



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS



**Rol de los metabolitos secundarios del alga
Chondracanthus chamissoi (C. Agardh)
Kützing 1843, en la inducción del
asentamiento primario de larvas de mitílidos
de importancia comercial en Chile**

POR MACARENA FERNANDA PINILLA VELÁSQUEZ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de
la Universidad de Concepción para optar al grado de Magister en Cs.
mención Botánica

Profesor Guía: Dr. José Becerra Allende

Profesor co-guía: Dr. Eduardo Tarifeño Silva

Concepción-Chile, 2020

Página oficial de Firmas:

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

Rol de los metabolitos secundarios del alga *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing
1843, en la inducción del asentamiento primario de larvas de mitílidos de importancia comercial
en Chile

Profesor Guía

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Profesor Co-guía



Nombre y Grado (s) Académico (s)

Ha sido aprobada por la Siguiete Comisión evaluadora

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Directora de Programa

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Dedicatoria

Este arduo trabajo quiero dedicárselo con todo el corazón a mi madre, Grisol Velásquez y a todas las mujeres de mi familia, porque me han enseñado que pese a la adversidad una jamás debe rendirse. A todas esas mujeres que cada día y en distintos rincones del mundo, luchan por sus sueños pese a que el sistema quiera comérselas vivas.

Quiero también aprovechar estas líneas para también dedicar este trabajo a mi tío Iván, que, pese a que ya no está con nosotros en este plano material, sé que estaría muy feliz.



Agradecimientos

A los docentes y tutores del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, especialmente a mis profesores guías; Dr. Víctor Hernández y Dr. José Becerra, a la directora del Programa; Dra. Fabiola Cruces y también a cada docente de las asignaturas cursadas durante el proceso académico del Magister.

Al equipo del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, quienes siempre me brindaron su amistad, y compartieron conmigo sus conocimientos y momentos que atesoraré siempre en mi mente.

Al Dr. Eduardo Tarifeño y Dra. Alejandra Llanos, por permitirme participar en el Proyecto FONDEF IDeA 2016-ID16110154 y por financiar parte mi investigación.

A ANID (ex CONICYT) por la Beca de Magister Nacional 2018 22180888.

A mi querida Dra. María Eugenia Casanueva, quien durante todo el proceso de alguna u otra forma siempre tuvo un consejo para brindarme y siempre me incentivó a jamás rendirme.

A Claudio, Konny, Maryori, Matías y Miguel pues sin su ayuda durante este proceso, seguramente aún estaría dando vueltas en círculos. A mis queridas/os chinos, especialmente a Salem quien se la jugó por mí en un momento tan difícil.

A Felipe Millacura, porque fue gracias a ti pejelagarto, que volví a creer en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	5
1. Relación ecológica entre mitílidos y algas	5
2. Metabolitos producidos por algas y su rol en el asentamiento de invertebrados marinos.....	7
Antecedentes	11
a) Observación de terreno, Iquique 2017.....	11
b) Experimento en terreno, Proyecto FONDEF ID1610154.....	12
<i>Chondracanthus chamissoi</i>	13
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
1. Objetivo General.....	15
2. Objetivos Específicos.....	15
METODOLOGÍA.....	16
1. Muestreo del alga <i>Chondracanthus chamissoi</i>	16
2. Extracción de metabolitos	17
a) Extracción por maceración.	17

b) Extracción en sistema Soxleth.....	17
c) Extracción en Agua.....	18
3. Experimento <i>in vitro</i> con extractos totales de las macroalgas <i>Chondracanthus chamissoi</i> y <i>Capreolia implexa</i>	18
3.1 Análisis por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa (GC-MS)	22
3.2 Categorización de larvas post-ensayo	23
4. Experimento en terreno con mallas impregnadas con distintos tipos de extractos obtenidos de la macroalga <i>Chondracanthus chamissoi</i>	24
4.1. Procesamiento de las mallas	26
4.2. Clasificación de semillas.....	28
5. Análisis Estadístico	29
RESULTADOS.....	30
1. Experimento <i>in vitro</i> con extractos totales de las macroalgas <i>Chondracanthus chamissoi</i> y <i>Capreolia implexa</i>	30
2. Experimento en terreno con mallas impregnadas con distintos tipos de extractos obtenidos de la macroalga <i>Chondracanthus chamissoi</i>	39
2.1.....	39
Identificación taxonómica.....	39
2.2. Datos de conteo.....	41
2.3. Análisis estadístico	45
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ingreso de semillas de mejillón chileno al mercado mitilicultor (Fundación Chile, 2017).....	2
Tabla 2: Resumen datos obtenidos. Categorías: larvas vivas, larvas muertas y total de larvas (Promedios y desviación estándar asociada)	33
Tabla 3: Resumen datos obtenidos. Categorías: larvas asentadas, larvas posadas y larvas muertas (Promedios y desviación estándar asociada)...	33
Tabla 4: Resumen de datos sin valores atípicos. Categorías: larvas vivas, larvas muertas y total de larvas (Promedios y Errores estándar asociados)	35
Tabla 5: Resumen de datos sin valores atípicos. Categorías: larvas asentadas, larvas posadas y larvas muertas (Promedios y desviación estándar asociada).	35
Tabla 6: Resumen de datos obtenidos.	42
Tabla 7: Análisis estadístico modelo inicial.....	50
Tabla 8: Interpretación de los coeficientes obtenidos para cada tratamiento modelo inicial.	51
Tabla 9: Resultados comparación de AIC.....	52
Tabla 10: Resultados test <i>Xi Cuadrado</i>	53
Tabla 11: Análisis estadístico modelo optimizado.	55
Tabla 12: Interpretación de los coeficientes obtenidos para cada tratamiento modelo optimizado.....	57

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Fotografías de las muestras de <i>Chondracanthus chamissoi</i> Iquique 2017.....	11
Figura 2: Fotografías del proceso de montaje del experimento en terrero.....	26
Figura 3: Procesamiento de mallas. a) Malla extraída después del experimento en terreno.....	27
Figura 4: Etapas del montaje experimental.....	30
Figura 5: Muestras de choro zapato expuestas a tinción en rojo neutral.....	32
Figura 6: Distribución de datos por categoría y tratamiento.....	34
Figura 7: Porcentajes de número promedio de individuos obtenidos para las categorías vivas/muertas.....	36
Figura 8: Porcentajes de número promedio de individuos obtenidos para las categorías asentadas/posadas/muertas.....	37
Figura 9: Cromatograma extracto total <i>C. chamissoi</i>	38
Figura 10: Compuestos identificados via GC-MS en el extracto total.....	39
Figura 11: Mitílidos extraídos desde las mallas utilizadas en el experimento. ..	40
Figura 12: Individuos de la especie <i>Mytilus galloprovincialis</i> obtenidos del experimento realizado.....	40
Figura 13: Individuos de la especie <i>Semimytilus algosus</i> obtenidos del experimento realizado.....	40
Figura 14: Individuos de la especie <i>Choromytilus chorus</i> obtenidos del experimento realizado.....	41
Figura 15: Distribución de especies presentes en cada tratamiento.....	44
Figura 16: Distribución de tamaño de los individuos presentes en cada	

tratamiento.....	44
Figura 17: Distribución de tamaño de los individuos presentes por especie.....	45
Figura 18: Gráfica de frecuencia de cantidad de mitílidos por tratamiento	48
Figura 19: Ecuación general del Modelo lineal Generalizado	49
Figura 20: Comparación entre el modelo inicial (A) y el modelo optimizado (B).	55
Figura 21: Ajuste del Modelo Inicial.	55



RESUMEN

La mitilicultura comúnmente depende de semillas silvestres capturadas de bancos naturales y su escasez afecta la producción comercial de mejillones. Dado que el interés por las aplicaciones biotecnológicas de las algas marinas aumenta en países costeros, este trabajo evalúa el uso de extractos de la macroalga roja *Chondracanthus chamissoi* (comúnmente conocida como "chicoria de mar") como posible inductor del asentamiento primario de larvas de mitílidos. Se observó que esta alga tiene en su ambiente natural interacción con diversos mitílidos. Así, se prepararon extractos del alga de diferente polaridad y se utilizaron en dos experimentos; uno cuyo objetivo era evaluar la toxicidad y la influencia en el proceso de asentamiento en larvas de *Choromytilus chorus* del extracto total del alga en condiciones *in vitro* y otro experimento *in vivo* donde se indujo el asentamiento de larvas de tres especies diferentes de mitílidos, siendo estas *Mytilus galloprovincialis*, *Semimytilus algosus* y *Choromytilus chorus*. Este es un método prometedor que puede usarse para inducir el asentamiento de larvas de mitílidos en mar abierto, aprovechando la relación ecológica natural entre el alga roja *C. chamissoi* y las diversas especies de mejillones presentes en la costa chilena.

Palabras claves: Macroalgas, Rhodophyta, inductores de asentamiento, mitílidos.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura chilena de mitílidos, impulsada por la producción de mejillones (comúnmente conocidos como “choros”) ha tenido un fuerte repunte en los últimos diez años llegando a convertirse en la segunda actividad acuícola de importancia país, solo después de la salmonicultura (Musquiz, 2017)

El 2015, el total de producción de mejillones cultivados a nivel mundial se estimó en dos millones de toneladas por año (Fundación Chile, 2017). De la cantidad anterior, China produce aproximadamente el 50%, destinando casi su totalidad a consumo doméstico. En Chile, la Industria mitilicultora establecida en la Región de Los Lagos ha presentado en la última década un importante crecimiento en volumen de producción, pasando de una producción de 60.708 toneladas en el año 2003 a un total de 283.300 toneladas en 2015, alcanzando un volumen de exportación de 69.499 toneladas (Mejillon de Chile, 2015). Es por lo anterior que Chile se ubica en el cuarto lugar de países con mayor producción de mejillones del mundo, siendo gran parte de la producción de mejillones chilenos exportada al mercado Europeo, incluyendo Rusia, y otros países sudamericanos (*The European market for mussels | GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2019)

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes para este sector de producción es la notable disminución en el abastecimiento de post larvas o semillas (estado juvenil de los mitílidos). Entre los años 2011 y 2013, por ejemplo, se observaron disminuciones de hasta un 14% en el volumen de extracción (Subsecretaria de Pesca y Acuicultura, 2014) (Ver Tabla 1).

Tabla 1: Ingreso de semillas de mejillón chileno al mercado mitilicultor (Fundación Chile, 2017)

Años	2001 al 2005	2006 al 2010	2011 al 2014
Promedio anual de ingreso de semillas (toneladas)	14 622	64 666	55 560

El 100% de las semillas utilizadas para el proceso de crecimiento y engorda son obtenidas mediante captación desde el medio natural, principalmente entre los meses de octubre y marzo (Plaza *et al.*, 2005). Esto se traduce en una problemática debido a la limitación y variabilidad de la disponibilidad ofrecida por la naturaleza y a la falta de estudios enfocados en conocer el comportamiento y dinámica de la distribución de larvas y semillas en las áreas utilizadas para cultivo (Holmberg, 2012).

Existen una serie de hipótesis acerca de las posibles variables que inciden en la drástica disminución larval, sin embargo, debido a la falta de información sostenida en el tiempo de distintos parámetros ambientales (García, 2012) éstas no se encuentran comprobadas al momento de desarrollo de esta tesis. Oliva (2015) logró identificar en el marco del estudio *“Valorización Económica para Modelo de Gestión de Centros Semilleros de Mejillón en base a Pago por Servicio Ambiental”*, algunos factores que influirían en la baja de la captación de semillas según la percepción de los entrevistados en su estudio (siendo estos distintos actores de la cadena de valor de la industria de mitílidos), factores mencionados a continuación:



1.- Ciclos Naturales: ciclos de baja productividad originados por distintos factores propios de los cambios cíclicos del ecosistema.

2.- Presencia de Salmoneras: el impacto de actividades de control de enfermedades realizado por salmoneras podría tener incidencia sobre los cultivos de mitílidos y la captación de semillas.

3.- Factores bio-oceanográficos: principalmente relacionado con la disponibilidad de alimento (fitoplancton) y asociado a cambio en los patrones de circulación de corrientes.

En este mismo estudio, es llamativo que los entrevistados no contemplaran la sobreexplotación de bancos naturales como una posible causa de desabastecimiento.

Esto plantea la necesidad urgente de buscar alternativas para incrementar de forma segura la oferta de semillas de mejillones necesarios para el desarrollo sustentable de la mitilicultura nacional.

Con motivo de aumentar el porcentaje de asentamiento larval y la metamorfosis sincrónica de moluscos marinos, así como contar con buenas cohortes de semillas en términos de cantidad y calidad, el uso de una gran variedad de inductores de asentamiento de larvas premetamórficas han sido ensayados, tales como biopelículas de origen microbiano (Bao *et al.*, 2006), agentes farmacológicos (Gansbiller, 2013), químicos orgánicos o inorgánicos (Murillo *et al.*, 2008) y macroalgas marinas (Alfaro *et al.*, 2006). Entender los factores que influyen en los procesos de asentamiento y metamorfosis es particularmente importante en la acuicultura de invertebrados marinos, pues permite optimizar los procesos de captación y producción de semillas y/o individuos juveniles (Carpizo-Ituarte, 2002; Dobretsov, 1999).

MARCO TEÓRICO

Relación ecológica entre mitílidos y algas

Los mitílidos (Mytilidae), conocidos comúnmente como mejillones (“choros” en Chile) son una familia de moluscos bivalvos de gran interés económico y gastronómico. Como otros bivalvos, son organismos filtradores que viven fijados al sustrato. Son exclusivamente marinos y viven tanto en zonas intermareales como zonas sumergidas de las costas de todo el mundo (Gosling, 2015). Inicialmente, las larvas premetamórficas de mejillón se asientan en una amplia variedad de sustratos, por ejemplo, rocas, superficies rugosas y duras (Cáceres-Martínez *et al.*, 1994; Petersen, 1984), cuerdas filamentosas (Kajihara & Oka, 1980; Ramírez & Cáceres-Martínez, 1999), conespecíficos (Cáceres-Martínez *et al.*, 1994; Petersen, 1984) y macroalgas (Bulleri *et al.*, 2006; Dobretsov, 1999; Eyster & Pechenik, 1987; Seed, 1969).

