

**EFFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
CAROTENOIDES Y LA MORFOLOGÍA DE LA MICROALGA**

***Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher (1959).**



Yuliana Gómez Montes

Juan David Pérez Cañas

**Universidad De Córdoba
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Montería- Córdoba**

2020

**EFFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES Y
LA MORFOLOGÍA DE LA MICROALGA
Tetraselmis gracilis (Kylin) Butcher (1959).**

Yuliana Gómez Montes

Juan David Pérez Cañas

Trabajo de tesis presentado como requisito para optar el título de
Biólogos

Directoras:

Martha Mogollón Arismendy M.Sc en Ciencias Ambientales
Docente, Programa de Biología

Carolina Arango Rivas M.Sc en Biotecnología
Docente, Programa de Biología

Universidad de Córdoba
Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Biología
Montería- Córdoba

2020

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado “EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES Y LA MORFOLOGÍA DE LA MICROALGA *Tetraselmis gracilis* (KYLIN) BUTCHER (1959)”. Realizado por los estudiantes: YULIANA GÓMEZ MONTES Y JUAN DAVID PÉREZ CAÑAS, cumple con los requisitos exigidos por la facultad de Ciencias Básicas para optar por el título de BIÓLOGO ha sido aprobada.

MARTHA MOGOLLÓN ARISMENDY. Msc

Director

CAROLINA ARANGO RIVAS. Msc

Director

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

Con el amor más inmenso, quiero dedicarle este trabajo a DIOS quien siempre me guío dándome fortalezas en los momentos difíciles, me llenó de paciencia y sabiduría para escalar un peldaño más.

A mis padres, pero en especial a mi mamá SOLIMAR MONTES DÍAZ quien me apoyo y acompaño en este largo camino, a pesar de las difíciles situaciones, siempre me dio alientos para seguir adelante y nunca decaer.

A todos mis familiares quienes siempre estuvieron apoyándome cada momento y me tendieron la mano cuando la necesite.

A todas esas personas especiales que fueron más que amigos durante toda mi carrera y estuvieron allí a mi lado brindándome momentos maravillosos.

.

YULIANA GÓMEZ MONTES

DEDICATORIA

Les dedico este trabajo mis padres MARTHA NOELIA CAÑAS JIMÉNEZ, Y HUMBERTO PÉREZ quienes me apoyaron y acompañaron en este largo camino, a pesar de las difíciles situaciones siempre me dieron alientos para seguir adelante y nunca declinar en este camino, gracias por siempre estar ahí.

A mis hermanos quienes me acompañaron en este proceso del cual participaron de forma directa, gracias por estar ahí, y demás familiares que de alguna manera contribuyeron a este logro.

A mis amigos que fui conociendo durante este proceso gracias por sus consejos y su apoyo en este largo recorrido.

A la profesora ASTRID ADRIANA AGÁMEZ por ser una persona que me inspiro a realizar una carrera universitaria y a la cual le agradezco inculcar en sus alumnos las ganas de salir adelante, ya que un gran profesor no es aquel que más sabe, sino aquel que puede ayudar a cambiar la sociedad con sus acciones.

Juan David Pérez Cañas

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecerle a Dios por acompañarnos en este camino, dándonos la fortaleza en cada momento.

A las profesoras MARTHA MOGOLLÓN ARISMENDY Y CAROLINA ARANGO RIVAS quienes con mucha paciencia nos guiaron en todo el proceso y nos dieron la oportunidad de realizar este trabajo.

A los auxiliares de laboratorio de los diferentes programas que requerimos en este proceso ya que siempre estuvieron dispuestos a colaborarnos.

A la Universidad de Córdoba y su cuerpo de docentes por permitirnos educar en esta gloriosa universidad.

Yuliana Gómez Montes

Juan David Pérez Cañas

Tabla de Contenido

1. Introducción.....	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo general.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Marco referencial.....	15
3.1. Marco teórico.....	15
3.2. Antecedentes.....	22
5. Materiales y métodos	24
5.1. Área de estudio.....	21
5.2. Condiciones de trabajo.....	25
5.3. Preparación del medio de cultivo	26
5.4. Montaje del experimento.....	26
5.5. Determinación del crecimiento poblacional.....	27
5.6. Determinación de carotenos.....	28
5.7. Morfología.....	30
5.8. Análisis estadístico.....	31
6. Resultados.....	32
7. Discusión.....	40
8. Conclusiones.....	44
9. Recomendaciones.....	45
10. Referencias bibliográficas.....	46
11. Anexos.....	53

Lista de tablas

Tabla 1. Componentes del medio f/2 uillard.....	26
Tabla 2. Valores promedio de densidades poblacionales (cel/mL ⁻¹).....	34
Tabla 3. Tasa de crecimiento (K) y Tiempo de duplicación o división celular (Td) en función del tiempo.....	36
Tabla 4. Promedio tamaño de las células de las microalgas en los diferentes fotoperiodos en las tres fases de crecimiento del cultivo.....	38

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Tetraselmis gracilis</i>	16
Figura 2. Estructura de carotenoides (betacaroteno).....	20
Figura 3. Clasificación de los carotenoides.....	21
Figura 4. Ubicación del área de estudio.....	25
Figura 5. Unidades experimentales del cultivo de <i>T. gracilis</i>	27
Figura 6. Representación esquemática de cámara Neubauer.....	28
Figura 7. Medición de carotenoides.....	30
Figura 8. Mediciones morfológicas.....	31
Figura 9. Representación gráfica de la densidad poblacional de <i>Tetraselmis gracilis</i> sometida a 3 fotoperiodos.....	33
Figura 10. Representación gráfica del promedio de producción de carotenoides totales en los diferentes fotoperiodos.....	37
Figura 11. Mediciones celulares de <i>Tetraselmis gracilis</i> en las diferentes fases de crecimiento.....	39
Figura 12. Representación gráfica del volumen <i>Tetraselmis gracilis</i> en los diferentes fotoperiodos.....	40

Resumen

En condiciones normales las microalgas están sometidas a periodos de luz/oscuridad, y esta alternancia generalmente se utiliza también en su cultivo. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene la influencia del fotoperiodo sobre la producción de carotenoides y en la morfología de la microalga *Tetraselmis gracilis*., basado en el método biológico para determinar el crecimiento poblacional, el método químico por espectrofotometría para estimar la concentración de carotenos y registro fotográfico de células para mediciones morfológicas. La evaluación del crecimiento poblacional consistió en un procedimiento experimental, tipo bioensayo, en el cual se tuvieron 3 unidades experimentales cada una con 150 mL de medio F/2 Guillard con 25% de salinidad, sometidas a un fotoperiodo de 24:0 y otras 6 unidades las cuales se mantuvieron con un tipo de fotoperiodo 8:16 y 12:12, cada una con tres replicas para un total 9 unidades de cada uno de los tratamientos, se realizaron conteos celulares cada 48 horas en cámara Neubauer y se estimaron variables de densidad celular, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, la determinación de cambios morfológicos se realizó mediante el cálculo de volumen celular. El fotoperiodo 24:0 presentó la mayor densidad celular en el crecimiento con un valor de $597958 \text{ cel/mL}^{-1}$, los resultados de tasa de crecimiento específico evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos a las 432 y 480 horas del cultivo, los tiempos de duplicación diaria en promedio fueron muy parecidos entre tratamientos. La mayor producción de carotenoides totales se presentó cuando la microalga fue expuesta a condiciones de fotoperiodo 8:16 en la fase exponencial del crecimiento, el tratamiento 24:0 presentó los mayores valores de volumen celular a medida que transcurrieron las fases del experimento, en comparación a los otros 2 fotoperiodos. Los resultados mostraron que el fotoperiodo tiene un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento específico de *Tetraselmis gracilis*, así como también tuvo efecto significativo sobre la producción de carotenoides. Este estudio demostró que *T. gracilis* cuando es expuesta a variaciones en la intensidad de luz, es decir a fotoperiodos, presenta variaciones en el crecimiento, contenido de carotenos y volumen celular, lo cual sirve como base para futuras investigaciones que tengan como objeto de estudio masificar su cultivo en condiciones controladas para posteriores aplicaciones en diversos sectores de la industria.

Palabras claves: cultivo, espectrofotometría, volumen celular

Abstract

Under normal conditions the microalgae are subject to periods of light / dark, and this alternation is generally also used in their cultivation. In this work, the effect of the photoperiod influence on the production of carotenoids and on the morphology of the microalgae *Tetraselmis gracilis* was evaluated, based on the biological method to determine population growth, the chemical method by spectrophotometry to estimate the concentration of carotenes and photographic record of cells for morphological measurements. The evaluation of population growth consisted of an experimental procedure, bioassay type, in which there were 3 experimental units each with 150 mL of F / 2 Guillard medium with 25% salinity, subjected to a photoperiod of 24: 0 and another 6 units which were maintained with a type of photoperiod 8:16 and 12:12, each with three replicates for a total of 9 units of each of the treatments, cell counts were performed each 48 hours in Neubauer chamber and variables of cell density, growth rate and doubling time were estimated, the determination of morphological changes was made by calculating cell volume. The photoperiod 24: 0 presented the highest cell density in growth with a value of 597958 cel / mL⁻¹, the results of specific growth rate evidenced significant differences between treatments at 432 and 480 hours of culture, doubling times daily were on average very similar between treatments. The highest production of total carotenoids occurred when the microalgae was exposed to 8:16 photoperiod conditions in the exponential phase of growth, the 24: 0 treatment presented the highest values of cell volume as the phases of the experiment passed, in comparison to the other 2 photoperiods. The results showed that the photoperiod has a significant effect on the specific growth rate of *Tetraselmis gracilis*, as well as having a significant effect on the production of carotenoids. This study showed that *T. gracilis*, when exposed to variations in light intensity, that is, photoperiods, presents variations in growth, carotene content and cell volume, which serves as a basis for future research that has the object of study. massify its cultivation under controlled conditions for subsequent applications in various sectors of the industry.

Keywords: culture, spectrophotometry, cell volume

1. Introducción

Las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz solar y se desarrollan a partir de la materia inorgánica. Sin embargo, existen algunas especies las cuales suelen ser fotoheterótrofas ya que son capaces de crecer utilizando la materia orgánica como fuente de energía (Malgas, 2013). Algunas presentan nivel de especialización celular, se caracterizan por ser típicamente acuáticas, viven fijas a un sustrato o flotando libremente en él, también se pueden encontrar en ambientes terrestres extremos, evidenciando que se encuentran ampliamente distribuidas en la biosfera (González, 2015). Son conocidas por su capacidad de producir pigmentos resultados de sus procesos fisiológicos como es el caso de la producción de ficoeritrinas, astaxantina y carotenos, entre otros (Bolaños, 2008). Estos pueden ser utilizados en un rango amplio de industrias como la agricultura, acuicultura, biomedicina e incluso la industria cosmética (Priyadarshani & Rath, 2012).

Estos microorganismos poseen diversidad de tamaños y formas, las cuales pueden variar cuando se presentan cambios en su morfología como rotura de las estructuras internas, adelgazamiento de la célula, pérdida de color, así como, aumento del pirenoide, entre otros; dichas alteraciones son provocadas por condiciones adversas del medio en que se encuentran, como lo son los agentes químicos tóxicos (Pellón *et al.*, 2003); desconociéndose posibles cambios provocados por agentes físicos como lo es la luz.

Las características que poseen las microalgas, son las que las llevan a ser muy utilizadas en productos que hacen parte de ciclos sostenibles y es por esto que más de sesenta años de investigación en ficología aplicada avalan un conocimiento

actual sobre producción masiva de microalgas, permitiendo su uso como alimento en la acuicultura de especies marinas, la depuración de aguas residuales y la producción de compuestos para sectores como la dietética y la cosmética. Se trata de productos cuyo valor de mercado permite llevar a cabo de forma rentable este tipo de actividad económica (Malgas, 2013).

Uno de estos productos de gran interés comercial son los carotenos, actualmente a nivel global la demanda es alta, pero la mayoría de la oferta de estos a nivel industrial presentan altos costos y además son de origen sintético, por lo que se busca la implementación de pigmentos de origen natural (Parra & Barajas, 2011), provocando un creciente interés por los carotenos obtenidos naturalmente por procesos biotecnológicos.

Según Gonzáles (2015), existen más de 30.000 especies de microalgas, de las cuales unas 100 han sido estudiadas y solo unas 10 especies se explotan comercialmente. En el caso de la obtención de pigmentos orgánicos las investigaciones se han centrado principalmente en algunas especies de los géneros *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Spirulina* (Wijffels *et al.*, 2013); dejando de lado a otros como *Tetraselmis*, el cual también puede presentar altos contenidos de pigmentos accesorios como los carotenoides; es entonces, como la utilización de las mismas especies ha generado un vacío de información acerca del posible potencial de producción en pigmentos que presentan otras microalgas.

