materia orgánica como fuente de energía o de carbono” (AST ingeniería S. L., 2013).

La versatilidad del metabolismo de las microalgas las hace potencialmente interesantes, para el área farmacéutica, comercial, industrial, producción de biodiesel, remediación y depuración de efluentes industriales altamente contaminados y por supuesto, para el área de alimentos en animales y seres humanos, reconocidos por su contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas, aunque también son fuente de vitaminas como la A, B1, B2, B6, C, y E. En cuanto al cultivo controlado, se desarrolla un crecimiento rápido, presenta ventajas relacionadas a su capacidad de almacenamiento de CO₂, acumulación de moléculas de interés (Rave, 2013).

La producción de los compuestos potencialmente útiles a partir de microalgas están estrechamente ligados a factores de tipo ambiental, el sistema de cultivo y los métodos de cosecha (Satyanarayana *et al.*, 2011).

La biotecnología de microalgas ha adquirido una considerable importancia en las últimas décadas, teniendo en cuenta, la biodiversidad de las microalgas y de los avances en la ingeniería genética que constituyen fuentes promisorias para el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones, éstas últimas van desde la producción de biomasa para alimentos destinados a humanos y animales como tecnologías que dan respuesta a problemáticas vinculadas con el medio ambiente. Con los estudios de cultivo e investigación de cepas, la biotecnología de microalgas se ha introducido también al tratamiento de aguas residuales, biorremediación de suelos, biocombustibles, acuicultura e industria cosmética (García, 2013).

El cultivo de microalgas se inicia de forma masiva en los años 50, para la obtención de lípidos y proteínas como reemplazo a las proteínas de origen animal y vegetal convencionales, destinados para consumo directo de ganado y alimentación humana. Fue así que se desarrolla con mayor interés el estudio en estas propiedades específicas que aportó valiosos conocimientos a la cadena alimentaria proteica de aquellos tiempos (Colorado *et al.*, 2013).

1.3. Clasificación de las microalgas

Según Olaizola (2003), los primeros parámetros para identificar a los grupos de microalgas se basaban en la pigmentación, donde radica la importancia en los diversos grupos de microalgas. Por ello, se describieron las características como la morfología, presencia de flagelos, composición de pared celular y tipo de producto fotosintético almacenado, así para ser llamado microalga, el organismo necesita, que sea usualmente microscópico, unicelular, con pigmentación, de hábitos comúnmente acuáticos y en algunos casos fotoautotróficos (parcial o total).

En tabla 1 se presenta la clasificación de las microalgas atendiendo sus requerimientos nutricionales según Ruiz (2011).

Tabla 1. Clasificación de las microalgas según su requerimiento nutricional.

Clasificación	Características
Fotoautótrofa	Las algas obtienen la energía del Sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales). Son a las que nos referiremos principalmente en este trabajo
Fotoheterótrofa:	Obtienen la energía del Sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
Mixotrófica	Muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO ₂ .
Heterótrofa	Los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Es decir, existen en efecto algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz

Fuente: Adaptación de Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica (Tecnoplades, 2013).

1.4. Importancia de los cultivos de microalgas

La importancia radica en que “las cepas utilizadas para fines comerciales se obtienen generalmente de colecciones ya establecidas y conocidas, pero existen varios motivos para seguir aislando especies de microalgas de poblaciones naturales locales, en parte porque se

encuentran más adaptadas a las condiciones ambientales dominantes en cada región” (Tecnoplades, 2013).

En la actualidad la biotecnología de las microalgas juega un papel muy importante en diversas áreas económicas, políticas, ambientales y sociales. Como lo mencionan Jasso *et al.* (2012), en el sector acuícola son destinados para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las etapas larvales de diversos organismos acuáticos, las microalgas se han considerado importantes al igual que para otras especies diminutas, ciertas larvas de moluscos gasterópodos y bivalvos, camarones, ranas, peces marinos y dulceacuícolas. Las microalgas oleaginosas dinofíceas y clorofíceas son consideradas como fuente de biocombustibles y contribuyen en el ambiente para la fijación de bióxido de carbono. En algunos casos, las microalgas, han sido empleadas para diagnosticar concentraciones significativas de petróleo mediante ensayos en ambientes acuáticos.

Otros aportes mencionados por Gómez *et al.* (2010), señalan que, en las últimas dos décadas, la biotecnología de microalgas ha cobrado protagonismo, desde la producción de biomasa para alimentación, su uso en la acuicultura o aplicación como biofertilizante, hasta la fabricación de productos con significativo valor industrial y terapéutico, por sus cuantiosas moléculas bioactivas destinadas para alimentación y salud humana. Las cianobacterias de interés son la *Arthrospira sp*, las clorofíceas (*Chlorella sp*, *Dunaliella sp* y *Haematococcus sp*) y algunas otras especies de otros grupos (*Odontella*, *Porphyridium* o *Phaedactylum*) para producir, esencialmente, biomasa y carotenoides.

1.5. Microalgas fotoautótrofas

La utilización de energía solar para la producción de hidrógeno por microalgas fotoautótrofas ha sido evidenciada en estructuras denominadas tilacoides tanto que en “la membrana de estas estructuras está la serie de proteínas y compuestos que en último término transportan los electrones desde el agua hacia moléculas como NADH (Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida) y el H₂”. Esta transferencia de electrones hacia la enzima reversible Hidrogenasa, reduce los protones del hidrogeno, oxidando a la ferredoxina, que pasa de su estado reducido al estado oxidado.(Mendoza *et al.*, 2008).

1.6. Cianobacterias-Clasificación taxonómica

Las cianobacterias o cianofíceas, son considerados como microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos. Se encuentran entre los organismos más primitivos de la tierra; su fácil crecimiento, favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en los ambientes dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras con pH entre 6 y 9, y temperaturas entre 15 y 30 °C. Prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Roset *et al.*, 2001).

Así como lo mencionan Mendoza *et al.* (2008), “las cianobacterias son organismos con una talla que se sitúa de manera general entre 1 y 10 micras. Su pared es de tipo gram-negativo clásico. Son verdaderas procariotas (organismos desprovistos de membrana nuclear), a pesar de su sistema fotosintético cercano del de las eucarióticas ya que contienen clorofila-a y un fotosistema II (PS-II). A este grupo pertenecen de los géneros *Spirulina*, *Arthrospira*, *Clostridium*, *Chromatium*, entre otras”.

Una de las mayores controversias sobre las cianobacterias se refiere a su tratamiento taxonómico. Tomando como referencia el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (CINB), éstas deberían considerarse como bacterias, ya que su característica principal de ser productores primarios en casi todos los ambientes de la biosfera. Los biólogos moleculares tienden a seguir la propuesta del CINB. Por otro lado, teniendo en cuenta el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, las algas azules o cianobacterias deben considerarse como algas eucarióticas, esta propuesta suele ser aceptado usualmente por los botánicos y ecólogos, basados en sus atributos morfológicos (Rosso y Leda Giannuzzi, 2011).

Por otra parte, Rodríguez y Triana (2006), afirman que se presenta una confusión en el uso de los términos *Espirulina*, *Spirulina* y *Arthrospira*, que podrían deberse a errores en las determinaciones científicas de los años 1950 y también de la designación nominal comercial de algunas cianobacterias alimentarias. La denominación *Arthrospira* es utilizado mayoritariamente en los argumentos científicos, como también son términos compatibles; algas verdes-azuladas o cianofíceas, que responden a su taxonomía y filogenia; ecología y biología.

Tabla 2. Ubicación taxonómica de *A. platensis*.

Reino: Eubacteria

Dominio: Bacteria

Phylum: Cianobacteria

Clase: Cianobacteria

Orden: Oscillatoriales

Familia: Oscilatoriaceae

Género: *Spirulina=Arthrospira*

Especie: *Spirulina platensis=Arthrospira*

Fuente: Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina spp. (=Arthrospira)* bajo condiciones de laboratorio (Rodríguez y Triana, 2006).

2. Spirulina

Se reconoce como Spirulina a la denominación más común en el ámbito comercial y se han identificado más de cincuenta mil especies de microalgas. “La gran mayoría forman parte del fitoplancton y unas pocas son cultivadas por el hombre. La Spirulina (*Arthrospira platensis*) es una cianobacteria que pertenece al phylum Cianobacteriay que en la naturaleza habita en lagos alcalinos de zonas tropicales. La forma de espiral de sus tricomas le dio su nombre vulgar, se considera como un tricoma helicoidal de forma cilíndrica e inmóvil, cuya reproducción se realiza por ruptura intracelular. Su talla oscila entre 13 y 25 micras. Su alto contenido de proteína, vitaminas, minerales, y compuestos especiales de la Spirulina ha motivado su producción comercial” (Barra Galárraga, 2010).

A. platensis es el género de cianobacteria más investigado, por su importancia en alimentación y la producción de metabolitos. “Actualmente la *Spirulina* es conocida como *Arthrospira*, tiene su rango de pH óptimo entre 9 y 10 y admite hasta pH 11,5; pero no se desarrolla a pH 7. Tras el aislamiento de diversas cepas y un estudio sobre su temperatura óptima de crecimiento, se ha llegado a la conclusión que para algunas ésta se sitúa entre 24-28 °C mientras que para otras cepas el rango llega hasta 40-42 °C. Su eficiencia de fijación de CO₂ puede llegar al 38%, siendo una de las más altas entre las cianobacterias” (Ruiz, 2011).

Tabla 3. Identificación de especies de *A. platensis*

Especies de Arthrospira	Primera Descripción
<i>A. fusiformis</i>	Estepa siberiana, Rusia, Lago Tunatan
<i>A. gomontiana</i>	América del Norte, agua estancada
<i>A. indica</i>	Madurai, India, estanque natural
<i>A. jenneri</i>	Europa, agua estancada
<i>A. khannae</i>	Rangoon, Myanmar, estanque natural
<i>A. massartii</i>	Luxemburgo, agua de manantial
<i>A. máxima</i>	Oakland, California, poza salina
<i>A. platensis</i>	Montevideo, Uruguay, agua estancada
<i>A. spirulinoides</i>	Lahore, Pakistán, agua de lluvia Estancada
<i>A. tenuis</i>	Bengala. India, estanque artificial

Fuente: *Arthrospira* (Spirulina) Systematics and Ecophysiology (Vonshak y Tomaselli, 2000) y Adaptado por (L. Ramírez, 2006).

En cuanto a las características generales de la *Arthrospira* L. Ramírez (2006), describe que las cianobacterias, son usualmente algas azules, multicelular, células cilíndricas con ancho de 3 a 16µm . Presenta filamentos en forma de hélices abiertas de entre 100 a 200 µm, éstas dependerán de las condiciones ambientales y del desarrollo. En cuanto a su reproducción se realiza por fisión binaria transversal.



Figura 1: *Arthrospira platensis*.

Fuente: Propia

2.1. Antecedentes

La *Arthrospira* es un organismo primitivo que se originó hace unos 3,5 billones de años Satyanarayana *et al.* (2011). La especie que conocemos actualmente como espirulina pertenece realmente al género *Arthrospira* y no al de *Spirulina*. Según señala Gómez (2015), ninguna especie del género *Spirulina* es comestible y que las especies más utilizadas en el sector nutracéutico son la de *Arthrospira maxima* y *Arthrospira plantesis*. Este hecho puede deberse a que hasta el año 1989 solo existía el género *Spirulina*, que posteriormente dio lugar al género *Arthrospira*, si bien se sigue utilizando el término *Spirulina* o *Espirulina* como nombres comunes, crea una gran confusión de usos. La *Arthrospira* fue aislada por primera vez por Turpin en 1827 a partir de una corriente de agua dulce, y posteriormente se han encontrado especies de espirulina en una gran variedad de ambientes (tierra, arena, pantanos, agua salobre, agua de mar y agua dulce).

Asimismo Satyanarayana *et al.* (2011) describen que los aztecas fueron los primeros en descubrir sus propiedades en la salud, en el siglo XVI, cercanos al lago de Texcoco. “Los cronistas españoles describen a los pescadores con redes finas de color azul que recogen este Techuitlatl de las lagunas y hacen un pastel azul-verde de ella. Otras descripciones afirman que los mensajeros Aztecas corredores tomaban la espirulina para realizar sus recorridos”.

En el 1940 un ficólogo francés, descubrió en el lago Chad y los lagos del Valle del Rift en África oriental que eran las principales áreas en las que la espirulina prosperaba (Piccolo, 2016).

El ciclo de vida es uno de los aspectos fundamentales de la biología de *Arthrospira*, enmarcado por su ubicación taxonómica, su fisiología e implicaciones ambientales de cultivo. Todas las células dispuestas en filamentos o rosarios, tienen la facultad de multiplicarse por bipartición. Hacia los extremos de los filamentos, la división es más frecuente que en la zona intercalar, este es un periodo que se puede resumir en tres etapas fundamentales como fragmentación de tricomas, a ampliación de células del hormogonio y procesos de maduración y el alargamiento de tricoma (Asero Farinango, 2014).

El tricoma maduro se divide en varios filamentos u horgomonios pequeños, gracias a la formación previa de células especializadas, las llamadas células de necridio, que se caracterizan por tomar un aspecto granuloso, sus tabiques transversales se abomban fuertemente y la célula se vuelve bicóncava, la materia de la célula se reabsorbe para permitir la fragmentación (Berry *et al.*, 2003).

2.2. Experiencia del uso de *Arthrospira* en algunos países

Según Arias (2010), la *Arthrospira* se origina en forma natural en numerosos lugares, como los lagos de África, principalmente en Kenia, Etiopía, Egipto, Sudán, Argelia, Congo, Zaire y Zambia. Se la encuentra además en Asia tropical y subtropical (India, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, China, Tailandia y Rusia), en América (Perú, Uruguay, California) y en Europa (España, Francia, Hungría y Azerbaiyán).

A nivel internacional, millones de personas en todo el mundo utilizan esta cianobacteria como complemento alimenticio de su dieta siguiendo las recomendaciones de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud. En este informe realizado a partir del Instituto Intergubernamental para el Uso de las Microalgas Spirulina contra la Malnutrición, perteneciente a las Naciones Unidas (IIMSAM - *Intergovernmental Institution for Use of Micro-Algae Spirulina Against Malnutrition-United Nations*), se recomienda el empleo de *Arthrospira* contra la malnutrición aguda en situaciones de las emergencias humanitarias, de malnutriciones de índole crónico, y para el desarrollo sostenible (Gómez y García, 2013).

Según Naranjo (2013) “los grandes productores mundiales de *Arthrospira* como China, India y Estados Unidos realizan el cultivo en áreas tropicales y bajo un diseño que impera desde hace 40 años: grandes piscinas abiertas de 200 metros de largo, 10 de ancho, formando un óvalo alargado, a modo de una pista de carreras, con una profundidad considerable”.

Se han llevado a cabo los programas y proyectos en el marco del apoyo al sistema de las Naciones Unidas para un mejor mundo y de las metas de las Naciones Unidas para el Desarrollo Sostenible 2015-2030 en alianza con la Institución intergubernamental para el uso de la *Arthrospira* contra la desnutrición (IIMSAN, por sus siglas en inglés) (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.1 *Arthrospira* en México

La Agencia Nacional de México (para el Desarrollo Integral de la Familia) implementó un programa de distribución de la *Arthrospira* en todo el estado para combatir la desnutrición masiva con hechos concretos. “Este fue un gran paso hacia adelante en una escala sin precedentes en la distribución de la *Arthrospira* desde el inicio del programa en 2011. En representación de + 7% de la población del Estado y + 3% de reducción en el índice de desnutrición” (IIMSAM, ONU, 2017).

Tabla 4. La Información de Atención y Volúmenes de producto en los Programas Alimentarios del IIMSAM / DIF Chiapas, República de México: La Cobertura de Atención y Volúmenes de Productos.

Programa	Beneficiarios	Pasta para sopa con spirulina (Unidades)	Mazapán con Concentrado proteico y spirulina (Unidades)
Desayunos escolares	197717	180302	3837831
Cocinas comunitarias	1425	172043	0
Adultos mayores	3769	38430	0
Fortalecimiento Nutricional	52395	838644	195928
Un Kilo de Ayuda	15310	0	551160
Centros asistenciales	8452	130554	651160
Maternidad Segura	17248	242212	0
Total general	298499	1602629	4655440

Fuente: Instruction manual for the cultivation of spirulina for personal consumption (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.2. *Arthrospira* en la India

Se han distribuido más de 300.000 dosis de *Arthrospira* a personas con problemas de desnutrición en el estado de Punjab desde creación del proyecto Campaña Mundial de *Arthrospira* desde el 12 de febrero de 2011. El objetivo es llegar a 1.000.000 de dosis en aproximadamente cuatro años (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.3. *Arthrospira* en Somalia

El IIMSAM y la Real Fuerza Aérea de Jordania están abocados a la distribución de *Arthrospira*, para socorrer a las víctimas de la hambruna de Somalia como también la desnutrición que afecta a bebés, niños y adultos (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.4. *Arthrospira* en Burkina Faso

La primera granja para la acuicultura de *Arthrospira*, fue lanzado en Koudougou en el año 1999 bajo los auspicios de la Organización Católica para el Desarrollo y la Solidaridad, OCADES (*Organización Catholique pour le Développement y la Solidaridad*). “En la actualidad el éxito de *Arthrospira* ha dado lugar a la extensión de las explotaciones existentes y la creación de otras nuevas para satisfacer la creciente demanda en Burkina y en los países vecinos” (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.5. *Arthrospira* en Nigeria

Antenna Technologies, una organización no gubernamental, cuyo objetivo principal es la lucha contra la desnutrición, decidió desarrollar la cultura de la *Arthrospira*, en los países en desarrollo, mediante la construcción de tanques de cultivo subsidiados por el gobierno de Francia, como así también la venta de la biomasa seca de Spirulina (IIMSAM, ONU, 2017).

2.2.6. *Arthrospira* en España

La *Arthrospira*, de forma salvaje, se puede encontrar en el Parque nacional de Doñana (Huelva), se estima que no es originaria de España, pero que fue transportada por los flamencos, en sus emigraciones, desde las lagunas volcánicas africanas. Así también, en el Parque Natural

de Sierra-España es posible encontrar a la *Arthrospira*, donde existe una explotación comercial de la empresa ASN Leader, que aprovecha la presencia en el Parque. Cabe resaltar que el conocimiento acabado de esta cianobacteria es parcial, aunque la venta de *Arthrospira* sea totalmente desarrollada y los medios de ventas especializados a través de internet, mayoritariamente (Gómez y García, 2013).

2.2.7. *Arthrospira* en Ecuador

La principal planta productora de *Arthrospira* de Ecuador, se encuentra en la sierra, a 30 kilómetros de Quito, en Pintag. Realizan el cultivo, cosecha y su procesamiento a través de métodos novedosos que aún no son aplicados en otras partes del mundo. “Su sistema es avalado por certificaciones como la ISO 22000, norma internacional que especifica los requisitos para un sistema de gestión de inocuidad de alimentos y el certificado de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que reconocen los principios básicos y prácticas generales de higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado y almacenamiento de productos para consumo humano” (Naranjo, 2013).

2.2.8. Antecedentes de *Arthrospira* en Paraguay

Durante la sexagésima Asamblea General de las Naciones Unidas se inició un proyecto de resolución revisado (A/C.2/60/L.14/RE.1), en el año 2005, sobre el uso de la *Arthrospira* para combatir el hambre y la malnutrición y contribuir al logro del desarrollo sustentable que fue presentada por; Burundi, Camerún, República Dominicana, Nicaragua y Paraguay. Esta resolución fue retirada por un impase diplomático. Así para dar continuidad a la presente resolución, la Organización para la Agricultura y Alimento de las Naciones Unidas (FAO) fue designada para desarrollar el proyecto de *Arthrospira*. En el informe se expone los argumentos relacionados a la necesidad tanto para los gobiernos nacionales y las organizaciones intergubernamentales para volver a evaluar las potencialidades de la Spirulina en torno a la seguridad alimentaria, así como una herramienta para las respuestas ante emergencias. También ha sido propuesto considerar las soluciones técnicas y económicas en la producción de la Spirulina en condiciones ambientalmente empobrecidas, proporcionar suplementos nutricionales en las zonas rurales y urbanas donde su la dieta sea insuficiente; enseñar a un corto y mediano plazo de que la Spirulina es una solución a situaciones de emergencia y es en un producto alimenticio sostenible de alto contenido proteico y vitaminas. Por lo tanto, esto implica la capacidad de instalar rápidamente sistemas en diversos ambientes que puedan ser

sostenidas por las comunidades locales para cubrir tanto las necesidades alimentarias a corto plazo y para complementar los requerimientos nutricionales a más largo plazo (FAO, 2016).