La asociación de mitílidos con algas (en su mayoría filamentosas) les proporciona a los primeros un medio de protección contra depredadores (Moreno, 1995), adaptación para evitar la intensa competencia con grupos adultos establecidos de las mismas o diferentes especies (Petersen, 1984) y para también evitar el “desalojo” por fuerzas hidrodinámicas (Alfaro *et al.*, 2004; Alfaro & Jeffs, 2002). Otro de los beneficios que las macroalgas proporcionan a los mejillones es

convertirse en sustrato para que las larvas experimenten la transición metamórfica desde el estado planctónico hacia lo bentónico. En el caso de las macroalgas de libre flotación, estas proporcionan un vehículo de transporte del mejillón a la orilla durante etapas tempranas del desarrollo (Alfaro *et al.*, 2006). No obstante, son pocos los estudios relacionados al beneficio directo proporcionado al alga en esta relación ecológica. Moreno (1995) propone, por ejemplo, que la presencia de pequeños moluscos (mejillones) proporcionaría para algunas macroalgas un medio de protección contra depredadores. Además, Mercado *et al.* (1998), demostró que la asociación de *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) con briozoos contribuiría a aumentar la tasa fotosintética de las macroalgas al aumentar la disponibilidad de CO₂ en el medio, infiriendo que la asociación de las algas con larvas de algunos invertebrados marinos pudiera generar el mismo efecto.

Las especies de Mytilidae con importancia comercial en Chile, (excluyendo islas oceánicas) son: la “cholga” (*Aulacomya atra*), “choro zapato” (*Choromytilus chorus*), “chorito” (*Mytilus chilensis* Hupé 1854) y “choro aracucano” (*Mytilus galloprovincialis*), este último encontrándose hace algunos años de forma natural en las costas de la Región del Biobío (36°S) y de la Región de Los Lagos (54°S) (Tarifeño *et al.*, 2005; Tarifeño *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2005), siendo recurrente observar estas especies convivan en los mismos sitios del intermareal rocoso chileno junto a macroalgas de la División Rhodophyta, entre otras (Camus & Andrade, 1999; Moreno, 1995; Soto *et al.*, 2012).

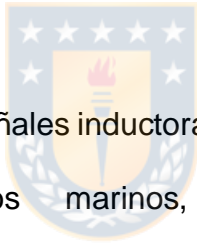
La asociación y coexistencia de estos bivalvos con las macroalgas podría responder a distintas razones ecológicas como las anteriormente mencionadas, sin embargo, el mecanismo de interacción es aún una situación que es difícil de dilucidar; mientras algunos autores plantean que las macroalgas serían, morfológicamente hablando, sitios ideales para los procesos de asentamiento primario y metamorfosis de las larvas premetamórficas de estos mitílidos, también existen autores que hablan de señales químicas que serían producidas por las macroalgas y que promoverían quimiotaxis en larvas premetamórficas de mitílidos e inducen su proceso de asentamiento primario.



Metabolitos producidos por algas y su rol en el asentamiento de invertebrados marinos

Desde una perspectiva ecológica, el asentamiento es considerado como una de las fases de colonización de hábitat por parte de organismos marinos con larvas planctónicas, fase que incorpora una etapa de fijación al sustrato y otra de metamorfosis (Harrold *et al.*, 1991; Keough & Downes, 1982). En este contexto, el asentamiento primario puede definirse como un proceso biológico iniciado con la búsqueda de un sustrato adecuado donde residir y terminado cuando la metamorfosis ha sido finalizada (Johnson *et al.*, 1991). En este proceso se pueden diferenciar dos fases: i) una primera fase de búsqueda de micrositios

adecuados, conocido como “asentamiento primario” y ii) una fase de fijación al sustrato, donde se desencadena la metamorfosis, es decir el “asentamiento secundario”. Esta proposición resulta de gran operacionalidad, ya que las respuestas conductuales y morfogenéticas descritas pueden ser desencadenadas por distintas señales químicas inductoras provenientes del medio externo (Coon *et al.*, 1990). Cabe mencionar que dichas respuestas son observables en larvas competentes, es decir, larvas que han completado su desarrollo y poseen la capacidad de responder a estímulos externos, tales como inductores del asentamiento (Bonar *et al.*, 1990)



Se ha demostrado que las señales inductoras externas estimulan el asentamiento en muchos invertebrados marinos, como el gastrópodo abalón (Morse & Morse, 1984), equinodermos (Pearce & Scheibling, 1990), cirrípedos, conocidos en Chile como “picorocos” (Wright & Boxshall, 1999), poliquetos (Toonen & Pawlik, 1996) y ostras (Turner *et al.*, 1994). Muchas de estas señales inductoras externas han sido descubiertas y estudiadas a partir de observaciones de asentamiento de larvas sobre distintos sustratos naturales (muchos de ellos macroalgas) y en términos generales actualmente podemos hablar de 2 tipos de inductores; naturales y artificiales (Rodríguez *et al.*, 1992).

Los inductores naturales son señales químicas que incluyen moléculas orgánicas y/o inorgánicas (Yang *et al.*, 2007), las cuales pueden ser secretadas por

conespecíficos (Matsumura *et al.*, 1998) u otros organismos que potencialmente proporcionarían información sobre el medio ambiente, tales como bacterias (Alfaro *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2006) o algas (Hayakawa *et al.*, 2007; Kitamura *et al.*, 1993; Steinberg & de Nys, 2002; Suenaga *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004; Trapido-Rosenthal & Morse, 1984; Williams *et al.*, 2008). Sin embargo, el estudio del rol de la ecología química de macroalgas ha sido escaso. Esto se debe a una serie de razones (Hadfield & Paul, 2001; Steinberg & de Nys, 2002) que incluyen cuestiones metodológicas como la dificultad para identificar, cuantificar y probar señales químicas para la colonización *in situ*, y su relación con experimentos y mediciones análogas realizadas, por ejemplo, para estudios de relación algas / herbívoros. De esta forma es más fácil estudiar de una manera ecológicamente significativa la interacción entre un alga marina, un erizo de mar adulto macroscópico y/o un herbívoro de larga vida, que la interacción entre esa alga marina y la larva microscópica, la cual es efímera y de producción esporádica (Hadfield & Paul, 2001).

Es así como en el abalón *Haliotis rufescens*, las señales para inducir el asentamiento se identifican como pequeños péptidos aún no caracterizados de aproximadamente 1000 Da de tamaño, siendo estas subunidades de proteínas más grandes asociadas con la superficie de algas coralinas crustosas (Morse & Morse, 1984). Otro ejemplo es el asentamiento y metamorfosis en larvas de erizo de mar australiano *Holopneustes purpurascens*, el cual se ve

beneficiado por la producción de histamina por parte del alga *Delisea pulchra* (Swanson *et al.*, 2004). *Marginisporum crassissima* y *Gelidium elegans* son dos especies de algas que también presentan un alto porcentaje de asentamiento para el caracol *Turbo (Batillus) cornutus*. Hayakawa *et al.* (2007), indicaron que es poco probable que la estructura de las algas sea el principal inductor de asentamientos; por lo tanto, la colonización de las larvas parece ser fuertemente inducida por los productos químicos de las dos especies de algas rojas.

Los estudios realizados en el mejillón azul (*Mytilus edulis*), por Dobretsov (1999), demostraron que la macroalga *Cladophora rupestris* era inductora del asentamiento de las larvas del mejillón mediante algún metabolito producido por esta alga. A una conclusión similar llegó Alfaro *et al.* (2006) con el mejillón verde (*Perna canaliculus*). Los resultados de los experimentos de asentamiento sugirieron que los productos químicos dentro de los extractos de algas que utilizaron (*Scytothamnus australis* y *Melanthalia abscissa*) estimularon el asentamiento primario de las larvas del mejillón. Yang *et al.* (2007), por otro lado, comprobó para *Mitilus galloprovincialis* que las especies de macroalgas *Chlorodesmis fastigiata* y *Ceramium tenerrimum* inducían asentamiento de larvas premetamórficas en condiciones donde se les había hecho un tratamiento para eliminar diatomeas y biofilms de la superficie de los talos.

Antecedentes

a) Observación de terreno, Iquique 2017

Durante el mes de noviembre del año 2017, al Laboratorio de Química de Productos Naturales en la Universidad de Concepción, llegó una muestra de alga del norte de Chile, colectadas en la zona portuaria de Iquique ($20^{\circ}12'30.9''S$ $70^{\circ}09'05.1''W$) el día 2 de noviembre de ese mismo año. Esta alga fue identificada por el Dr. Erasmo Macaya (UdeC) como *Chondracanthus chamissoi*, en cuyo talo venían fijadas una gran cantidad de semillas de mitílidos (Figura 1), las cuales fueron identificadas por el Dr. Eduardo Tarifeño (UdeC), como “choro zapato” (*Choromytilus chorus*).

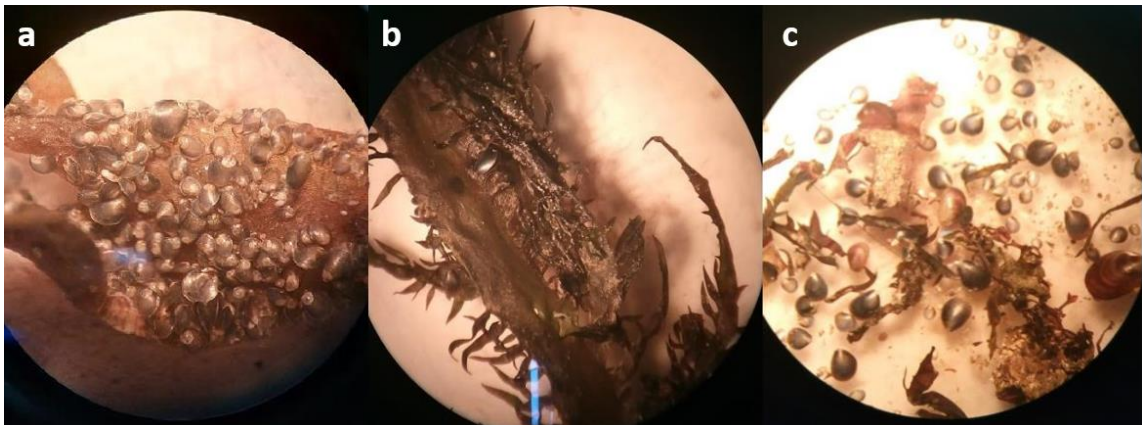


Figura 1: Fotografías de las muestras de *Chondracanthus chamissoi* Iquique 2017. a) Talo cubierto por post- larvas de mitílidos. A: 20x. b) Talo en proceso de limpieza. Post-larvas extraídas con pinzas y luego colectadas para su posterior identificación. A: 15x. c) Variedad de post-larvas obtenidas durante la limpieza de los talos. A: 15x.

Esta observación fue relevante para la elección de la especie con la que se trabajó en esta tesis, al igual que las observaciones y resultados de los experimentos realizados por Godoy (2020).

b) Experimento en terreno, Proyecto FONDEF ID1610154.

Durante el mes de Diciembre 2017, en el contexto de las actividades realizadas para cumplir con los objetivos de la tesis de pregrado “*Asentamiento primario de semillas de Mitílidos en algas rojas (Rhodophyta)*” de la estudiante de Biología Marina de la Universidad de Concepción Konny Godoy, se montó un experimento de terreno que consistió en poner cajas de mallas, con algas de distintas especies de la División Rhodophyta (géneros *Corallina*, *Callophyllis*, *Pyropia*, *Mazzaella*, *Chondracanthus* y *Capreolia*) en las líneas de cultivo de un centro de cultivo de mitílidos ubicado en la Bahía de Coliumo, Región del Biobío. Luego de un mes, las algas fueron recolectadas y llevadas al Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción para ser analizadas y así observar el posible asentamiento de post-larvas de mitílidos de la zona. Se determinó que 2 especies de las 6 algas en estudio mostraron una alta utilidad en cuanto a captación de larvas con un porcentaje de entre un 33-43% de semillas por volumen de alga *Capreolia implexa*, entre un 31-36% de semillas por volumen de alga, *Chondracanthus chamissoi*.

Los resultados obtenidos en este experimento de terreno demuestran la capacidad de inducción del asentamiento de larvas de mitílidos en las algas Rhodophytas, lo cual abre interesantes perspectivas para identificar posibles compuestos o moléculas orgánicas presentes en el alga roja que posean acción inductora en el asentamiento de mitílidos (Godoy, 2020).

Chondracanthus chamissoi

La Chicorea de Mar (*Chondracanthus chamissoi*) es un alga roja endémica de la costa templada del Pacífico Sur y se distribuye desde Piura, Perú, hasta Chiloé, Chile (Figueroa, 2005). Habita en zonas rocosas del intermareal y submareal. Se describe como una especie que posee resistencia por su forma de fijación al sustrato, y que además presenta flexibilidad y firmeza. Las fases gametofíticas y tetraesporofíticas se encuentran presentes al mismo tiempo (Riofrío, 2013).

Esta especie se caracteriza por presentar un talo membranáceo de 6 a 45 cm de altura. Su color varía de un verde oscuro a un marrón rojizo, o casi negro. Está constituido generalmente por varios ejes axiales cilíndricos en la base y divididos subdicotómicamente, que derivan de un disco basal pequeño. Las ramificaciones son dísticas o pinnadas, abundantes, las ramas laterales son de diferente tamaño y longitud (Vidal & O’Ryan, 2015). Crece adherida a rocas y conchas, mediante un pequeño disco de fijación. Se multiplican a través de esporas o por

fragmentación de sus propias ramificaciones (Ortiz, 2011). Presenta un ciclo de vida isomórfico y trifásico, con alternancia de gametofitos (dioicos) y tetrasporofitos erectos.

Dado los antecedentes expuestos, se propuso trabajar con la macroalga Rhodophyta *Chondracanthus chamissoi* por su evidente relación con el proceso de asentamiento de larvas de mitílidos.



HIPÓTESIS

Extractos orgánicos de *Chondracanthus chamissoi* promueven quimiotaxis en larvas premetamórficas de mitílidos e inducen su proceso de asentamiento primario.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Evaluar el proceso de asentamiento primario de larvas de mitílidos expuestas a diferentes extractos orgánicos de *C. chamissoi*.