En la actualidad, urge buscar alternativas de nuevas fuentes de producción de compuestos que no sean nocivas para el medio ambiente, con el fin de adquirir un

amplio rango de variabilidad para su obtención (Reyes & Franco, 2006). En Colombia, la falta de optimización en los métodos de cultivo y las condiciones controladas de variables como la luz, factores que se deben manejar para que se dé un aumento en la producción de pigmentos, conlleva a que no se aproveche al máximo este recurso micro algal (Beltrán *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que el género *Tetraselmis* ha sido reconocido por su amplio contenido de lípidos (Flores *et al.*, 2003); pero hay poca información sobre su potencial en la producción de pigmentos, esta investigación se perfila como un estudio que pretende revelar el potencial biotecnológico que ofrece la especie, mediante la optimización de métodos basados en parámetros como la luz, la cual interviene directamente en el crecimiento y su fisiología, a su vez en la producción de pigmentos carotenoides.

Conocer el posible efecto que tiene la variable fotoperiodo en la producción de carotenoides de la especie *Tetraselmis gracilis*, apoyaría futuras investigaciones que apunten a la obtención de pigmentos de origen orgánico. Contribuyendo de esta manera al desarrollo sostenible, utilización de menos contaminantes, mayor aplicabilidad en las industrias, mayor economía y fácil accesibilidad.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del fotoperiodo sobre la producción de carotenoides y la morfología en *Tetraselmis gracilis*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento poblacional de *Tetraselmis gracilis* bajo condiciones de diferentes fotoperiodos.
- Estimar la concentración de carotenoides en *Tetraselmis gracilis* bajo condiciones de fotoperiodo.
- Observar posibles cambios morfológicos de *Tetraselmis gracilis* bajo

3. Marco referencial

3.1. Marco teórico

Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos que pueden presentarse de forma unicelular, colonial o filamentosa; forman parte de los productores primaria de la mayoría de los sistemas acuáticos y ocupan hábitats muy diversos en prácticamente todo el planeta, su distribución geográfica está limitada por factores ambientales, que son específicos para el desarrollo de cada una de las especies. Los hábitats donde se distribuyen comprenden desde mares con abundancia de nutrientes hasta ambientes que presentan condiciones extremas, como cuerpos de agua hipersalinos (Andersen, 2013).

3.1.1. Generalidades de *Tetraselmis*

El género *Tetraselmis* está compuesto por organismos unicelulares flagelados, con células más o menos comprimidas, a menudo ligeramente curvadas, pero nunca retorcidas. Células cordiformes, elípticas o casi esféricas. Extremo anterior con invaginación, cuatro flagelos iguales en dos pares opuestos (Fig. 1). La célula contiene un solo cloroplasto más o menos en forma de copa (muy raramente dos cloroplastos), generalmente con un pirenoide central (Butcher, 1959).

Está presente una única mancha ocular, ubicada en uno de los lados aplanados de la célula, cuya posición depende de la especie. Los flagelos cubiertos por escamas en forma de diamante en 24 filas superpuestas por 24 filas dobles de escamas. Dos hileras de escamas en forma de cabello se proyectan desde lados opuestos de los flagelos. Se presenta división asexual en la etapa no móvil. las dos células hijas yacen en posiciones invertidas. En la etapa no móvil se desarrollan nuevas paredes, las paredes viejas se acumulan como anillos concéntricos alrededor de la célula o

se polarizan en un lado, formando un tallo (Butcher, 1959).

Dominio: Eucariota.

Reino: Plantae.

Phylum: Chlorophyta.

Subphylum: Chlorophytina.

Clase: Chlorodendrophyceae.

Orden: Chlorodendrales.

Familia: Chlorodendraceae.

Género: *Tetraselmis*.

Especie: *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher (1959)



Figura 1. Morfología de *Tetraselmis gracilis*. Fotografía Gómez y Pérez, 2019

3.1.2 Reproducción y características

Algunas especies de este género se reproducen de una forma sexual desconocida, presentan quistes de paredes gruesas vegetativas conocidos en varias especies, estos germinan por división en cuatro células (Marin *et al.*, 1993). Las especies difieren en la forma celular, el tamaño, la presencia o ausencia de pirenoides, la morfología del cloroplasto, pero muchas de estas características se han descrito mal y la taxonomía del género se encuentra en un estado de confusión. Se ha

sugerido la ultraestructura del pirenoide como marcador taxonómico, y recientemente, la estructura detallada de las escamas del cabello flagelar (Marín *et al.*, 1993). Algunas especies de *Tetraselmis* se encuentran en el plancton, otras son bentónicas, colonizan arena y algunas ocurren como endosimbiontes en metazoos (Provasoli *et al.*, 1968; Yamasu, 1982). Se ha logrado describir 36 especies del género de *Tetraselmis* (Moestrup, 2002).

3.1.3. Fases de crecimiento de las microalgas

Las fases de crecimiento de un cultivo típico de microalgas son cinco, que se definen por el número de células presentes en un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo: fase de latencia, de adaptación o inicial, exponencial o desarrollo logarítmico, de declinación de la fase exponencial, estacionaria y la fase de declinación o muerte (Madigan *et al.*, 2003; García *et al.*, 2017).

3.1.3.1. Fase de latencia, adaptación o inicial.

En esta fase el incremento o densidad celular es poco, debido a que las células se están adaptando a las nuevas condiciones del medio. Muchas enzimas metabólicas llegan a ser inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan a la división de la célula, y por ello antes de reanudar el crecimiento las microalgas necesitan un corto periodo de tiempo para aclimatarse a su medio acuático.

Otro factor que contribuye es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes de que la fase exponencial comience. Esta fase puede durar entre uno y tres días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo (García

et al., 2017).

3.1.3.2. Fase exponencial o desarrollo logarítmico.

La división celular se incrementa en función del tiempo, el incremento de la población existente se debe a que las células están asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual es activo.

La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio. En la fase de declinación de la fase exponencial, como su nombre indica, la división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento, por lo que puede llegar a durar de uno a dos días, en los que la edad del cultivo alcanza su valor máximo (García *et al.*, 2017).

3.1.3.3. Fase estacionaria.

En la fase estacionaria el factor limitante (carencia de nutrientes) y la velocidad de crecimiento están equilibrados, es decir, las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un periodo relativamente prolongado. Esta fase es muy corta en grupos de cultivo donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados (Madigan, 2003).

3.1.3.4. Fase de declinación o muerte.

Las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes y la densidad celular comienza a caer rápidamente liberando azúcares, proteínas y lípidos, los cuales son aprovechados en algunos casos por bacterias oportunistas que se alimentan de ellos desplazando a la población que se mantiene viva pero que rápidamente colapsa, el tiempo en que suceda esto depende de la especie (García *et*

al., 2017).

3.1.4. Carotenoides

Son una clase de pigmentos terpenoides orgánicos solubles en grasa que se encuentran de forma natural en algas, plantas y algunas clases de hongos y bacterias. Debido a sus características fisicoquímicas, los carotenoides son responsables de la gran mayoría de los colores verdes, anaranjados o rojos presentes en algunos vegetales y también animales, poseen una estructura de 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato (Santizo, 2004).

Cabe mencionar que en la actualidad se conocen alrededor de 800 carotenoides presentes en la naturaleza (Ong & Tee, 1992). Los carotenoides son antioxidantes de lípidos y al ser combinados con vitamina E y C inhibe en gran manera la oxidación de la partículas de colesterol, por lo tanto evita la displasia fibromuscular focal y degeneración de la capa media de las arterias coronarias, además que permite controlar la inflamación y los mediadores trombogénicos, actúan como preventivo de enfermedades como alzhéimer, afecciones precancerosas, coadyuva en la formación y mantenimiento tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas y de la piel, mejora la visión nocturna, como elemento para la reproducción y la lactancia (Zamora, 2007).

3.1.4.1. Estructura química y propiedades de los carotenoides.

Son tetra terpenos constituidos por múltiples unidades isoprenoides con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos (Fig. 2). Son moléculas lipofílicas, con nula solubilidad en agua. La propiedad de absorber luz se deriva de la presencia de siete o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible, con colores que van del amarillo al rojo. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones. En presencia de oxidantes fácilmente se forman radicales libres de vida corta. Los radicales libres como el oxígeno singlete O_2 e hidroxilo OH son especies altamente reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, inactivar proteínas, o causar daño molecular de ADN o ARN. Se ha demostrado que los carotenoides inactivan oxígeno singlete, hidroxilo, peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de dos excitaciones a un triplete del carotenoide. Este puede volver al estado basal liberando calor o modificando la molécula basal (Meléndez *et al.*, 2017).

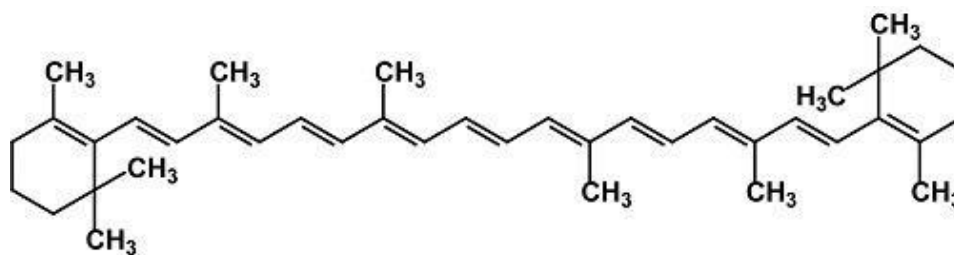


Figura 2. Estructura de carotenoide (betacaroteno) (tomado de Meléndez *et al.*, 2017).

3.1.4.2. Clasificación de los carotenoides.

Los carotenoides se dividen en dos grandes grupos, los carotenos y las xantófilas (Fig. 3) (Armstrong & Hearst, 1996). Los primeros contienen carbono e hidrógeno en sus

moléculas. Los pigmentos β -caroteno, α -caroteno, licopeno y criptoxantina se encuentran principalmente en microalgas y macroalgas, así como en vegetales terrestres: zanahorias, papayas, melones y naranjas, entre otros. En contraste, las xantófilas están compuestas por carbono, hidrógeno y, adicionalmente, por lo menos un átomo de oxígeno. Algunos ejemplos son la luteína, zeaxantina, capsantina y astaxantina, pigmentos que le dan la coloración amarillenta, roja y anaranjada a las algas, bacterias y plantas superiores, como el pimiento rojo y el arándano, entre otros.

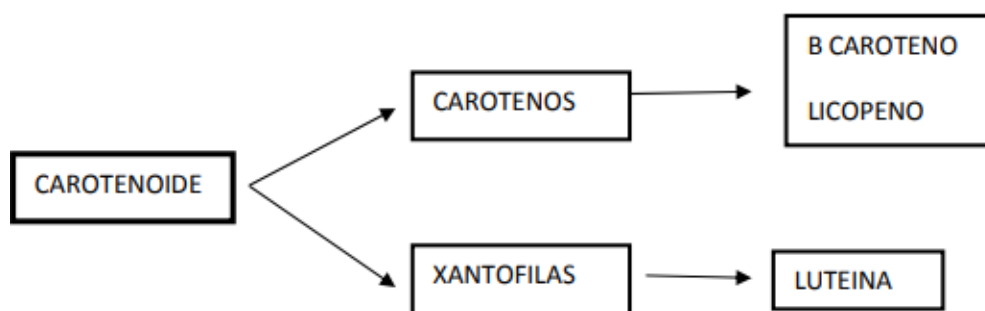


Figura 3. Clasificación de los carotenoides (tomado de Armstrong y Hearst, 1996)

Los factores que influyen en la presencia de carotenoides son el manejo pre cosecha, estado de madurez, así como las operaciones de procesado y conservación. Entre éstos la temperatura e intensidad de la luz tienen una gran influencia en el contenido de los carotenoides. Durante el procesamiento y almacenamiento la oxidación y los cambios estructurales al aplicar calor son los principales factores que los alteran. El empacado de alimentos congelados y esterilizados en atmósferas libres de oxígeno ayuda a mantener el contenido de carotenoides. Sin embargo, el tipo de suelo, riego y fertilización no afectan significativamente el contenido de éstos (Sánchez *et al.*, 1999).

3.1.5. Fotoperiodo

El fotoperiodo (tiempo de exposición a la luz y oscuridad) tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas tanto en cultivo como en la naturaleza (Humprey, 1979). En condiciones naturales, la mayoría de las algas se establecen en periodos alternos de luz/oscuridad, sin embargo, en la mayoría de los laboratorios de microalgas se mantienen iluminación constante en los cultivos al interior, debido a que se favorece la división celular en ciertas microalgas como las diatomeas; cuando se llega a utilizar los ciclos luz/oscuridad, es con el fin de simular las condiciones naturales o la de sincronizar los cultivos (Humprey, 1979).