Concretamente, el uso de la *Arthrospira* se evidenció con la Innovación de un laboratorio en el centro de alevinajes del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de Paraguay que habilitó el primer laboratorio nacional de producción de plancton, que sirve para el cultivo de zooplancton, semillas actualmente importadas de Argentina. Esta infraestructura está ubicada en el Centro de Alevinaje de Eusebio Ayala, departamento de Cordillera, construida en el año 2010. “Las herramientas tecnológicas innovan el rubro acuícola y abaratará los costos de producción de peces, destacó el MAG. Con la existencia del laboratorio, Paraguay cesará la importación de *Artemia* y tendrá alimentos de alto valor proteico a base de tecnología para la alimentación de las larvas pacú. Esto asegurará una mayor producción de alevines y beneficiará de forma gratuita a los pequeños y medianos productores paraguayos” (La Nación, 2015).

Por otra parte, según Dos Santos, (2016) se identificó *Arthrospira platensis* mediante muestreos de agua en las lagunas saladas del Chaco Paraguayo, específicamente en la Laguna Capitán, Pozo Colorado, Región Occidental del Paraguay. Además, cabe resaltar que la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción viene desarrollando investigaciones relacionadas con cultivos de microalgas desde el año 2011, (FACEN, 2011).

3. Usos de la *Arthrospira*

3.1. Medicina

En los últimos años se han hecho diferentes estudios acerca de los efectos que la *Arthrospira* tiene sobre algunos roedores y en el humano. “Algunos de estos efectos son la inmuno-regulación, efectos antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, antitóxicos y contra la hiperlipidemia y la hiperglicemia” (Belay *et al.*, 1996). Además, “la protección contra el cáncer ha sido atribuida a su actividad antioxidante, siendo uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres” (Chamorro *et al.*, 2002).

Así también, se ha comprobado a nivel experimental, *in vivo* e *in vitro*, la efectividad en diversas patologías, debido a sus propiedades recientemente halladas, como ser el Ca-Spirulan (Ca-SP), con actividad antiviral. Además de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados ω -3

y ω -6, el β -caroteno, α -tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y un complejo aislado. Por ello ha sido estudiado estas características en tratamientos como alergias, anemia, leucemia y otros tipos de cáncer, reducción de hepatotoxicidad, enfermedades virales y cardiovasculares, procesos inflamatorios, entre otros (Chamorro *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha estudiado sobre los posibles pigmentos de interés, así “los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales solubles en lípidos. Son los responsables de una amplia variedad de colores vistosos en la naturaleza, los más conspicuos siendo el amarillo, el naranja y el rojo” (Olvera-Ramírez *et al.*, 2003). Además, otro pigmento de interés es el β -caroteno, un constituyente común de la fracción carotenoide de la *Arthrospira* y de otras algas, estando en mayor concentración en las algas verdes. “Este compuesto incrementa la respuesta inmune en animales y en los seres humanos y en los animales es convertido en retinol (vitamina A), por lo que también se le conoce como provitamina A” (AEH, 2017).

3.2. Medio ambiente

En la investigación realizada por Carmona y Coffeen (2013) se utilizó un cultivo por lote de *Arthrospira maxima* en aguas residuales, la cual mostró tener una gran capacidad de remoción de nutrientes (fosfatos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal).

Esta investigación demuestra, por lo tanto, la efectividad para la remoción de nutrientes. Estudios realizados por Cañizares *et al.* (1994) utilizó *Arthrospira máxima* inmovilizada en Kcarragenina para el tratamiento terciario de residuales porcinos diluidos al 50%, mostraron remociones entre el 70 y 80% para amonio en 100 días.

En cuanto a los mecanismos de remoción de metales pesados Cerón Hernández *et al.* (2015) indican que se emplean biomásas suspendidas de *Arthrospira* o en consorcio con otras microalgas. En zonas tropicales hay déficit de información al respecto, pues la mayoría de estos estudios son realizados en zonas con estaciones diferenciadas.

3.3. Biocombustibles

Según datos de Martín, *et al.* (2008) en Hawai, la empresa Cianotech, una de las pioneras y más avanzadas del mundo, utilizando *Arthrospira platensis*, anunció que produce más de 350 t/año, con una superficie de estanques de 10 ha y 41.000 m³ de agua. Esto supone 35 t/ha, muy por encima de las 5,5 t/ha que pueden conseguirse con cultivos de palma de aceite.

Se ha desarrollado de manera exponencial la industrialización de la *Arthrospira platensis* por su fácil obtención y crecimiento de esta especie en cualquier lugar del mundo, teniendo en cuenta la adaptabilidad a las condiciones climáticas, en miras para la producción de biocombustibles, sin necesidad de competir con los cultivos de consumo humano y teniendo en cuenta que la *Arthrospira* “presenta en su composición química una concentración cercana al 20% de azúcares, entre los que se encuentran azúcares fermentables que hacen de ésta un candidato potencial para la producción de biocombustibles” (Nie *et al.*, 2002).

3.4. Alimentos

3.4.1. *Arthrospira* como alimento animal

La *Arthrospira* se ha empleado como suplemento en la alimentación de variadas especies animales: rumiantes, cerdos, aves, peces y crustáceos entre otros, como una fuente proteica o como complemento de proteínas en dietas balanceadas (Fox, 1999; Vitón, 2016).

Algunos beneficios reportados en aves son la mejora la calidad de las plumas, el color y la fertilidad, acelera el desarrollo del sistema inmune en los polluelos; también en vacas lecheras puede controlar la mastitis y estimular el apetito. Mejora la resistencia a enfermedades en cerdos destetados. En caballos reduce la anemia, crea glóbulos rojos y blancos, mejora la energía, la resistencia a las infecciones y la recuperación de lesiones. En gatos y perros mejora el pelaje, reduce la dermatitis, mejora la resistencia a las infecciones virales y cáncer (Henrikson, 2010).

Bezares *et al.* (1965), investigaron el valor pigmentante y nutritivo de *Arthrospira* en dietas para gallinas en postura y el resultado obtenido fue el incremento de color en las yemas de huevos a medida que se aumentaba el nivel de *Arthrospira*.

Por otro lado, Kulpys *et al.* (2009), informaron que el uso de *Arthrospira* en vacas lituanas, en su periodo de lactancia temprana, produjeron un aumento de peso de 8 a 10% y el aumento de producción de leche en un 21%.

En el caso de los peces, la utilización de *Arthrospira* en la dieta de tilapia ha resultado satisfactorio debido a que mostraron un mayor crecimiento y un aumento de contenido de proteína en comparación a una dieta convencional y se consideró como estimulante del crecimiento de la Tilapia del Nilo (B. Belal, 2012).

Con el objetivo de conocer el poder atrayente de la harina de *Arthrospira platensis* como aditivo en la alimentación de *Litopenaeus schmitti*, se realizó un experimento en el laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Pesqueras, (Jaime-Ceballos *et al.*, 2007). Se concluyó que la adición de 5% de harina de *Arthrospira platensis* mejoró la atractabilidad del alimento para *Litopenaeus schmitti* (camarón blanco).

En tanto, Calderón *et al.* (1976) llevaron a cabo tres experimentos con objeto de determinar el valor nutricional de la harina de espirulina como fuente de proteína para rumiantes, concluyendo que la *Arthrospira* puede reemplazar a otros alimentos convencionales.

Así también en la investigación realizada por Valdivie y Dieppa (2001), se utilizaron 1200 pollonas de engorde White Plymouth Rock x Cornish de un día de edad con el objetivo de determinar el momento apropiado de suministrar el pigmento para lograr, en el menor tiempo posible, la coloración de la piel y la grasa según las preferencias de los consumidores. Los resultados obtenidos fueron la pigmentación de piel y grasa abdominal con el uso de *Arthrospira*, al momento del sacrificio.

3.4.2. *Arthrospira* como alimento humano

La evidencia muestra que desde hace más de veinte siglos las microalgas son parte de la alimentación humana y en algunos países persiste su uso. Las nuevas tecnologías han permitido explorar con más detalle el aporte nutricional de estas plantas microscópicas para mostrarnos todo el potencial que tienen (Espinoza, 2017).

Se ha demostrado que la *A. platensis* tiene una buena aceptación organoléptica, lo que le confiere un gran potencial para considerarse como suplemento nutricional y, finalmente, no se han reportado toxicidades crónicas ni agudas, haciéndola segura para el consumo humano (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015).

Las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) mediante el Instituto Intergubernamental para el Uso de las Microalgas Spirulina contra la Malnutrición la ONU, recomienda el empleo de microalgas como la spirulina contra la malnutrición aguda en situaciones de emergencia humanitaria, de malnutriciones de índole crónico, y para el desarrollo sostenible. De esta manera las Naciones Unidas avalan, apoyan y recomiendan la utilización de la *Arthrospira* para corregir estados nutricionales, convirtiéndose en uno de los pocos productos alimentarios (sino el único) en ser reconocido completamente y

propuesto como una posible solución definitiva a los problemas alimentarios mundiales (Organización de las Naciones Unidas (ONU), 2008).

Sera Blanco y García Díaz (2017) resaltan las propiedades de la *Arthrospira* para la nutrición y la salud humana, por su alto porcentaje de proteína y valor biológico.

La *A. platensis* se ha comercializado y consumido como alimento humano y ha sido aprobado como alimento para el consumo humano por muchos gobiernos, agencias de salud y asociaciones de estos países: Argentina, Australia, Austria, Bahrein, Bahamas, Bangladesh, Bielorrusia, Bélgica, Brasil, Bulgaria, Canadá, Chad, Chile, China, Colombia, Costa Rica, Croacia, República Checa, Dinamarca, Ecuador, Egipto, Etiopía, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Guam, Estados del Golfo, Haití, Hungría, India, entre otros.

Así también Henrikson (1997) elaboró un programas de autocuidado con energía verde limpia, en donde detalló que la *A. platensis* puede llegar a ser beneficioso en una dieta natural para disminuir los niveles de colesterol, reducir el síndrome pre-menstrual, disminuir el riesgo de contraer cáncer, aumentar el rendimiento en atletas, en algunos países como India y Vietnam se prescribe el consumo de *A. platensis* en mujeres embarazadas y madres lactantes con la finalidad de combatir la anemia ferropénica.

A la luz de la bondad nutricional de *A. platensis*, varias organizaciones están desarrollando programas para abordar la desnutrición en países en desarrollo. Además de considerarse como un superalimento para combatir virus, prevenir el envejecimiento e incluso prevenir el cáncer. (Matondo *et al.*, 2016; Gallardo-Rodríguez *et al.*, 2012) citado por (Soni *et al.*, 2017).

En las investigaciones realizadas por Durand-Chastel, (1980), citado por (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015) con respecto a la proteína presente en la *Arthrospira*, se han registrado informes de resultados favorables en el caso de niños o infantes mexicanos que sufren de desnutrición severa. En otro estudio, llevado a cabo en África, se ha suplementado con *A. platensis* a niños con desnutrición proteica, como resultado, el estado nutricional mostró una mejoría significativa y se redujo el número de niños diagnosticados con desnutrición; en promedio, el grupo suplementado con *Arthrospira* ganó 25 g/día de peso, mientras que el grupo control 15 g/día (Simpore *et al.* 2005; J. *et al.* 2006).

3.4.3. Ejemplos de alimentos elaborados con *Arthrospira*

Investigaciones realizadas por Camacho (2017), en análisis a la *A. platensis*, fue estudiada mediante la aplicación de varios tratamientos con distintas condiciones específicas que permitan una mejor asimilación de la misma, en el caso de ser aplicada como ingrediente farmacéutico activo o suplemento proteico, en donde el pH óptimo registrado fue de 5, relación 1:20 de sustrato-agua y una temperatura de hidrólisis entre los 65 °C a 70 °C, se aplicó las técnicas de electroforesis SDS-PAGE y cromatografía RP-HPLC, obteniéndose un proceso de hidrólisis adecuado y una mezcla compleja de péptidos y aminoácidos libres con bajos pesos moleculares, que podría convertir a la *A. platensis* como un ingrediente funcional.

Según Ruiz (2016) la búsqueda de las condiciones ideales en proporción de ingredientes para la elaboración de un queso adicionado con *A. platensis* pretende proporcionar un producto innovador y suplementario ya que se mejorará la calidad proteica de este, así como sus características sensoriales y el análisis cualitativo. Esto proporcionó una aceptabilidad del queso, teniendo en cuenta la textura mejorada, el color verde característico, la diferencia significativa de olor y sabor a diferencia del queso fresco.

4. Propiedades bioquímicas de la *Arthrospira*

En todos los análisis bioquímicos de la composición de nutrientes de la *A. platensis* se presentan diferencias en los valores las sustancias medidas según se corrobora en la investigación de Saracho (2007), se debe tener en cuenta la estación del año y las condiciones locales, ya que la *A. platensis* es considerado un alimento natural. En cuanto a su composición nutricional se encuentra; la proteína, compuesta de cadenas cortas de aminoácidos indispensables y no indispensables, convirtiéndola en una proteína completa y fácil de digerir. Además, cabe resaltar, que es fuente natural de tocoferoles, contiene el complejo B y betacaroteno, precursor de la vitamina A, minerales y oligoelementos. Ácidos grasos esenciales y ácido gamalinolénico, este último sólo presente en la leche materna y en la *A. platensis*. Carbohidratos de fácil absorción, como la glucosa y la ramnosa.

Tabla 5. Composición bioquímica de la *A. platensis*.

	Contenido (%)		Contenido (%)		Contenido (%)
Proteínas	50-70*	Vitaminas		Pigmentos	6
Leucina	5,9-6,5	Provitamina A	0,11-0,2	Clorofila a	0,8-1,5
Valina	7,5	Tiamina B1	3-4 mg	Carotenoides	0,648
Isoleucina	6,8	Riboflavina B2	2,5-3,5mg	betacaroteno	15
Lisina	2,6-3,3	Niacina B3	0,014	Equinenona	11-13
Fenilalanina	2,6-3,3	Vitamina B6	0,5-0,7mg	b-criptoxantina	6-8
Metionina	1,3-2,0	Cobalamina B12	0,15-0,25mg	3'-hidroxiequinenona	7-11
Triptófano	1,0-1,6	Vitamina E	5-7mg	Zeaxantina	25
Tirosina	2,6-3,3	Vitamina K	2,2mg	Diatoxantina	5
Ácido glutámico	7,3-9,5	Ácido fólico	4-5mg	Cantaxantina	5
Ácido aspártico	5,2-6,0	Ácido pantoténico	0,5-0,8mg	Mixoxantofila	13-17
Cisteína	0,5-0,7	Biotina	5µg	Oscillaxantina	3-5
Ácidos grasos	3-6,5*	Carbohidratos	15-20 *	No identificados	3-4
Ácido mirístico	0,23	Glicerol	7,4	Ficocianina	16-20
Ácido palmítico	44,6-54,1	Glucosa	7,5	Minerales	7*
Ácido palmitoleico	1,26	Ramnosa	17,1	Potasio	1-14
Ácido γ-linoleico (GLA)	8-32	Fucosa	3,3	Sodio	0,45-0,5
Ácido linoleico	11-31	Ribosa	8,1	Fósforo	0,3-0,7
Ácido oleico	1-15,5	Xilosa	4,5	Calcio	0,1-0,4
Otros	20,88	Manosa	1,9	Magnesio	0,1-0,2

Galactosa	8,2	Fierro	0,03-0,05
D-Glucosamina	2,12	Manganeso	0,005
No identificados	2,6	Zinc	0,003
		Cobre	0,0012
		Cromo	0,28mg

* % en base al peso seco de la biomasa.

Fuente: Uso tradicional y actual de *Spirulina sp. (Arthrospira sp.)* (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez 2006b).

Además, su uso no es tóxico y por su alto contenido proteico, la Agencia Europea Espacial lo seleccionó para la dieta de los astronautas y es usado en clínicas para tratar la malnutrición (Desmorieux y Decaen 2005) igualmente está siendo considerado por la NASA como un alimento ideal y es aclamada como el alimento del futuro (Raouf *et al.*, 2006). También ha sido catalogada como un *Novel Food* o alimentos nuevos, utilizado como suplemento dietario en atletas (Carvalho *et al.*, 2017).

5. Metabolitos de interés biotecnológico presentes en *A. platensis*

5.1. Carotenoides y Betacaroteno

El betacaroteno es un constituyente común de la fracción carotenoide de la *A. platensis* y de otras algas, estando en mayor concentración en las algas verdes. “Este compuesto incrementa la respuesta inmune en animales y en los seres humanos y en los animales es convertido en retinol (vitamina A), por lo que también se le conoce como provitamina A. La protección contra el cáncer ha sido atribuida a su actividad antioxidante, siendo uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres” (Chamorro *et al.*, 2002).

5.2. Exopolisacáridos (EPS)

Muchas cianobacterias, incluyendo a la *A. platensis*, poseen estructuras superficiales adicionales tales como vainas, cápsulas o mucílago disperso, compuestos principalmente de polisacáridos y que durante el crecimiento de las células en cultivos estacionarios son liberados

al medio provocando que éste se vuelva más viscoso. “Estos polisacáridos solubles en el medio son fácilmente recuperables, por lo que se han sugerido diferentes aplicaciones en biomedicina y en la industria cosmética y de alimentos, como agentes emulsificantes, estabilizantes o espesantes” (De Philippis y Vincenzini, 1998).

5.3. Lípidos

Los lípidos que contiene la *Arthrospira* varían entre un 6 y 13%, de los cuales la mitad son ácidos grasos. De los ácidos grasos presentes los que se encuentran en mayor proporción son los ácidos palmíticos, g-linoleico (GLA), linoleico y oleico, pero el que más importancia tiene es el GLA, un ácido graso insaturado, esencial, que rara vez está presente en la dieta diaria. Entre las fuentes que contienen GLA, *A. platensis* es la que lo contiene en mayor concentración (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006a).

5.4. Minerales

La *A. platensis* suministra un portentoso aporte de minerales en forma natural, los que son fácilmente absorbidos por el organismo y tienen una gran eficacia en nuestro cuerpo. Igualmente es una excelente fuente de calcio, de hierro, de manganeso, y de magnesio. Además, aporta zinc, germanio y cobre (Cárdenas Nieto, *et al.*, 2010).

5.5. Proteínas y vitaminas

El alto contenido de proteínas de *A. platensis* hace de ésta un alimento altamente nutritivo, además de que contiene aminoácidos esenciales y su aminograma es muy similar al de la yema de huevo. (Ximena Pedraza, 1989). A lo anterior, se puede agregar que las proteínas presentes en esta cianobacteria son de fácil digestión y metabolización, ayudando con esto al tratamiento de la desnutrición (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006b).

6. Aspectos de seguridad

Teniendo en cuenta los reportes recopilados por Sotiroudis y Sotiroudis (2013), la *A. platensis* está regulada como alimento y como suplemento dietético (Kulshreshtha *et al.*, 2008). La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. ha clasificado varios productos de biomasa seca *A. platensis* como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) para el consumo humano. (Food and Drug Administration (FDA), 2011). La *Arthrospira* ha

sido típicamente estudiada en dosis diarias de 1 a 10 g y la dosis recomendada para adultos suele estar en el rango de 3-10 g por día. La cantidad de yodo contenida en 10 g de biomasa de *A. platensis* seca es de solo 3 µg o menos (no detectada). Desde el nivel de seguridad superior para la ingesta diaria total de yodo (para un adulto de 60 kg de peso corporal), establecido por el *Scientific Committee on Food* (SCF) y la *European Food Safety Authority* (EFSA) son 600 µg, mientras que el valor correspondiente sugerido por el *US Institute of Medicine* es de 1100 µg, no hay riesgo de que un consumidor consuma excesivo yodo por el uso de Spirulina.

Se han reportado contenidos totales de ácido nucleico de *A. platensis* de 4.2-6% de la materia seca de microalgas (Falquet, 2017).

El contenido de ARN es aproximadamente 3-4 veces mayor que el del ADN, comparados con los de la carne animal y alimentos vegetales, parecidos a las algas unicelulares, pero más bajos que las bacterias y las levaduras. Teniendo en cuenta la influencia de los ácidos nucleicos en los niveles séricos de ácido úrico, por el metabolismo de las purinas, se ha recomendado un margen de seguridad de 30 g de ingesta máxima diaria de *A. platensis* (Gershwin y Belay, 2008).