2. Objetivos Específicos

- Determinar si los extractos del alga *C. chamissoi* tienen efecto sobre la supervivencia de larvas de mitílidos en experimentos *in vitro*.
- Determinar si los extractos del alga *C. chamissoi* tienen efecto inductivo del asentamiento primario de las larvas de mitílidos, mediante un experimento de terreno en la Bahía de Coliumo, Región del Biobío, Chile.

METODOLOGÍA

1. Muestreo del alga *Chondracanthus chamissoi*

La recolección de muestras de macroalgas se realizó en Caleta Cocholgüe (36°35'34.0" S 72°58'40.3" W) dentro de la Bahía de Concepción, en formaciones rocosas donde se observó evidente coexistencia del alga roja *C.chamissoi* y diversas especies de mitílidos, e.g. *Mytilus galloprovincialis*, *Brachidontes purpuratus* y *Semimytilus algosus*. Las algas fueron recolectadas en los meses comprendidos de entre enero-abril de 2018 y también desde septiembre 2018 a enero del año 2019.



Todas las algas recolectadas fueron puestas en bolsas herméticas inmediatamente luego de su recolección, manteniéndolas a baja temperatura en cajas termoaislantes con hielo, hasta llegar completar el transporte al laboratorio para su posterior procesamiento.

La identidad taxonómica de las muestras se determinó a partir de la observación de los rasgos morfológicos descritos en la literatura (Figueroa, 2005; Ortiz, 2011; Riofrío, 2013; Vidal & O’Ryan, 2015) y fue corroborada por el Dr. Erasmo Macaya, ficólogo del Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

2. Extracción de metabolitos

Para obtener los extractos utilizados en los experimentos que serán mencionados más adelante, se utilizaron 3 métodos de extracción de metabolitos, obteniendo extractos algares con distintas características químicas, respecto a la polaridad de los metabolitos extraídos.

a) Extracción por maceración.

Las algas fueron procesadas según la metodología utilizada por Alfaro *et al.* (2006). Las muestras de algas fueron liofilizadas por 48 horas y luego se realizó la maceración del material seco en diclorometano/metanol (1:1) por 24 horas, para luego macerar con metanol por 24 horas adicionales. Ambos extractos se mezclaron y se secaron en un equipo de evaporación rotatoria, obteniendo un extracto orgánico crudo final (Figura 4.a).

b) Extracción en sistema Soxleth

Las algas utilizadas en este método de extracción (Taher *et al.*, 2014) fueron liofilizadas y trituradas. Posteriormente puestas en un cartucho de extracción de celulosa, montado en el sistema y embebido repetidas veces en *n*-hexano por un periodo de 8 horas. Realizada la extracción, el extracto junto con el solvente fue recuperado del sistema, para así ser finalmente secado en un equipo de

evaporación rotatoria, obteniendo un extracto orgánico crudo.

c) Extracción en Agua

En este caso, se ocuparon algas frescas para realizar la extracción en agua. Para ello se utilizó un baño de ultrasonido con sucesivas exposiciones del talo del alga a este tratamiento. Una vez obtenida la extracción, los extraíbles obtenidos fueron liofilizados.

3. Experimento *in vitro* con extractos totales de las macroalgas *Chondracanthus chamissoi* y *Capreolia implexa*



En el mes de octubre del año 2018 se obtuvieron los siguientes extractos a partir de la maceración de material algal liofilizado de las especies *C. chamissoi* y *C. implexa* en diclorometano/metanol:

- Maceración en metanol/diclorometano *C. chamissoi*
 - Extracto Total *C. chamissoi*

- Maceración en metanol/diclorometano *C. implexa*
 - Extracto Total *C. implexa*

Estos extractos fueron utilizados en ensayos *in vitro* para evaluar que; no fueran tóxicos para trabajar con larvas de mitílidos y para además evaluar su efecto inductor en el proceso de asentamiento primario en larvas premetamórficas de “choro zapato” (*Choromytilus chorus*) en condiciones *in vitro*.

Por consiguiente, se prepararon diluciones de los extractos totales a distintas concentraciones (10 mg/mL, 5 mg/mL, 1mg/mL y 0,1 mg/mL), resuspendiendo los extractos en metanol (Figura 4.b).

Los sistemas experimentales se montaron en microplacas de 6 pocillos, considerando cada pocillo como réplica. En cada uno de ellos se agregó 1 mL de las diluciones del extracto total, más 9 mL de agua de mar previamente filtrada y esterilizada (Figura 4.c).

Para este ensayo se consideraron la utilización de blanco (agua de mar filtrada y esterilizada) y control (metanol más agua de mar filtrada y esterilizada).

En cada uno de los sistemas, se agregó aproximadamente 20 larvas premetamórficas de la especie *Choromytilus chorus* (Figura 4.d), exponiéndolas al tratamiento por 72 horas a 17°C en una cámara de cultivo.

Durante el transcurso del ensayo las larvas no fueron alimentadas (según

protocolo proyecto FONDEF ID1610154).

Las larvas premetamórficas utilizadas en estos ensayos fueron proporcionadas por la unidad modular de producción de semillas (UMPS) o *hatchery* de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción (sede Dichato).

Según Ruiz *et al.* (2008), las características morfológicas y de comportamiento del estadio larval premetamórfico o competente de larvas de *Mytilus galloprovincialis* son las siguientes:



- Prodisoconcha I y II
- Charnela semi curva
- Presencia de estrías concéntricas
- Estómago definido, excepto al final de estadio
- Velo en regresión avanzada
- Ausencia de flagelos
- Inserción de músculos aductores bien definidos
- Septos branquiales bien desarrollados
- Presencia de mancha ocular pigmentada
- Órgano pedal funcional
- Larva con poca o nula actividad natatoria, preferentemente sésil

Estas características son similares para *Choromytilus chorus*, por lo que también se utilizaron como criterio para la selección de individuos.

Dada la cantidad de larvas en estado premetamórfico disponibles para estos ensayos, es que el número de replicas por tratamiento es la siguiente:

- Extracto total *C. chamissoi*
 - Dilución 0,1 mg/mL: 10 réplicas
 - Dilución 1 mg/mL: 10 réplicas
 - Dilución 5 mg/mL: 10 réplicas
 - Dilución 10 mg/mL: 10 réplicas

- Extracto total *C. implexa*
 - Dilución 0,1 mg/mL: 6 réplicas
 - Dilución 1 mg/mL: 6 réplicas
 - Dilución 5 mg/mL: 6 réplicas
 - Dilución 10 mg/mL: 6 réplicas

- Blanco: 6 réplicas

- Control (Metanol): 6 réplicas

3.1 Análisis por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa (GC-MS)

Este se llevó a cabo con el objetivo de caracterizar parcialmente la identidad química del extracto de *C. chamissoi* utilizado en el experimento *in vitro*. El protocolo utilizado se adaptó a partir de Torres (2016). Los extractos obtenidos fueron analizados mediante GC-MS en un cromatógrafo de gases (Agilent) acoplado a un detector de MS (Agilent 5975C) equipado con una columna capilar J&W HP-5ms (5% *Phenyl Methyl Silox*) de 30 m de largo, con 250 μm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA). Las condiciones del horno fueron las siguientes: mantención a una temperatura inicial de 100°C por 3 min, incrementando 10°C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 280°C, la cual se mantuvo por 20 min. Una muestra de extracto de 1 mL (disuelto en hexano) fue inyectado en modo *splitless*. La temperatura del inyector y detector de masas fueron 250°C y 300°C respectivamente. La detección por espectrometría de masa (MS) fue realizada en modo escaneo desde 50 hasta 600 mz^{-1} . Las sustancias detectadas fueron identificadas por coincidencia espectral con la librería espectral NIST 2005 (Gatesburg, PA, USA).

3.2 Categorización de larvas post-ensayo

Transcurrido el tiempo asignado para el ensayo, se procedió a categorizar las larvas como asentadas, posadas o muertas, según los criterios mencionados a continuación. Previo a esto, 30 minutos antes de la medición de los parámetros anteriormente mencionados, se agregó a cada pocillo 20 μ L de una dilución del colorante rojo neutro de concentración 1 mg/mL para identificación de larvas vivas y muertas (Figura 5). El rojo neutro es un tinte vital que actúa tiñendo solamente los organismos vivos y en menor intensidad los moribundos, logrando diferenciarlos de los muertos (Recabarren, 2012).

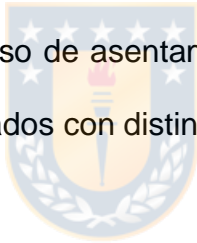
- Asentadas: todas aquellas larvas que se encontraban adosadas al pocillo de la microplaca o a un conespecífico y que presentaran actividad visceral o presencia de bisco. Con pigmentación asociada al colorante rojo vital (Figura 5.d).
- Posadas: todas aquellas larvas que se encontraban posadas en el fondo del pocillo y con movimiento visceral evidente. Con pigmentación asociada al colorante rojo vital (Figura 5.a.b).
- Muertas: todas aquellas larvas que se encontraban posadas en el fondo del pocillo, sin movimiento visceral. Sin pigmentación asociada al colorante rojo vital (Figura 5.c).

Las observaciones se realizaron en microscopio estereoscópico

Las categorizaciones antes mencionadas fueron utilizadas para ordenar los datos obtenidos y mencionados en la sección de *Resultados*.

4. Experimento en terreno con mallas impregnadas con distintos tipos de extractos obtenidos de la macroalga *Chondracanthus chamissoi*

A mediados de enero del año 2019, se realizó el montaje del experimento cuyo objetivo fue evaluar el proceso de asentamiento primario de larvas de mitílidos expuestas a extractos realizados con distintos solventes del alga *C. chamissoi*.



Para ello se utilizaron los extractos obtenidos a partir de distintos métodos:

- Maceración en metanol/diclorometano
 - Extracto Total

- Extracción en sistema Soxhlet en *n*-hexano.
 - Extracto Hexano

- Extracción por ultrasonido en agua
 - Extracto Fracción Polar 1
 - Extracto Fracción Polar 2
 - Extracto Fracción Polar 3
 - Extracto Polar Total (mezcla de las tres anteriores)

Dichos extractos fueron impregnados en mallas anchoveteras cuadradas de 10 x 10 cm (Figura 2.a). Los extractos fueron disueltos en una solución de agar para poder impregnar cada malla según protocolo proyecto FONDEF ID1610154.

Se impregnaron 5 mallas para cada tipo de extracto. Además, se prepararon 5 mallas control, las cuales solo contenían la solución de agar (sin extracto) y 5 mallas blanco (sin solución de agar ni extracto).

A continuación, se procedió a poner las mallas de forma aleatoria en un sistema de bastidores diseñados para tal objeto. Estas mallas fueron adosadas a los bastidores utilizando un código de colores para su posterior identificación (Figura 2.b) siguiendo el diseño desarrollado en el proyecto FONDEF ID1610154.

Una vez preparados los bastidores, fueron montados en enero del 2019, en líneas de cultivos de mitílicos en la Granja Marina de la Bahía de Coliumo ($36^{\circ}32'18.4''S$ $72^{\circ}57'12.2''W$), Región del Biobío. Dichos bastidores estuvieron en el mar por 48

días, siendo extraídos el 6 de marzo del 2019, donde se realizó la recolección del material. Cada malla fue puesta en una bolsa hermética con su respectivo código de color y llevada para su posterior análisis al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

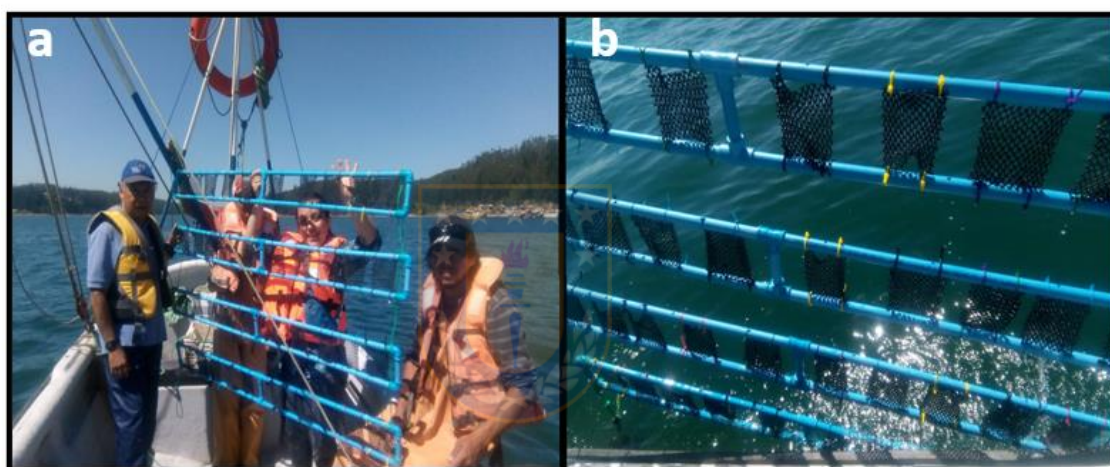


Figura 2: Fotografías del proceso de montaje del experimento en terreno. a) Fotografía del sistema de bastidores. b) Fotografía donde se observa el código de colores y las mallas en los bastidores.

4.1. Procesamiento de las mallas

Durante los meses de abril y mayo del 2019 se procedió a extraer de cada una de las mallas obtenidas en el experimento en terreno, las semillas de mitílidos asociadas a ellas.

Para ello, las mallas (Figura 3.a) se sumergieron en una solución clorada (20% v/v aprox.) por un período de 5-10 minutos con el fin de desprender los elementos adheridos a dicha estructura. Luego, se procedió a tamizar (en tamices de distinto tamaño) el sobrenadante de la solución en la cual se sumergieron las mallas, descartando material orgánico de tamaños mayores al diámetro de los tamices.

Se recuperó y se lavó con abundante agua el material que quedó en la solución clorada tras ser tamizado, para así comenzar a descartar el material que quedó en suspensión. Esto se repitió varias veces hasta quedar únicamente con las semillas de mitílidos (Figura 3.d). Estas semillas fueron tomadas con pipetas de vidrio y guardadas en tubos Eppendorf apropiadamente rotuladas para su posterior análisis.