3.2. Antecedentes

Las investigaciones llevadas a cabo con las microalgas del género de *Tetraselmis* son muy variadas, pero se han centrado principalmente en el crecimiento o en la producción de lípidos como se puede evidenciar en el estudio realizado por Zevallos (2018), quien evaluó la influencia del fotoperiodo en *Tetraselmis striata* (Chlorodendraceae) en sistema de cultivo bentónico, aplicando diferentes fotoperíodos: 12:12, 16:8, 18:6 y 24:0 horas de luz - oscuridad. Los resultados sobre la estimación de la tasa de crecimiento específico evaluada por el efecto de la exposición lumínica sobre el cultivo de *T. striata* a 24, 16, 12 y 8 h de luz, demostraron que las mayores tasas específicas de crecimiento se obtuvieron a las 24 h de exposición a la luz con un valor de 0,44 día⁻¹.

Son muy pocas las investigaciones que se han centrado en el estudio de la producción de carotenoides totales a partir de la microalga *Tetraselmis gracilis*, sin embargo, hay

algunas como la realizada por Gorgonio et al. (2013), quienes evaluaron aspectos morfológicos y químicos de tres diferentes microalgas entre las que estaba *Tetraselmis gracilis*, utilizando el medio Guillard y fotoperiodo constante, teniendo como resultados cambios en el volumen celular de las células de esta microalga y una alta producción de carotenoides totales en *Tetraselmis gracilis*.

Además de estudiar el efecto de la variable fotoperiodo también se han realizado estudios donde se ha buscado el posible potencial de efectividad en el crecimiento de otros medios de cultivo como se puede evidenciar en la investigación realizado por Silva et al. (2011). Su investigación se basó en la determinación del crecimiento de *Tetraselmis Suecia*, utilizando como medio agua de mar con sanguaza. Al comparar los resultados del crecimiento de la microalga en los medios tradicionales como Guillard, se determinó que los valores obtenidos con el medio de cultivo sanguaza/agua de mar, superaron al medio de cultivo tradicionalmente usado, demostrando así la potencialidad de uso del medio sanguaza/agua de mar en estudios escalables a nivel piloto de producción de *Tetraselmis suecica*, con miras a la producción de biodiesel.

Además del estudio del crecimiento y producción de metabolitos, otros autores han incluido posibles cambios morfológicos ocasionados por diferentes variables, como lo demostró Quevedo et al. (2008), quienes en su investigación con la microalga *Scenedesmus sp* sometidas a diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal, incluyeron un análisis del polimorfismo que presenta la microalga en cada medio de cultivo, evidenciando cambios morfológicos de la especie, incluso entre colonias con el mismo número de células.

Otra de las investigaciones relacionadas con cambios en la morfología de las células ha sido la realizada por Borges et al. (2010), quienes cultivaron diez especies de microalgas marinas, dentro de las cuales se encontraba *Tetraselmis gracilis*. Estos autores Compararon el crecimiento y la composición química que presentaron cada una de las microalgas; en los resultados observaron diferencias en la velocidad de crecimiento, con especies más pequeñas que crecen más rápido que las microalgas de mayor tamaño. Para el caso de *Tetraselmis gracilis*, está presentó aumento en el volumen celular comparado con las demás microalgas.

Por otro lado, diferentes autores han trabajado con especies de microalgas, de las cuales ya se conoce su capacidad de producir metabolitos. Buscando potencializar esta característica, Niño et al. (2017), enfocaron su estudio en determinar el mejor medio de cultivo y las condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*, teniendo en cuenta la influencia de diferentes factores como el pH, temperatura, agitación, aireación, CO₂ e iluminación, que favorecen el crecimiento celular, al darle un ambiente óptimo a la microalga, más la utilización de tres medios de cultivos, determinando así que las variables mencionadas tienen gran influencia, tanto en crecimiento poblacional, como en producción de pigmentos.

5. Materiales y métodos

5.1. Área de Estudio

Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Departamento de Biología y el Centro de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba CINPIC, ubicado en Montería - Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son

Latitud Norte: 8° 47' 16.01" Longitud Oeste: 75° 51' 28.08" Oeste (Fig. 4), a una altitud de 18 metros sobre el nivel del mar y precipitación promedio 1230 mm anuales.

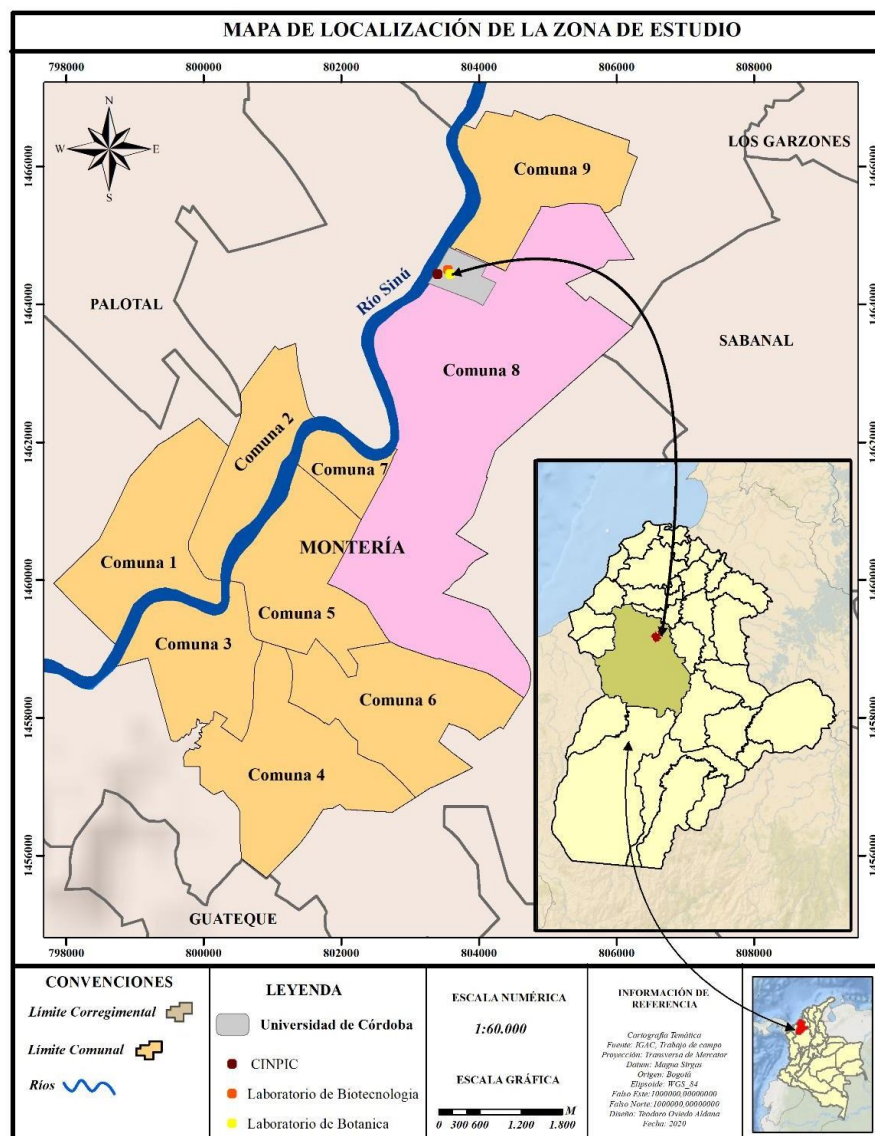


Figura 4. Ubicación de la Universidad de Córdoba (Aldana, 2020).

5.2. Condiciones de trabajo

La cepa inicial fue suministrada por el semillero de investigación de Planctología la Universidad de Córdoba. Se inocularon muestras en tubos de ensayo utilizando

5 mL de medio f/2 Guillard al 25% de salinidad, se realizaron conteos en cámara Neubauer cada 48 horas y con agitación manual diaria, hasta obtener una densidad celular óptima para la posterior siembra. Todos los tratamientos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de temperatura a 28°C.

5.3. Preparación del medio de cultivo

Tetraselmis gracilis fue cultivada f/2 Guillard a 25 % de salinidad. Este medio se preparó según lo propuesto por Guillard (1973) (Tabla 1), modificado según los requerimientos.

Tabla 1. Componentes del medio f/2 Guillard (1995)

1. Nutrientes mayores	Fórmula	Cantidad en 1 litro de agua de mar
Nitrato de sodio	NaNO ₃	75 mg
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 mg
Silicato de sodio metasoluble	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	15 – 30 mg
2. Metales traza		
Edta disódico	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	4.36 mg
Cloruro férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 mg
sulfato cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 mg
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 mg
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 mg
Cloruro de manganeso	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 mg
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006 mg
3. Vitaminas		
Tiamina hidroclorehidrica	C ₁₂ H ₂₇ ClN ₄ O ₈	0.1 mg
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.5 µg
Cianocobalamina(B ₁₂)	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ P	0.5 µg

5.4. Montaje del experimento

El experimento estuvo constituido por tres tratamientos, uno control con

fotoperiodo 24:0, fotoperiodo 8:16, y 12:12, cada uno con tres replicas, para un total de nueve unidades experimentales (Fig. 5). En cada frasco de 250 mL, fue sembrado un mismo inóculo (2mL), en fase exponencial, donde la concentración fue previamente determinada (15320 cel/mL de *Tetraselmis gracilis*).

Se sembró un volumen de 150 mL de medio F/2 Guillard en condiciones controladas de temperatura °C, PH y fotoperiodo 8:16, 12:12, no olvidando el tratamiento control (24:0). El fotoperiodo se controló mediante un temporizador marca Master Clear.



Figura 5. Unidades experimentales del cultivo de *Tetraselmis gracilis*

5.5. Determinación del crecimiento poblacional

Los conteos se realizaron durante 480 horas (20 días), puesto que al realizar el pre ensayo correspondiente se pudo conocer el tiempo de las diferentes fases de crecimiento del cultivo de *T. gracilis*, y el tiempo requerido para llegar a la fase final, donde no se observó más crecimiento del cultivo sino declinación. Estos

conteos se realizaron cada 48 horas desde el inicio del cultivo, utilizando la cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad (Fig. 6) y un microscopio óptico marca Olympus. Se graficaron las curvas de crecimiento poblacional, se calculó la tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación diaria (TD), según las siguientes ecuaciones propuestas por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_0)}{T_f - T_0} \quad TD = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

N_0 = Número inicial de células

N_f = Número final de células

T_0 = tiempo inicial

T_f = tiempo final

μ = Constante de crecimiento

- Densidad celular

Número de células /mL = (Numero de células en 0,1 mm³) (10000)

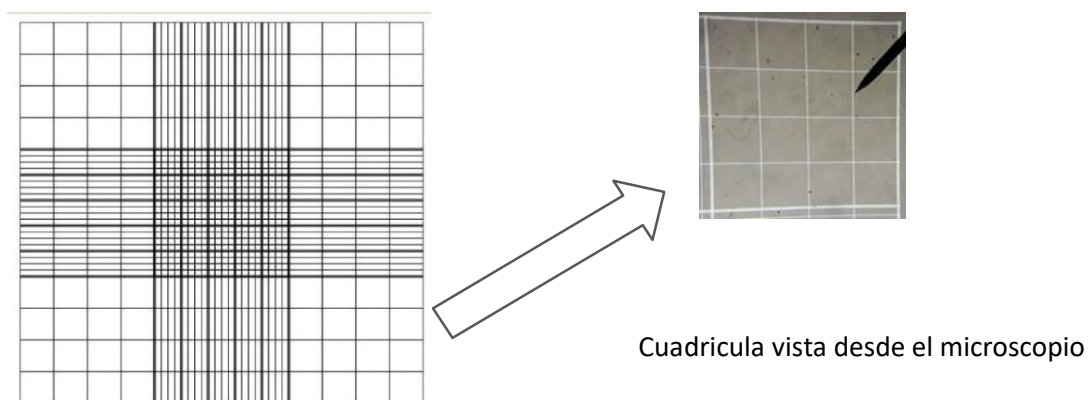


Figura 6. Representación esquemática del conteo en cámara Neubauer (Tomado y modificado de González, 2019)

5.6. Determinación de carotenos

Para la extracción de carotenos se utilizó el protocolo de García (2012) usando

una mezcla de acetona: metanol 2:1 (v/v) y se cuantificó por espectrofotometría. Se procedió a centrifugar 5 mL de biomasa de cada uno de los tratamientos a 3000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió 5 mL de solvente al pellet resultante, se guardó en congelación durante 24 horas a 4°C para una completa extracción.

Transcurridas las 24h se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 5 minutos, se obtuvo un sobrenadante el cual fue utilizado para la lectura a través de un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10vis a longitudes de onda: de 480 nm (carotenos). La longitud de onda de los carotenoides es muy variada desde 430 a 480 nm (betacaroteno es de 478 nm y alfa caroteno 473 nm) (Davies, 1976). El blanco utilizado fue la mezcla del solvente. Para la cuantificación total de los carotenoides totales se utilizó la curva de calibración con su respectiva ecuación realizada en Excel. Algunas fases del procedimiento se pueden observar en la (fig. 7).