Según Chamorro *et al.* (1996), la administración oral de una suspensión de *A. platensis* a ratas Wistar, hasta dosis de 800 mg/Kg, no produce muertes, síntomas tóxicos, ni alteración en el consumo de alimento durante dos semanas de observación. La autopsia tampoco acusa alteración en el peso e histología de los órganos.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

1. Descripción del área de estudio

Se procedió a la identificación de posibles lugares, según la bibliografía consultada (Dos Santos, 2016), con posibilidades para la recolección de las muestras en lagunas del Chaco paraguayo con evidencia o perspectivas de presencia de *A. platensis*. Teniendo en cuenta el siguiente diagrama de flujo (Figura 2):

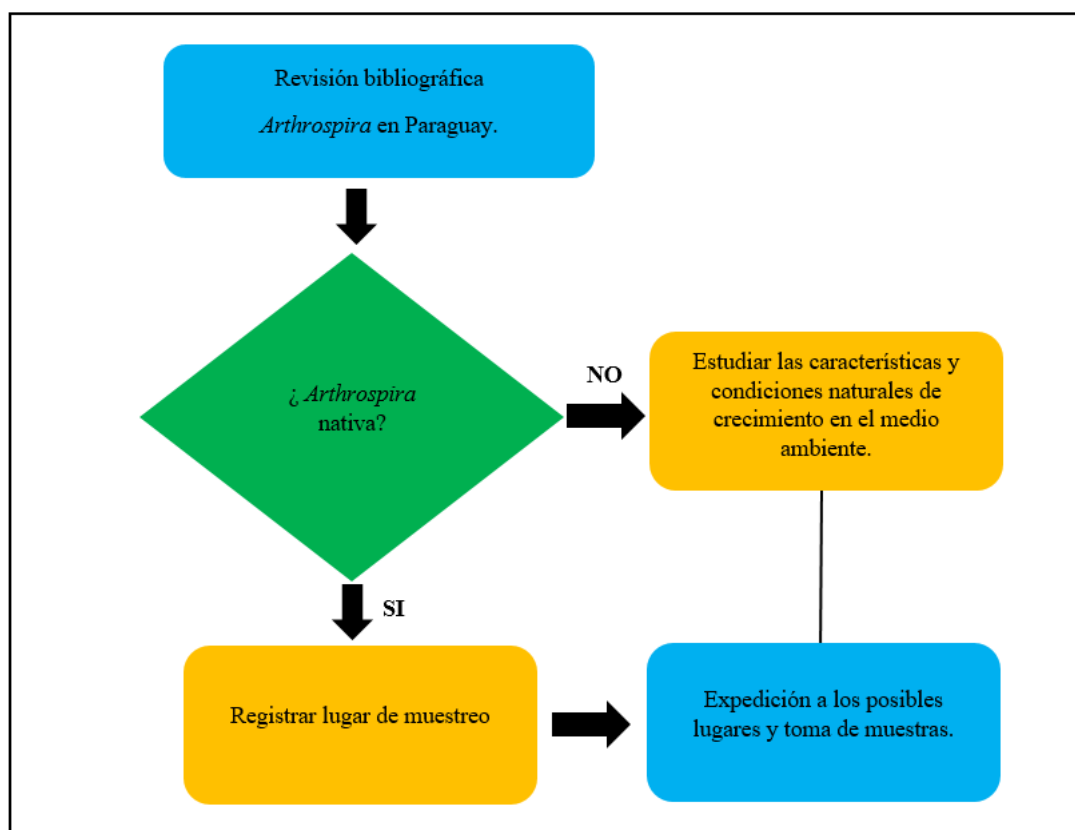


Figura 2. Diagrama de flujo de la identificación de posibles lugares.

Fuente: Propia

2. Colecta de la muestra

El muestreo se realizó en los meses de febrero y marzo del año 2017. Para la colecta de la muestra en lagunas se utilizó una red de fitoplancton de 25 μm que fueron colectados en recipientes estériles debidamente rotulados y conservados a 4° C para su traslado al laboratorio. Se procedió al registro de las coordenadas geográficas de cada punto de muestreo mediante GPS (Garmin Etrex20). Además, se midieron *in situ* los parámetros como pH (ph-metro, marca Hach) y temperatura.

3. Identificación morfológica

La identificación y el conteo se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Itapúa-Facultad de Ciencias y Tecnología. Las muestras rotuladas fueron analizadas, previa homogenización manual. Se tomó una gota de la muestra utilizando una pipeta Pasteur, se colocó sobre una lámina portaobjeto y se cubrió con una lámina cubreobjetos. La observación de las cianobacterias se realizó empleando un microscopio óptico (Zeiss Primo Star) en los aumentos de 10X, 40X, 100X, repitiéndose este procedimiento por lo menos tres veces por muestra.

Con la observación de la *A. platensis* en el microscopio se procedió también a la medición y la foto-documentación. La identificación taxonómica se llevó a cabo utilizando como base el Atlas de Algas del Paraguay, (Dos Santos, 2016). La densidad celular (cel/ml) se determinó con el conteo en la cámara de Neubauer.

3.1. Tinción de Gram

Como parte de la caracterización morfológica de la cepa de *A. platensis* aislada se procedió a su identificación por técnicas estandarizadas de tinción Gram con un kit (Britania Lab), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se preparó un extendido fino del material en estudio, en este caso de *A. platensis* y se dejó secar al aire. Posteriormente, se fijó el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto 3 ó 4 veces por la llama de un mechero de Bunsen. Se colocó el preparado sobre un soporte de tinción y se cubrió la superficie con solución de Cristal Violeta por 1 minuto, pasando el minuto, se lavó con agua destilada y se cubrió el preparado con Lugol Gram por 1 minuto. Nuevamente, se lavó con agua destilada. Seguidamente, se colocaron unas gotas del decolorante alcohol

acetona durante unos 30 segundos. Se lavó con agua destilada y se colocó nuevamente el portaobjeto sobre el soporte. Se cubrió la superficie con Safranina (contracolor), durante un minuto. Se procedió a lavar con agua y colocar el preparado en un soporte de tinción en posición vertical, se dejó que escurra el exceso de agua y que se seque el extendido. Finalmente, se examinó el extendido al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X) y se documentaron las imágenes con cámara digital.

4. Aislamiento e inoculación

Se realizó con el método de aislamiento con pipeta, que se utiliza para separar microalgas mayores a 10 μm de diámetro en forma de quistes, células vegetativas, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas (Vonshak, 2004). Para este proceso se aisló la cianobacteria de interés con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida. Se colocó una gota de muestra de fitoplancton en un portaobjeto y luego se observó bajo el microscopio, donde las células de interés se succionaron por capilaridad con la pipeta y se pasaron a un portaobjetos limpio con una gota de agua estéril. Este procedimiento se repitió, lavando la célula en medio o en agua estéril hasta no observarse contaminantes y la gota contenga un solo tipo de células.

Una vez realizadas las transferencias, la célula aislada se pudo colocar en tubos de ensayo con 2-5 ml de medio de cultivo estéril. Posteriormente, en matraces de 200 ml se realizó el sembrado con el medio nutritivo para ello se colocó la cianobacteria aislada en el medio de cultivo inicial de 100 ml, se distribuyó los inóculos en 3 matraces que necesitaron agitación constante mediante aireadores y acompañado de luz artificial, respetando las 12 horas luz y 12 horas de oscuridad necesarias.

5. Conservación de la cepa

El cepario es el área que mantiene las cepas puras de interés biotecnológico, es importante mantener los cultivos en condiciones apropiadas para garantizar que las cepas se mantengan viables y disponibles para cualquier estudio posterior.

Los cultivos líquidos de las cepas se mantuvieron en recipientes de volumen pequeño, en matraces Erlenmeyer de 20-100ml o en tubos de ensayo de 25-50 ml.

Se rotularon los recipientes con el nombre y origen de la especie, fecha de inoculación y tipo de medio de cultivo. Finalmente se colocaron en condiciones favorables de luz y temperatura para su crecimiento.

5.1. Conservación en refrigeración

Se utilizaron como agente crioprotector glicerol al 15%. En los viales se introdujeron 1 ml de glicerol y 400 µl de la cepa, se marcaron los viales con tinta que no se desvanezca por la baja temperatura. Se procede a la refrigeración a 4-8 °C.

5.2. Criopreservación

También fue utilizado como agente crioprotector glicerol al 15%. En los viales se agregaron el agente crioprotector y 200 µl del cultivo bacteriano concentrado por centrifugación, se rotularon los viales. Se procedió a un primer paso de disminución de la temperatura y se almacenaron los viales a 0 °C por 24 h y luego se procedió a su almacenamiento final a -80°C.

6. Cultivo y escalado

6.1. Instalación de los biorreactores de cultivo

Una vez aisladas la cepa de *A. platensis*, se procedió a la instalación de biorreactores para su cultivo. Estos fueron ubicados en un lugar cerrado, con aireación (0,025 vvm) y luz artificial disponible (Fluorescentes del tipo “cool-white” de 5600 lúmenes, 40W), se incorporó además un circuito automático de tiempo, 12 horas de oscuridad (corte de luz a las 20:00 horas.) y 12 horas de luz (iluminación a las 08:00 horas.). Se trabajó con 6 recipientes de plástico con tapa de 2,5 L de capacidad para evitar que las microalgas cultivadas sean contaminadas y se dispuso de un sistema de aireación constante.

6.2. Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo estándar fue el de Schlösser (1982) y citado por Bezerra *et al.* (2012) cuya composición, por litro de agua destilada, es la siguiente:

Tabla 6. Composición del medio de cultivo

NaHCO₃	13,61g
Na₂CO₃	4,03g
K₂HPO₄	0,50g
NaNO₃	2,50g
K₂SO₄	1,00g
NaCl	1,00g
MgSO₄.7H₂O	0,20g
CaCl₂.2H₂O	0,04g
“PIV” solución de metales	6mL
“CHU” solución de micronutrientes	1mL
Vitamina B12 (15µg/100mL H₂O)	1mL

Fuente: Cultivo de *Spirulina platensis* por proceso discontinuo alimentado repetitivo utilizando urea como fuente de Nitrógeno, (Chuei, 2006).

Tabla 7. Composición del medio PIV, solución de metales (en 1 litro de agua destilada)

Na₂EDTA	750 mg
FeCl₃.6H₂O	97 mg
MnCl₂.4H₂O	41 mg
ZnCl₂	5 mg
CoCl₂.6H₂O	2 mg
Na₂MoO₄.2H₂O	4 mg

Fuente: Cultivo de *Spirulina platensis* por proceso discontinuo alimentado repetitivo utilizando urea como fuente de Nitrógeno, (Chuei, 2006).

Tabla 8. Composición del medio CHU, solución de micronutrientes (en 1 litro de agua destilada)

Na₂EDTA	50,0 mg
H₃BO₃	618,0 mg
CuSO₄.5H₂O	19,6 mg
ZnSO₄.7H₂O	44,0 mg
CoCl₂.6H₂O	20,0 mg
MnCl₂.4H₂O	12,6 mg
Na₂MoO₄.2H₂O	12,6 mg

Fuente: Cultivo de *Spirulina platensis* por proceso discontinuo alimentado repetitivo utilizando urea como fuente de Nitrógeno (Chuei, 2006).

6.3. Escalado del cultivo

Se utilizó un sistema semi-abierto tipo acuarios de interior. El biorreactor consiste en un recipiente de vidrio de 40 cm de profundidad, 70 cm de largo y 30 cm de ancho, con una capacidad de 50 litros. Se procedió a la instalación de aireadores y la iluminación, según lo mencionado en el apartado 6.1 Para el llenado de este acuario (Figura 3), se utilizó el contenido de cada uno de los módulos de los biorreactores (2 litros) y el medio de cultivo correspondiente (Tabla 9):

Tabla 9. Escalado del cultivo.

Módulo de cultivo (2 L c/u)	Medio de cultivo escalado (L)	Intervalo de llenado (días)
Biorreactor 1	2	15
Biorreactor 2	4	15
Biorreactor 3	6	15
Biorreactor 4	8	15
Biorreactor 5	8	15
Biorreactor 6	10	15
Total: 12 Litros	Total: 38 Litros	Total: 90 días

Fuente: Propia

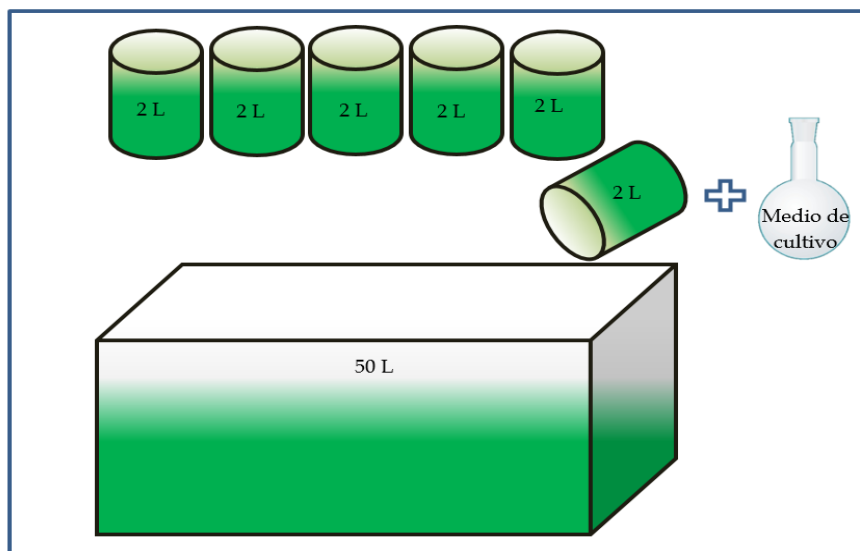


Figura 3. Escalado del cultivo.

Fuente: Propia

7. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Las evaluaciones de los parámetros físico químicos se realizaron diariamente desde el inicio de la instalación de los módulos de cultivo, con un intervalo de 8 días, durante 3 meses. Las mediciones de los parámetros físicos y químicos consistieron en registrar: temperatura del agua de los cultivos y la medición de pH del agua con papel tornasol o papel pH.

8. Determinación de la cinética de crecimiento

Se realizó el conteo celular bajo microscopio (Primo Star Zeiss), cada 8 días por 3 meses que duró el manejo de los cultivos. Para el efecto se utilizó la fórmula de cálculo de densidad celular (Fórmula 1).

$$Densidad = \frac{Total\ células\ contadas \times 10000}{Número\ de\ cuadrados} \quad \text{Fórmula 1.}$$

La evaluación de la cinética de crecimiento se realizó utilizando el modelo matemático Gompertz, Coll *et al.* (2001) en cultivos discontinuos, donde las variables respuesta fueron los parámetros cinéticos de crecimiento, biomasa a (Fórmula 2):

$$\log = \frac{N}{N_0} \text{ F\acute{o}rmula 2.}$$

Donde N es n\umero de c\elulas a un tiempo determinado (C\el/ml) al tiempo (h) y N₀ es n\umero de c\elulas al inicio del experimento (C\el/ml), fase de adaptaci\on (λ : horas) (F\acute{o}rmula 4), velocidad espec\ufica de crecimiento (μ_{max} : horas⁻¹) (F\acute{o}rmula 5) y tiempo de generaci\on (G: horas) (F\acute{o}rmula 6). La cuantificaci\on de las c\elulas de *A. platensis* se realiz\o empleando c\amara Neubauer (1/10 mm deep, Brighth line-Boeco, Germany) cuyos datos se introdujeron al modelo matem\atico de Gompertz (F\acute{o}rmula 3):

$$Y = a * \exp(-\exp(b - c * T)) \text{ F\acute{o}rmula 3.}$$

Donde Y es el log (N/N₀) y T es el tiempo en horas. Las constantes (a), (b), (c) se determinaron con el empleo del software STATISTICA 13; los que permitieron calcular los valores de duraci\on de fase de latencia, velocidad espec\ufica de crecimiento y tiempo de generaci\on respectivamente:

$$\lambda = \frac{(b-1)}{c} \text{ F\acute{o}rmula 4.}$$

$$\mu_{max} = a \times c \text{ F\acute{o}rmula 5.}$$

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \text{ F\acute{o}rmula 6.}$$

La precisi\on del modelo matem\atico con respecto a los datos experimentales se evalu\o a trav\es de coeficiente de regresi\on (R), empleando el software anteriormente mencionado.

9. Cosecha, filtrado y secado de la biomasa

La cosecha se realiz\o con la ayuda de una bomba de vac\fo con papel filtro cuantitativo Whatman N\o 1 de 0,45 μ m y con el apoyo de la medici\on visual de densidad mediante el espirul\metro. Al t\ermino de la cosecha la biomasa se lav\o con agua clorada para eliminar contaminaci\on por g\ermenes de c\olera o hepatitis (pH 5, dos gotas de cloro en 1 litro de agua). La recolecci\on se realiz\o con el agitador detenido para dejar en reposo el cultivo y esperando que las algas se acerquen a la superficie. Posteriormente se realiz\o el secado suave en estufa a 65 $^{\circ}$ C. El producto final fue depositado en un recipiente de pl\astico con tapa.

10. Determinación de coliformes totales

Se utilizó el método de recuento por dilución en tubos, mediante el Número más probable (NMP). El método de NMP para coliformes totales se basa en primera instancia, en una selección de los microorganismos que producen ácido y gas a partir de lactosa a 37 °C. Por ello, el primer paso es siempre la siembra en tubos roscados de Caldo Mac Conkey que contiene lactosa, y agregando una campana de Durham o tubo de fermentación invertido, que permite recoger el gas que pueda producirse, (Baggini, 2014).

11. Ensayo de toxicidad de *Arthrospira platensis* con el cladóceros *Daphnia magna*.

El siguiente ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo expuesto por Pica Granados (2004). Dentro del grupo de los cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, a nivel universal. El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *D. magna*, *D. pulex*, y *D. similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos compuestos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *D. magna*, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros.

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplean neonatos (< 24 horas de nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un periodo de 48 horas. Como resultado de dicha exposición, es posible determinar la concentración de la muestra o compuesto problema que produce la muerte al 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL50), con un nivel de confiabilidad del 95% (Ramirez Romero y Mendoza Cantú 2013).

Se obtuvo la *D. magna* (Figura 4), del Centro de alevinaje de Eusebio Ayala y la Misión Técnica de Taiwán. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias y Tecnología, perteneciente a la Universidad Nacional de Itapúa.

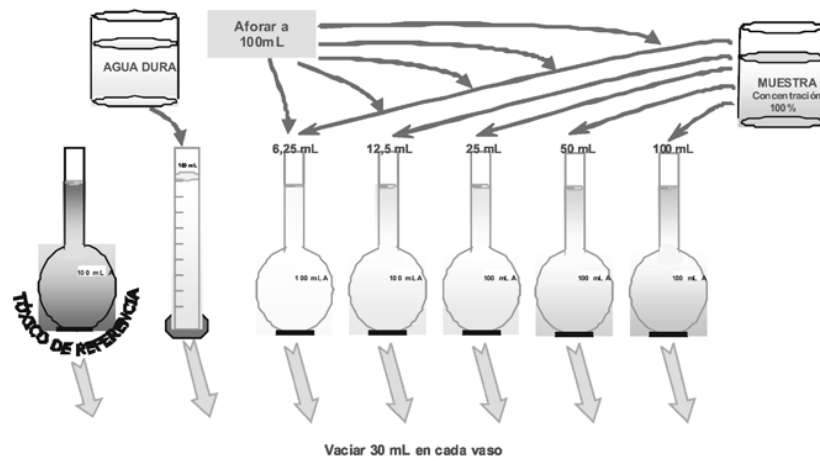


Figura 4. *Daphnia magna*, Centro de Alevinaje Eusebio Ayala.

Fuente: Propia.

Siguiendo la descripción de Ramirez Romero y Mendoza Cantú (2013); (Figura 5), las pruebas definitivas requieren por lo menos 5 diluciones, por lo que es necesario preparar un mínimo de 100 mL por dilución. Este volumen será suficiente para el llenado de las tres replicas (25 mL en cada uno) de cada concentración. Además de las diferentes concentraciones de la muestra, se debe preparar, junto con las respectivas replicas, un control negativo con agua dura reconstituida sin suplementos y un control positivo con una solución del compuesto toxico de referencia (Cr (VI)), preparada a partir de dicromato de potasio en la concentración que, de acuerdo a la carta control previamente elaborada, corresponda a la CL₅₀. El control negativo se emplea para verificar el adecuado estado de salud de los organismos, de manera que se esperaría que al término del experimento su sobrevivencia fuera mayor a 90%. El control positivo se emplea para valorar la estabilidad de la sensibilidad de los organismos. Aunque se pueden utilizar diferentes compuestos tóxicos de referencia, el recomendado para pruebas con *D. magna* es el Cr (VI). Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transfieren diez neonatos de menos de 24 horas de nacidos a cada uno de los recipientes. Para realizar este procedimiento se puede utilizar una pipeta despuntada. Terminada la transferencia, se cubren los vasos con papel Parafilm y se colocan bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura por un periodo de 48 horas.