Figura 3: Procesamiento de mallas. a) Malla extraída después del experimento en terreno. b) Malla al finalizar el lavado con la solución clorada. c) Material orgánico obtenido desde las mallas luego del proceso de lavado y tamizado. d) Ejemplo de semillas obtenidas desde una de las mallas.

4.2. Clasificación de semillas

Una vez limpias todas las mallas del experimento, se procedió mediante observación en lupa y con uso de papel milimetrado, a medir las semillas obtenidas bajo los siguientes parámetros:

- Número de mitílidos en la muestra
- Tamaño de mitílidos en la muestra
- Especies de mitílidos en la muestra



Estos datos fueron ordenados en dos tablas resumen (Tabla 2 y Tabla 3), presente en la sección *Resultados*.

En cuanto a la identidad taxonómica de las muestras, se procedió a identificar las especies observadas a partir de rasgos fenotípicos característicos para las larvas y post larvas de cada especie según Ramorino & Campos (1983). Además, se aplicó el protocolo de identificación de semillas de mitílidos desarrollado en el Proyecto FONDEF ID1610154.

5. Análisis Estadístico

Respecto al experimento *in vitro* con extractos totales de las macroalgas *Chondracanthus chamissoi* y *Capreolia implexa*, los datos obtenidos (Tabla 2 y Tabla 3) fueron analizados en el programa estadístico R (R Core Team, 2013). Se analizó la distribución de los datos obtenidos a través de diagramas de cajas y bigotes (*boxplots*) (Figura 6) comprobando la existencia de valores atípicos (*outliers*). Se procedió a eliminar los datos atípicos para realizar nuevamente el análisis de los datos y calcular los valores de desviación estándar para los datos ajustados, con el fin de observar si existían diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 4 y Tabla 5). La representación gráfica de los resultados (Figura 7 y Figura 8) se realizó en base al porcentaje de los promedios obtenidos en cada categoría.

Por otro lado, los datos obtenidos en el experimento montado en la Granja Marina de la Bahía de Coliumo también fueron analizados en el programa estadístico R. Los resultados obtenidos no reflejaron una distribución normal, por lo que al corroborar una distribución de tipo Poisson, se procedió a utilizar un modelo lineal generalizado que resultó ajustarse a la realidad.

RESULTADOS

1. Experimento in vitro con extractos totales de las macroalgas *Chondracanthus chamissoi* y *Capreolia implexa*

Con motivo de analizar la inducción de asentamiento primario en escala menor, un experimento *in vitro* fue llevado a cabo utilizando diluciones en distintas concentraciones de los extractos totales del alga *Chondracanthus chamissoi* y *Capreolia implexa* (Figura 4).

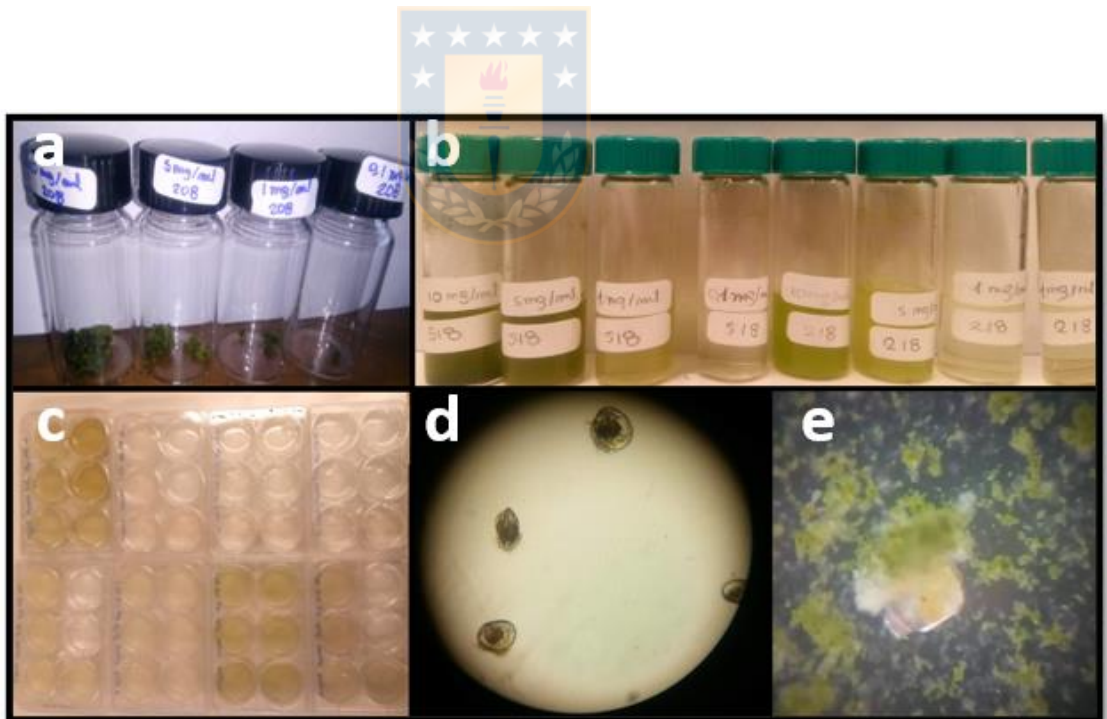


Figura 4: Etapas del montaje experimental. a) Extractos totales recién masados. b) Preparación de diluciones de los extractos totales de *Chondracanthus chamissoi* y *Capreolia implexa*. c) Microplacas de 6 pocillos con los extractos disueltos en agua de mar filtrada y esterilizada. d) Fotografía tomada durante la elección de las larvas para los ensayos. e) Fotografía de una larva en uno de los pocillos montado.

Las concentraciones utilizadas para las diluciones elaboradas a partir de los extractos totales fueron: 0.1 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL. Estas diluciones fueron utilizadas para evaluar primero una posible toxicidad de los extractos en los mitílidos. Para lo anterior, larvas de choro zapato (*Choromytilus chorus*) fueron usadas como sujeto de estudio (Figura 4.d). Transcurrido el tiempo de exposición, estas fueron clasificadas como vivas o muertas utilizando la tinción por rojo neutral (Figura 5). Aquellas larvas que se colorearon intensamente luego de la exposición al colorante (Figura 5 a.b.d.e.f) fueron consideradas vivas, mientras que aquellas que no se colorearon (Figura 5.c) fueron consideradas muertas.



Las muestras previamente identificadas como vivas fueron reclasificadas como posadas (Figura 5.a.b) o asentadas (Figura 5.d).

Los datos brutos obtenidos para cada tratamiento se encuentran en la sección de *Anexos* (Tabla A1). A partir de ellos, se elaboraron dos tablas de datos (Tabla 2 y Tabla 3) correspondientes a los promedios de individuos que hay en cada categoría medidos en cada una de las réplicas de los tratamientos utilizados.

Una de las tablas (Tabla 2), indica el número promedio de larvas vivas, larvas muertas y larvas totales por cada tratamiento. Se incluye también, la desviación estándar para cada dato. En el caso de la Tabla 3, se entrega la

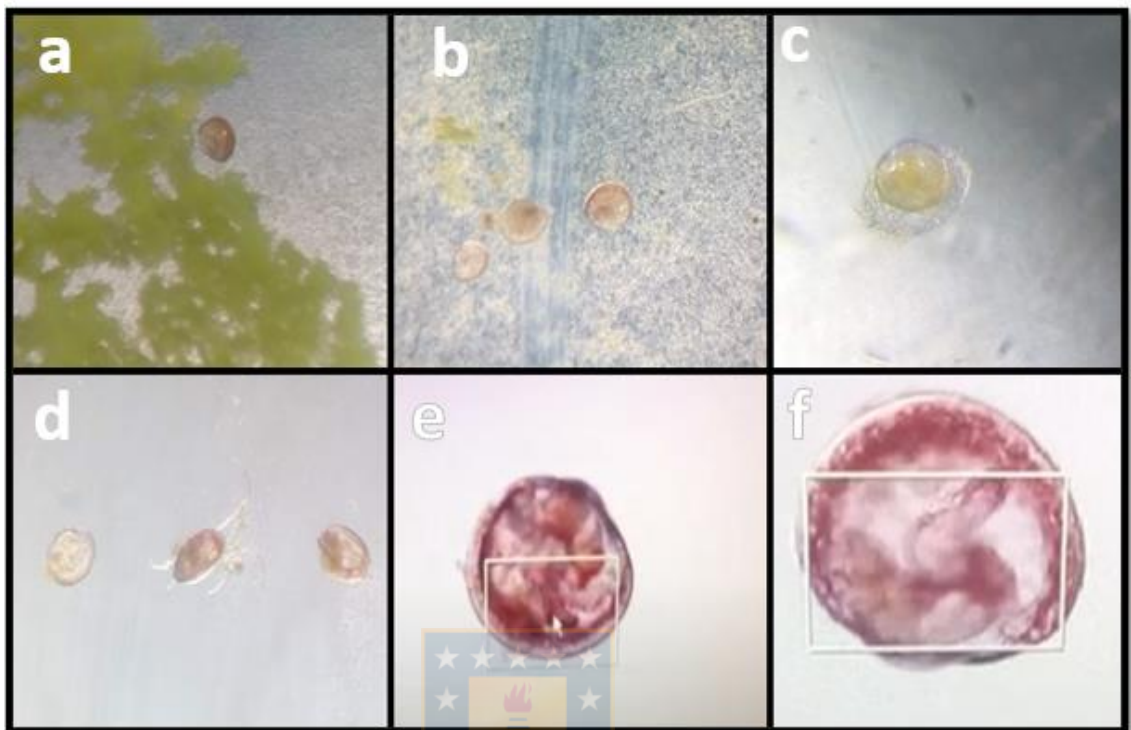


Figura 5: Muestras de choro zapato expuestas a tinción en rojo neutro. a,b) Larvas que han incluido en su organismo la tinción. En este caso, se observa que están posadas en la superficie. c) Larva muerta sin tinción. Se observa que el material visceral ha salido hacia el exterior. d) Imagen donde se observan 3 larvas; la de la izquierda está muerta y sin tinción y las dos siguientes están asentadas (larva central con biso observable) y tinción evidente de su interior. e.f) Tomas fotográficas realizadas a larvas vivas con activo movimiento visceral. Se indica en el recuadro la zona donde encontramos el pie.

subcategorización de los individuos que han sobrevivido (asentados o posados) junto con larvas muertas por tratamiento. Al igual que en la tabla anterior, los datos se indican como número promedio de larvas asentadas, posadas y muertas, del total muestral por cada tratamiento.

Tabla 2: Resumen datos obtenidos. Categorías: larvas vivas, larvas muertas y total de larvas (Promedios y desviación estándar asociada)

Tratamiento	Promedio larvas vivas	Desv. estándar	Promedio larvas muertas	Desv. estándar	Promedio total larvas	Desv. estándar
Blanco	11,3	5,9	8,7	6,1	20,0	1,7
Control	15,8	4,1	2,2	3,9	18,0	1,9
<i>C. chamissoi</i> 0,1 mg/mL	16,7	2,9	3,0	1,6	19,7	1,9
<i>C. chamissoi</i> 1 mg/mL	13,9	1,8	5,4	2,0	19,3	0,7
<i>C. chamissoi</i> 5 mg/mL	3,3	2,4	16,1	2,2	19,4	1,3
<i>C. chamissoi</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	20,3	1,3	20,3	1,3
<i>C. implexa</i> 0,1 mg/mL	15,0	2,2	3,7	1,8	18,7	1,2
<i>C. implexa</i> 1 mg/mL	4,5	5,2	14,7	4,9	19,2	1,0
<i>C. implexa</i> 5 mg/mL	4,0	2,2	15,7	2,8	19,7	1,4
<i>C. implexa</i> 10 mg/mL	0,2	0,4	18,8	1,3	19,0	1,5

Tabla 3: Resumen datos obtenidos. Categorías: larvas asentadas, larvas posadas y larvas muertas (Promedios y desviación estándar asociada).

Tratamiento	Larvas asentadas	Desv. estándar	Larvas posadas	Desv. estándar	Larvas muertas	Desv. estándar
Blanco	1,2	0,8	10,2	5,8	8,7	6,1
Control	3,0	1,9	12,8	3,4	2,2	3,9
<i>C. chamissoi</i> 0,1 mg/mL	4,1	3,0	12,6	2,9	3,0	1,6
<i>C. chamissoi</i> 1 mg/mL	1,4	1,0	12,5	1,8	5,4	2,0
<i>C. chamissoi</i> 5 mg/mL	0,3	0,7	3,0	2,4	16,1	2,2
<i>C. chamissoi</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	0,0	0,0	20,3	1,3
<i>C. implexa</i> 0,1 mg/mL	0,8	1,0	14,2	2,6	3,7	1,8
<i>C. implexa</i> 1 mg/mL	0,3	0,5	4,2	4,9	14,7	4,9
<i>C. implexa</i> 5 mg/mL	0,2	0,4	3,8	2,0	15,7	2,8
<i>C. implexa</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	0,2	0,4	18,8	1,3

La distribución de los datos obtenidos para cada categoría fue visualizada utilizando diagramas de cajas y bigotes (Figura 6)

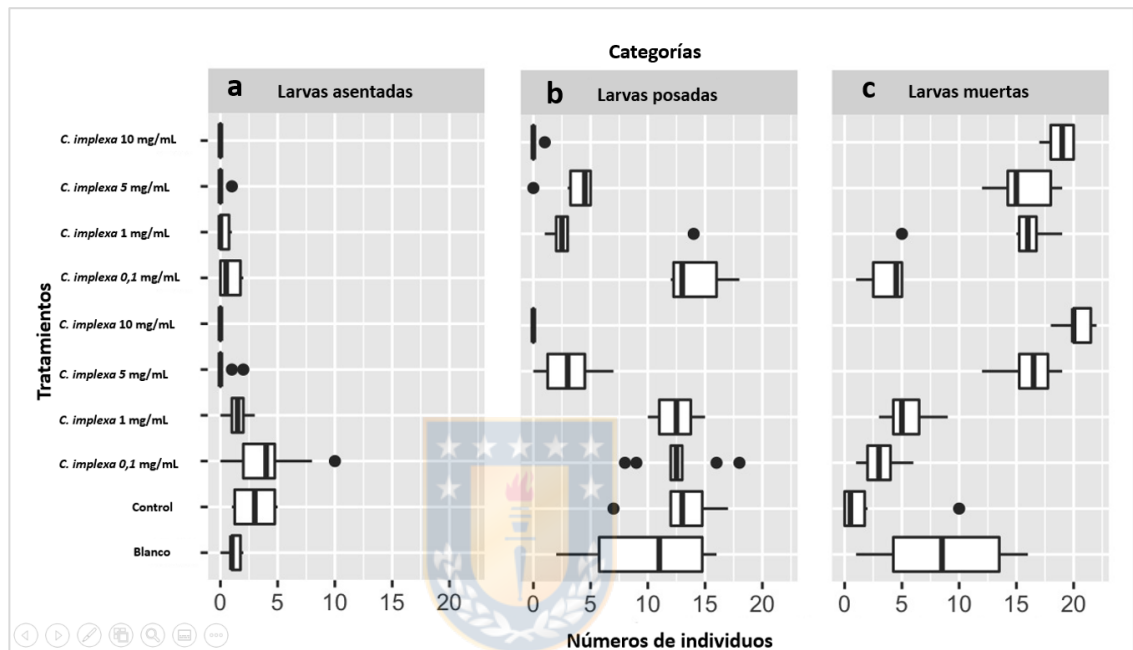


Figura 6: Distribución de datos por categoría y tratamiento. a) Larvas asentadas. b) Larvas posadas. c) Larvas muertas.