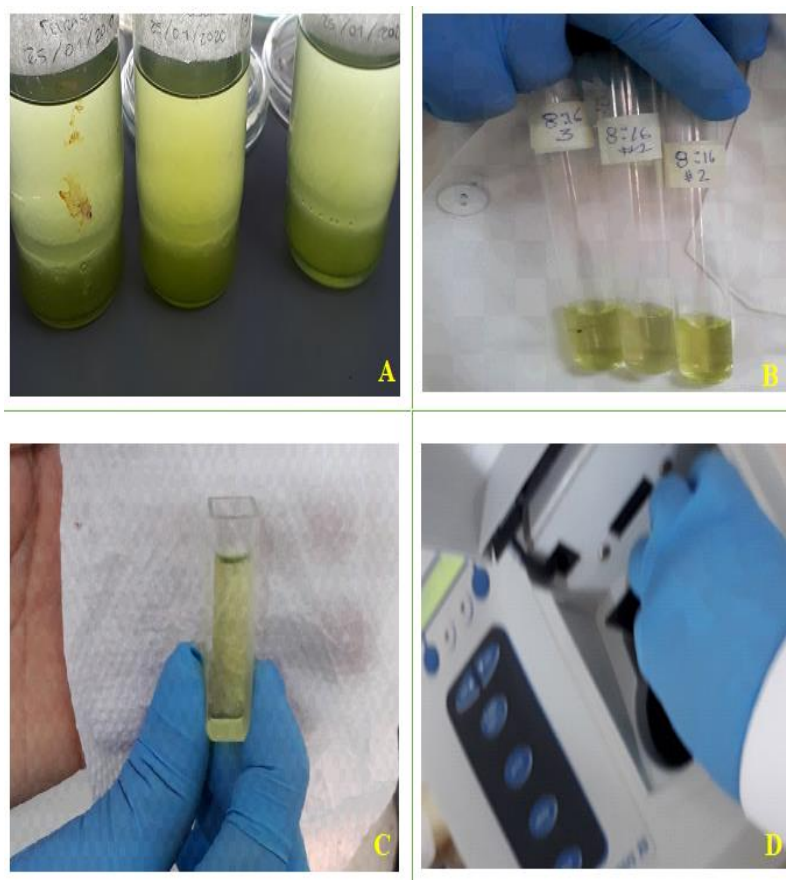


Figura 7. Proceso de lectura de carotenoides. A) Cultivo Tetraselmis, B) Muestras para procesar, C) Adición de alícuota para lectura en espectrofotómetro, D) Lectura.

5.7. Morfología

El volumen celular de la microalga de *Tetraselmis gracilis* se determinó según lo propuesto por Hillebrand et al. (1999). Se tomó la muestra en un porta objeto, y se llevó al microscopio para la toma de fotografías (Fig. 8) utilizando un equipo Leica dm 500 con cámara fotográfica incorporada Leica ICC50W, proporcionado por el laboratorio del Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). Para las mediciones se utilizó un software encargado del procesamiento de imágenes cell ^ B Image (3.0). Para obtener las mediciones de volumen (m^3) se midieron 25 células por réplica del tratamiento en cada fase de crecimiento. Para el procesamiento de los datos obtenidos de las mediciones

celulares, se asumió la forma de célula elipsoide según las observaciones realizadas, y los modelos de Hillebrand et al. (1999) para esta especie, y se usó la ecuación correspondiente.

$$V = (\pi/6) \cdot d^2 \cdot h$$

Dónde: V = volumen celular; $\pi = 3.14$; d = diámetro de la célula; h = altura de la célula.

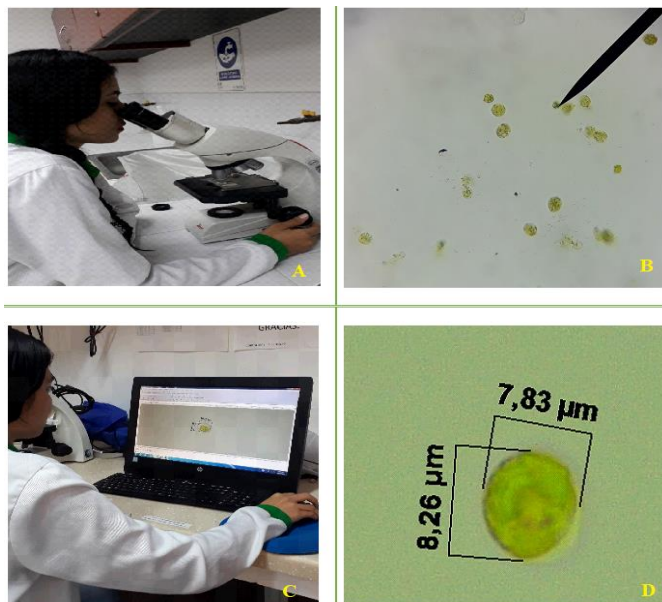


Figura 8 Montaje para la medición de células de *Tetraselmis gracilis*. A) Montaje de la muestra B) Observación de Células, C) Utilización del software, D) Células con sus respectivas medidas.

5.7. Análisis estadísticos

Los datos registrados fueron tabulados en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2019, para luego ser procesados en el programa estadístico Statgraphics Centurión 16.103 versión español. Se realizaron los supuestos de normalidad para las variables de densidad celular y contenido de carotenoides, haciendo una comprobación de la normalidad de los datos y homocedasticidad de sus varianzas (prueba de Shapiro-Will y test de Bartlett).

Posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un

nivel de significancia de 0.05, para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con fotoperiodos (8:16, 12:12) y el cultivo control con luz constante, también se utilizó el software estadístico R Project Versión 1.0.153., para los análisis estadísticos de los parámetros de crecimiento (tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación), para verificar si existían diferencias significativas entre los tratamientos.

6. Resultados

La microalga *Tetraselmis gracilis* creció en los diferentes fotoperiodos, estos se mantuvieron en igualdad de condiciones de temperatura y exposición lumínica (45w); como se ha demostrado en otras investigaciones, microalgas del género *Tetraselmis* tienen la capacidad de crecer bajo diferentes condiciones de luz e incluso en diferentes medios de cultivo, siempre y cuando se mantenga la temperatura (Hernández & Velasco, 2014).

6.1. Determinación del crecimiento poblacional de *Tetraselmis gracilis*.

La densidad celular de *Tetraselmis gracilis* fue evaluada en tres tratamientos de fotoperiodo 8:16, 12:12 y 24:0, tomando este último como el control, fueron sembrados con un inóculo inicial de $15,320 \text{ cel/mL}^{-1}$ en promedio. Los distintos tratamientos alcanzaron su fase estacionaria a las 288 horas. En la figura 9, se puede observar la curva de crecimiento de *Tetraselmis gracilis*. La densidad celular de *Tetraselmis* desde las 48 horas hasta las 288, mostró variaciones entre un tratamiento y otro (Tabla 2), el mayor promedio de células lo presentó el fotoperiodo 24:0 en el transcurso de las 240 – 288 horas, lo cual corresponde al final

de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria, ya desde esta fase el tratamiento 8:16 alcanza un máximo de 597,958 cel/mL⁻¹; manteniendo los mayores valores hasta la fase final de crecimiento.

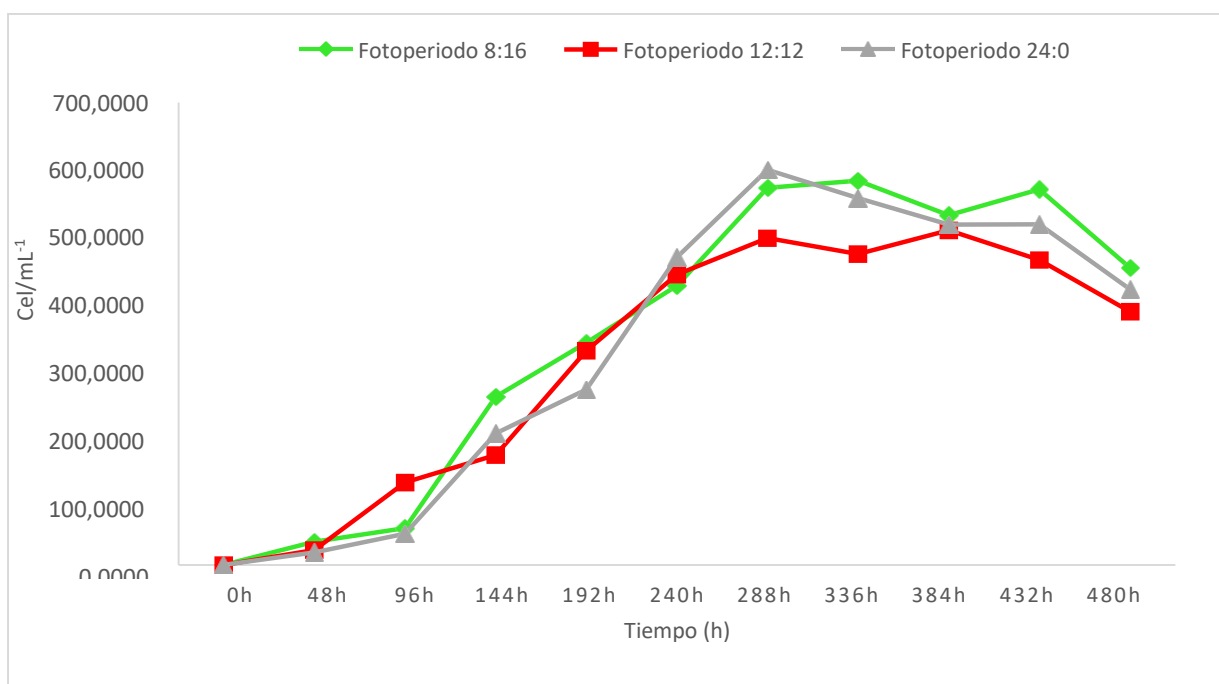


Figura 9. Curvas de crecimiento poblacional de la microalga *Tetraselmis gracilis* sometida a condiciones de fotoperiodos 8:16, 12:12 y 24:0.

Tabla 2. Valores promedio de densidad celular (cel/ mL⁻¹) en un periodo de 480 horas.

Horas	Fotoperiodo 8:16	Fotoperiodo 12:12	Fotoperiodo 24:0
0	15320	15320	15320
48	34969	22813	18750
96	55729	125063	47167
144	254667	166313	198833
192	336208	324417	265,00
240	422500	439354	465625
288	570521	494583	597958
336	581279	470708	555208
384	529146	506667	515000
432	568333	461667	515500
480	449167	383583	416833

6.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación

Los parámetros cinéticos de crecimiento, evidencian los cambios específicos en la velocidad y la división celular por la exposición a los diferentes tratamientos (fotoperiodos) en función del tiempo. Tanto la tasa de crecimiento como el tiempo de duplicación, fueron estimados a partir de las 96 horas hasta un periodo de 480 horas, como se muestra en la Tabla 3, debido a que en las primeras horas del cultivo la microalga se encontraba en fase de adaptación.

Tetraselmis gracilis presentó una tasa de crecimiento específico y duplicación diaria muy similar entre los diferentes tratamientos como se puede identificar en la tabla 3, al realizar los supuestos para evaluar la normalidad para los diferentes fotoperiodos se pudo determinar que estos seguían una distribución normal, se realizó un Análisis de Varianza de una Vía (ANOVA) , el cual arrojó que no se

presentaban diferencias significativas entre los tratamientos con un p - valor de 0,9003, y un 95% de confianza (Anexo 1).

Sin embargo, al realizar los análisis estadísticos para la tasa de crecimiento específico este arrojó que existían diferencias significativas entre los tratamientos entre las 432 y 480 horas del cultivo (Anexo 2).