1. PREPARACION DE DILUCIONES



2. PREPARACIÓN DE PRUEBA

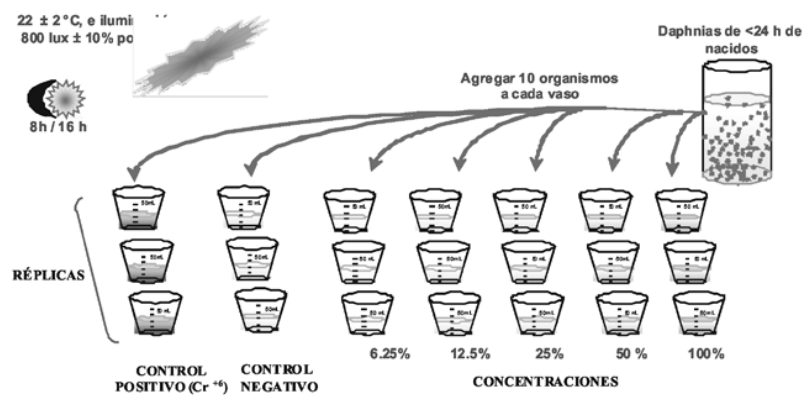


Figura 5. Procedimiento de la prueba para el ensayo de toxicidad aguda

Fuente: (Ramirez Romero y Mendoza Cantú, 2013. p29)

Transcurrido el tiempo establecido, se revisaron los vasos de prueba y se registra el número de organismos muertos en cada uno. La muerte se reconoce, por la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco. Antes de efectuar las lecturas se agitan los recipientes en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo. Aquellos que no presenten movilidad pueden observarse con un microscopio estereoscópico para confirmar la ausencia de ritmo cardiaco (Ramirez Romero y Mendoza Cantú 2013).

12. Caracterización molecular *Arthrospira platensis* por técnicas de ADN

Los siguientes procedimientos han sido realizados en el Instituto de Biotecnología de Misiones "Dra. María Ebe Reca". Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

Como parte de la caracterización de *A. platensis* se han evaluado 3 protocolos de extracción de ADN. Se evaluó un protocolo de extracción de ADN para microalgas y plantas; un protocolo de extracción de ADN propuesto para algunas cepas de *Arthrospira sp*; y un kit comercial para extracción de ADN. La eficacia de estos protocolos se evaluó midiendo la calidad y cantidad de ADN extraído mediante geles de agarosa, espectrofotometría UV y amplificación por PCR. Los protocolos de extracción utilizados fueron:

12.1. Protocolo de Extracción de ADN 1: Método Chelex.

Para este protocolo se utilizó la solución Chelex- resina Chelex 100 al 5% (p/v) (Bio-Rad, Hercules, CA) en agua destilada estéril como se menciona en Berthold *et al.* (1993)

Primeramente, se agregó un pequeño número de células *A. platensis* a aproximadamente 20 μ L de agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga cónico de 1,5 ml. Se añadieron 20 μ L de etanol al 100% y las muestras se incubaron durante aproximadamente un minuto. Posteriormente se agregaron 200 μ L de solución de Chelex al 5%. Luego, las muestras se agitaron para mezclar. Las muestras se incubaron a 100 °C durante 5 minutos y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo.

Finalmente, las muestras se agitaron vorticialmente para mezclarlas, y se centrifugaron durante 5 minutos para sedimentar el Chelex y los restos celulares. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo y se almacenó a -20 °C. Este sobrenadante puede usarse directamente en la reacción de PCR.

12.2. Protocolo de extracción de ADN 2: utilizado para algunas especies de *Arthrospira sp*.

Teniendo en cuenta estudios realizados por Scheldeman *et al.* (1999). Se recogió aproximadamente 1 mL de un cultivo denso por centrifugación en un tubo de microcentrífuga (16,000 g, 15 min) y las células se lavaron tres veces con buffer RS (NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0). Se agregó 20 μ L de una solución de 0,05 μ g/ μ L de proteinasa K en 1 X de buffer, luego se incubaron a 37 °C durante 1 h, seguido de 5 min en un baño de agua hirviendo.

Seguidamente se añadieron 5 μ l de NaCl 5 M y se mezclaron suavemente para llevarlo a una centrifugación final (8,000 g, 5 min) y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

12.3. Protocolo de extracción de ADN 3: Kit ADN PuriPrep-S. InBio Highway ®

Se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante, que se describe brevemente a continuación. Para cada muestra en un microtubo de 1,5 ml, se añadieron 20 μ L de proteasa y 150 μ L de buffer fosfato salino (PBS). Las muestras fueron mezcladas en un vórtex. Se agregaron 200 μ L de buffer BL (proporcionado con el kit) al microtubo. Las muestras se agitaron en vórtex y se realizó un centrifugado de 5 segundos en la microcentrífuga. Se incubó 10 - 15 minutos a 56 °C, se realizó una centrifugación de 5 segundos, se añadieron 200 μ L de etanol (100%), se agitó invirtiendo 3 veces y se repitió un pulso de 5 segundos en el microcentrífuga. El contenido del microtubo se colocó en una minicolumna (incluida con el kit). Los microtubos se centrifugaron a 12,000 g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se añadieron a las paredes de la minicolumna 500 μ L de buffer BLAV 1 (proporcionado con el kit). De nuevo, el microtubo se centrifugó a 12,000 g durante 1 minuto, el filtrado se descartó y se añadieron 500 μ L de buffer BLAV 2 (proporcionado con el kit) en las paredes de la minicolumna. Los microtubos se centrifugaron a 15,000 g durante 3 minutos (porque cualquier traza de BLAV 2 puede actuar como un inhibidor de PCR). A continuación, los tubos de recogida se descartaron y se colocaron 100 μ L de buffer EDTA pH: 9 (calentado a 70 °C) en el centro de la membrana de sílice sin tocarlo con la punta de la micropipeta. Los microtubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 g durante 2 minutos para la elución de ADN. La solución obtenida se almacenó a -20 °C.

12.4. Evaluación del ADN extraído

El ADN extraído se evaluó en electroforesis en gel de agarosa (1% p/v). Se tiñó con una solución de Gel Red (10.000 x). La evaluación cuantitativa de los protocolos de extracción de ADN (Tabla 10), se realizó espectrofotométricamente (MAPADA UV 3300 Spectrophotometer, ULH1210003), midiendo por duplicado la absorbancia de cada muestra a 230, 260 y 280 nm para análisis cuantitativos comparativos de polisacáridos, ADN y proteínas Sambrook *et al.* (1989). Se usó una relación de absorbancia a 260 y 280 nm para verificar la pureza del ADN extraído.

Tabla 10. Protocolos de extracción de ADN

Protocolo de Extracción de ADN	Métodos
Protocolo de Extracción 1	Chelex
Protocolo de Extracción 2	Para algunas especies de <i>Arthrospira</i>
Protocolo de Extracción 3	Kit ADN PuriPrep-S. InBio Highway

Fuente: Propia

Además, el ADN extraído por cada protocolo se evaluó cualitativamente por amplificación por PCR. La región espaciadora transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) del ADNr se amplificó mediante una reacción de PCR. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de 20 μ L que incluía 1 x tampón de PCR, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de mezcla de dNTP, 10 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación, 0,5 U de Taq polimerasa (InBio-Argentina) y 5-20 ng del ADN genómico extraído con el protocolo 3, que presentó mejor calidad. Los cebadores utilizados fueron ITS1 F- (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 R- (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para obtener un fragmento de PCR de aproximadamente 650 pb (White *et al.*, 1990) y (Hadi *et al.*, 2016). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación de PCR de 94 °C durante 40 s, 53 °C durante 40 s y 72 °C durante 40 s. Se incluyó un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min (Castrillo *et al.*, 2016). El fragmento amplificado se tiñó y evaluó en electroforesis en gel de agarosa (2% p/v).

Adicionalmente, para la identificación molecular se realizó la amplificación de la región 16S ADNr utilizando el ADN extraído de mejor calidad (protocolo 3) y los cebadores 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA -3') (Griffoni *et al.*, 1995; Scortichini *et al.*, 2002). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de 20 μ L que incluía 1 x tampón de PCR, 3 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de mezcla de dNTP, 10 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación, 0,5 U de Taq polimerasa (InBio-Argentina) y 5-20 ng del ADN genómico extraído. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación de PCR de 94 °C durante 40 s, 53 °C durante 60 s y 72 °C durante 60 s. Se incluyó un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min. El fragmento amplificado se tiñó y evaluó en electroforesis en gel de agarosa (2% p/v), y posteriormente se envió a secuenciar por los servicios de Macrogen Korea.

Luego, las secuencias de ADN enviadas por Macrogen Korea fueron analizadas bioinformáticamente y contrastadas frente a las bases de datos moleculares del Genbank, (NCBI, 2018).

13. Descripción de las propiedades nutricionales de la biomasa, mediante la caracterización bioquímica.

Las determinaciones se llevaron a cabo con el producto seco (polvo) de *Arthrospira platensis* (30 gr.)

13.1. Determinación de proteínas

El contenido proteico fue realizado en el laboratorio BLB Ingeniería Industrial, Posadas-Misiones, la metodología que se utilizó fue Kjeldahl (Pearson, 1981).

13.2. Grasas totales

Se realizó por el método extractor Twisselman con éter de petróleo por 5 h, realizado en el laboratorio BLB Ingeniería Industrial, Posadas-Misiones (Pearson, 1981).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Descripción del área de estudio

Se identificó la ubicación de la fuente natural de *A. platensis* en el Chaco Paraguayo (Proyección UTM-Zona 21 K Sur, Región Occidental del Paraguay), que según la referencia de Dos Santos (2016) se encuentra en la Laguna Capitán de Pozo Colorado (Figura 6). Para ello, se procedió a la toma de muestra y posterior visualización al microscopio, constatándose la ausencia de *A. platensis* en dicha laguna en los puntos muestreados. (Figura 8 y 9)

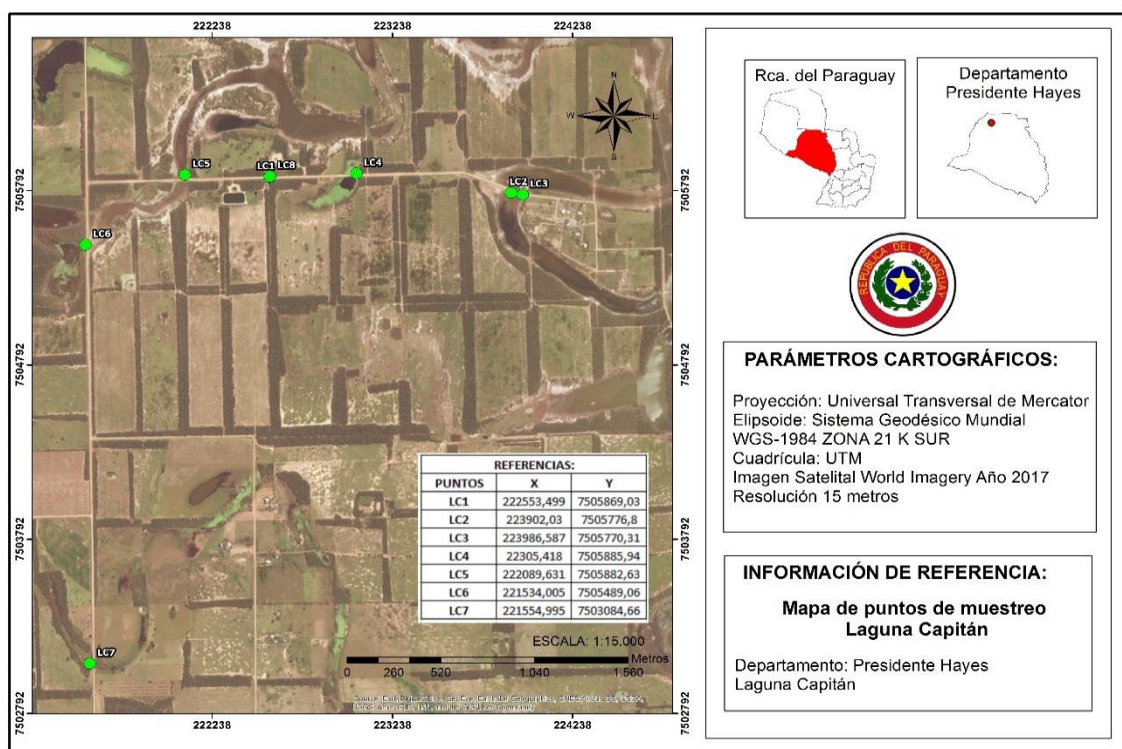


Figura 6. Puntos de muestreo. Laguna Capitán (Primera expedición).

Fuente: Propia

Considerando que en la primera expedición no se encontró la cepa de *A. platensis*, se vio la necesidad de realizar una nueva expedición en lagunas saladas del Chaco, ya que según se detalla en FAO. Fisheries (2008); *A. platensis* crece vigorosamente en condiciones de temperaturas y alcalinidad altas. Fue así que en la Laguna Yaragui de la Colonia Lolita (Figura 7) se llegó a recolectar muestras que posteriormente visualizadas

al microscopio se confirmaron la presencia de *A. platensis* en los puntos muestreados en la segunda expedición, (Figura 8 y 9).

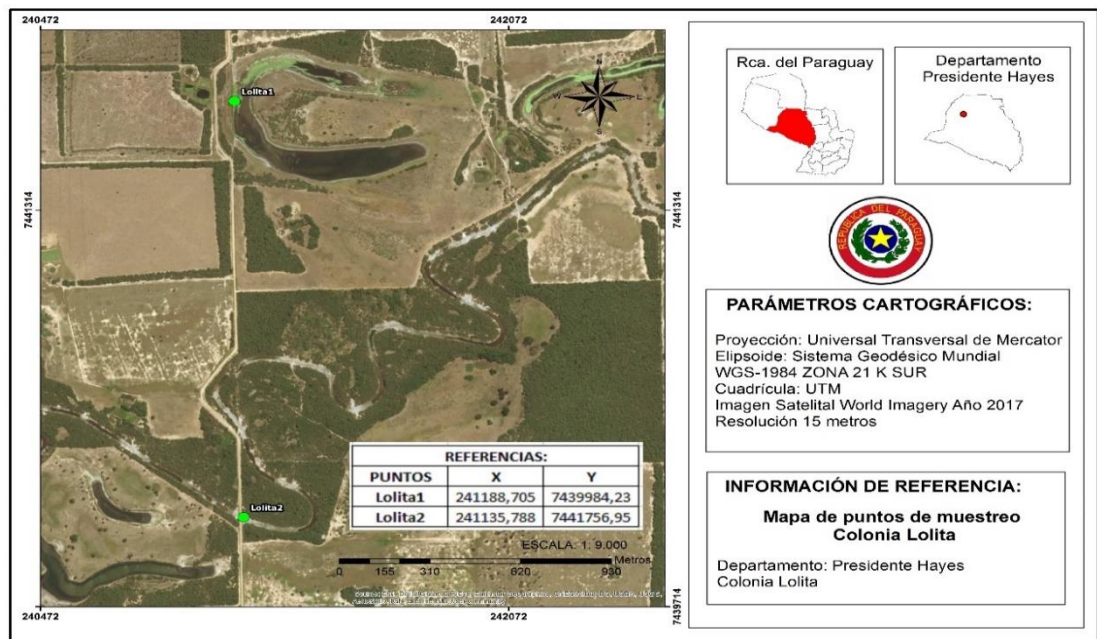


Figura 7. Puntos de muestreo. Laguna Yaragui (Segunda expedición).

Fuente: Propia

La Laguna Yaragui se encuentra ubicada a 4 Km. de la Colonia Lolita y a 59 Km. del desvío de Loma Plata, Ruta Transchaco; a una altitud de 113 m.s.n.m, tiene una extensión aproximada en uno de sus brazos de 17 ha. y una profundidad promedio de 1.30 m.



Figura 8. Toma de muestra Laguna Capitán.
Primera expedición

Fuente: Propia.



Figura 9. Punto de muestreo Laguna
Capitán. Segunda expedición

Fuente: Propia.

2. Colecta de la muestra

La colecta se realizó el 19 marzo del año 2017, se colectaron en dos sitios de muestreo de la Laguna Yaragui, haciendo un arrastre con una red para fitoplancton (malla de 25 μm) y colectados en recipientes estériles (Figura 10 y 11). Los recipientes fueron debidamente rotulados y conservados a 4 °C para su traslado posterior al laboratorio de la Universidad Nacional de Itapúa para su identificación.



Figura 10. Utilización de la red de fitoplancton. Laguna Yaragui. Colonia Lolita

Fuente: Propia.



Figura 11. Colecta de las muestras en recipientes estériles.

Fuente: Propia.

Las variables fisicoquímicas del agua colectada en el área de estudio se presentan en la Tabla 11. Teniendo en cuenta la temperatura del agua y el pH se puede corroborar que los resultados son similares con lo descrito por Rodríguez y Triana, (2006), lo que diferencia el género *A. platensis* del resto de las cianobacterias, es su muy particular nicho ecológico, ya que estos microorganismos proliferan en aguas muy mineralizadas, extremadamente alcalinas y en ocasiones calientes.

Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos de la Laguna Yaragui. Colonia Lolita

Lugar de muestreo	Temperatura del agua (°C)	pH
Lolita 1	21	9,06
Lolita 2	21	9,05

Fuente: Propia.

En la Laguna Yaragui se observó la formación de una nata verde espesa o “*scum*” (Figura 12 y 13), como así también una marcada presencia de sales en el suelo que son depositadas en las orillas de la laguna formándose depósitos de sales.



Figura 12. Toma de muestra de la Laguna Yaragui. Colonia Lolita

Fuente: Propia.



Figura 13. Formación de nata verde.

Fuente: Propia.

3. Identificación morfológica

Se observó en el microscopio para la verificación de las muestras de acuerdo a las características morfológicas descritas por Vonshak (2002) y Dos Santos (2016), los microorganismos del género *A. platensis* deben registrarse como células de color azul verdosas (Figura 16), filamentosas, de preferencia en con forma espiral, tal como lo observado en la Figura 14 y 15.

En la muestra se observó la presencia dominante de *Arthrospira*, seguida por diatomeas de forma dispersa. Esto concuerda con lo expuesto en la investigación de Ñ *et al.* (2010), donde observaron que la concentración de sal en los lagos presenta una variada población microbiana compuesta de clorofíceas, cianobacterias y diatomeas.

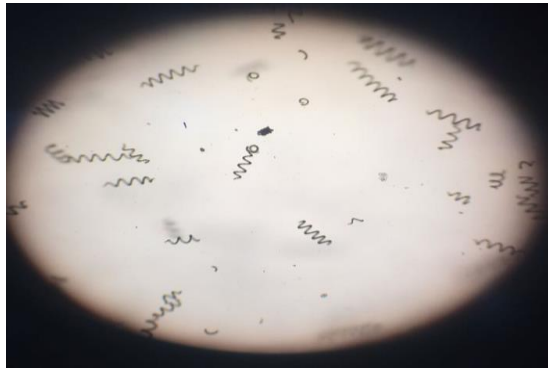


Figura 14. Microfotografía de *Arthrospira platensis*. observada al microscopio óptico.
Aumento 10x

Fuente: Propia.

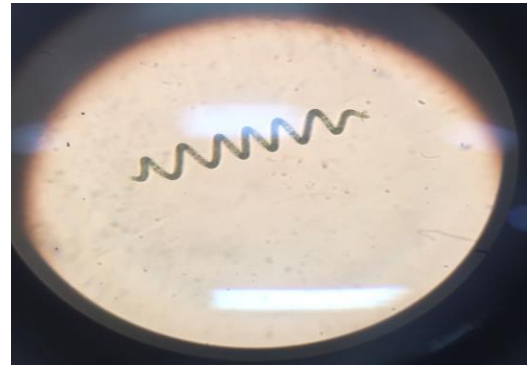


Figura 15. Microfotografía de *Arthrospira platensis*. observada al microscopio óptico.
Aumento 40x

Fuente: Propia.

Una vez establecidos los cultivos se procedió a la medición morfológica de la *Arthrospira*, obteniéndose valores de 5 a 20 μm de largo (Figura 17), cifra variable con el periodo de crecimiento. Similares resultados se obtuvieron según Chen (2011), la hormogonia apareció después de que los medios se desplazaron dentro de los 5 días del cultivo con medidas variables.



Figura 16. Tableta de color de referencia.
Fuente: Propia.