En la Figura 6 se puede observar la distribución de cada uno de los datos dentro de los tratamientos con respecto al valor mediano (línea negra). Los datos ubicados fuera de las líneas de error, 1.5 veces la desviación estándar, fueron considerados como datos atípicos (outliers) y posteriormente eliminados según el principio de Chauvenet. Los datos corregidos tras el análisis estadístico se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Resumen de datos sin valores atípicos. Categorías: larvas vivas, larvas muertas y total de larvas (Promedios y desviaciones estándar asociadas)

Tratamiento	Promedio larvas vivas	Desv. estándar	Promedio larvas muertas	Desv. estándar	Promedio total larvas	Desv. estándar
Blanco	14,8	3,3	5,5	4,7	20,3	2,1
Control	17,8	1,7	0,8	1,0	18,5	2,1
<i>C. chamissoi</i> 0,1 mg/mL	17,3	1,0	3,0	0,8	20,3	1,3
<i>C. chamissoi</i> 1 mg/mL	14,5	0,6	4,5	1,0	19,0	0,8
<i>C. chamissoi</i> 5 mg/mL	5,5	1,3	14,0	1,8	19,5	1,0
<i>C. chamissoi</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	20,3	1,3	20,3	1,3
<i>C. implexa</i> 0,1 mg/mL	15,3	1,9	4,0	1,4	19,3	1,0
<i>C. implexa</i> 1 mg/mL	2,0	0,8	17,0	1,4	19,0	1,2
<i>C. implexa</i> 5 mg/mL	5,3	0,5	14,0	1,4	19,3	1,0
<i>C. implexa</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	19,0	1,2	19,0	1,2

Tabla 5: Resumen de datos sin valores atípicos. Categorías: larvas asentadas, larvas posadas y larvas muertas (Promedios y desviaciones estándar asociadas).

Tratamiento	Larvas asentadas	Desv. estándar	Larvas posadas	Desv. estándar	Larvas muertas	Desv. estándar
Blanco	1,3	0,5	13,3	3,6	5,5	4,7
Control	3,8	1,9	14,0	2,4	18,5	1,0
<i>C. chamissoi</i> 0,1 mg/mL	4,8	2,5	12,5	3,3	20,3	0,8
<i>C. chamissoi</i> 1 mg/mL	2,3	0,5	12,3	1,0	19,0	1,0
<i>C. chamissoi</i> 5 mg/mL	0,3	0,5	5,3	1,7	19,5	1,8
<i>C. chamissoi</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	0,0	0,0	20,3	1,3
<i>C. implexa</i> 0,1 mg/mL	1,3	1,0	4,0	2,7	19,3	1,4
<i>C. implexa</i> 1 mg/mL	0,0	0,0	17,0	0,8	19,0	1,4
<i>C. implexa</i> 5 mg/mL	0,3	0,5	14,0	0,5	19,3	1,4
<i>C. implexa</i> 10 mg/mL	0,0	0,0	19,0	0,0	19,0	1,2

La representación gráfica de los valores obtenidos en las categorías de las Tablas 4 y 5, son las Figuras 7 y 8 respectivamente.

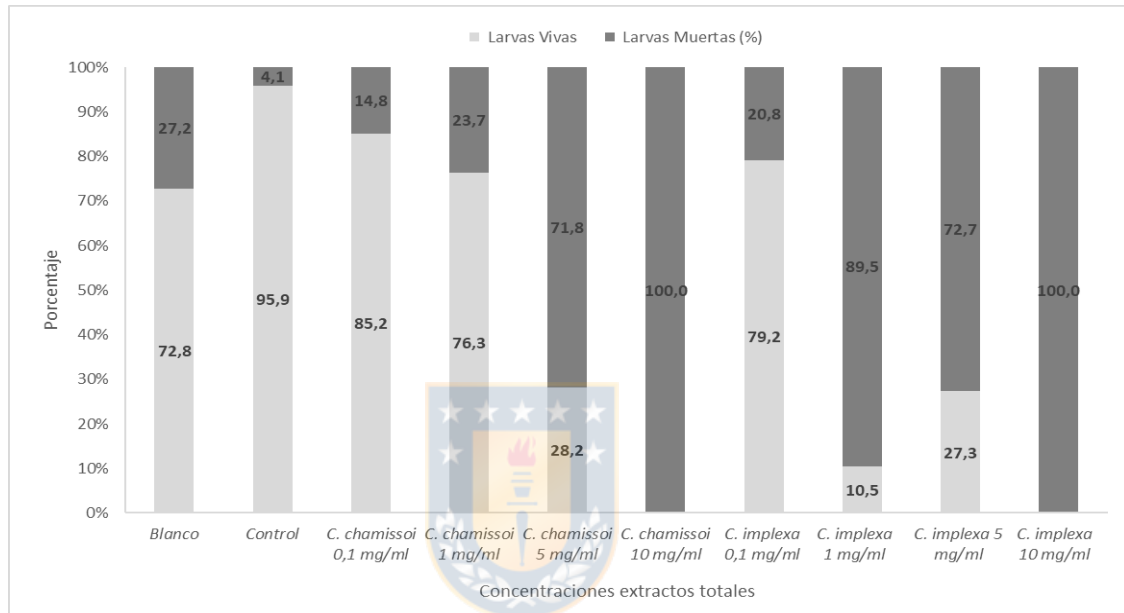


Figura 7: Porcentajes de número promedio de individuos obtenidos para las categorías vivas/muertas. Los datos están expresados como porcentajes del total de larvas promedio por cada tratamiento.

Se observa en la Figura 7 que, en los tratamientos con concentraciones de 0,1mg/mL de los extractos totales de *C. chamissoi* y *C. implexa* presentan un alza significativa en la supervivencia de las larvas respecto al *Blanco* (12,4 % y 6,4%). También se observa que el *Control* del experimento presenta un aumento de cerca del 23,1% de supervivencia respecto al *Blanco*.

La supervivencia disminuye a medida que las concentraciones de los extractos totales aumentan, llegando en concentraciones de 10 mg/mL a ser 0%.

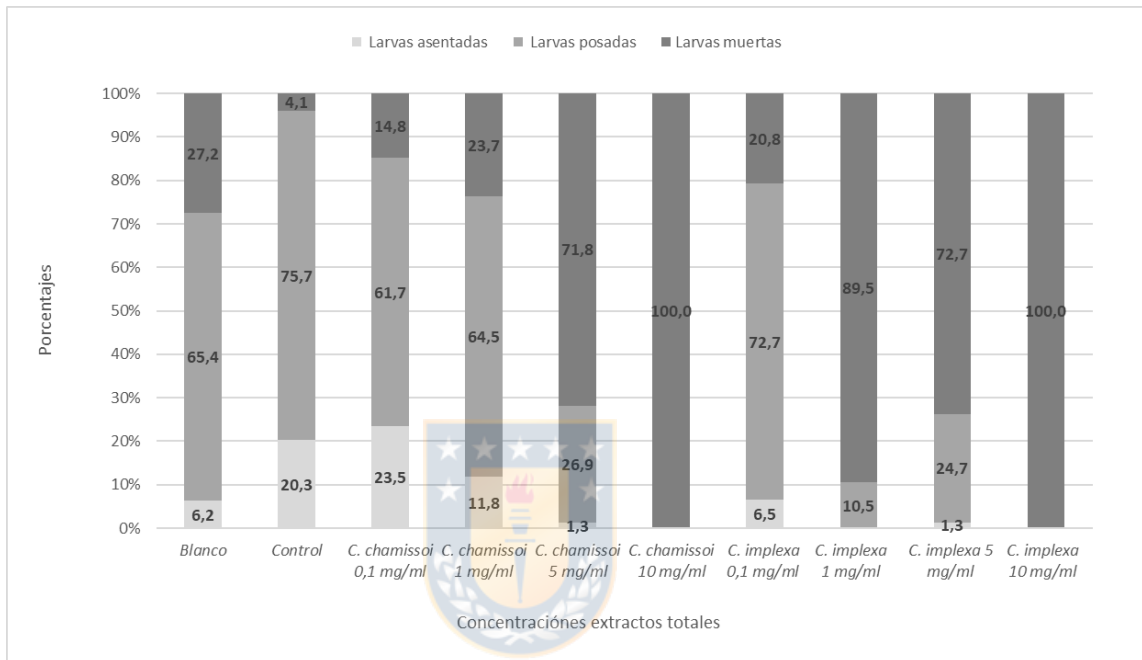


Figura 8: Porcentajes de número promedio de individuos obtenidos para las categorías asentadas/posadas/muertas. Los datos están expresados como porcentajes del total de larvas promedio por cada tratamiento.

En la Figura 8 se puede observar que el tratamiento de 0,1 mg/mL del extracto total de *C. chamissoi* tiene asociado un porcentaje promedio de asentamiento mayor al *Blanco* (17,3 % adicional), observación que también se corrobora en la Figura 6. Interesantemente se observa que nuevamente en la categoría “asentadas” el *Control* del experimento muestra un aumento considerable en el porcentaje promedio de larvas (14,1% adicional) respecto al *Blanco*, que también podemos corroborar en la Figura 6. En concentraciones mayores o iguales a 5

mg/ML de ambos tipos de extractos totales, los porcentajes de larvas promedio que hay en la categoría asentadas se ve fuertemente disminuido, llegando incluso a valores de 0% para 10 mg/mL.

Con respecto a los análisis realizados al extracto total de *C. chamissoi* vía GC-MS, se detectó la presencia de 3 compuestos con abundancias relevantes (Figura 9); un hidrocarburo identificado como heptadecano (CAS Number 629-78-7) (Figura 10.a), el ftalato de diisooctilo (CAS Number 27554-26-3) (Figura 10.b) y colesterol (CAS Number 57-88-5) (Figura 10.c).

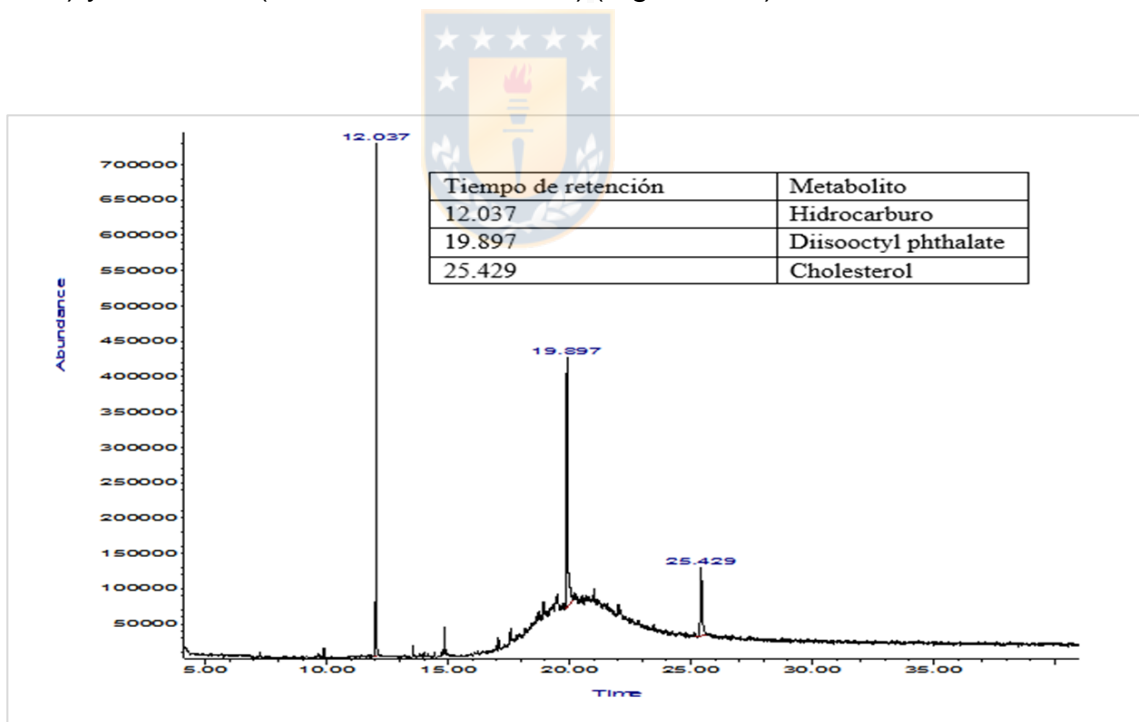


Figura 9: Cromatograma extracto total *C. chamissoi*

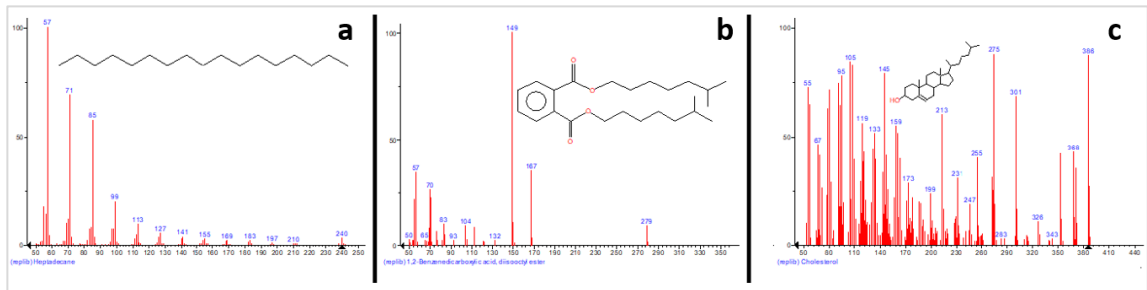


Figura 10: Compuestos identificados via GC-MS en el extracto total. a) Heptadecano. b) Ftalato de diisooctilo. c) Colesterol.