Tabla 3. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación del medio de cultivo de *Tetraselmis gracilis* en los 3 diferentes fotoperiodos. $\pm$ representa la desviación estándar.

k (dia⁻¹)			
Horas	Fotoperiodo 8:16	Fotoperiodo 12:12	Fotoperiodo 24:0
96	3,618 $\pm$ 0,781	4,156 $\pm$ 1,223	3,823 $\pm$ 0,823
144	5,367 $\pm$ 0,495	5,065 $\pm$ 0,264	5,270 $\pm$ 0,127
192	5,776 $\pm$ 0,355	5,745 $\pm$ 0,234	5,565 $\pm$ 0,321
240	6,004 $\pm$ 0,132	6,053 $\pm$ 0,223	6,126 $\pm$ 0,147
288	6,249 $\pm$ 0,078	6,167 $\pm$ 0,260	6,377 $\pm$ 0,159
336	6,373 $\pm$ 0,219	6,130 $\pm$ 0,198	6,310 $\pm$ 0,021
384	6,338 $\pm$ 0,3174	6,220 $\pm$ 0,239	6,252 $\pm$ 0,149
432	6,336 $\pm$ 0,153	6,128 $\pm$ 0,234	6,238 $\pm$ 0,321
480	6,101 $\pm$ 0,234	5,943 $\pm$ 0,457	6,133 $\pm$ 0,322
Td (div/dia⁻¹)			
96	0,197 $\pm$ 0,036	0,176 $\pm$ 0,043	0,181 $\pm$ 0,003
144	0,130 $\pm$ 0,011	0,137 $\pm$ 0,007	0,132 $\pm$ 0,002
192	0,120 $\pm$ 0,007	0,121 $\pm$ 0,005	0,125 $\pm$ 0,002
240	0,115 $\pm$ 0,002	0,115 $\pm$ 0,004	0,113 $\pm$ 0,003
288	0,111 $\pm$ 0,001	0,113 $\pm$ 0,005	0,109 $\pm$ 0,001
336	0,109 $\pm$ 0,004	0,113 $\pm$ 0,004	0,110 $\pm$ 0,002
384	0,110 $\pm$ 0,006	0,111 $\pm$ 0,034	0,111 $\pm$ 0,001
432	0,109 $\pm$ 0,007	0,113 $\pm$ 0,037	0,111 $\pm$ 0,010
480	0,114 $\pm$ 0,012	0,117 $\pm$ 0,033	0,113 $\pm$ 0,003

6.3. Estimación de la Concentración de Carotenoides en *Tetraselmis gracilis*

La tendencia de concentración de carotenoides totales fue mayor en la fase exponencial de los tratamientos con fotoperiodo 8:16 y 12:12 con valores de 5,004 g mL⁻¹ y 2,957 µg mL⁻¹ respectivamente, mientras que en el tratamiento control la mayor concentración se presentó en la fase estacionaria (figura 10).

Los resultados indican que la cantidad de carotenoides fue dependiente del suministro de la exposición lumínica, ya que a medida que aumentaban las horas luz en el fotoperiodo, así mismo, se incrementó la producción de pigmentos en fase exponencial y en la fase final del cultivo.

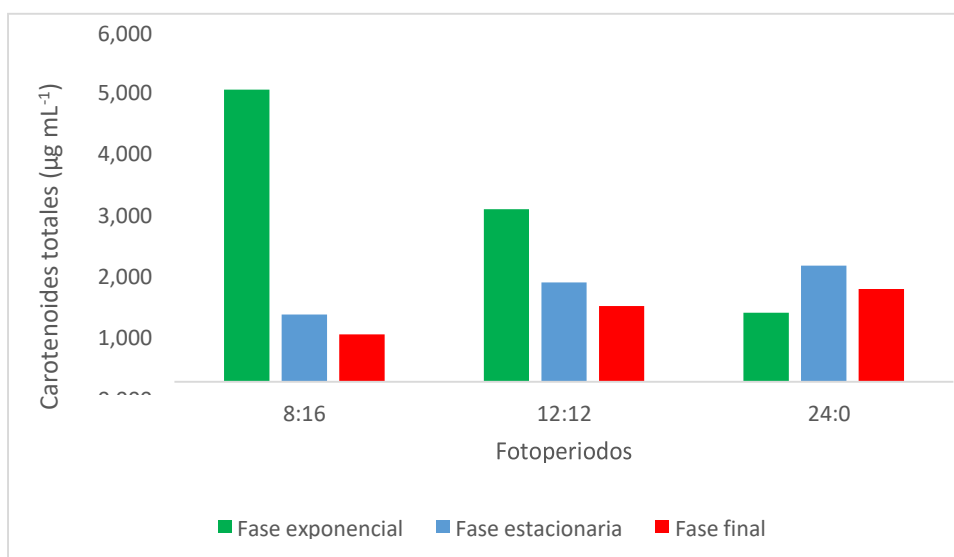


Figura 10. Producción de carotenoides totales por fase de crecimiento celular en *Tetraselmis gracilis* sometida a diferentes fotoperiodos.

Después de realizar los supuestos para evaluar la normalidad de la concentración de carotenoides totales se obtuvieron valores de P-Valor > 0,05 indicando que los datos seguían una distribución normal, es decir que los datos se pueden modelar de forma simétrica, se realizó un ANOVA de Fisher para determinar si existían

diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, encontrando como resultado con un 95% de confianza de que existían diferencias significativas en la concentración de carotenoides totales entre los tratamientos (Anexo 3).

6.4. Morfología de *Tetraselmis gracilis*

La microalga *Tetraselmis gracilis* sometida a diferentes fotoperiodos presentó diferencias en los tamaños en los tres tratamientos y diferentes fases del crecimiento (Fig. 11). La longitud celular fue mayor en el tratamiento control, es decir, se encontraron células más largas al compararlas con los demás tratamientos durante la etapa estacionaria y final del cultivo (Tabla. 4). El diámetro adquirido por las células también presentó un comportamiento similar en la fase estacionaria y final del ensayo, puesto que este aumentó a medida que la exposición de horas se incrementaba en los tratamientos. Sin embargo, para una mayor comprensión e interpretación de estas variaciones, fue hallado el volumen celular (μm^3) debido a que este agrupa las medidas anteriores permitiendo abarcar una forma de dimensión más real de las células.

Tabla 4. Descripción del tamaño promedio de las células de las microalgas en los diferentes fotoperiodos y fases de crecimiento del cultivo.

Fotoperiodo	Fase exponencial		Fase estacionaria		Fase final	
	Longitud	Ancho	Longitud	Ancho	Longitud	Ancho
8:16	9,95 $\pm$ 1,00)	8,66 ($\pm$ 0,94)	8,17 ($\pm$ 0,44)	7,42 ($\pm$ 0,38)	8,46 ($\pm$ 0,45)	7,68 ($\pm$ 0,50)
12:12	9,95($\pm$ 1,02)	8,66 ($\pm$ 0,97)	8,45 $\pm$ (0,48)	7,91 ($\pm$ 0,53)	8,66 ($\pm$ 0,51)	8,09 ($\pm$ 0,56)
24:0	9,44 ($\pm$ 1,41)	7,916 ($\pm$ 1,46)	9,64 ($\pm$ 1,05)	9,15 ($\pm$ 1,13)	10,05 ($\pm$ 1,49)	9,44 ($\pm$ 1,56)

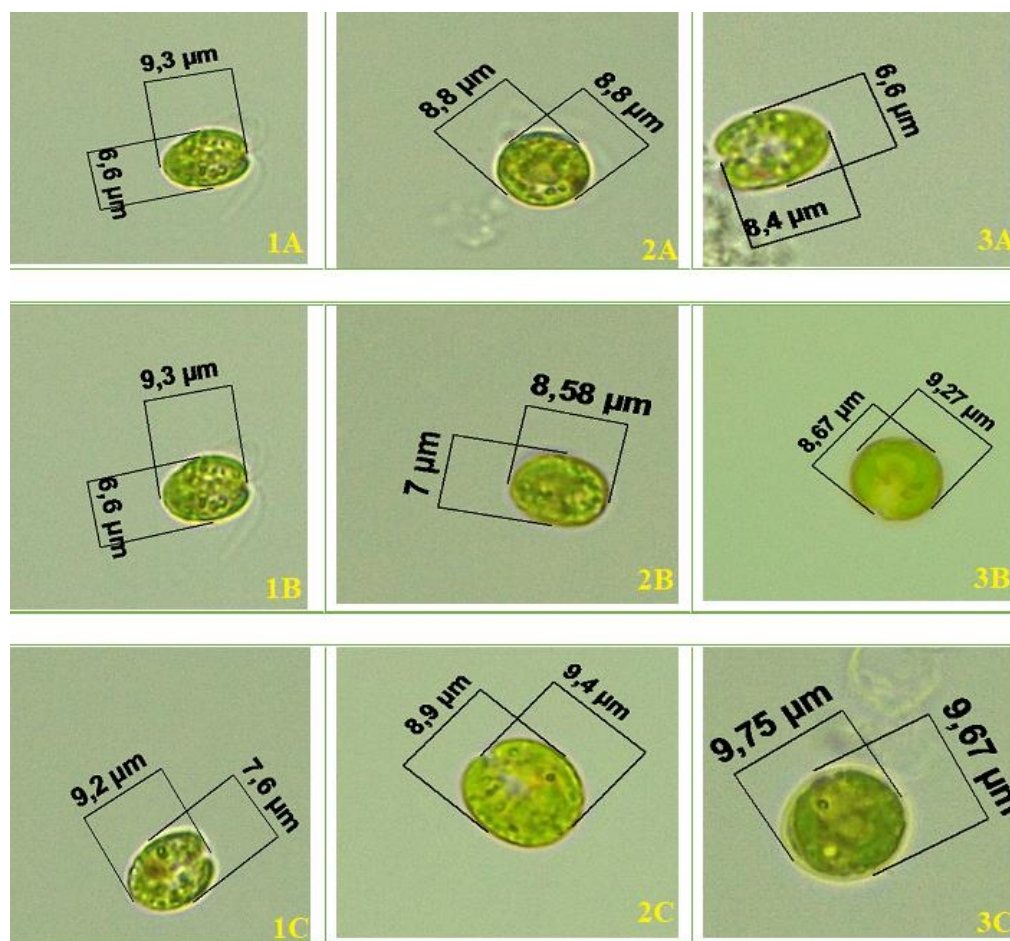


Figura 11. Mediciones celulares de *Tetraselmis gracilis* en las diferentes fases del crecimiento y fotoperiodos. 1 fase exponencial, 2 fase estacionaria y 3 fase final, (A, B, C) y fotoperiodos 8:16, 12:12 y 24:0 respectivamente. Fotografía: Gómez y Pérez, 2019.

Los fotoperiodos 8:16 y 12:12 presentaron los mayores volúmenes celulares en la fase exponencial, a diferencia del fotoperiodo 24:0 el cual presentó un comportamiento totalmente diferente a los otros dos tratamientos al transcurrir las fases del cultivo (Fig. 12).

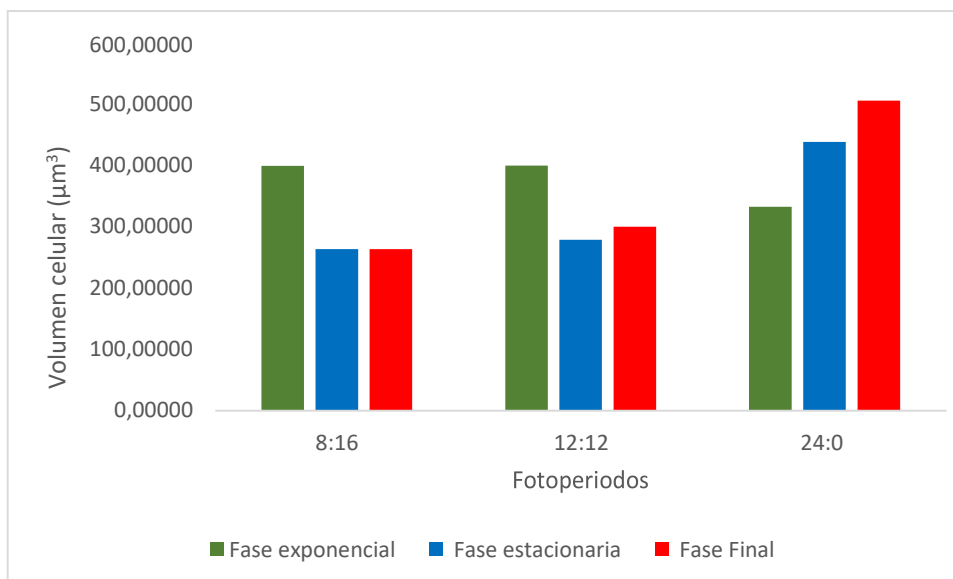


Figura 12. Volumen celular de las células de *Tetraselmis gracilis* en las diferentes fases de crecimiento

7. Discusión

7.1. Crecimiento Poblacional

El crecimiento en las microalgas en algunos casos se ve afectado por diferentes variables como es el caso del fotoperiodo donde algunas microalgas presentan mayor crecimiento que otras, en este estudio se pudo demostrar que el sometimiento a fotoperiodos influyó en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis gracilis* la cual obtuvo una tasa de crecimiento específico alta en los diferentes tratamiento solo se pudo identificar diferencias significativas entre los tratamientos en las horas 432 y 480 horas del cultivo (Anexo 2), mientras que en las demás horas no, ya que el comportamiento entre estos tratamiento fue similar. Este resultado difiere con Zevallos (2018) quien en sus resultados obtuvieron una tasa de crecimiento específico mayor con luz constante en un cultivo bentónico de la microalga *Tetraselmis striata*. Pero concuerdan que la

variable de fotoperiodo es indispensable para el adecuado crecimiento y realización de sus funciones fisiológicas de las microalgas. Como se puede ratificar con Molina et al. (1996) quienes en sus resultados demostraron que la luz debe ser suministrada continuamente porque representa la fuente de energía para la fotosíntesis e influye directamente en el crecimiento y metabolismo microalgal.