Seguidamente, se realizó la tinción de Gram, en donde se evidenció que la *Arthrospira* corresponde a células Gram negativa, corroborando las afirmaciones de Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez (2006a), donde se menciona a las células de A.

platensis, al igual que las de otras cianobacterias, poseen una membrana plasmática rodeada por una pared celular multiestratificada, Gram negativa. (Figura 18)



Figura 17. Medición de la *Arthrospira*
Aumento 100X

Fuente: Propia.

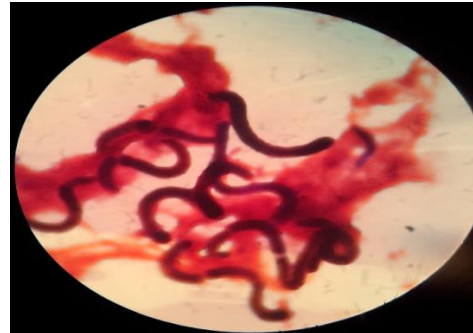


Figura 18. Microfotografía de la Tinción de Gram.
Aumento 100X

Fuente: Propia.

4. Aislamiento e inoculación

Se realizaron las transferencias de las muestras en Erlenmeyer con el medio de cultivo y visualizadas posteriormente al microscopio, (Figura 19). Posteriormente se realizó la inoculación, mediante el sembrado de la *A. platensis* con el medio de cultivo inicial de 100 ml, se distribuyeron en 3 matraces, incorporando agitación y luz artificial. (Figura 20)



Figura 19. Transferencias de las células.
Fuente: Propia.



Figura 20. Iniciación de la inoculación.
Fuente: Propia.

5. Conservación de la cepa

Las cepas fueron conservadas en refrigeración y criopreservación (según metodología descrita en el Capítulo, apartado 5.2) para su posterior utilización (Figura 21). Teniendo en cuenta los delineamientos desarrollados, de igual manera, por Casp Vanaclocha y Abril Requena (2003). Depositadas en la colección de cultivos del Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Reca” (InBioMis), Universidad Nacional de Misiones-Argentina, con número de acceso LBM 213.



Figura 21. Viales con las cepas conservadas.
Fuente: Propia.

6. Cultivo y escalado

Para el cultivo de *A. platensis* a escala laboratorio se utilizaron 6 biorreactores (Figura 22), estos consistían en recipientes de plásticos cada una de las cuales con el inóculo que contenía 1 L de medio de cultivo de Schlösser von Richter (1873) y 100 ml de cepa respetando los requerimientos de aireación y fotoperiodo, por un periodo de dos meses. Cuando aumenta la concentración celular del cultivo, con la aireación se logra una dispersión efectiva de nutrientes, se mejora la disponibilidad de la luz para las células y se aporta CO₂ ayudando a estabilizar el pH. Así mismo se mantuvo en suspensión las microalgas, evitando la formación de estratos térmicos y el cultivo se vuelve más uniforme al momento de la cosecha, (Tello Hidalgo, 2017).

Se evidenció el crecimiento exponencial a los 15 días posteriores a la inoculación, al igual que en los estudios de Chuei (2006) y Camacho (2016). Posteriormente, se procedió al escalado, utilizando para tal fin, acuarios de interior con una capacidad de 50 litros, (Figura 23). Este procedimiento se realizó por un periodo de 3 meses, mediante el aumento progresivo de volumen, (Figura 24).



Figura 22. Biorreactores utilizados para los cultivos bancos
Fuente: Propia.



Figura 23. Instalación del módulo de cultivo.
Fuente: Propia.



Figura 24. Aspecto superficial del biorreactor de 50 litros
Fuente: Propia.

7. Evaluación de parámetros físicoquímicos

La temperatura del cultivo presentó un promedio de 23 °C registrándose temperaturas más bajas en el mes de junio, (Figura 23). Se registró un pH 10, de forma constante. Afirmando lo expuesto por Gaitero (2012), la *A. platensis* crece en condiciones alcalinas con un pH que oscila entre 8.5 y 10.5, y a una temperatura promedio de 23 a 35°C. La adición de CO₂ es propuesta para la regulación del pH, ya que este parámetro aumenta si la fuente de carbono es insuficiente.

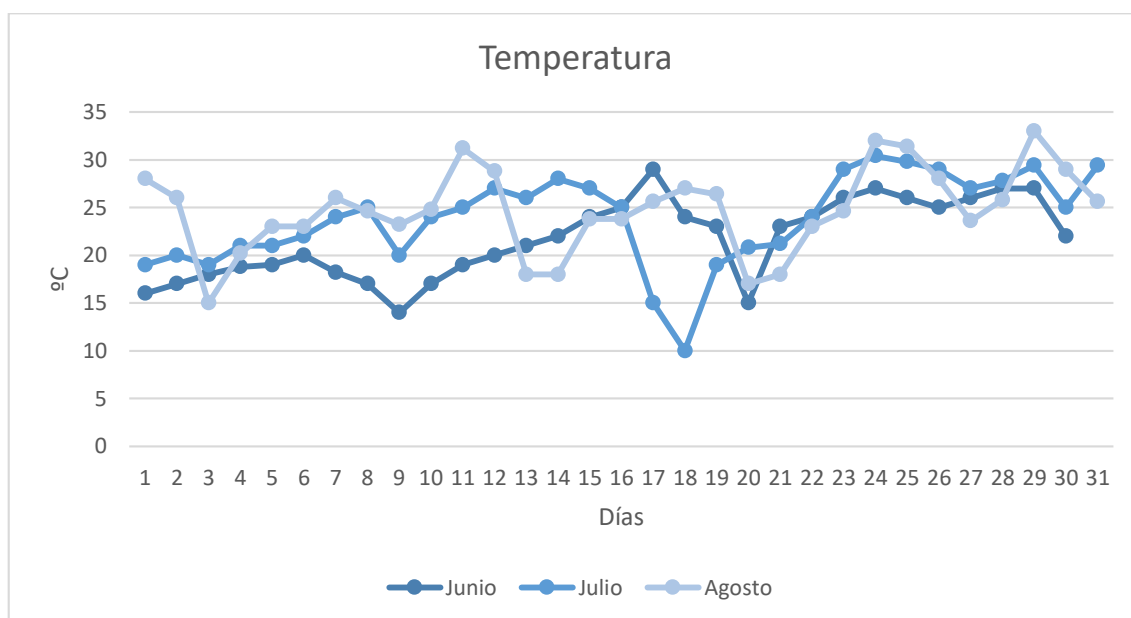


Figura 25. Registro de Temperatura

Fuente: Propia.

8. Determinación de la cinética de crecimiento

Teniendo en cuenta el modelo matemático de Gompertz, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 12), mediante el software STATISTICA 13:

Tabla 12. Cinética de crecimiento.

μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)	G (h)	R ²
0.003351063	186.9358186	206.8439704	0.962369105

Fuente: Propia.

Para un cultivo de un periodo de 3 meses, se obtuvo el mayor valor de biomasa (a) $\log N/N_0$: 1,62 (Figura 24) con un tiempo de generación de 206,84 horas, en un medio de cultivo de pH 10 y a una temperatura de 26 °C, una velocidad específica (μ_{max} (h^{-1})) de 0,0033 h^{-1} y una duración de la fase de latencia de 186,93 h con un R^2 de 0,96. Similares resultados se obtuvieron en la investigación realizada por Vázquez Villalobos, *et al.*, (2014), con valor de biomasa (a) $\log N/N_0$: 0,928 a las 168,8 horas en un medio de cultivo con pH de $8,8 \pm 0,1$; a temperatura de 25°C, con R^2 de 0,99; empleándose el mismo modelo matemático.

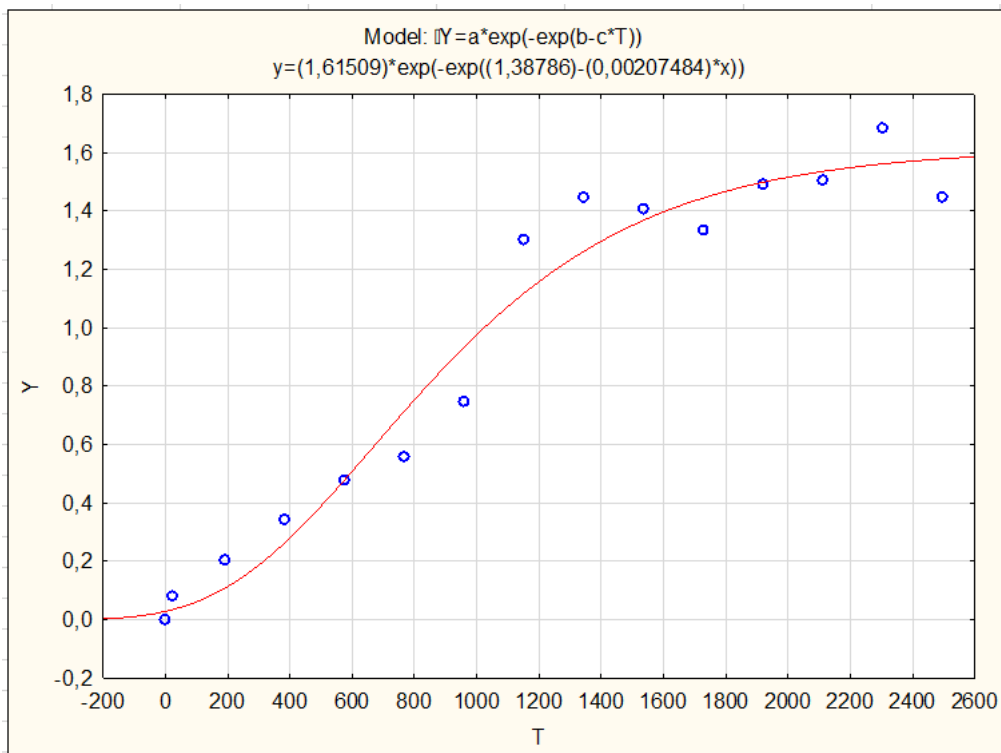


Figura 26. Curva de crecimiento de *Arthrospira platensis* en el sistema de cultivo desarrollado.

Fuente: Propia.

9. Cosecha, filtrado y secado

El cultivo se realizó en el área de cultivo de *A. platensis* en el laboratorio de Alimentos de la Universidad Nacional de Itapúa-Facultad de Ciencias y Tecnología. Para la cosecha se utilizó el cultivo del acuario de interior de capacidad de 50 L, teniendo en cuenta la fase exponencial de crecimiento con el apoyo del espirulímetro, se observó la consistencia del cultivo y se procedió a cosechar 40 L, dejando los 10 L restantes para un nuevo cultivo

y posteriormente realizar una recirculación del medio de cultivo, según muestra en la siguiente figura:

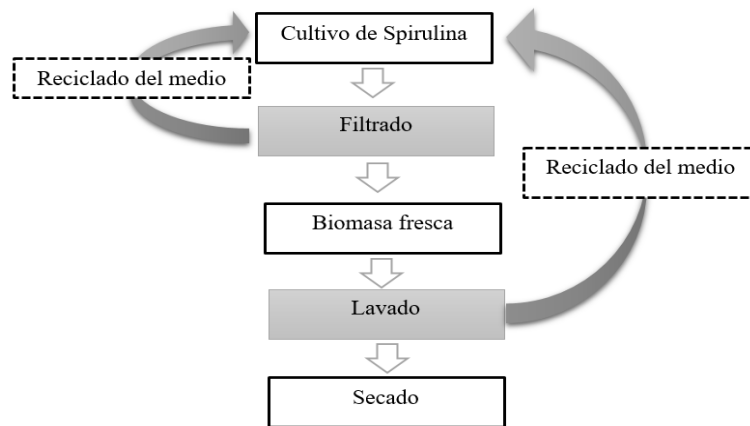


Figura 27. Flujograma del proceso de reciclado de medio de cultivo.

Fuente: Propia.

Finalmente, luego de realizar el lavado y secado (65 °C por 6 horas) se obtuvo como producto final un polvo fino seco de color verde intenso, con olor intenso y sabor característicos (umami). Teniendo en cuenta los estudios realizados por Jourdan, (2013), corrobora estas características.

10. Determinación de coliformes totales

No se registraron la presencia de coliformes totales en las condiciones ensayadas (Figura 28). Contrastando estos datos con los resultados obtenidos por Loreto *et al.* (2007), en el que de 7 muestras estudiadas solo una dio negativo para coliformes totales. Por lo tanto, indica la ausencia de contaminación y de patógenos.

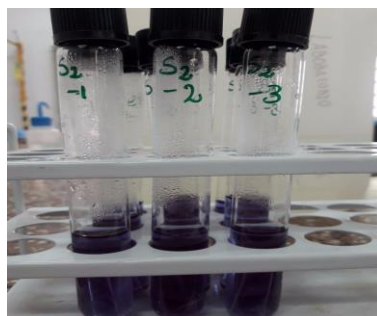


Figura 28. Determinación de Coliformes totales por el método de tubos múltiples

Fuente: Propia.

11. Ensayo de toxicidad de *Arthrospira* con el cladóceros *Daphnia magna*

No se evidenciaron individuos de *Daphnia magna* inmóviles o muertos a las 48 horas de exposición a las soluciones con *Arthrospira* en las condiciones y concentraciones ensayadas (Figuras 29 y 30, Tabla 13). En el control negativo (agua dura reconstituida), tampoco se observaron mortalidad; mientras que se produjo el 100% de mortalidad en el control positivo (50 mg $K_2Cr_2O_7$ /100 ml agua destilada). Teniendo en cuenta los estudios realizados por Romo Pazmiño, (2014), esta cianobacteria no muestra toxicidad en cladóceros, razón por la cual, se utiliza la *Arthrospira* o conjuntamente con otros preparados para la alimentación de *Daphnia*.

Concentración (%)	Respuesta	Total
6,25	0	10
6,25	0	10
6,25	0	10
12,5	0	10
12,5	0	10
12,5	0	10
25	0	10
25	0	10
25	0	10
50	0	10
50	0	10
50	0	10
100	0	10
100	0	10
100	0	10

Tabla 13. Resultados de mortalidad

Fuente: Propia



Figura 29. Preparación de las diluciones para el ensayo con *D. magna*.
Fuente: Propia.



Figura 30. Disposición de *Daphnia magna* en las diferentes diluciones.
Fuente: Propia.



Figura 31. Visualización de *Daphnia*

Fuente: Propia

Según la *Division of Biotechnology and GRAS Notice Review* (2011), para las evaluaciones de seguridad en *A. platensis*. con el propósito de notificación GRAS, se han estudiado efectos agudos, subcrónicos, crónicos, teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y de generación múltiple. No se observaron signos de toxicidad en ninguno de estos estudios.

En otros estudios, se ha reportado que el nivel de efecto no observado (NOEL) supera los 10,000 mg/kg peso corporal/día para *A. platensis*, esto corresponde a un 30% de la dieta basada en *A. platensis* (30,000 mg/kg peso corporal/día), en niveles máximos probados en ratas y ratones (Hutadilok-Towatana *et al.*, 2008; Krishnakumari *et al.*, 1981). En general, la *A. platensis* tiene valores altos de NOEL y desde la década de 1990, los valores LD50 (más de 5.000 mg/kg) se consideran que pertenecen a la categoría "prácticamente no tóxica", según una tabla de clasificación de toxicidad

12. Protocolos de extracción de ADN de *A. platensis*

Se observó que los rendimientos de ADN variaron con el procedimiento de extracción utilizado. En la evaluación cualitativa en gels de agarosa, la cantidad de ADN aislado con los protocolos convencionales utilizados fue menor que con el kit comercial utilizado. Curiosamente, se observó una fuerte banda extraída de ADN solo con el kit comercial evaluado cuando se tiñó con una solución de Gel Red (10.000 x) (Figura 32). Por otro lado, ninguno de los tres protocolos requirió mucho tiempo, lo cual es una característica importante en cualquier protocolo de laboratorio estándar.

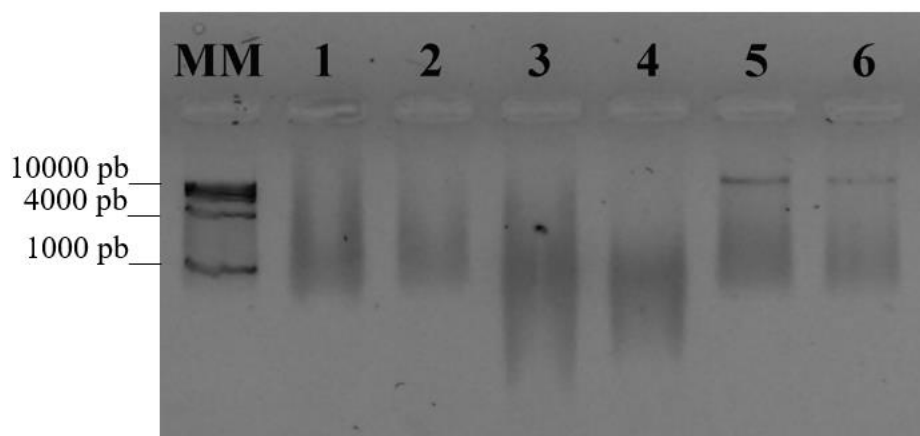


Figura 32. Evaluación cualitativa del protocolo de extracción de ADN de *A. platensis*. Carriles 1 y 2: protocolo 1. Carriles 3 y 4: protocolo 2. Carriles 5 y 6: protocolo 3. MM: marcador molecular Escalera de 1 kb Trans Genbiotech®. 1% (p/v) de gel de agarosa teñido con Gel Red.

Fuente: Propia.

La presencia de contaminación del proceso de extracción se debe a restos de carbohidratos y proteínas, y se estimó midiendo la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de 230 nm y 280 nm, respectivamente. El protocolo 3 fue el que

mostró una concentración más baja de ADN, sin embargo, este protocolo fue el que evidenció también la menor presencia de contaminantes remanentes en las muestras de ADN extraído (menores valores de A230 y A280). Esto es importante porque la presencia de altos niveles de contaminación en el ADN como los carbohidratos parece disminuir la eficiencia de amplificación de la PCR (La Montagne *et al.*, 2002).

Además, la calidad del ADN se estimó midiendo la relación de absorbancia UV 260/280. Los protocolos 1 y 3 dieron ADN con buenos parámetros de pureza, con relaciones A260/A280 de 1.8 y 2.5 respectivamente. El protocolo 2 mostró una baja proporción de A260/A280 a pesar de la alta concentración de ADN extraído, lo que indica la presencia de contaminantes de extracción de ADN. La calidad del ADN extraído también es importante, y el ADN extraído de mala calidad solo puede producir una banda de PCR débil en geles de agarosa (Amita y Vandana, 2002). Se encontró que los protocolos 1 y 3 produjeron una cantidad baja de ADN (en comparación con el protocolo 2), pero de buena calidad (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis cuantitativo del ADN extraído de *Arthrospira platensis*. Valores medios DE±

Protocolo No.	A230	A260	A280	Pureza de ADN A260/A280	Concentración de ADN µg/mL
1	0.285 ± 0.011	0.079 ± 0.033	0.045±0.02	1.85 ± 0.31	294.48 ± 123.03
2	0.281 ± 0.059	0.110 ± 0.001	0.078±0,005	1.42 ± 0.11	409.25 ± 2.62
3	0.008 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.0065±0.0007	2.57 ± 0.61	61.11 ± 7.86

A230=Absorbancia a 230 nm. A260=Absorbancia a 260 nm.

Fuente: Propia.

Para los análisis moleculares, uno de los atributos más importantes del ADN extraído es su pureza (Miller *et al.*, 1999). El ADN extraído por el protocolo 3 se sometió a amplificación por PCR del gen 16S en condiciones estándar para evaluar su calidad. Se observó que el ADN del protocolo 3 producía una banda de aproximadamente 900 pb con los cebadores 27f y 1495r.

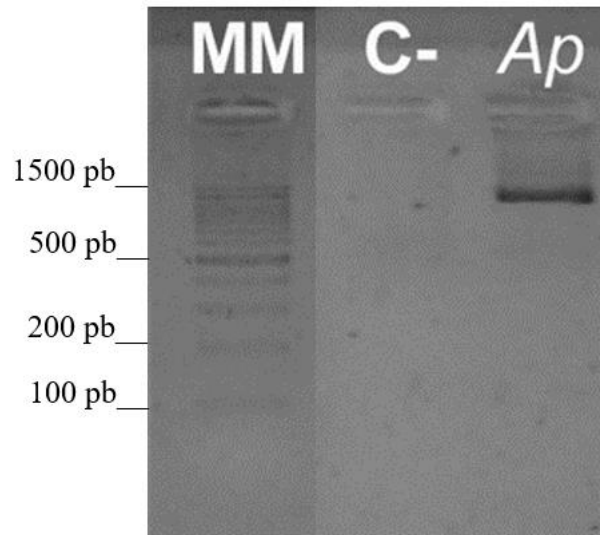


Figura 33. Evaluación cualitativa de la amplificación del gen 16S extraído. *Ap*: ADN extraído de *A. platensis* por el protocolo 3. *MM*: marcador molecular 100 pb PLUS Trans Genbiotech®. *C-*: mezcla maestra de PCR sin ADN. Gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con Gel Red.