2. Experimento en terreno con mallas impregnadas con distintos tipos de extractos obtenidos de la macroalga *Chondracanthus chamissoi*

2.1 Identificación taxonómica



Durante el procesamiento de las mallas se observó la presencia de al menos tres especies distintas de mitílidos (Figura 11), las cuales presentaban características morfológicas claramente distinguibles, tales como: estructura de las valvas, forma, disposición y presencia del vértice del umbo, entre otras.

A partir de los criterios de identificación planteados por Ramorino & Campos (1983), y con la ayuda de la Dra. Maryori Ruiz se identificaron las siguientes especies: *Mytilus galloprovincialis* (Figura 12), *Semimytilus algosus* (Figura 13) y *Choromytilus chorus* (Figura 14)

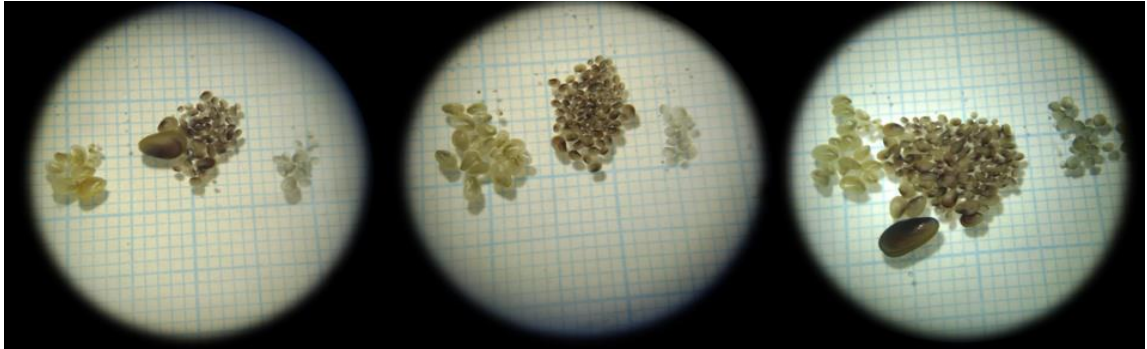


Figura 11: Mitílicos extraídos desde las mallas utilizadas en el experimento. Mitílicos obtenidos tras proceso de tamizado, observados bajo lupa (10X) sobre papel milimetrado.

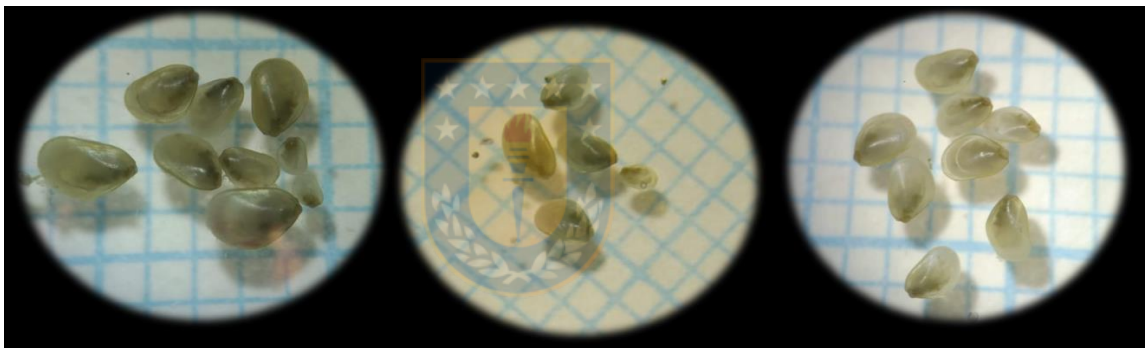


Figura 12: Individuos de la especie *Mytilus galloprovincialis* obtenidos del experimento realizado. Mitílicos observados bajo lupa (10X) sobre papel milimetrado.

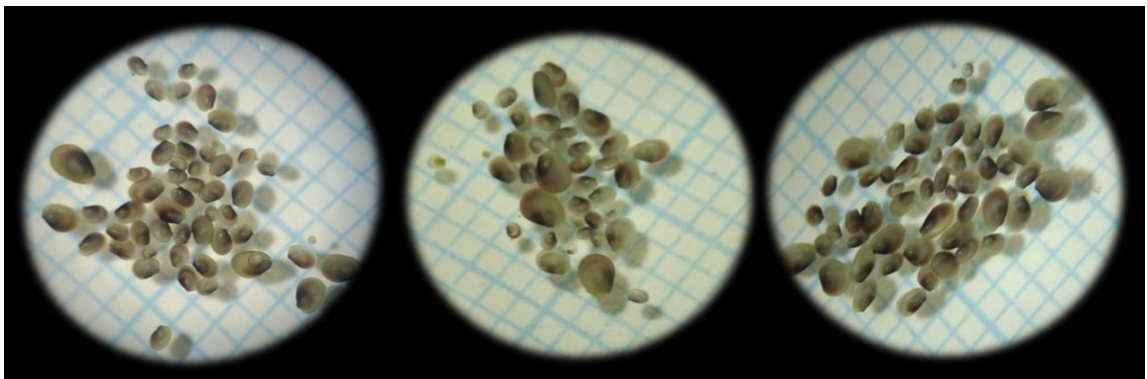


Figura 13: Individuos de la especie *Semimytilus algosus* obtenidos del experimento realizado. Mitílicos observados bajo lupa (10X) sobre papel milimetrado.

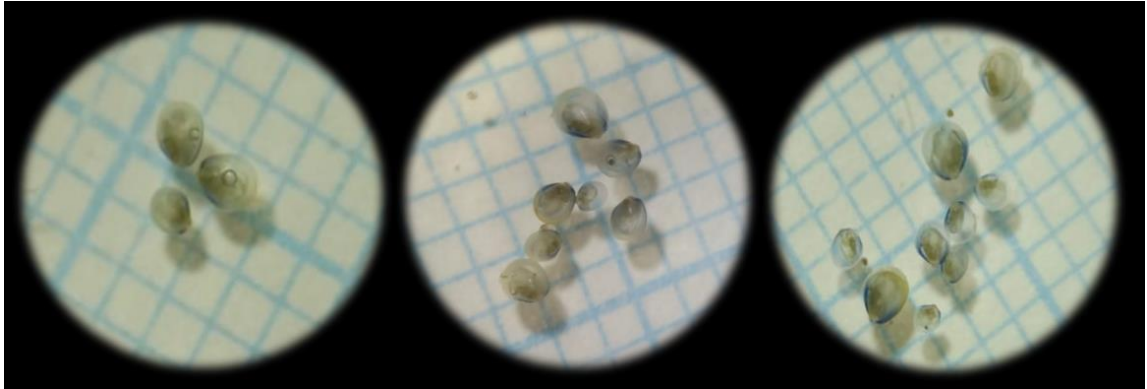


Figura 14: Individuos de la especie *Choromytilus chorus* obtenidos del experimento realizado. Mitílidos observados bajo lupa (10X) sobre papel milimetrado.

2.2. Datos de conteo



A continuación, se presentan un resumen de los datos obtenidos (Tabla 6) en el experimento de fijación de semillas de mitílidos sobre mallas anchoveteras impregnadas con extractos del alga *Chondracanthus chamissoi*, realizado en el Centro de Cultivos Granja Marina de Coliumo. Para ver la totalidad de los datos ir la sección de *Anexos* (Tabla A2).

En general, se puede observar que en todos los tratamientos (incluidos los datos obtenidos en las mallas *Blanco* y *Control*) la proporción de individuos por *Especie* (Figura 15) es similar, por lo que se observa un patrón de distribución homogéneo en estas variables.

Tabla 6: Resumen de datos obtenidos.

Tratamientos		Cantidad de individuos			Total
		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Semimytilus algosus</i>	<i>Choromytilus chorus</i>	
Blanco		62	301	17	380
Rangos tamaños (mm)	0.5 - 1.0	6	214	7	227
	1.0 - 1.5	23	79	8	110
	1.5 - 2.0	25	5	1	31
	2.0 - 2.5	6	2	0	8
	> 2.5	2	1	1	4
Control		84	526	55	665
Rangos tamaños (mm)	0.5 - 1.0	19	362	36	417
	1.0 - 1.5	17	150	17	184
	1.5 - 2.0	41	12	2	55
	2.0 - 2.5	7	2	0	9
	> 2.5	0	0	0	0
Extracto Fracción Polar 1		70	456	51	577
Rangos tamaños (mm)	0.5 - 1.0	18	247	31	296
	1.0 - 1.5	15	185	18	218
	1.5 - 2.0	23	20	2	45
	2.0 - 2.5	9	4	0	13
	> 2.5	5	0	0	5
Extracto Fracción Polar 2		77	416	52	545
Rangos tamaños(mm)	0.5 - 1.0	9	255	28	292
	1.0 - 1.5	23	133	22	178
	1.5 - 2.0	34	21	2	57
	2.0 - 2.5	10	7	0	17
	> 2.5	1	0	0	1
Extracto Fracción Polar 3		53	293	30	376
Rangos tamaños(mm)	0.5 - 1.0	15	170	12	197
	1.0 - 1.5	7	105	17	129
	1.5 - 2.0	24	17	1	42
	2.0 - 2.5	7	1	0	8
	> 2.5	0	0	0	0

Extracto Hexano		66	500	58	624
Rangos tamaños(mm)	0.5 - 1.0	6	293	31	330
	1.0 - 1.5	20	180	26	226
	1.5 - 2.0	31	24	1	56
	2.0 - 2.5	9	2	0	11
	> 2.5	0	1	0	1
Extracto Polar Total		65	366	39	470
Rangos tamaños(mm)	0.5 - 1.0	9	190	21	220
	1.0 - 1.5	14	151	18	183
	1.5 - 2.0	38	19	0	57
	2.0 - 2.5	3	6	0	9
	> 2.5	1	0	0	1
Extracto Total		62	447	49	558
Rangos tamaños(mm)	0.5 - 1.0	13	255	16	284
	1.0 - 1.5	17	162	33	212
	1.5 - 2.0	21	28	0	49
	2.0 - 2.5	10	2	0	12
	> 2.5	1	0	0	1
Total general		539	3305	351	4195

* Números destacados en negrita corresponden a la sumatoria para cada tratamiento.

Al comparar la proporción de *Rangos de tamaño* por cada tratamiento (Figura 16), se puede observar que existen diferencias significativas en los porcentajes de individuos con tamaño entre 1,0-1,5 mm en de los tratamientos *Extracto Total*, *Extracto Polar Total*, *Extracto Hexano* y *Extracto Fracción Polar 1* con respecto a los datos obtenidos para el *Blanco*

Cuando se compara *Rangos de tamaño* de los individuos por *Especie* (Figura 17) se aprecia también diferencias en los porcentajes para todas las especies.

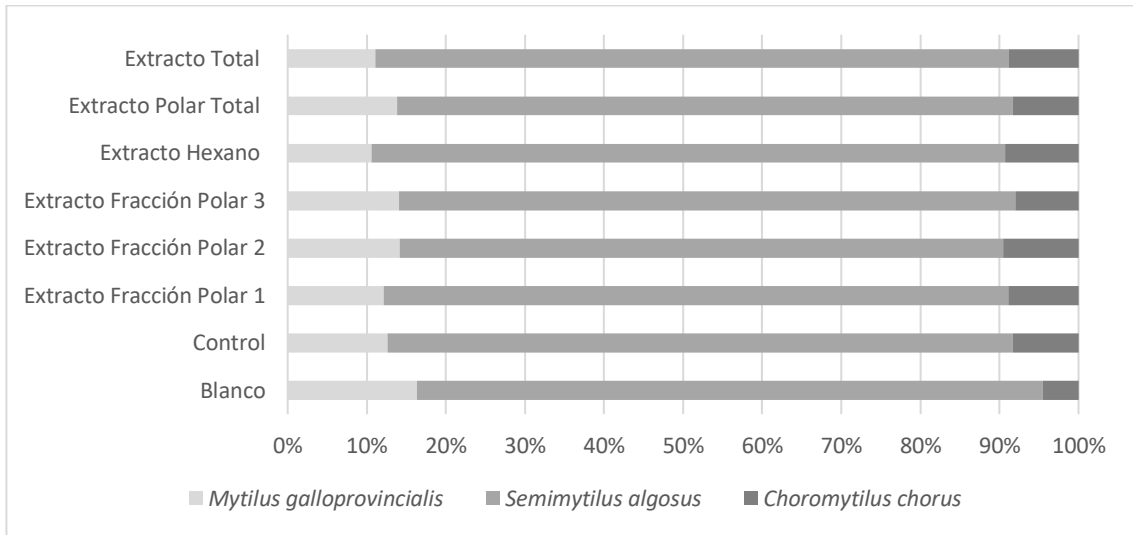


Figura 15: Distribución de especies presentes en cada tratamiento. Porcentajes expresados con respecto al total de mitílidos en cada tratamiento.