Así mismo, los resultados pueden ser comparados con la investigación que realizó Humprey (1979), quien a partir del estudio del crecimiento de diferentes microalgas entre esas *T. striata*, determinó que la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal, ya que cuando crecieron en un ciclo 12 h luz: 12 h oscuridad comparado con cultivos expuestos a iluminación continua quedo evidenciado que la iluminación continua favoreció el crecimiento.

7.2. Concentración de Carotenoides

El fotoperiodo tuvo una incidencia significativa en la concentración de carotenoides totales en *Tetraselmis gracilis* en los distintos tratamientos, se pudo evidenciar que el fotoperiodo 8:16 presentó la mayor concentración de carotenoides totales en la fase exponencial o de crecimiento, seguido por los fotoperiodos 12:12 y 24:0, demostrando que en esta fase la microalgas disponen de energía para la producción de metabolitos secundarios, los resultados de esta investigación presentan similitud con la realizada por Gorgonio et al. (2013) quienes obtuvieron una producción de carotenoides por parte de *Tetraselmis gracilis* de $2,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ sus resultados concuerdan con los obtenidos en este

estudio en la terminación de la fase exponencial de los fotoperiodos 12:12 y 24:0.

El estrés que ocasiono los fotoperiodos prolongados a los que fue sometida la microalga, afectó la concentración de pigmentos en *Tetraselmis gracilis* ya que al estar sometida a un tiempo de más horas luz esta redujo su concentración de pigmentos por el estrés ocasionado. Este efecto concuerda con los resultados obtenidos por Mora et al. (2004) quienes indicaron que las células de microalgas del *Chlorella sp* a bajas intensidades lumínicas incrementaron la concentración de clorofila de forma significativa en comparación a cuando fueron expuestas a intensidades lumínicas altas.

Por otra parte, los resultados obtenidos coinciden con la investigación realizada por Loreto et al. (2003), quienes evaluaron la producción de pigmentos y proteínas en un organismo con características diferentes pero demostrando así que al ser autótrofos pueden presentar algunas similitudes en sus procesos fisiológicos dando resultados como los que obtuvieron con la cianobacteria *Anabaena* en relación a la irradiación obteniendo valores significativos en los resultados en la concentración de carotenos en fase estacionaria, En este estudio dos de los tratamientos obtuvieron valores elevados entre el final de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria.

La adaptación de las microalgas a variaciones extremas en la intensidad de luz, es decir, a luz y sombra, es un fenómeno muy conocido y caracterizado por cambios en el contenido intracelular de pigmentos, generalmente acompañados en cambios en la respuesta fotosintética y en la composición bioquímica (Abalde *et al.*, 1995). Soeder & Stengel (1974) distinguen dos tipos de reacciones adaptativas. La más

frecuente caracterizada por una relación inversa entre la intensidad de luz a la que está expuesta el alga y su contenido en pigmentos. El otro tipo, muestra una relación directa entre la intensidad de luz a la que está expuesta el alga y las actividades o concentraciones de pigmentos. En esta investigación al analizar los resultados se pudo observar que *Tetraselmis gracilis* presenta una relación directa entre el contenido de pigmentos y el aumento de las horas luz en la fase exponencial y final del cultivo.

7.3. Cambios Morfológicos

El volumen de las células expuestas a un fotoperiodo de luz constante presentó un comportamiento totalmente distinto a los demás fotoperiodos 8:16 y 12:12, ya que se observó un aumento de volumen celular al transcurrir las fases del cultivo, es decir, las células aumentaban de tamaño; en los otros dos fotoperiodos los mayores volúmenes celulares se presentaron en la fase exponencial, resultados que no coinciden con la investigación de Gorgonio et al. (2013). Ellos utilizaron la microalga *Tetraselmis gracilis*, el mismo medio y fotoperiodo 24:0 reportando medidas celulares muy diferentes a las obtenidas en la investigación en los diferentes tratamientos. Al comparar los resultados del fotoperiodo de luz constante de las dos investigaciones, se refleja que hay una gran diferencia ya que en los resultados de esta investigación se obtuvo un promedio de longitud inferior al obtenido en la investigación de estos investigadores. Con respecto a valores referente al ancho celular, si fueron semejantes. Todas estas diferencias pueden haberse presentado posiblemente ya que el espacio en el que se cultivaron las microalgas, ya que en este estudio se trabajó con 150 mL y los autores con volúmenes de 20L.

Los volúmenes alcanzados por los otros dos tratamientos se asemejan más a los reportados por otros autores como la investigación de Borges et al. (2010) quienes utilizaron fotoperiodos iguales a 8:16 y 12:12 ratificando de esta manera que las microalgas sometidas a largos periodos de incidencia de luz afectan su morfología, como se pueden ver en el aumento de su tamaño celular lo cual no sucede con fotoperiodos intermitentes.

8. Conclusiones

El tratamiento con fotoperiodo 8:16 mostró mejores valores de densidad celular al final de la fase del cultivo.

Los parámetros cinéticos de crecimiento, evidenciaron que no se presentaron cambios específicos en la velocidad y la división celular de la microalga durante las fases de crecimiento del cultivo sometida a los diferentes fotoperiodos ya que los valores fueron similares entre ellos.

La producción de carotenoides en la microalga *Tetraselmis gracilis* fue mayor en el fotoperiodo 8:16 en la etapa de crecimiento exponencial comprobando así que es el fotoperiodo ideal para la producción de metabolitos secundarios, ya que es un equilibrio entre luz y oscuridad y por ende no genera un estrés a la microalga.

Los cambios morfológicos que se presentaron fue el aumento del volumen celular de las células de *Tetraselmis gracilis* en aquellos fotoperiodos con mayor intensidad de luz como fue el 24:0, seguido del 12:12.

Los resultados de este trabajo son un aporte para la información acerca del efecto de factores físicos como lo es la luz sobre las microalgas, además, contribuye

información acerca del potencial en producción de carotenoides por parte de la especie *Tetraselmis gracilis*.

9. Recomendaciones

Determinar si se obtienen resultados similares o iguales en otros medios de cultivos tanto orgánico, como inorgánicos.

Incluir más variables a analizar como la agitación constante del medio para mantener las células en movimiento.

Realizar el mismo montaje a mayor escala para determinar si los valores de carotenoides obtenidos son suficientes para una producción industrial

Ejecutar el mismo experimento, pero con otras especies del género de *Tetraselmis* para determinar si en este grupo se da el mismo comportamiento.

Buscar alternativas de extracción de metabolitos en las microalgas de forma orgánica para afectar menos el medio ambiente.

10. Referencias bibliográficas

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo Paredes, P., Torres, E., Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións. ISBN: 978-84-97497-69-5. DOI: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Andersen, R. A. (2013). The Microalgal Cell. En A. Richmond & Q. Hu (Eds.), Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology (Segunda, p. 719). Nueva Delhi: Wiley Blackwell.
- Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228–237. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.2.8641556>
- Barreto Hernández, A., & Velasco, L. A. (2014). Aislamiento y cultivo de microalgas bentónicas del Caribe colombiano bajo diferentes condiciones de temperatura. *Intropica*, 9(1794-161X), 23–32. <https://doi.org/10.21676/23897864.1422>
- Beltrán-Cediel, Y. K., Quiñones-García, A. M., & Vargas, J.(2017). Sistema De Automatización Para El Control De Las Condiciones Ambientales En Cultivo De Microalga Chlorella. *Revista Ciencia, Ingeniería y Desarrollo Tec Lerdo*. Núm.:3 ISSN: 2448-623X.
- Bolaños, E. R. A. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14(1). <https://www.researchgate.net/publication/266730483>
- Borges-Campos, V., Barbarino, E., & Lourenço, S. de O. (2010). Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos

estanques. *Ciência Rural*, 40(2), 309–317. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010005000009>

Butcher, R. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters.

Part I: Introduction and Chlorophyceae. Minist. Agric. Fish. *Food, Fish. Invest. Great Britain*.

Carvajal, A., Cadena, M., Molina, D., Romero, P., Gavilanez, F., & Morales, E. (2013).

Cultivo de una cepa carotenogénica de *Chlorococcum* sp.(Chlorophyta: Chlorococcales) aislada de rizosfera de *Vicia faba* (haba). *Acta Botánica Venezuelica*, 36(2), 309–324.

Davies, B. (1977). Carotenoids in higher plants. In *Lipids and lipid polymers in higher plants* (pp. 199–217). Springer.

Dávila Villafana, E. Q., & Dávila Villafana, R. R. (2016). *Efecto de tres concentraciones de 5, 10 y 15 mL L⁻¹ de extracto acuoso de lodo de la bahía “El Ferrol” en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos totales, de la microalga Tetraselmis suecica en condiciones de laboratorio*. [Tesis de Pregrado].

<http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3162>

Flores, C. C., Peña, M., Bernardo, L., & Olivia, R. (2003). Avances en el diseño

conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8), 450–456.

García Romeral, J., Pavía Gómez, M., García Sanz, T., Chirivella Martorell, J., & Serrano

Aroca, Á. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis*, 9, 115–130.

- García, S., & Pérez, R. (2012). *Aspectos analíticos sobre la determinación de compuestos carotenoides en microalgas mediante cromatografía de líquidos con detector de diodos*. Editorial Ciemat.
- González Céspedes, A. (2015). ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. *ADN Agro*, 1–11.
- Gorgônio, C. M. da S., Aranda, D. A. G., & Couri, S. (2013). Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. *Natural Science*, 05(07), 783–791. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.57094>
- Guillard, R. R., Kilham, P., & Jackson, T. A. (1973). kinetics of silicon-limited growth in the marine diatom *thalassiosira pseudonana* hasle and heimdal (cyclotella nana hustedt) 1, 2. *Journal of Phycology*, 9(3), 233-237.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollingher, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(79\)90034-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(79)90034-0)
- Lavine, P. L. S. (2000). *Nitrogênio orgânico intracelular: Extração, papel fisiológico e acumulação por microalgas marinhas, em cultivos estanques* [Tesis Doctoral].

- López Elías, J. A., García Lagunas, N., Jiménez Gutiérrez, L. R., & Huerta Aldaz, N. (2009). Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. *Biocencia*, 11(1), 11–18.
- Lorenzo Rodríguez, M. (2018). *Efecto del contaminante bisfenol A a distintas temperaturas, sobre la microalga marina Tetraselmis suecica* [Tesis].
<http://hdl.handle.net/2183/21321>
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., & Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana. Botánica*, 60(2), 83–89.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432003000200001>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock biología de los microorganismos* (10th ed.). Pearson educación.
- Malgas. 2013. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. AST Ingeniería S.L. 70
- Marín, V., Rodríguez, L., Vallejo, L., Fuenteseca, J., & Oyarce, E. (1993). Efectos de la surgencia costera sobre la productividad primaria primaveral de Bahía Mejillones del Sur (Antofagasta, Chile). *Revista Chilena de Historia Natural*, 66(4), 479–491.
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186–202.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>

- Meléndez Martínez, A., Vicario Romero, I., & Heredia Mira, F. (2007). *Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas*. 57.
https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/26236/file_1.pdf?sequen
- Moestrup, Ø. (2002). Phylum Prasinophyta. In *Freshwater Algal Flora of the British Isles* (pp. 281–286). Cambridge University Press.
- Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J., Sánchez Pérez, J., & García Camacho, F. (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59–69. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00144-1)
- Niño Castillo, C. M., Rodríguez Rivera, F. C., Díaz, L. E., & Lancheros Díaz, A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19–31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>
- Ong, A., & Tee, E. (1992). [14] Natural sources of carotenoids from plants and oils. In *Methods in enzymology* (Vol. 213, pp. 142–167). Elsevier.
- Parra, V., & Barajas, L. (2011). Pigmentos naturales: un futuro prometedor. *Ciencia Cierta. Revista de Divulgación Científica*, 28(20), 23–36.
- Pellón, A., Benítez, F., Frades, J., García, L., Cerpa, A., & Alguacil, F. (2003). Empleo de microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Revista de Metalurgia*, 39(1), 9–16.
<https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.i1.312>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro

- algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89–100.
- Provasoli, L., Yamasu, T., & Manton, I. (1968). Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(2), 465–478.
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15(1), 25–31.
- Ramaraj, R., Tsai, D. D.-W., & Chen, P. H. (2015). Biomass of algae growth on natural water medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.007>
- Reyes-González, G., & Franco-Correa, M. (2006). Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. *Universitas Scientiarum*, 11(2), 23-30.
- Romero, Y., Lodeiros, C., Esclapés, M., Marín, N., Guevara, M., & Morales, E. (2002). Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia*, 27(3), 104–109.
- Sánchez, A., FloresCotera, L. B., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G., & Sanchez, S. (1999). Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(3), 175–192.
- Santizo, I. (2004). Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. *Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Guatemala*, 25–29.