Fuente: Propia

Berthold *et al.* (1993) propusieron un protocolo rápido para extraer ADN para PCR de algas y plantas, pero no usaron pasos adicionales de purificación, y como consecuencia plantearon almacenar el ADN extraído a -20 ° C solo por unos pocos meses.

Wu *et al.* (2000) propusieron un protocolo para la extracción de ADN para PCR a partir de cianobacterias filamentosas y plantas, pero requirió mucho tiempo debido a las sucesivas etapas de rotura, incubación y purificación de las células.

Además, Morin *et al.* (2010) encontraron que un protocolo de extracción de ADN con ciclos de congelación-descongelación, tratamientos enzimáticos de lisozima y proteinasa K, 2% de SDS e incubación de solución CTAB, cloroformo: extracción de alcohol isoamílico y precipitación de ADN en isopropanol produjeron un ADN con degradación reducida y excelente calidad general para el análisis de biología molecular. Sin embargo, el protocolo posterior implica diferentes pasos adicionales y consume más tiempo que los protocolos evaluados en este trabajo. Este resultado respalda la sugerencia de selección del protocolo de ADN de acuerdo con el uso adicional del ADN extraído.

Al seleccionar un método de aislamiento de ADN, la calidad del ADN y la reducción de los inhibidores de la PCR en la solución final deben considerarse y optimizarse. (Gaget *et al.*, 2016; Scheldeman *et al.*, 1999) seleccionaron un protocolo de

extracción de ADN sin una etapa de purificación del ADN antes de la PCR. Como resultado, estos autores encontraron obligatoria la adición de BSA a la mezcla de PCR para el éxito de la amplificación de los genes de rRNA en su estudio.

La purificación y precipitación del ADN se encuentran entre los pasos más importantes en cualquier protocolo de extracción de ADN (Miller *et al.*, 1999; Tan y Yiap, 2009). Solo el protocolo 3 (kit de extracción de ADN) realizó una etapa de purificación. La eliminación de los restos celulares y los posibles inhibidores de la PCR pueden mejorar el almacenamiento de ADN a tiempo. Esto está de acuerdo con trabajos previos donde se ha demostrado que algunos kits de aislamiento de ácidos nucleicos produjeron ADN puro y adecuado de diferentes cepas de cianobacterias (Gaget *et al.*, 2016).

Las cianobacterias pueden producir vainas protectoras o mucílago. Esto hace que la extracción de ADN de las cianobacterias sea particularmente difícil; también se encontraron diferentes rendimientos de ADN de una cepa a otra (Morin *et al.*, 2010); en consecuencia, es muy importante evaluar diferentes protocolos de extracción de ADN (Gaget *et al.*, 2016).

12.1. Identificación molecular y análisis bioinformático

Utilizando el protocolo de amplificación (por PCR) especificado en el capítulo anterior se logró amplificar un fragmento del gen 16S ADNr de aproximadamente 1000 pb que fue enviado a secuenciar.

Desde los servicios de secuenciación de Macrogen Korea enviaron secuencias nucleotídicas sentido y antisentido que se analizaron bioinformáticamente (Geneious 8) y se generó una secuencia consenso de buena calidad de aproximadamente 300 pb (Tabla 15), las cuales se alinearon y compararon con las depositadas en el banco de genes de Genbank utilizando el programa *on line* BLASTn (BLASTn, 2017).

Tabla 15. Secuencia nucleotídica consenso de *A. platensis* aislada de Paraguay.

>Arthrospira

CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCAGCGGCTCCCAAAA
 GAAGGCACATTTCTGTGCCGGTCCCCTGCATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCC
 CGTTGCATCCAATTTAGCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGGACCCCTCAATTC
 CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCTCAGGGGGGGTACTTAACGCGTTAG
 CTTGGCCACTGACGCGGTAAACCGCCCATAGCTAGTACAGAACGCTTTACAGTGT
 GGACTACAGGGGGTATATAATCACCTT

Fuente: Propia.

Corroborándose por métodos moleculares la identificación previa realizada en base a sus características morfológicas, se obtuvo como resultado que la secuencia de 16S ADNr de la muestra *Arthrospira platensis* aislada del Chaco paraguayo con un código de acceso Genbank (MH828254), presentó una similitud del 82% con secuencias de ADN depositadas de *Arthrospira platensis*, (Anexo 18). Según el código de acceso de Genbank (KJ562186.1), esta cepa corresponde a la India, registrada bajo el título de “Cianobacterias en campos de arroz de Manipur”. Cabe resaltar que, al analizar la secuencia obtenida, en la base de datos del Genbank, se tuvo en cuenta las opciones de búsqueda por filtro, indicando el organismo como “*Arthrospira*” en “secuencias de muestras no cultivadas/ambientales”.

En los estudios realizados por Pineda-Mendoza *et al.* (2011), se obtuvo un porcentaje de similitud con *Arthrospira* por debajo de 97% en la identificación de cepas aisladas de tres lagos de México, aportando además que los estudios basados en la secuencia de 16S ADNr, son importantes para la identificación taxonómica adecuada, corroborándose también con caracteres morfológicos y ecológicos.

La identificación en particular de los microorganismos que pertenecen a cianobacterias como el género *Arthrospira*, sigue siendo compleja. Los métodos moleculares representan una estrategia sensible y rápida para identificar especies, también las estrategias de identificación molecular eliminan diversas limitaciones técnicas Chakraborty *et al.* (2011). Los métodos moleculares no reemplazan la

caracterización morfológica; por el contrario, complementan los métodos morfológicos (Bich *et al.*, 2016).

13. Descripción de las propiedades nutricionales de la biomasa, mediante la caracterización bioquímica analizada.

Los resultados obtenidos para la descripción de las propiedades nutricionales se observan en la siguiente tabla:

Tabla 16. Determinaciones fisicoquímicas de la muestra de *Arthrospira*

Determinaciones Fisicoquímicas	Métodos	Resultados	Unidades
Humedad	Secado en estufa a (103±2) °C, hasta peso constante	7,6	% bh
Proteínas (N x 5,75)	Método de Kjeldhal	58,6	g/100 g bs
Grasas totales	Extractor Twisselman con éter de petróleo por 5 h	0,4	g/100 g bs

Bh: base húmeda Bs: base seca

Fuente: Laboratorio de Análisis de agua y alimentos. Informe de resultados N° 005-18. (BLB, 2018).

Según el análisis realizado a la muestra, se obtuvo un 58,6 g/100 g de biomasa seca, de acuerdo con Khan *et al.* (2005) reportaron que el contenido de proteína de la *A. platensis* oscila entre el 60 y el 70% de su peso seco, coincidiendo también con los resultados obtenidos por Ali y Saleh, (2012). Esta es una proporción excepcional ya que la gran mayoría de los alimentos de origen vegetal contienen solo alrededor del 35%, (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015).

Los valores presentados en este estudio son similares a los obtenidos por Vázquez Pérez *et al.* (2016). Estos investigadores reportaron que el contenido de proteína total de *A. platensis* osciló de 70 a 40%. Igualmente Dillon *et al.* (1995), en ciertas muestras de *A. platensis* se registra hasta 70% de proteína en peso seco, además de representar una de las fuentes de proteínas más ricas en origen vegetal, mucho más que la carne y el pescado (15-25%) o la harina de soja (35%).

Ofrece proteínas más digeribles que las de la carne de vacuno, en estado seco contiene entre el 55-70% de proteínas. Esta alga microscópica constituye un alimento digestibilidad muy alta alcanzado registros entre el 88 y 92%, por tanto tiene una

biodisponibilidad inmediata de sus componentes básicos como vitaminas, minerales y proteínas (Neftalí Asero, 2014).

Con respecto al consumo de agua en litros por kilogramo producido y al porcentaje de proteína aportada, la *A. platensis* tiene un 65% de proteínas y consume 2.499 litros; la soja tiene 34% de proteínas consumiendo 8.860 litros; el maíz tiene 9% de proteínas y consume 12.416 litros; una res en establo alimentada con grano tiene 20% de proteínas y consume 104.000 litros, (Ponce López, 2013).

Por otra parte, en el análisis realizado a la muestra para la determinación de grasas totales, se obtuvo 0,4 g/100 g bs. De acuerdo a Gutiérrez-Salmeán *et al.* (2015) según el perfil nutricional del polvo de *A. platensis* en una composición de 100 g se estima en 4,3 g, de los cuales 1,95 g son grasas saturadas; 1,93 g grasas polinsaturadas; 0,26 grasas monoinsaturadas y colesterol <0,1g . Así, Henrikson (2013), describe que sólo contiene entre 4-7% mayoritariamente son ácidos grasos esenciales que forman parte de la membrana celular de todas y cada una de las células del organismo, favorecen la normalización del colesterol y son precursores de los compuestos llamados prostaglandinas, gammalinolénicos, glucolípidos y sulfolípidos. Por otra parte, Gutiérrez-Salmeán *et al.* (2015) reportaron 4,3 g/100 bs de grasas totales.

De esta forma, teniendo en cuenta las características bioquímicas analizadas, su alto contenido de proteínas y bajo en grasas totales la *A. platensis* podría también ser utilizada a nivel nacional como suplemento dietario en humanos y animales, partiendo desde las necesidades propias de la región y la experiencia de otros países. Así, se han desarrollado programas de producción y distribución de *A. platensis* para fines nutricionales en diferentes países del mundo, como lo ha reportado (Antenna Foundation, 2018) y ratificada mundialmente por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para un mundo mejor y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como el mejor alimento del futuro (IIMSAM, ONU, 2017)

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

En la investigación se logró determinar los procedimientos de bioprospección, clave para el reconocimiento de las características naturales de *Arthrospira platensis* y su posterior identificación de una fuente natural, convirtiéndose, así como el primer reporte de cepa nativa del Paraguay en la Laguna Yaragui, Colonia Lolita-Chaco paraguayo.

Seguidamente a la identificación de la fuente natural y posterior colecta de la muestra se establece las condiciones de aislamiento y cultivo que resultaron adecuadas, ya que se pudo replicar los procedimientos satisfactoriamente ajustándose a los recursos y materiales disponibles, rigiéndose en la evolución de los parámetros fisicoquímicos y de acondicionamiento (no se presentó problemas adaptativos) del cultivo al diseño a escala de laboratorio.

Si bien, actualmente, es escaso el conocimiento acerca de la *Arthrospira platensis* a nivel nacional en la República del Paraguay, es factible la implementación de un sistema de cultivo a escala laboratorio con una cepa nativa para el desarrollo potencial de la *A. platensis* en diferentes áreas.

Esta investigación permitió el establecimiento de las condiciones necesarias básicas para el aislamiento y cultivo, desde los materiales utilizados y los parámetros monitoreados, evidenciándose en esta última, características particulares de la *Arthrospira*, como ser: la ausencia de contaminación fecal, de agentes patógenos y de toxicidad.

Por otra parte, la identificación morfológica y molecular en las condiciones desarrolladas permitió el reconocimiento de la especie. Cabe resaltar la importancia del establecimiento de protocolos adecuados para la extracción de ADN del género *Arthrospira*, reconociendo la complejidad en la determinación correcta de la metodología, debido a las características propias de este género.

Asimismo, las características bioquímicas, tanto de proteínas y grasas totales han demostrado la nobleza de sus propiedades para fines alimentarios, reconociendo el alto porcentaje de proteínas presentes y bajo en grasas totales en la *Arthrospira platensis*. Esto que posibilita la proyección de nuevos horizontes a nivel local de suplementación

alimentaria, como alternativa tanto para humanos como para animales de importancia económica.

De esta forma, reconociendo las características que ofrece la *Arthrospira platensis* se evidencia la posibilidad de proyección biotecnológica, partiendo de la herramienta de bioprospección, la *Arthrospira platensis* puede desarrollarse en las áreas como; alimentos funcionales, nutracéuticos, productos farmacéuticos, bioenergía y la exploración en el campo de la manipulación genética.

Finalmente, se propone dar seguimiento a la presente investigación, ampliando aspectos como, el estudio del cultivo a una escala mayor y en diferentes condiciones, la evaluación de la calidad de la proteína presente en la *Arthrospira platensis*, determinación de más propiedades bioquímicas y la profundización del estudio molecular. Así también, ampliar estudios vinculados con la toxicidad aguda y crónica en otros organismos modelos.

RECOMENDACIONES

Para un mejor monitoreo de las condiciones fisicoquímicas del cultivo de *Arthrospira platensis* y el aseguramiento de la calidad de la producción se recomienda la automatización del mismo.

Por ello, cabe destacar que junto con la instalación del módulo de cultivo se ha desarrollado un prototipo, que actualmente se encuentra en su etapa final de diseño de interfaz del usuario (entrada y salida de datos), para el control de los parámetros básicos de medición: pH, temperatura y horas de luz, mediante un sistema informático que conectados a sensores podrán enviar en tiempo real las informaciones citadas anteriormente. El fundamento del sistema se basa en un diseño web responsivo, es decir, con una flexibilidad en visualización en computadoras como en dispositivos móviles (ver Anexo 19 y 20). Este prototipo servirá de monitoreo tanto para cultivos a pequeña escala como para gran escala que permitirá un mejor rendimiento y calidad del producto. Para la visualización en su dispositivo móvil u ordenador se dispone del código QR, para su escaneo, (Anexo 21).

La siguiente propuesta se formula, partiendo de la base de que la *Arthrospira platensis* posee un alto valor en proteínas que puede desarrollarse como un suplemento dietario y teniendo en cuenta los datos actuales reportados en Paraguay (FAO, 2015) y (Ellver, 2018) en donde se cita al Paraguay como uno de los países con mayores índices de desnutrición en el mundo, afectando a un 10% de la población (700.000 personas aproximadamente). De estas, el 10% corresponde a niños de hasta 5 años de edad, quienes a consecuencia de ello están expuesto a sufrir retraso como consecuencia de una alimentación deficiente. Esta cifra se multiplica en las poblaciones indígenas, donde el 41% de los niños de estas edades padece desnutrición crónica, cuyos efectos pueden ser irreversibles.

Por lo tanto, se propone armonizar las posibilidades de incorporación de la *Arthrospira platensis* como suplementación dietaria en las poblaciones vulnerables mencionadas, en programas de erradicación de la desnutrición en Paraguay.

BIBLIOGRAFÍA

- Ã, R.V. *et al.*, 2010. Spirulina, the Edible Microorganism. *Bioresource Technology*, 1(1), pp.1-11. Available at: [file:///Users/Sina/Documents/PhD Thesis FMP/Papers/2006/Unknown/2006-1.pdf](file:///Users/Sina/Documents/PhD%20Thesis/FMP/Papers/2006/Unknown/2006-1.pdf) <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Physiologische+und+biochemische+Charakterisierung+von+S.>
- AEH, 2017. *El alimento más antiguo del futuro*. [En línea] Available at: <http://spiralspring.com/> [Último acceso: 26 Julio 2017].
- Ali, S.K. y Saleh, A.M., 2012. Spirulina - An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Antenna Foundation, 2018. *Antenna*. [En línea] Available at: <https://www.antenna.ch/en/activities/nutrition/> [Último acceso: julio 2018].
- Amita, J. y Vandana, T., 2002. Qualitative evaluation of mycobacterial DNA extraction protocols for polymerase chain reaction. *Molecular Biology ...*
- Arias, D., 2010. *PROYECTO DE FACTIBILIDAD DE PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN DE ALGA SPIRULINA EN CÁPSULAS DE 400mg Y EN POLVO DE 100g AL MERCADO DE BRASIL*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana de Quito.
- AST ingeniería S. L., 2013. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. *Journal of Chemical Information and Modeling*, p.69. Available at: www.ast-ingenieria.com
- B. Belal, E., 2012. Use of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile Tilapia fingerlings. *African Journal of Microbiology Research*.
- Baggini, S., 2014. *Seguridad alimentaria, bromatología y microbiología de los alimentos*. [En línea] Available at: <https://bagginis.blogspot.com/2014/07/guia-practica-del-laboratorio.html> [Último acceso: Diciembre 2017].
- Barra Galárraga , R. F., 2010. *DISEÑO DE UN FOTOBIOREACTOR INDUSTRIAL*

PARA CULTIVO DE SPIRULINA (Arthrospira platensis). Guayaquil: Escuela Superior Politécnica Litoral-Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

Belay, A., Kato, T. y Ota, Y., 1996. Spirulina (Arthrospira): potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8, pp.303-311.

Berry, S. *et al.*, 2003. Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium Arthrospira (Spirulina) platensis. *Photosynthesis Research*.

Berthold, D.A., Best, B.A. y Malkin, R., 1993. A rapid DNA preparation for PCR from Chlamydomonas reinhardtii and Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(4), pp.338-344.

Bezares, A., Arteaga, C. y Avila, E., 1965. Valor pigmentante y nutritivo del alga espirulina en dietas para gallinas en postura. *TÉCNICA PECUARIA*.

Bezerra, R.P. *et al.*, 2012. Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis. Bioenergetic aspects. *Biomass and Bioenergy*, 37, pp.309-317.

Bich GA; Castrillo ML; Villalba LL; Zapata PD (2016) Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. *Saudi Journal of Biological Sciences* (in press).

BLASTn, 2017. *National Center for Biotechnology Information*,. [En línea] Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [Último acceso: 2017].

Calderón, F., Merino, H. y Barragán, D., 1976. Valor alimenticio del alga espirulina (spirulina geitleri) para rumiantes. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, p. 1.

Camacho, S., 2016. *Producción de spirulina: aislamiento, optimización de cultivo y secado. Fase: aislamiento y preservación (Arthrospira spirulina) nativa de Jalisco*. Jalisco: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente.

Camacho, T., 2017. Obtención de un hidrolizado de Spirulina (Arthrospira platensis) en polvo, mediante secado por aspersion, como ingrediente funcional.. *Universidad*

Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.

Cañizares, R.O. *et al.*, 1994. Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology*, 47(1), pp.89-91.

Cárdenas Nieto, J. D., Díaz Bacca, M. F. y Vizcaíno Wagner, M., 2010. *Industrialización del alga Spirulina*. ReCiTeIA ed. Cali: Universidad del Valle.

Carmona, R. y Coffeen, U., 2013. *Cultivo de Spirulina maxima para el tratamiento de agua residual*. 13 ed. España: Académica Española.

Carvalho, L.F. *et al.*, 2017. Novel food supplements formulated with *Spirulina* to meet athletes' needs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

Casp Vanaclocha, A. y Abril Requena, J., 2003. *Procesos de conservación de alimentos*. Madrid: Mundi Prensa. Segunda Edición.

Castrillo ML; Bich GA; Zapata PD; Villalba LL (2016) Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. *Mycosphere* 7: 810–819.

Cerón Hernández, V.A., Madera Parra, C.A. y Peña Varón, M., 2015. Uso de lagunas algales de alta tasa para tratamiento de aguas residuales. (Spanish). *Using high rate algal ponds for wastewater treatment. (English)*, 33(1), pp.98-125. Available at: 10.14482/inde.33.1.5318%5Cn<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=102596287&lang=es&site=ehost-live>.

Chamorro, G. *et al.*, 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 52(3), pp.232-240.

Chamorro, G. *et al.*, 1996. Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. *Revista de Investigacion Clinica*.