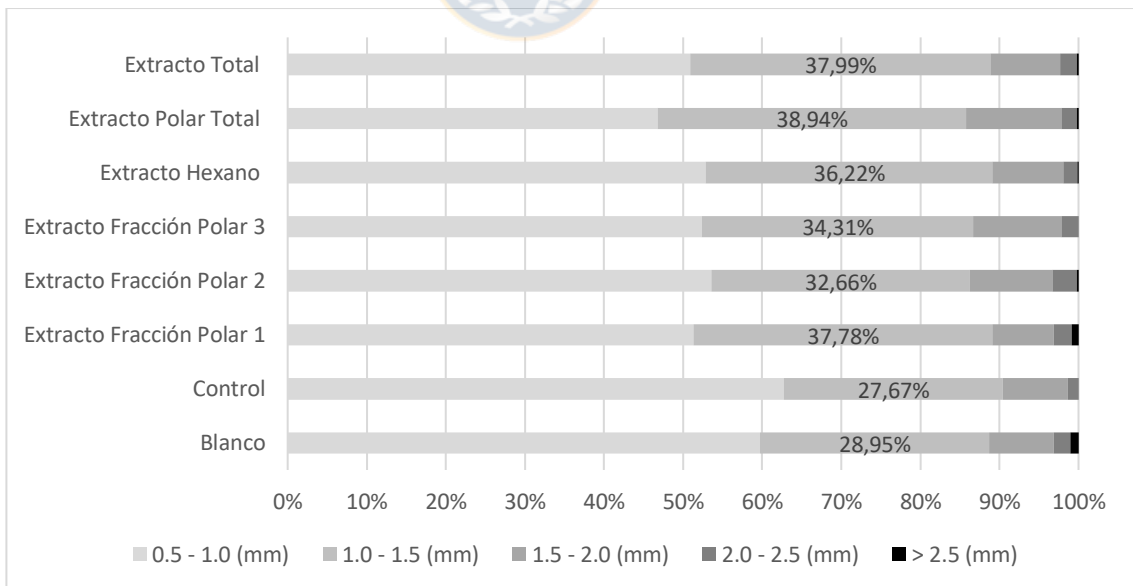


Figura 16: Distribución de tamaño de los individuos presentes en cada tratamiento. Porcentajes expresados con respecto al total de mitílidos en cada rango de tamaño.

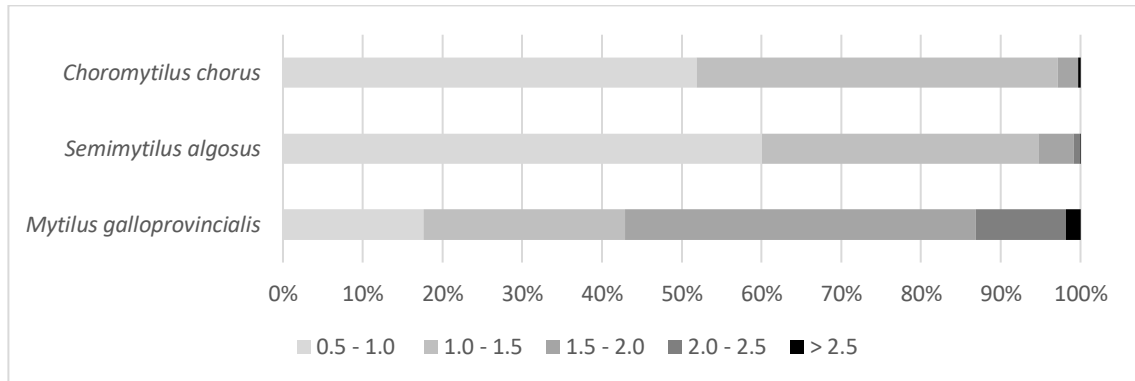


Figura 17: Distribución de tamaño de los individuos presentes por especie. Porcentajes expresados con respecto al total de mitílidos por especie.

En vista de estos resultados preliminares, es que todas las variables antes mencionadas se agregan al modelo generado para realizar el análisis estadístico, analizando una posible influencia significativa de cada una de ellas.

2.3. Análisis estadístico

Para el experimento en terreno realizado en el Centro de Cultivos Granja Marina en Coliumo, la cantidad de mitílidos presentes en la base de datos fue agrupada de acuerdo al tratamiento aplicado, al número de mallas utilizado en cada tratamiento, al rango de tamaño de los individuos y a la especie de mitílido identificada. En ese sentido, las variables utilizadas se identifican de la siguiente manera:

- **Variable independiente (x):** Tipos de tratamiento, donde tenemos:

Mallas Blanco: mallas

Mallas Control: mallas + agar

Mallas con Extracto Fracción Polar 1: mallas + agar + extracto FP1

Mallas con Extracto Fracción Polar 2: mallas + agar + extracto FP2

Mallas con Extracto Fracción Polar 3: mallas + agar + extracto FP3

Mallas con Extracto Hexano: mallas + agar + extracto hexano

Mallas con Extracto Polar Total: mallas + agar + extracto polar total

Mallas con Extracto Total: mallas + agar + extracto metanol/diclorometano

- **Variables dependientes (y):** Cantidad de mitílicos. Esta variable puede ser redistribuida o agrupada a su vez en:

Especies de mitílicos: (*Mytilus galloprovincialis*), (*Semimytilus algosus*) y (*Choromytilus chorus*).

Rangos de Tamaño: (0,5-1 mm), (1-1,5 mm), (1,5-2 mm), (2-2,5 mm) y (> 2,5 mm)

Número de mallas por tratamiento: 1, 2, 3, 4 y 5.

Para cada tipo de tratamiento, se utilizaron 5 mallas anchoveteras de 10 x 10 cm, las cuales fueron puestas en un sistema de bastidores de forma aleatoria. Para identificarlas, se utilizó una clave de color (ver Metodología).

Pese a lo anterior, estas no fueron consideradas réplicas ya que para ello deberían haberse cumplido las siguientes condiciones:

1. Realizar una medición a una malla en 5 periodos distintos de tiempo.
2. Conocer la ubicación exacta de cada una de estas mallas en los bastidores

En ese sentido:

1. Todas las mallas fueron puestas en el experimento en el mismo periodo de tiempo.
2. No se tomaron los datos de la ubicación exacta de cada una de las mallas en los bastidores. Lo que sí se sabía, era que las mallas estaban puestas de forma aleatoria.



Al realizar los análisis previos para observar el tipo de distribución que presentaban los datos obtenidos, se evidencia para la variable *Cantidad de mitíldos* una ausencia de distribución normal (Figura 18). Esto se fundamenta principalmente en que los datos obtenidos son de conteo y generalmente este tipo de datos no presentan ese tipo de distribución.

Sin embargo, se pudo observar que los datos presentaban un tipo de distribución

conocida como distribución de Poisson, donde los datos observados se acumulan en la cola (o extremo) de tamaños más pequeños y luego se encuentran algunos datos de tamaños más grandes que son escasos (característico de este tipo de distribución).

Es por lo anterior, que teóricamente, se recomienda la utilización de un modelo lineal generalizado (Figura 19), ya que este tipo de modelo no requiere de la distribución normal en la variable de estudio. Este modelo estadístico nos permitirá observar cuanto influye la variable independiente (*Tratamiento*) sobre la variable de estudio. En este caso, como la variable independiente no tiene valor numérico, es necesario transformar estos datos. Para ello, se utilizó la

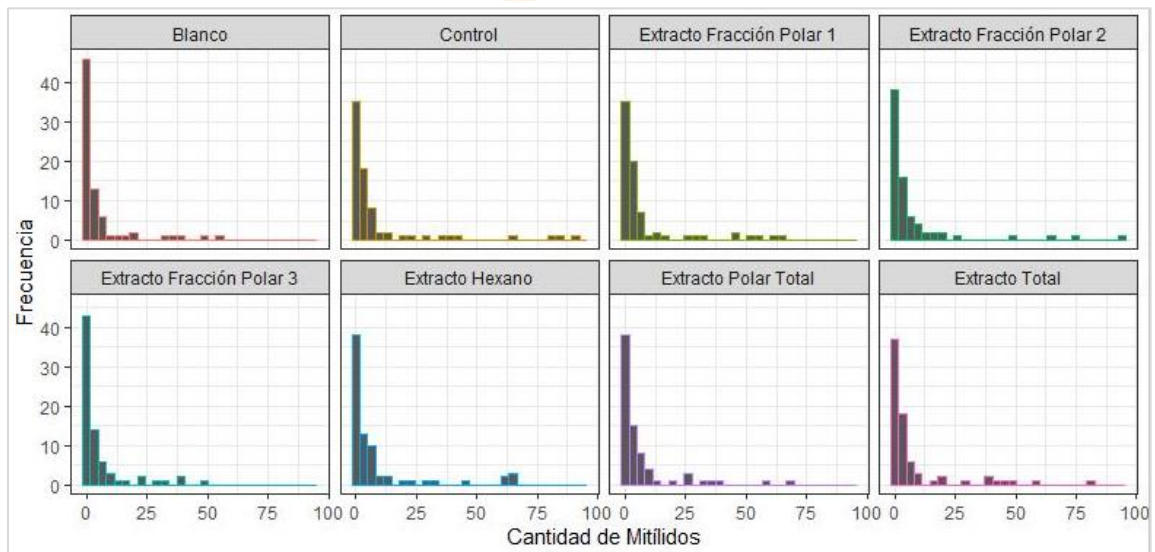


Figura 18: Gráfica de frecuencia de cantidad de mitílidos por tratamiento

transformación a variables “dummy” y para calcular el vector de coeficiente el modelo utiliza el método de estimación de máxima verosimilitud. En este caso, se utilizará el modelo ajustado a una distribución Poisson (Salinas-Rodríguez *et al.*, 2009). Los datos fueron procesados con el programa estadístico “R”.

$$\ln(Y) = \beta_1 X_1$$

Figura 19: Ecuación general del Modelo lineal Generalizado

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la validación del modelo lineal generalizado para los datos obtenidos en el experimento en terreno para cada tratamiento (Tabla 7).

De lo anterior, se observa que:

1. Los valores de error estándar son pequeños desde el punto de vista estadístico, por lo que se indica que el modelo utilizado para el análisis estadístico se ajusta muy bien a los datos obtenidos en la realidad.

2. Los coeficientes del modelo, indican que existen diferencias significativas (p -valor < 0.05) al comparar el *Blanco* con el resto de los tratamientos respecto a la variable *Cantidad de mitílicos* a excepción del tratamiento *Extracto Fracción Polar 3*, el cual no presenta diferencias significativas.

Tabla 7: Análisis estadístico modelo inicial.

Coeficientes	Estimado(β_1)	Error estándar	Valor z	Pr ($> z $)
Intercepto (Blanco)	1.62268	0.05130	31.633	$< 2e-16$ ***
Control	0.55962	0.06431	8.702	$< 2e-16$ ***
Tratamiento Extracto Fracción Polar 1	0.41767	0.06606	6.322	$2.58e-10$ ***
Tratamiento Extracto Fracción Polar 2	0.36061	0.06683	5.396	$6.82e-08$ ***
Tratamiento Extracto Fracción Polar 3	-0.01058	0.07274	-0.145	0.88433
Tratamiento Extracto Hexano	0.45598	0.06507	7.622	$2.49e-14$ ***
Tratamiento Extracto Polar Total	0.21256	0.06899	3.081	0.00206 **
Tratamiento Extracto Total	0.38419	0.06651	5.776	$7.63e-09$ ***

***Valores poseen diferencia estadísticamente significativa

Dado que el modelo Poisson se basa en cálculos logarítmicos para la interpretación de los coeficientes, se calculó la exponencial de ellos y se realizó la interpretación correspondiente (Tabla 8).

Tabla 8: Interpretación de los coeficientes obtenidos para cada tratamiento modelo inicial.

Tratamientos	Coefficiente Exponencial	Interpretación
Control	1,75	El promedio de mitílidos será 75% mayor usando el Control que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 1	1,52	El promedio de mitílidos será 52% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 2	1,43	El promedio de mitílidos será 43% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 3	0.99	El promedio de mitílidos será 1% menor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Hexano	1,64	El promedio de mitílidos será 64% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Polar Total	1,24	El promedio de mitílidos será 24% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Total	1,47	El promedio de mitílidos será 47% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>

Dado que los datos de *Cantidad de mitílidos* pueden ser redistribuidos en *Especies de mitílidos* y *Tamaño*, se analizó si la inclusión de estas variables al modelo inicial, que solo contemplaba *Tipos de Tratamientos*, aportaba información significativa para explicar el comportamiento de nuestra variable de estudio *Cantidad de Mitílidos*.

El criterio de Akaike (AIC) nos indica que a menor AIC existe un mejor ajuste con respecto al modelo. En este caso, se comprobó que la inclusión de estas nuevas variables mejora considerablemente el valor AIC asociado (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados comparación de AIC.

Modelo	AIC
Tratamiento	12089,881 ***
Tratamiento + Especie	7150,550 ***
Tratamiento + Especie + Tamaño	3466,942 ***
Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tratamiento-Tamaño)	3454,925
Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tratamiento-Especie)	3474,993
Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tamaño-Especie)	2578,009 ***
Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tratamiento-Tamaño) + (Tamaño-Especie)	2565.992 ***

***Valores poseen diferencia estadísticamente significativa

Al momento de estudiar si existe una asociación significativa entre las variables que pueda ayudarnos a explicar el comportamiento de nuestra variable de estudios, la interacción entre las variables *Tamaño* y *Especie* y *Tratamiento* y *Especie* resultaron significativa. A su vez, vemos que el valor AIC de este nuevo modelo (*Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tratamiento-Tamaño) + (Tamaño-Especie)*) es menor al antes mencionado (*Tratamiento*).

Para comprobar si las interacciones entre *Tamaño* y *Especie* y *Tratamiento* y *Tamaño* mejoran el modelo por sobre las tres variables por separado, se realiza

un test *Xi Cuadrado* que nos permite identificar si existen diferencias significativas entre estos 2 modelos.

Modelo 1: *Tratamiento + Especie + Tamaño*

Modelo 2: *Tratamiento + Especie + Tamaño + (Tamaño-Especie) + (Tratamiento-Tamaño)*

Del resultado del test (Tabla 10), podemos decir que existen diferencias significativas entre los modelos, donde según el criterio de AIC, concluimos que el modelo con ambas interacciones nos aporta la mejor información para explicar el comportamiento de nuestra variable de estudio.