- Silva, J., Vásquez, V., & Merino, F. (2011). Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 13–23.
- Villa, A., Herazo, D., & Torregroza, A. C. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (clon ccal) en cultivos estáticos. *Intropica*, 111–117.
<http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1438>
- Wijffels, R. H., Kruse, O., & Hellingwerf, K. J. (2013). Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.004>
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1), 17–26. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>
- Zevallos Feria, S. (2018). Influencia del fotoperíodo sobre *Tetraselmis striata* (Chlorodendraceae) en sistema de cultivo bentónico. *The Biologist*, 15(2).
<https://doi.org/10.24039/rtb2017152197>

11. Anexos

Anexo 1.

Análisis para crecimiento

Pruebas de Normalidad para FOTOPERIODO 8_16

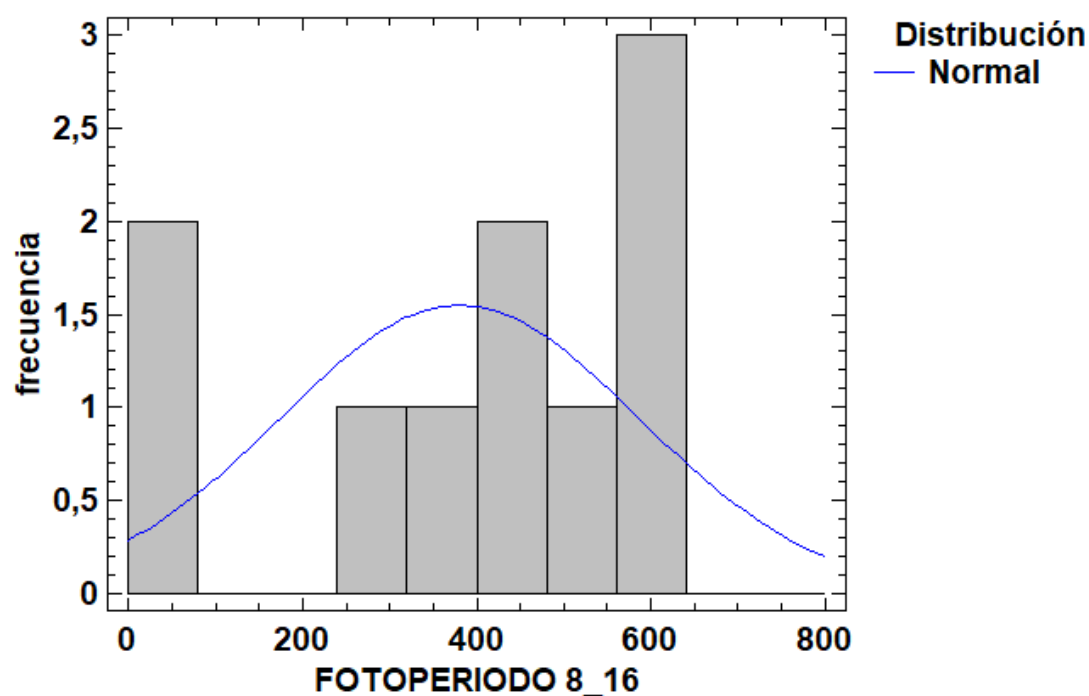
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,866809	0,0878098

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si FOTOPERIODO 8_16 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que FOTOPERIODO 8_16 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para FOTOPERIODO 8_16



Pruebas de Normalidad para FOTOPERIODO 12_12

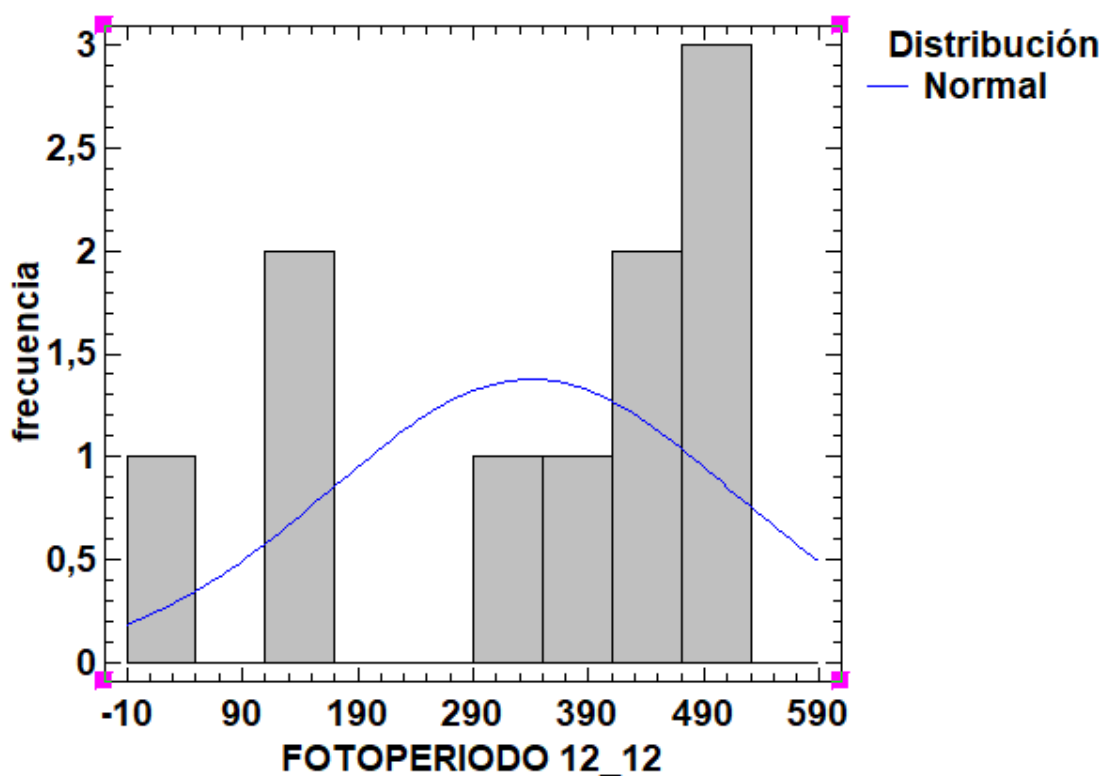
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,860947	0,0751146

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si FOTOPERIODO 12_12 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que FOTOPERIODO 12_12 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para FOTOPERIODO 12_12



Pruebas de Normalidad para FOTOPERIODO 24_0

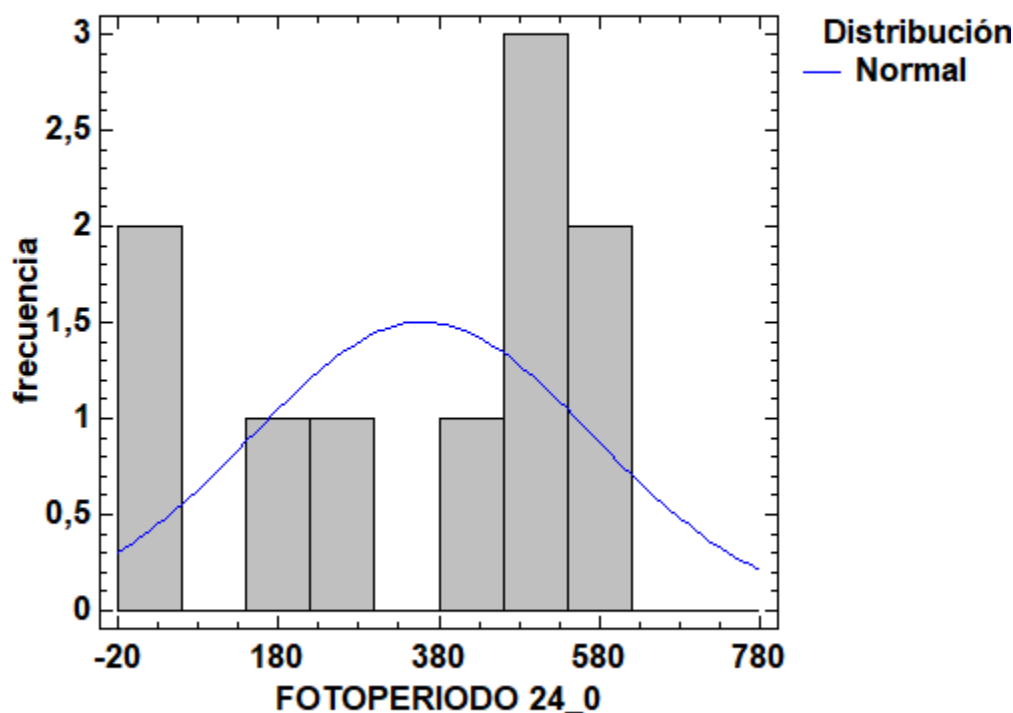
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,889202	0,158324

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si FOTOPERIODO 24_0 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que FOTOPERIODO 24_0 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para FOTOPERIODO 24_0



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,01498	0,825931

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
FOTOPERIODO 8_16 / FOTOPERIODO 12_12	206,274	174,02	1,40505	0,6206
FOTOPERIODO 8_16 / FOTOPERIODO 24_0	206,274	212,535	0,941943	0,9305
FOTOPERIODO 12_12 / FOTOPERIODO 24_0	174,02	212,535	0,670399	0,5609

El StatAdvisor

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 3 columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8297,15	2	4148,57	0,11	0,9003
Intra grupos	1,06203E6	27	39334,3		
Total (Corr.)	1,07032E6	29			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,10547, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

ANOVA Gráfico para FOTOPERIODO 8_16

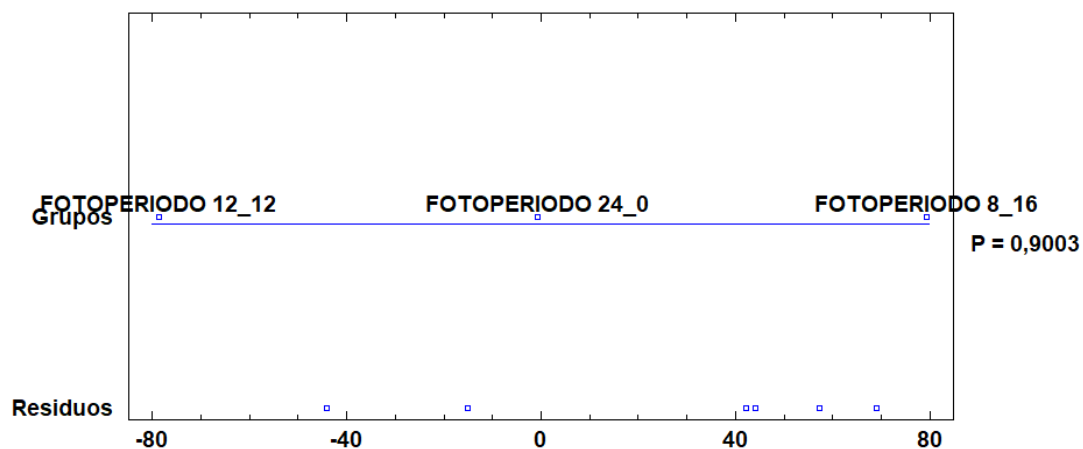
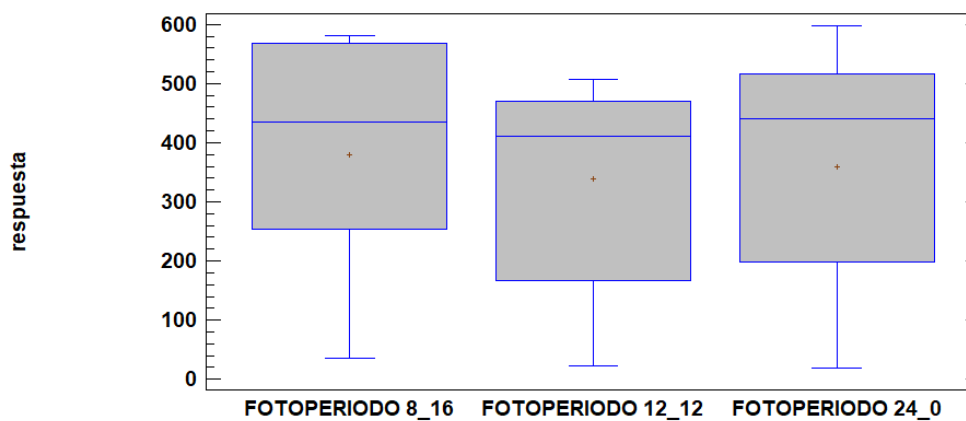


Gráfico Caja y Bigotes



Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FOTOPERIODO 12_12	10	339,517	X
FOTOPERIODO 24_0	10	359,637	X
FOTOPERIODO 8_16	10	380,252	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FOTOPERIODO 8_16 - FOTOPERIODO 12_12		40,7351	181,988

FOTOPERIODO 8_16 - FOTOPERIODO 24_0		20,6145	181,988
FOTOPERIODO 12_12 - FOTOPERIODO 24_0		-20,1206	181,988

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 2.