- Chen, Y.C., 2011. The effect of shifts in medium types on the growth and morphology of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Marine Science and Technology*, 19(5), pp.565-570.
- Chuei, M., 2006. *Cultivo de Spirulina platensis por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio*. São Paulo: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.
- Coll, F. *et al.*, 2001. El modelo matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias*, pp.22-28.
- Colorado, M., Moreno, D. y Pérez, J., 2013. Desarrollo , producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. *Ambiente y Desarrollo*, 17(32), pp.113-126.
- Desmorieux, H. y Decaen, N., 2005. Convective drying of spirulina in thin layer. *Journal of Food Engineering*, 66(4), pp.497-503.
- Dillon, J.C., Phuc, A.P. y Dubacq, J.P., 1995. Nutritional value of the alga *Spirulina*. *World Review of Nutrition and Dietetics*.
- Division of Biotechnology and GRAS Notice Review, 2011. GRAS exemption claim for *Spirulina platensis* as an ingredient in foods, s.l.: U.S. Food and Drug Administration.
- Dos Santos, M., 2016. Atlas de algas del Paraguay. Asunción: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Duarte Torres, O., 2009. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Scielo*, 38, p.15. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/ci/v38n3/v38n3a07.pdf>.
- Durand-Chastel, H., 1980. Production and use of *Spirulina* in Mexico. En *Shelef, G. and Soeder, C.J.*

- Espinoza, F., 2017. Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados?. Ciencia, p. 1.
- Ellver, H., 2018. *Paraguay.com*. [En línea] Available at: <http://www.paraguay.com/nacionales/alertan-sobre-desnutricion-y-obesidad-dos-caras-de-una-moneda-154032>
- FACEN, 2011. *Revista FACEN*. [En línea] Available at: https://issuu.com/facen/docs/revista_facen2011 [Último acceso: Mayo 2017].
- Falquet, J. F., 2017. *The Nutritional aspects of Spirulina*, s.l.: Antenna Technologies.
- FAO. Fisheries, A.C., 2008. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No . 1034 A REVIEW ON CULTURE , PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR*, Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2010/XF/XF0906.xml;XF2009437877>.
- FAO, 2015. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura..* [En línea] Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4674s.pdf> [Último acceso: agosto 2018].
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. *Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma., p.224. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>.
- Food and Drug Administration (FDA), 2011. *Division of Biotechnology and GRAS Notice Review*, College Park, MD 20740-3835: Office of Food Additive Safety-CFSAN.
- Fox, R., 1999. *Spiruline, Technique pratique et promesse..* France: Edisud, Aix-en-Provence.
- Gaget V; Keulen A; Lau M; Monis; Brookes JD (2016) DNA extraction from benthic Cyanobacteria: comparative assessment and optimization. *Journal of Applied Microbiology* 122: 294-304.

- Gaitero, A., 2012. Diseño de un Prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de "Spirulina Platensis ". *Conama*, p.25.
- Gallardo-Rodríguez, J. *et al.*, 2012. Bioactives from microalgal dinoflagellates. *Biotechnology Advances*.
- García, C., 2013. Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, pp.83-101.
- Gershwin, M. & Belay, A., 2008. *Spirulina in human nutrition and health*. Londres: CRC Press.
- Gómez, F., 2015. *Introducción a la espirulina: Historia, aplicaciones y sistemas de cultivo*. [En línea] Available at: <http://www.madrimasd.org/blogs/espirulina/2015/11/17/40/> [Último acceso: 26 Julio 2017].
- Gómez, F. y García, J., 2013. *Mercado Español de Spirulina*, Madrid: Comunidad de Madrid; Unión Europea; INSPIRA.
- Gómez, J. y otros, 2010. *Las microalgas, nuevos caminos hacia alimentos funcionales*. Huelva: University of Huelva.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L. y Chamorro-Cevallos, G., 2015. Nutritional and Toxicological Aspects of Spirulina (Arthrospira). *Nutricion hospitalaria*, 32(n01), pp.34-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26262693>.
- Hadi, S.I.I.A. *et al.*, 2016. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2).
- Hayes Paul K., El Semaary Nermin Adel and Sánchez-Baracaldo Patricia. The taxonomy of cyanobacteria: molecular insights into a difficult problema. In: Brodie J. and Lewis J. Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. p 93-101.
- Henrikson, R., 1997. *Earth food spirulina*, Available at: <http://www.smartmicrofarms.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>.

- Henrikson, R., 1997. *Earth food spirulina*, Available at: <http://www.smartmicrofarms.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>.
- Henrikson, R., 2010. *Spirulina world food*. Seventh Printing, Updated and Revised, September 2010. ed. Hawaii: Ronore Enterprises, Inc..
- Henrikson, R., 2013. *Algae Microfarms, for home, school, community and urban gardens, rooftop, mobile, and vertical farms and living buildings*. California: Ronore Enterprises, Inc. PO Box 71024, Richmond, CA 94807 USA.
- Hutadilok-Towatana, N. *et al.*, 2008. A subchronic toxicity study of *Spirulina platensis*. *Food Science and Technology Research*.
- IIMSAM, ONU, 2017. *Iniciativas de IIMSAM*. [En línea] Available at: <http://iimsam.org/en/> [Último acceso: 26 Julio 2017].
- J., S. *et al.*, 2006. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutrition Journal*.
- Jaime-Ceballos, B. *et al.*, 2007. Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiologica*, 17(2), pp.113-117.
- Jasso, A.M., Valdez, P.P. y Soto, M.N., 2012. La importancia de las Microalgas. *Biodiversitas*, pp.1-5.
- Jourdan, J., 2005. *GROW YOUR OWN SPIRULINA*. s.l.:s.n.
- Jourdan, J. P., 2013. *Manual de cultivo artesanal de Spirulina. Resumen de la versión Francesa*. Francia: Antenna.
- Khan, Z., Bhadouria, P. y Bisen, P., 2005. Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(5), pp.373-379. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=6&issue=5&spage=373>.
- Krishnakumari, M.K., Ramesh, H.P. y Venkataraman, L. V, 1981. Food Safety

- Evaluation: Acute Oral and Dermal Effects of the Algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on Albino Rats. *Journal of Food Protection*.
- Kulpys, J. *et al.*, 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* biomass additives towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research*.
- Kulshreshtha, A. *et al.*, 2008. *Spirulina* in health care management. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9(5), pp.400-405.
- L. Ramírez, R.O., 2006. Conocimientos Acerca Del Alga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Interciencia*, 31(nº 009).
- La Nación, 2015. *La Nación*. [En línea] Available at: <http://www.lanacion.com.py/2015/07/11/innovan-con-un-laboratorio-en-el-centro-de-alevinajes/> [Último acceso: 26 Julio 2017].
- Loreto, C. *et al.*, 2007. Calidad microbiológica y bioquímica de derivados comerciales de la cianobacteria *Spirulina*. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*.
- Matondo, F.K. *et al.*, 2016. *Spirulina* Supplements Improved the Nutritional Status of Undernourished Children Quickly and Significantly: Experience from Kisantu, the Democratic Republic of the Congo. *International Journal of Pediatrics*.
- Martín, F., Almazán, J. y Palomino, C., 2008. *Biodisel de algas*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- Mendoza, C., Espinal, G. y Scott, J., 2008. Potencial De Algas Verdes Para La Producción Fotobiológica De Hidrógeno. *Ciencia y*, XXXIII, pp.1-21. Available at: <http://en.scientificcommons.org/54096250>.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., & Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 4715-4724.
- Moran, K., King, S.R. y Carlson, T.J., 2001. Biodiversity Prospecting: Lessons and Prospects. *Annual Review of Anthropology*, 30(1), pp.505-526. Available at:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.anthro.30.1.505>.

Naranjo, J., 2013. *Estudio nutricional de la Spirulina y su aplicación en la gastronomía en la ciudad de Quito*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial de Ecuador.

NCBI, 2018. *NCBI-GENBANK*. [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Último acceso: 2018].

Neftalí Asero, F., 2014. *Obtención de la espirulina en polvo por secado al vacío para el enriquecimiento nutricional de los productos alimenticios*. Quito: Universidad Central del Ecuador.

Nie, Z.Y., Xia, J.L. y Levert, J.M., 2002. Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) maxima* in nitrogen-limited batch culture. *Journal of Central South University of Technology (English Edition)*, 9(2), pp.81-86.

Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. En *Biomolecular Engineering*. pp. 459-466.

Organización de las Naciones Unidas (ONU), 2008. *Resoluciones de las Naciones Unidas*. s.l.:s.n.

Pastor, S. y Sigüeñas, M., 2008. *Bioprospección en el Perú*. Isabel Lapeña – Sociedad Peruana de Derecho Ambiental ed. Barcelona: Bioversity Internacional.

Pearson, D., 1981. *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Acribia S.A. ed. Londres: Butterworth an Co. (Publishers) Ltd..

De Philippis, R. y Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3), pp.151-175.

Pica Granados, Y., 2004. *Ensayos Toxicológicos Y Métodos De Evaluación De Calidad De Aguas Estandarización, Intercalibración, Resultados Y Aplicaciones*, Available at: <http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/handle/123456789/731>.

Piccolo, A., 2016. *Spirulina A Livelihood And A Business Venture SF/2011/16*, s.l.:

Agrotec.

Pineda-Mendoza, R. *et al.*, 2011. Morfológica Y Molecular De Cianobacterias Filamentosas Aisladas De Florecimientos De Tres Lagos Urbanos Eutróficos De. ..., pp.31-50. Available at: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ForazarDescargaArchivo.jsp?cvRev=621&cvArt=62117054003&nombre=CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS AISLADAS DE FLORECIMIENTOS DE TRES LAGOS URBANOS EUTRÓFICOS DE LA CIUDAD DE MX.>

Ponce López, E., 2013. Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. *Idesia*, 31(1), pp.135-139. Available at: [http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2056/servlet/articulo?codigo=4517222&info=resumen&idioma=ENG.](http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2056/servlet/articulo?codigo=4517222&info=resumen&idioma=ENG)

Ramírez-Moreno, L. y Olvera-Ramírez, R., 2006a. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9), pp.657-663. Available at: [http://www.redalyc.org/pdf/339/33912009.pdf.](http://www.redalyc.org/pdf/339/33912009.pdf)

Ramírez-Moreno, L. y Olvera-Ramírez, R., 2006b. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9), pp.657-663.

Ramírez Romero, P. y Mendoza Cantú, A., 2008. *Ensayos toxicologicos para la evaluacion de sustancias en aguas y suelos. La experiencia en México..* Coyoacán: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.

Ramirez Romero, P. y Mendoza Cantú, A., 2013. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México,*

Raooof, B., Kaushik, B.D. y Prasanna, R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*, 30(6), pp.537-542.

Rave, A.G., 2013. Evaluación de cepas de microalgas para captura de dióxido de carbono. *Universidad Eafit*, p.113. Available at:

<https://repository.eafit.edu.co/handle/10784/7377#.VuqWpfl96M8>.

von Richter, V., 1873. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. *Chem. Ber.*, 6(2), pp.1249-1260.

Rodriguez, A.R. y Triana, F.C., 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (=Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio. *Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial*, p.106, Tesis doctoral.

Romo Pazmiño, S. I., 2014. *Efecto del alimento vivo Daphnia magna y Enchytraeus buchholzi en juveniles de Apistogamma cacatuoides en condiciones de cautiverio, en la ciudad de Palmira, valle de cauca*. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño.

Roset, J., Aguayo, S. y Muñoz, M., 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol*, 18, pp.65-71. Available at: <http://aetox.es/wp-content/revista/revtox.18.2/revtox.18.2.cianobacterias.pdf>.

Rosso, L. y Leda Giannuzzi, 2011. CIANOBACTERIAS COMO DETERMINANTES AMBIENTALES DE LA SALUD. En *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*.

Ruiz, A., 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Universidad Politécnica de Valencia*, p.102.

Ruiz, C., 2016. Determinación de la vida de anaquel de un queso tipo fresco suplementado con espirulina (*Arthrospira platensis*) mediante el uso de herramientas sensoriales. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería Agroindustrial*.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*,

Saracho, H., 2007. *¿Puede ser la Espirulina una herramienta potencialmente eficiente en la consecución de la Soberanía Alimentaria, desde el punto de vista de nutricional?*. Lléida: Universidad de Lléida.

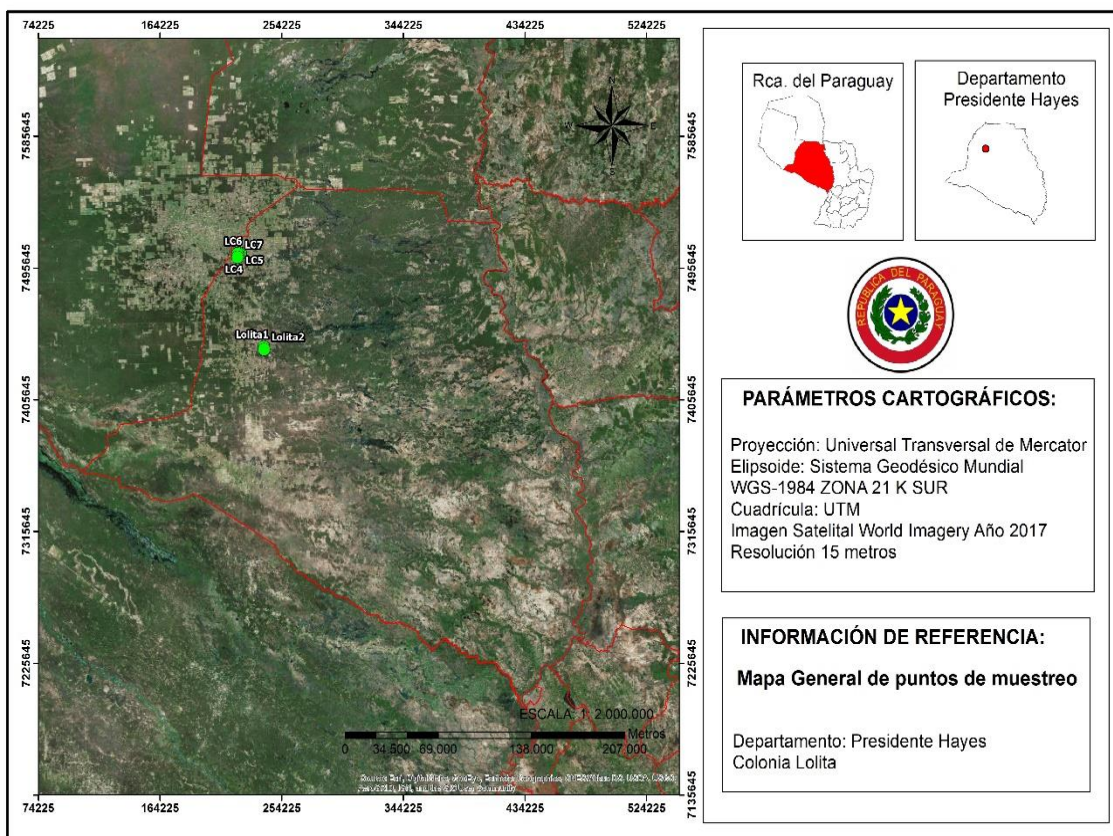
Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B. & Vargas, J.V.C., 2011. A review on microalgae, a

- versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35(4), pp.291-311.
- Scheldeman, P. *et al.*, 1999. *Arthrospira* ('Spirulina') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), pp.213-222.
- Schlösser, U.G., 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 95(1), pp.181-276.
- Sera Blanco, R.A. y García Díaz, M., 2017. The unbelievable spirulina. *Número*.
- Simpore, J. *et al.*, 2005. Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing spirulina. *Annals of Nutrition and Metabolism*.
- Soni, R.A., Sudhakar, K. y Rana, R.S., 2017. Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science and Technology*.
- Sotiroudis, T.G. y Sotiroudis, G.T., 2013. Health aspects of Spirulina (*Arthrospira*) microalga food supplement. En *Journal of the Serbian Chemical Society*. pp. 395-405.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *BioMed Research International*, 2009.
- Tecnoplades, 2013. *Protocolo de microalgas*. Colima: Centro Regional de Tecnología Pesquera (CRIP).
- Tello Hidalgo, E. G., 2017. *Respuesta agronómica del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a un biofertilizante con base en microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*, 2016.*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Tomaselli L (2007) Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. p 1-15.

- Valdivie, M. y Dieppa, O., 2001. Momento óptimo para la inclusión de spirulina en dietas para pollos de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 35(2).
- Vázquez Villalobos, V. y otros, 2014. Influencia de la proporción agua de mar y bicarbonato en la producción de biomasa de Spirulina sp. con iluminación de diodo emisor de luz. *Scientia Agropecuaria*, V(109-209), p. 1.
- Vázquez Pérez, R.N. *et al.*, 2016. Evaluación del contenido de Proteínas de la biomasa de Spirulina (*Arthrospira*) *maxima* cultivada En condiciones ambientales en bioreactores. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Vitón, D., 2016. Una reseña corta sobre el valor nutritivo de la Espirulina (*Arthrospira platensis*) y su uso en la alimentación porcina. *Revista computarizada de producción porcina*.
- Vonshak, A., 2004. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. p. 577.
- Vonshak, A., 2002. *Spirulina platensis (Arthrospira) : physiology, cell-biology and biotechnology*, Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>.
- Vonshak, A. y Tomaselli, L., 2000. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. *The Ecology of Cyanobacteria*, pp.505-522. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-46855-7_18.
- White, T.J. *et al.*, 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. En *PCR protocols: a guide to methods and applications*. pp. 315-322.
- Ximena Pedraza, G., 1989. Cultivo de Spirulina máxima. *Livestock Research for Rural Development*. Available at: <http://www.fao.org/ag/Aga/agap/frg/lrrd/lrrd1/1/gloria.htm>.

ANEXOS

Anexo 1. Mapa general de puntos muestreados



Anexo 2. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 1

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
2	2	1	1	1.5
Concentración (cél/ml): 15000				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
1	2	1	1	1.25
Concentración (cél/ml): 12500				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
1	2	3	2	2
Concentración (cél/ml): 20000				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
3	3	2	2	2.5
Concentración (cél/ml): 25000				

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
3	3	3	3	3
Concentración (cél/ml): 30000				

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
3	3	4	5	3.75
Concentración (cél/ml): 37500				

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
4	6	3	7	5
Concentración (cél/ml): 50000				

CONTEO 8				
A	B	C	D	PROM
9	10	10	11	10
Concentración (cél/ml): 100000				

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
53	40	65	52	52.5
Concentración (cél/ml): 525000				

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
29	45	34	14	30.5
Concentración (cél/ml): 305000				

Fuente: Propia.

Anexo 3. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 2

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
2	1	2	2	1.75
Concentración (cél/ml): 17500				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
1	2	2	1	1.5
Concentración (cél/ml): 15000				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
3	2	1	2	2
Concentración (cél/ml): 20000				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
1	1	2	2	1.5
Concentración (cél/ml): 15000				

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
3	3	3	2	2.75
Concentración (cél/ml): 27500				

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
4	5	5	5	4.75
Concentración (cél/ml): 47500				

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
6	7	6	5	6
Concentración (cél/ml): 60000				

CONTEO 8				
A	B	C	D	PROM
22	6	21	12	15.25
Concentración (cél/ml): 152500				

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
41	39	23	33	34
Concentración (cél/ml): 340000				

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
27	27	23	20	24.25
Concentración (cél/ml): 242500				

Fuente: Propia.

Anexo 4. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 3

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
2	0	1	0	0.75
Concentración (cél/ml): 7500				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
2	1	1	0	1
Concentración (cél/ml): 10000				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
0	0	1	5	1.5
Concentración (cél/ml): 15000				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
2	1	1	4	2
Concentración (cél/ml): 20000				

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
4	2	3	3	3
Concentración (cél/ml): 30000				

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
3	3	3	5	3.5
Concentración (cél/ml): 35000				

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
6	5	8	7	6.5
Concentración (cél/ml): 65000				

CONTEO 8				
-----------------	--	--	--	--

A	B	C	D	PROM
20	17	23	20	20
Concentración (cél/ml): 200000				

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
59	60	63	65	61.75
Concentración (cél/ml): 617500				

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
38	50	36	31	38.75
Concentración (cél/ml): 387500				

Fuente: Propia.

Anexo 5. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 4

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
0	1	2	1	1
Concentración (cél/ml): 10000				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
3	1	0	1	1.25
Concentración (cél/ml): 12500				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
1	3	3	1	2
Concentración (cél/ml): 20000				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
4	2	3	3	3
Concentración (cél/ml): 30000				

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
4	3	4	5	4
Concentración (cél/ml): 40000				

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
7	6	7	8	7
Concentración (cél/ml): 70000				

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
13	9	8	6	9
Concentración (cél/ml): 90000				

CONTEO 8				
A	B	C	D	PROM
32	35	34	39	35
Concentración (cél/ml): 350000				

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
88	37	83	82	72.5
Concentración (cél/ml): 725000				

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
15	28	30	27	25
Concentración (cél/ml): 250000				

Fuente: Propia.

Anexo 6. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 5

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
2	2	1	0	1.25
Concentración (cél/ml): 12500				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
1	2	2	2	1.75
Concentración (cél/ml): 17500				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
2	2	3	2	2.25
Concentración (cél/ml): 22500				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
1	2	4	3	2.5
Concentración (cél/ml): 25000				

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
4	1	2	5	3
Concentración (cél/ml): 30000				

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
7	10	10	10	9.25
Concentración (cél/ml): 92500				

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
15	19	15	14	15.75
Concentración (cél/ml): 157500				

CONTEO 8				
A	B	C	D	PROM
13	11	23	26	18.25
Concentración (cél/ml): 182500				

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
51	50	47	52	50
Concentración (cél/ml): 500000				

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
18	10	9	22	14.75
Concentración (cél/ml): 147500				

Fuente: Propia.