Análisis estadístico para la tasa de crecimiento específico entre tratamientos en R.

Tiempo	FC	valor_p	Alfa	Resultados
96 horas	0.4194	0.740483585	0.05	No Significativo
144 horas	0.8929	0.456988141	0.05	No Significativo
192 horas	0.8468	0.479979235	0.05	No Significativo
240 horas	0.5596	0.646099539	0.05	No Significativo
288 horas	1.4975	0.236793333	0.05	No Significativo
336 horas	2.1320	0.118613246	0.05	No Significativo
384 horas	0.3209	0.810173000	0.05	No Significativo
432 horas	120386.2704	0.000000000	0.05	Significativo
480 horas	8.2494	0.000433933	0.05	Significativo

Anexo 3.

Análisis para carotenoides totales

Pruebas de Normalidad para TOTAL CAROTENOS 8_16

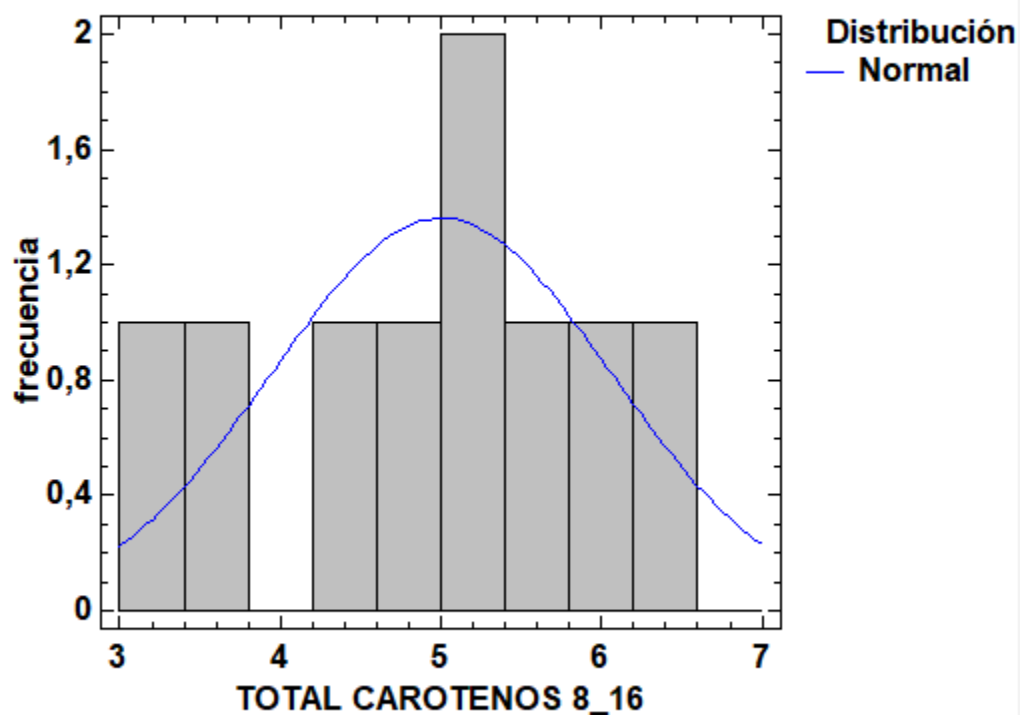
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,956388	0,753681

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si TOTAL CAROTENOS 8_16 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que TOTAL CAROTENOS 8_16 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para TOTAL CAROTENOS 8_16



Pruebas de Normalidad para TOTAL CAROTENOS 12_12

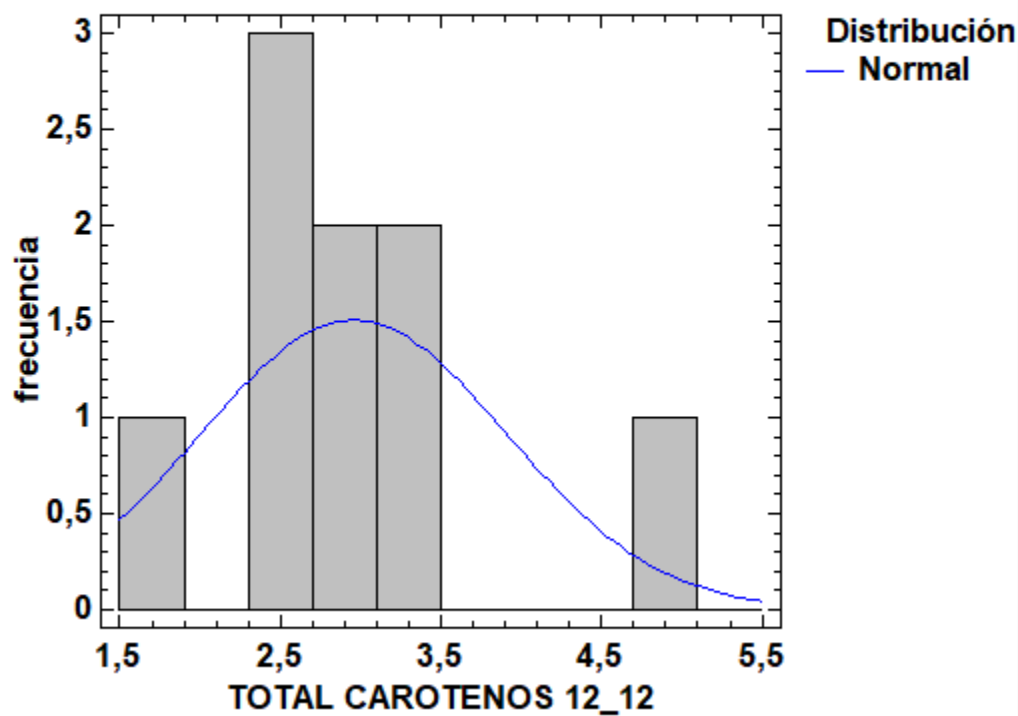
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,900245	0,249107

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si TOTAL CAROTENOS 12_12 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que TOTAL CAROTENOS 12_12 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para TOTAL CAROTENOS 12_12



Pruebas de Normalidad para TOTAL CAROTENOS 24_0

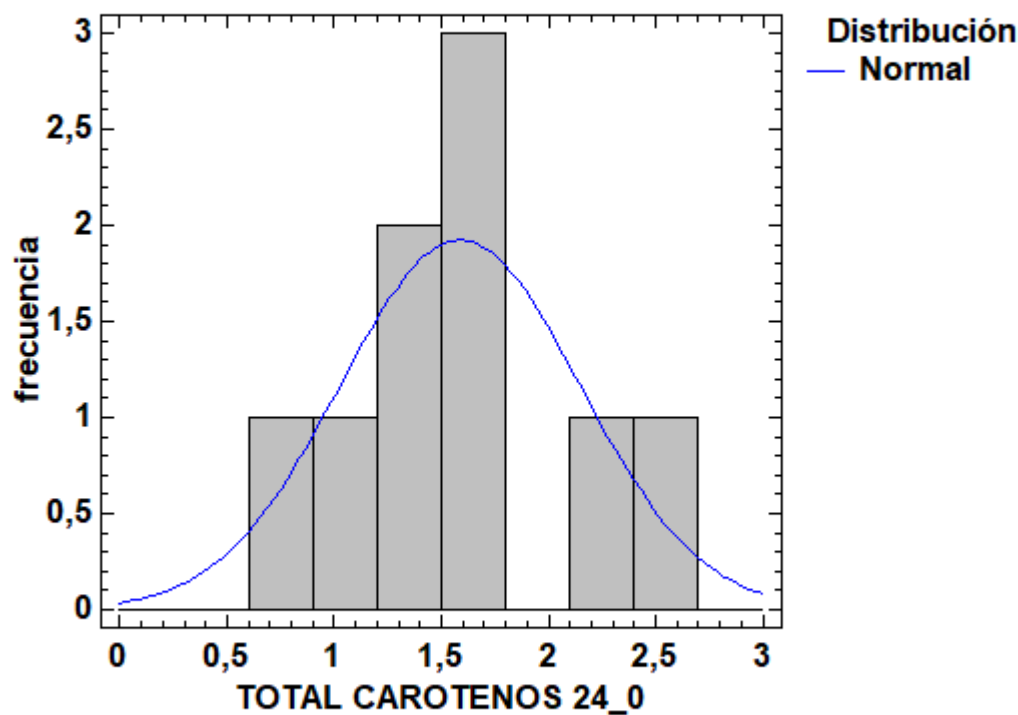
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,98869	0,992548

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si TOTAL CAROTENOS 24_0 puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que TOTAL CAROTENOS 24_0 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Histograma para TOTAL CAROTENOS 24_0



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,14142	0,222298

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
TOTAL CAROTENOS 8_16 / TOTAL CAROTENOS 12_12	1,0548	0,952663	1,22592	0,7803
TOTAL CAROTENOS 8_16 / TOTAL CAROTENOS 24_0	1,0548	0,55987	3,5495	0,0920
TOTAL CAROTENOS 12_12 / TOTAL CAROTENOS 24_0	0,952663	0,55987	2,89537	0,1538

El StatAdvisor

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 3 columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

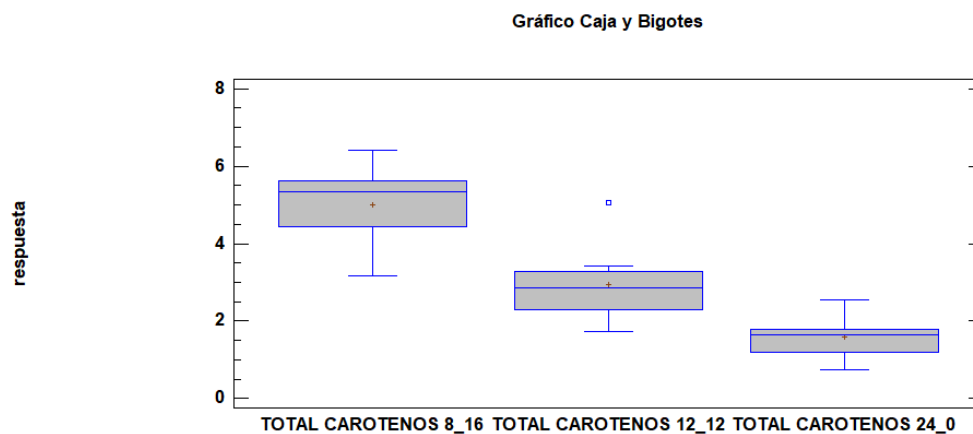
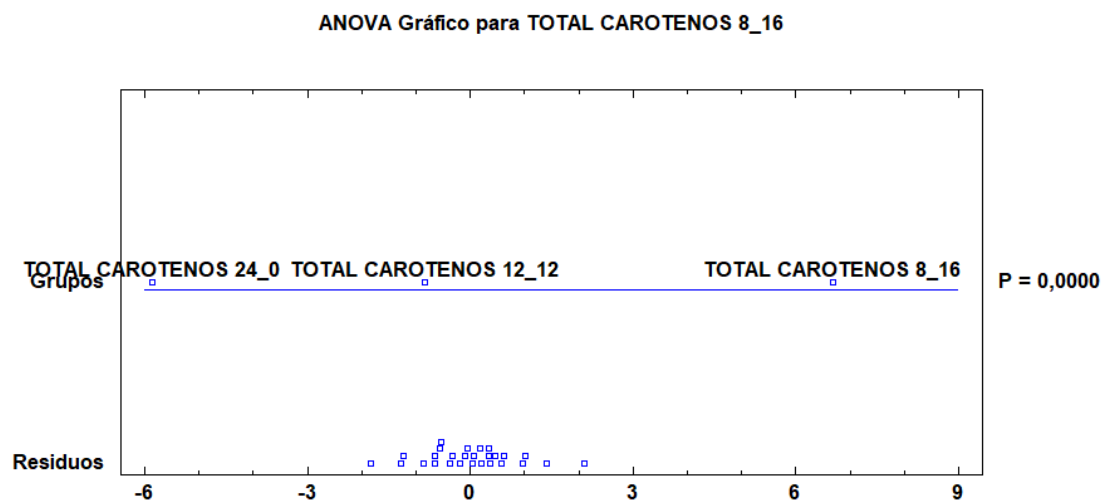
La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0,05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	53,2076	2	26,6038	34,20	0,0000
Intra grupos	18,669	24	0,777876		
Total (Corr.)	71,8766	26			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 34,2006, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.



Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TOTAL CAROTENOS 24_0	9	1,58778	X
TOTAL CAROTENOS 12_12	9	2,95678	X
TOTAL CAROTENOS 8_16	9	5,004	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
TOTAL CAROTENOS 8_16 - TOTAL CAROTENOS 12_12	*	2,04722	0,8581
TOTAL CAROTENOS 8_16 - TOTAL CAROTENOS 24_0	*	3,41622	0,8581
TOTAL CAROTENOS 12_12 - TOTAL CAROTENOS 24_0	*	1,369	0,8581

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