Anexo 7. Concentración del Conteo 1 al 10 del recipiente N° 6

CONTEO 1				
A	B	C	D	PROM
1	1	0	1	0.75
Concentración (cél/ml): 7500				

CONTEO 2				
A	B	C	D	PROM
1	1	1	2	1.25
Concentración (cél/ml): 12500				

CONTEO 3				
A	B	C	D	PROM
3	0	2	1	1.5
Concentración (cél/ml): 15000				

CONTEO 4				
A	B	C	D	PROM
2	1	2	5	2.5

Concentración (cél/ml): 25000

CONTEO 5				
A	B	C	D	PROM
2	2	3	5	3

Concentración (cél/ml): 30000

CONTEO 6				
A	B	C	D	PROM
3	3	5	7	4.5

Concentración (cél/ml): 45000

CONTEO 7				
A	B	C	D	PROM
7	7	9	5	7

Concentración (cél/ml): 70000

CONTEO 8				
A	B	C	D	PROM
21	25	32	22	25

Concentración (cél/ml): 250000

CONTEO 9				
A	B	C	D	PROM
28	67	28	37	40

Concentración (cél/ml): 400000

CONTEO 10				
A	B	C	D	PROM
21	17	19	25	20.5

Concentración (cél/ml): 205000

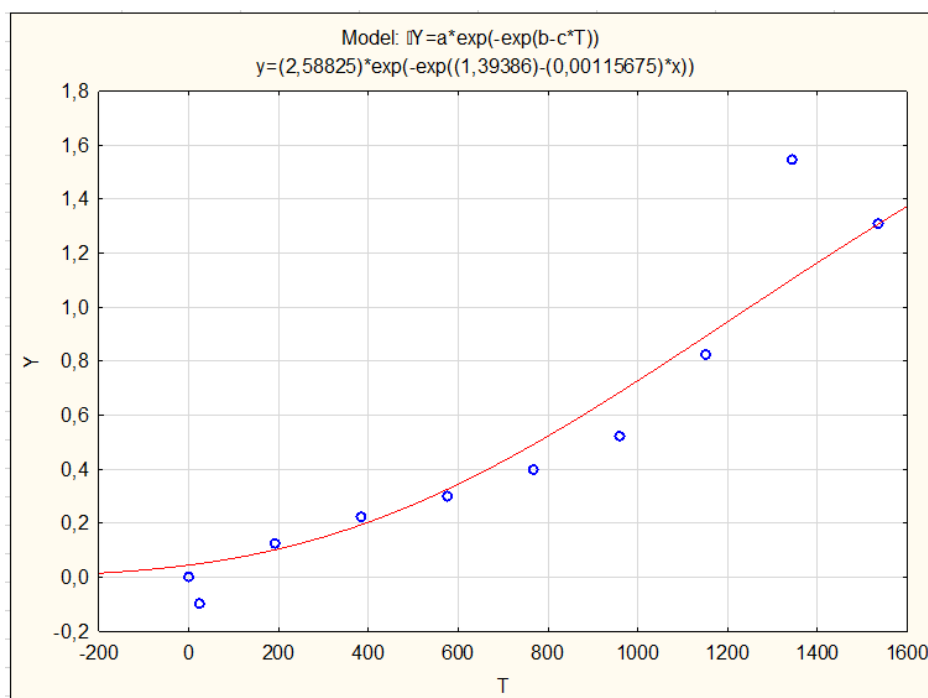
Fuente: Propia.

Anexo 8. Cinética de crecimiento de los diferentes recipientes.

Recipientes	μ_{max}	λ	G	R²
1	0.00299394	340.488579	231.516422	0.90455864
2	0.004230102	526.5903142	163.8606358	0.966442958
3	0.00395894	216.614374	175.083922	0.95496138
4	0.00372887	100.056879	185.886446	0.92236709
5	0.00379887	165.003073	182.461422	0.90200621
6	0.00335958	45.9628197	206.319409	0.9354647

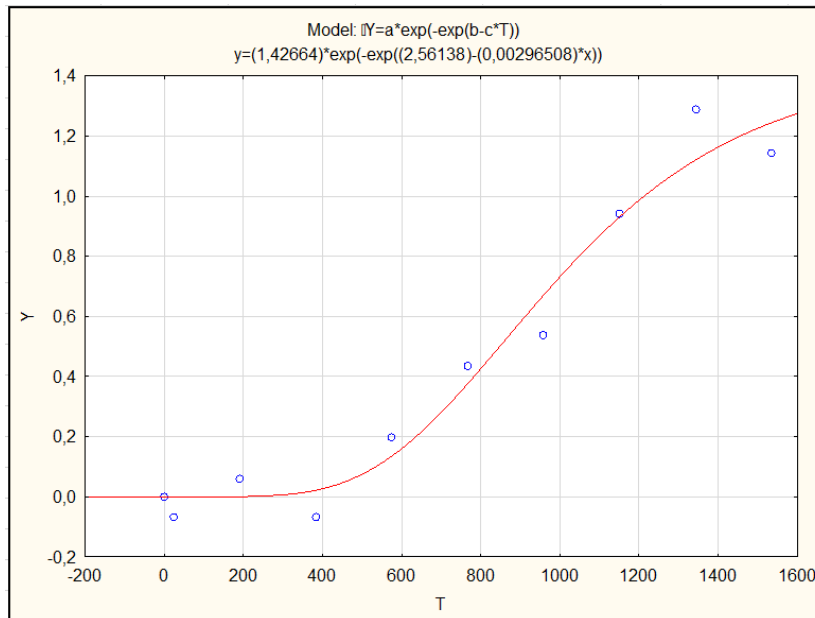
Fuente: Propia.

Anexo 9. Curva de crecimiento, recipiente N° 1.



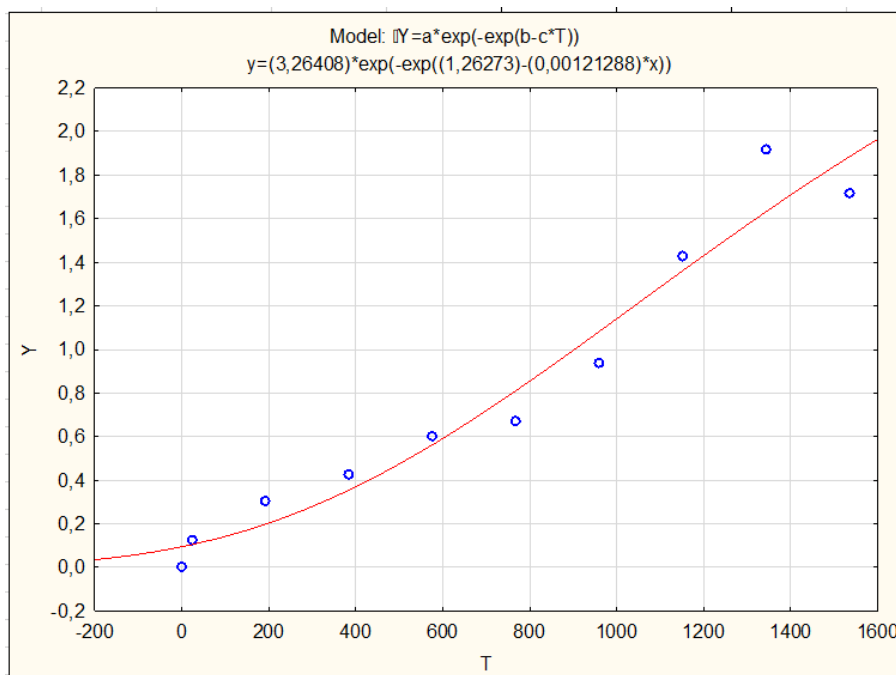
Fuente: Propia.

Anexo 10. Curva de crecimiento, recipiente N° 2.



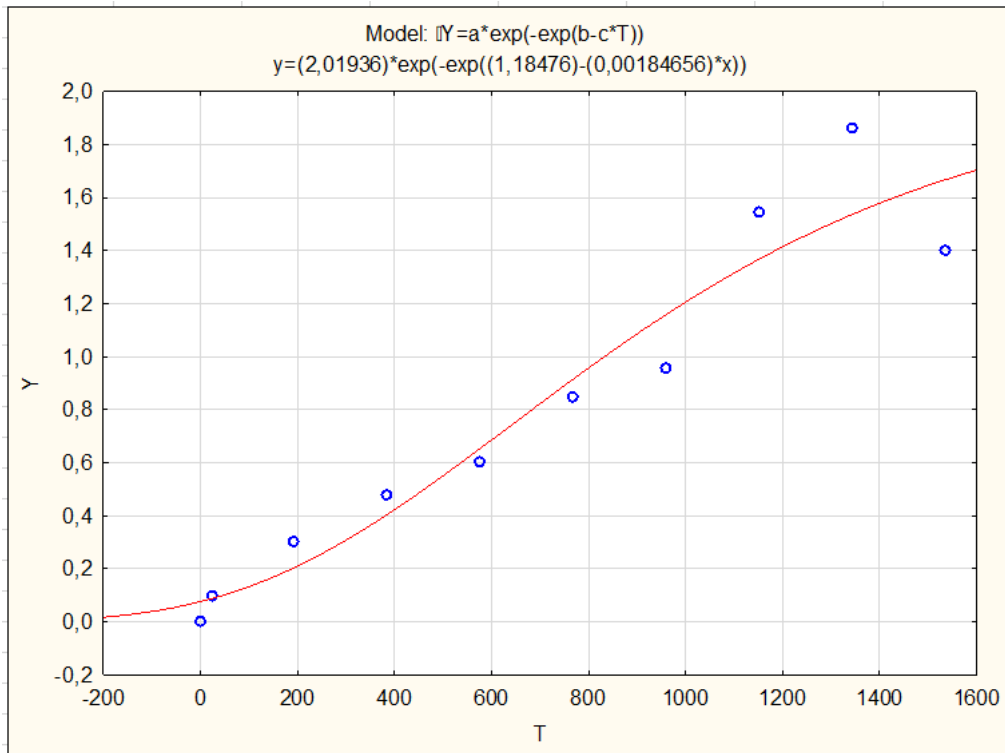
Fuente: Propia.

Anexo 11. Curva de crecimiento, recipiente N° 3.



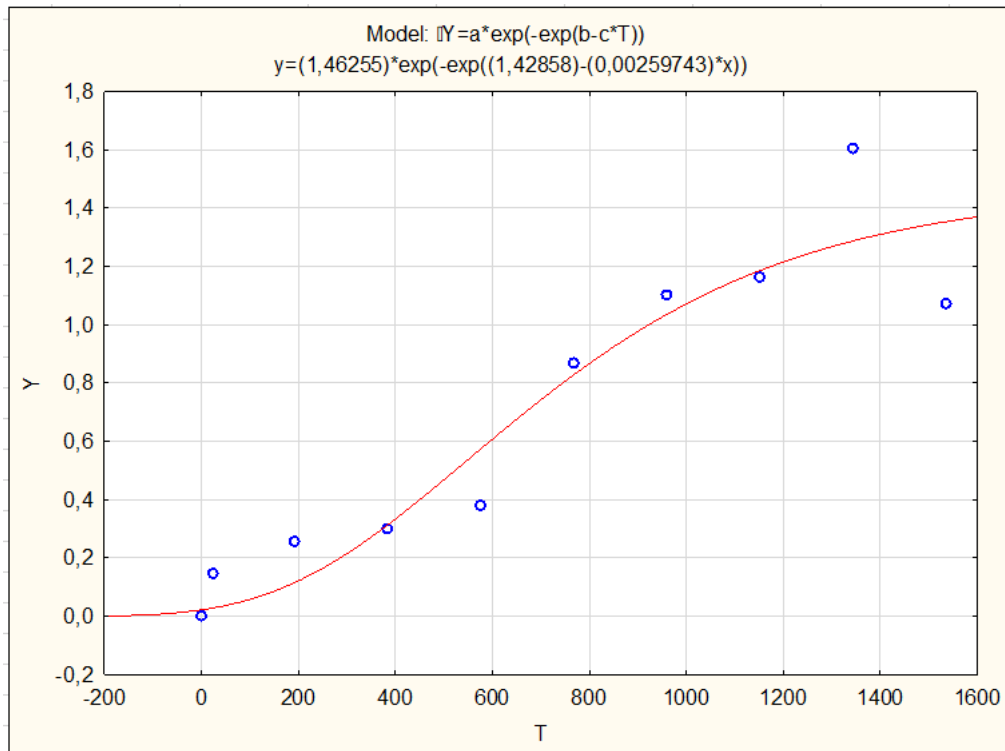
Fuente: Propia.

Anexo 12. Curva de crecimiento, recipiente N° 4.



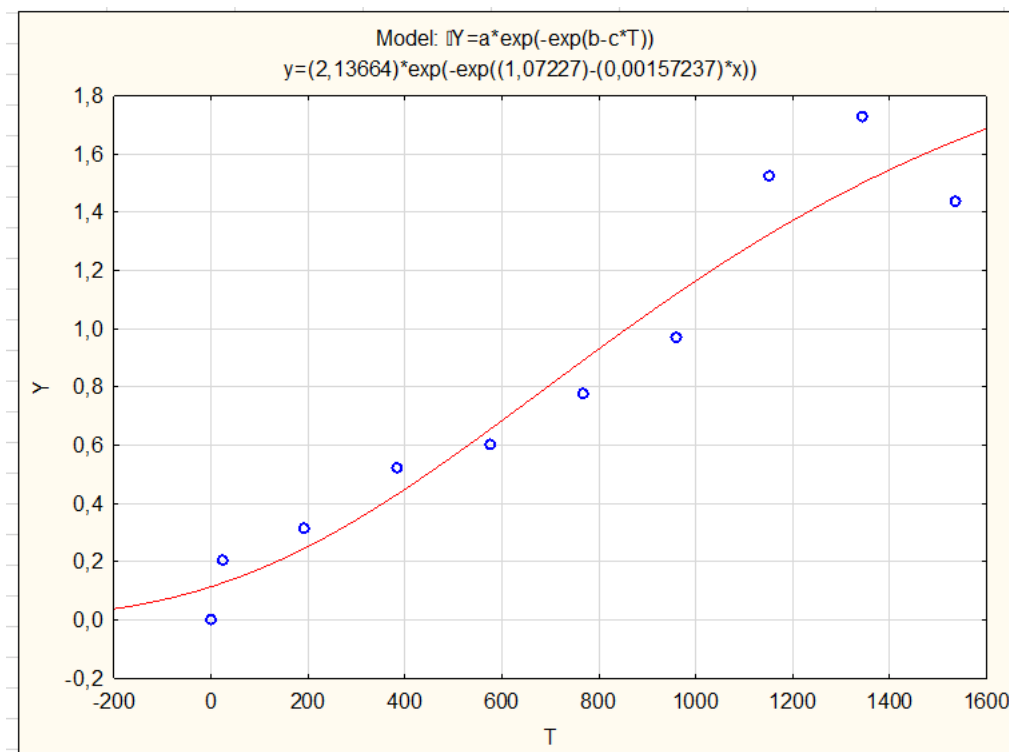
Fuente: Propia.

Anexo 13. Curva de crecimiento, recipiente N° 5.



Fuente: Propia.

Anexo 14. Curva de crecimiento, recipiente N° 6.



Fuente: Propia.


Anexo 15. Registro de temperatura (°C), desde el mes de Junio a Agosto de 2017

Días	Junio	Julio	Agosto	Promedio
1	16	19	28	21
2	17	20	26	21
3	18	19	15	17
4	19	21	20	20
5	19	21	23	21
6	20	22	23	22
7	18	24	26	23
8	17	25	25	22
9	14	20	23	19
10	17	24	25	22
11	19	25	31	25
12	20	27	29	25
13	21	26	18	22
14	22	28	18	23
15	24	27	24	25
16	25	25	24	25
17	29	15	26	23
18	24	10	27	20

19	23	19	26	23
20	15	21	17	18
21	23	21	18	21
22	24	24	23	24
23	26	29	25	27
24	27	30	32	30
25	26	30	31	29
26	25	29	28	27
27	26	27	24	26
28	27	28	26	27
29	27	29	33	30
30	22	25	29	25
31		29	26	28

Fuente: Propia.

Anexo 17. Informe de Resultados del Laboratorio de Agua y Alimentos.

	LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUA Y ALIMENTOS	 Intertek
---	--	--

Posadas, 2 de enero de 2018

INFORME DE RESULTADOS Nro. 005-18

DATOS DEL SOLICITANTE/CLIENTE	
SOLICITANTE/CLIENTE: Srta. Clara Villalba	
DOMICILIO: Itapúa, Paraguay	CUIT: -
☎ : -	✉ : claravillalba88@gmail.com

DATOS DE LA MUESTRA			
Nº DE MUESTRA: 015595-17		MUESTRA MANIFESTADA: Espirulina	
LOTE: No indica	FECHA ELABORACION: No indica	IDENTIFICACIÓN DE ORIGEN: Muestra 1	
LUGAR DE MUESTREO: Planta Piloto		FECHA DE MUESTREO: 23/12/2017	
RESPONSABLE DEL MUESTREO: Srta. Clara Villalba			
Determinaciones FISICOQUIMICAS	Métodos	Resultados	Unidades
Humedad	Secado en estufa a (103±2) °C, hasta peso constante.	7,6	% bh
Proteínas (N x 5,75)	Método de Kjeldhal	58,6	g/100 g bs
Grasas Totales	Extractor Twisselman con éter de petróleo por 5 h	0,4	g/100 g bs
Observaciones: Los resultados se refieren únicamente a la muestra examinada. bh: base húmeda bs: base seca			


Bqca. Raquel María Fretes
 Director Técnico
 Lab. Análisis Agua y Alimentos
 MP: 225 CUIT: 27-14639539-8

* Raquel M. Fretes - Bioquímica MP 225 - * Luis A. Brumovsky - Dr. Ing. Químico MP 2149 Avenida Mitre 2283 - (3300) Posadas - Misiones - Argentina - Telefax 0376-4422769 email: analisisagua.alimentos@gmail.com	Página 1 de 1 REG-LAB-06 VER 03 E-PSN CLAB
---	--

Fuente: Propia.

Anexo 18: Identidad molecular del aislamiento de *Arthrospira platensis* de Paraguay según base de datos Genbank del NCBI.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Arthrospira platensis BTA174 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	183	183	75%	2e-46	82%	KJ562186.1
Arthrospira sp. PMC738.11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KX840281.1
Arthrospira sp. PMC737.11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KX840360.1
Arthrospira sp. strain DICP-F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KY363516.1
Arthrospira platensis rsemsu_1/02-P 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KU855375.1
Arthrospira platensis rsemsu_1/02 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KU855374.1
Arthrospira platensis GMPC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KX279418.1
Arthrospira platensis GMPB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KX279416.1
Arthrospira platensis GMPA7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KX279415.1
Arthrospira platensis YZ genome	180	360	74%	2e-45	81%	CP013008.1
Arthrospira sp. 'Nigrita C1' 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-Ile and tRNA-Val genes, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KU605610.1
Arthrospira platensis RRGK-AP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KT250929.1
Arthrospira platensis CHM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KJ463625.1
Arthrospira sp. MV86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KP681557.1
Arthrospira platensis strain PCC 7345 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	NR_125711.1
Arthrospira platensis SAG 21.99 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	180	180	74%	2e-45	81%	KM019966.1
Arthrospira sp. str. PCC 8005 chromosome, complete genome	180	360	74%	2e-45	81%	FO818640.1

Fuente: Genbank, 2017

Anexo 19. Prototipo visualizado en computadora.

Fecha: 01/01/2018

Selecciona la fecha

Parametros:
 Luz
 Temperatura
 pH

Visualización de resultados: 25 °C

Actualizar

Selecciona el parámetro

Fuente: Propia.

Anexo 20. Visualización en dispositivo móvil.



The screenshot shows a mobile application interface for 'Spirulina Paraguay'. At the top, there is a green header with a circular profile picture on the left and the text 'Spirulina Paraguay' on the right. Below the header, there is a white box containing a date selection field labeled 'Fecha:' with the date '04/28/2018' displayed. Underneath, there is another white box titled 'Parametros' with three radio button options: 'Luz', 'Temperatura', and 'pH'. The 'pH' option is selected, and the value '10' is shown to its right. At the bottom of the interface, there is a green button labeled 'Actualizar'.

Fuente: Propia.

Anexo 21. Código QR



Fuente: Propia.