Tabla 10: Resultados test *Xi Cuadrado*

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
Modelo 1	586	2190.7			
Modelo 2	550	1217	36	972.95	< 2.2e-16 ***

***Valores poseen diferencia estadísticamente significativa

La comparación entre el modelo inicial (1) y modelo optimizado (2) se puede observar en la Figura 20. Es importante destacar que ambos modelos son útiles para el análisis de datos por los siguientes motivos:

1. El modelo inicial brinda una explicación más cualitativa de los datos obtenidos. Permite realizar comparaciones de los resultados entre los tratamientos.
2. El modelo optimizado permite visualizar si al agregar las variables *Tamaño* y *Especies* como variables, estas mejoran de forma significativa el modelo presentado inicialmente.



En ese sentido, se puede concluir que al incluir estas variables al modelo inicial si se evidencia una mejora significativa pues, el valor de AIC es bajo (2565.992) y porque al comparar los errores entre los modelos, se observa una diferencia de 0,80 puntos entre el modelo inicial y el ajustado.

El modelo optimizado (Figura 21) se utilizó para hacer un nuevo análisis estadístico, cuyos resultados se ven en la Tabla 11.

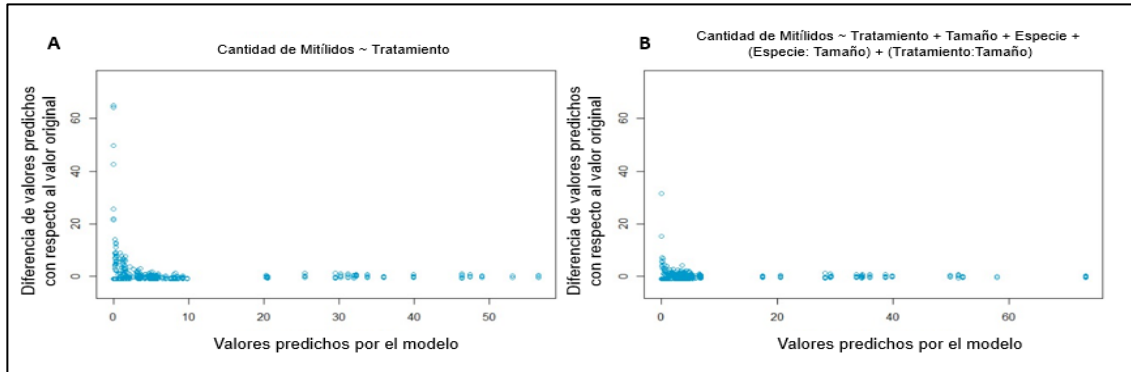


Figura 20: Comparación entre el modelo inicial (A) y el modelo optimizado (B).

$$\ln(Y) = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamiento} + \beta_2 \text{Tamaño} + \beta_3 \text{Especie} + \beta_4 (\text{Especie:Tamaño}) + \beta_5 (\text{Tratamiento:tamaño})$$

Figura 21: Ajuste del Modelo Inicial.

Tabla 11: Análisis estadístico modelo optimizado.

Coefficientes	Estimado(β_{1i})	Error estándar	Valor z	Pr (> z)
Intercepto (Blanco)	1.62268	0.05130	31.633	< 2e-16 ***
Control	0.60814	0.08248	7.373	1.67e-13 ***
Tratamiento Extracto Fracción Polar 1	0.26541	0.08823	3.008	0.002627 **
Tratamiento Extracto Fracción Polar 2	0.25180	0.08849	2.846	0.004432 **
Tratamiento Extracto Fracción Polar 3	-0.14175	0.09737	-1.456	0.145473
Tratamiento Extracto Hexano	0.37414	0.08623	4.339	1.43e-5 ***
Tratamiento Extracto Polar Total	-0.03132	0.09461	-0.331	0.740588
Tratamiento Extracto Total	0.22402	0.08903	2.516	0.011861*

(*) Valores poseen diferencia estadísticamente significativo.

De lo anterior, se observa que:

1. Los valores son de error estándar pequeños desde el punto de vista estadístico, por lo que se indica que el modelo utilizado para el análisis estadístico se ajusta muy bien a los datos obtenidos en la realidad.

2. Los coeficientes del modelo, indican que existen diferencias significativas (p -valor < 0.05) al comparar el *Blanco* con el resto de los tratamientos respecto a la variable “cantidad de mitílidos”, a excepción de los tratamientos *Extracto Fracción Polar 3* y *Extracto Polar Total*.



A continuación, se muestra el Coeficiente exponencial del modelo para cada tratamiento y su interpretación (Tabla 12).

Tabla 12: Interpretación de los coeficientes obtenidos para cada tratamiento modelo optimizado

Tratamientos	Coficiente Exponencial	Interpretación
Control	1,84	El promedio de mitílicos será 84% mayor usando el <i>Control</i> que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 1	1,30	El promedio de mitílicos será 30% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 2	1,27	El promedio de mitílicos será 27% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Fracción Polar 3	0,86	El promedio de mitílicos será 14% menor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Hexano	1.45	El promedio de mitílicos será 45% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Polar Total	0.97	El promedio de mitílicos será 3% menor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>
Extracto Total	1.25	El promedio de mitílicos será 25% mayor usando este tratamiento que usando el <i>Blanco</i>

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el experimento *in vitro* con larvas premetamórficas de *Choromytilus chorus* se puede mencionar que en concentraciones bajas (0,1 mg/mL) el extracto total de *C. chamissoi* aumenta en un 12,4% el porcentaje de supervivencia de las larvas (Figura 7) y en un 17,3% el porcentaje de asentamiento respecto al *Blanco* (Figura 8). Respecto a la causa de este aumento en ambos parámetros, no se descarta la posibilidad de que el extracto de *C. chamissoi* contenga algún tipo de metabolito que pudiera estar influyendo en estos procesos, pues como ya se ha mencionado con anterioridad, existen varios estudios que plantean la posibilidad de que las macroalgas produzcan algún tipo de compuesto desencadenante de asentamiento y metamorfosis en larvas de invertebrados marinos (Alfaro *et al.*, 2006; Dobretsov, 1999; Hayakawa *et al.*, 2007; Swanson *et al.*, 2004). Además, como las larvas se encontraban bajo condiciones sin alimento mientras estaban expuestas a los extractos, la supervivencia pudo haber aumentado debido a que estos podrían haber sido utilizados como fuente de carbono y energía.

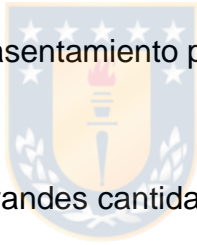
En concentraciones mayores a 1 mg/mL de extracto, la supervivencia disminuyó considerablemente llegando a 0% en el caso de 10 mg/mL (Figura 7), lo cual podría relacionarse con los compuestos detectados mediante GC-MS en el análisis de el extracto total de *C. chamissoi* (Figura 10). En este se puede

observar la presencia de ftalato de diisooctilo, un compuesto considerado antifouling (Bazes *et al.*, 2009) que, si bien se considera un contaminante de ambientes marinos y terrestres, hay autores que han postulado que este tipo de compuestos también sería sintetizado de forma natural por algunos tipos de macroalgas (Chen, 2004; Namikoshi *et al.*, 2006)

Interesantemente, se observa que el uso de solventes como el metanol, podría estar influyendo la supervivencia y el asentamiento de *C. chorus*, incluso superando el porcentaje de asentamiento observado en el tratamiento de 0,1 mg/mL con el alga *C. chamissoi* (Figura 8). La influencia de solventes orgánicos en los procesos de asentamiento y metamorfosis de invertebrados marinos ha sido reportada en otros experimentos *in vitro* (Pennington & Hadfield, 1989), por lo que no se descarta la posibilidad de que el metanol también estuviera ejerciendo algún tipo de influencia positiva en el proceso.

Para este experimento en particular, se recomienda en caso de repetir la experiencia, contar con un número mayor de replicas por tratamiento (para optimizar el análisis estadístico que se pudiera realizar) y que, en la medida de lo posible, se realicen con mayor detalle estudios de caracterización de los extractos a utilizar. También se recomienda utilizar algún tipo de solvente distinto al metanol para no provocar ruido de fondo al realizar las mediciones observadas.

En cuanto al experimento en terreno con mallas impregnadas con distintos tipos de extractos obtenidos de la macroalga *Chondracanthus chamissoi*, se puede observar que la mayor parte de las mallas tratadas con algún tipo de extracto del alga presentan un aumento en la cantidad de mitílidos asociados a su estructura respecto a las mallas *Blanco* (Tabla 12). Sin embargo, es interesante mencionar que las mallas *Control* (impregnadas solo con agar) son las que presentan el mayor porcentaje de asentamiento entre todos los tratamientos (con un 84% de aumento respecto al *Blanco*). Estos resultados, podrían sugerir que el agar no solo actuaría como impregnante para los extractos, sino que también podría ser una sustancia inductora del asentamiento primario en mitílidos.



Las macroalgas contienen grandes cantidades de polisacáridos, como alginatos (algas pardas) y carragenanos y agar (rojo algas) (Bueno *et al.*, 2019; Wijesinghe & Jeon, 2012). El agar es un polisacárido que se encuentra en la matriz y en la pared de las células de algas rojas y es usualmente extraído de especies de la familia *Gelidiaceae* y *Gracilariaceae*. Sin embargo, también puede ser encontrado en porcentajes variables en Rhodophytas de otros géneros (Painter, 1983). Investigaciones realizadas para estudiar el asentamiento primario y metamorfosis de larvas de distintos invertebrados marinos, revela que los polisacáridos generados por macroalgas, y por biofilms bacterianos asociados a ellas, tendrían un rol relevante en la inducción de estos procesos (Hadfield & Paul, 2001; Krug & Manzi, 1999; Moss, 1999; Tebben *et al.*, 2015). Por lo anterior, se sugiere

considerar en una próxima experiencia el realizar extractos de polisacáridos de *Chondracanthus chamissoi*, considerando que el porcentaje de polisacáridos es de más de 46% del total del peso seco de su talo (Vásquez *et al.*, 2019).

En las mallas anchoveteras utilizadas en los experimentos realizados en la bahía de Coliumo (Figura 2), se pudo observar la presencia de al menos 3 especies de mitílidos chilenos (Figura 11). Estas especies fueron identificadas como *Mytilus galloprovincialis* (Figura 12), *Semimytilus algosus* (Figura 13) y *Choromytilus chorus* (Figura 14), siendo *S. algosus* el que estuvo presente en mayor preponderancia correspondiendo a más de un 70% de los mitílidos extraídos totales (Figura 15 y Tabla 6). El sur de Chile posee una rica diversidad de mitílidos, siendo *Choromytilus chorus* y *Semimytilus algosus* dos de las especies más frecuentemente encontradas (Moreno *et al.*, 1986) lo cual se encuentra en concordancia con en este estudio. Por otra parte, *Mytilus galloprovincialis* también es comúnmente encontrado a lo largo de las costas del sur de Chile (Cáceres-Martínez *et al.*, 1994; Toro *et al.*, 2005).

Si bien hoy en día la extracción comercial de *S. algosus* no es tan popular, se podría recomendar que, en caso de realizar cultivos de esta especie, se utilice agar en la estructura de las cuelgas de cultivo para aumentar la captación de semillas.

Aunque se contempló, dentro de las variables de estudio, el rango de tamaño de los mitílidos asociados a las mallas como una variable que podría servir para extrapolar la edad aproximada de los individuos se recomienda que para un próximo trabajo se contemple como variable importante el estado de madurez sexual de las especies dentro del estudio, para de esta forma tener una medida estimativa de la edad de los individuos que componen las cohortes observadas.

El modelo lineal generalizado utilizado para analizar los resultados obtenidos en este experimento es ideal para el tipo de variable dependiente que estamos utilizando, pues al ser estos datos de conteo y no presentar una distribución normal, nos ayuda a comprender los patrones de distribución obtenidos en nuestros datos.

A partir de los resultados, podemos mencionar que existe diferencia significativa entre los modelos generados, evaluado y confirmado por el criterio AIC en conjunto con los análisis de Xi cuadrado. Es importante mencionar que ambos modelos son útiles al momento de analizar los datos. El modelo inicial permite comparar los resultados entre tratamientos. El modelo optimizado, por su parte, permite la visualización de variables interespecíficas, permitiendo observar la interacción de *Especie:Tamaño* y *Tratamiento:Tamaño* lo cual mejora de sobremanera el análisis global. Los valores de error obtenidos se adaptan muy bien a la realidad observada desde un punto de vista estadístico. Todos los

coeficientes evaluados presentan un p valor inferior a los 0.05 al momento de evaluar la variable cantidad de mitílidos como variable dependiente.

Trabajar en un medio ambiente natural tiene ventajas y desventajas a la hora de montar un experimento. Al realizar la experiencia bajo estas condiciones, podemos contemplar las variables reales que afectan o influyen en nuestra hipótesis. No obstante, múltiples factores podrían estar incidiendo en los resultados y podrían no ser contemplados en las mediciones; tales como condiciones climáticas, reproductivas, nutricionales, interacciones intra e interespecíficas, entre otras, influenciando directa o indirectamente los comportamientos de asentamiento y metamorfosis de los individuos en estudio.

Finalmente, comprender la ecología química que hay detrás de los procesos de colonización, asentamiento y metamorfosis en los sistemas bentónicos marinos aun es complejo y menos estudiado que las interacciones mediadas químicamente en la superficie terrestre. Esto se debe a que son pocos los inductores de asentamiento de larvas de invertebrados que hayan sido caracterizados químicamente, cuantificados in situ y que su concentración en condiciones naturales sea suficiente para inducir dichos procesos (Williamson *et al.*, 2000). Los inconvenientes para llevar a cabo las purificaciones y caracterizaciones necesarias son muchos, pero predominantemente se pueden resumir en (i) las moléculas suelen ser polares y (ii) los compuestos, incluso

cuando son altamente inductores, están presentes en concentraciones muy bajas (Hadfield & Paul, 2001)

Es por lo anterior que si bien esta tesis no puede explicar si la coexistencia de las algas de la especie *C. chamissoi* y de mitílidos presentes en las zonas del intermareal chileno es provocada solamente por las características morfológicas del alga en cuestión, o por alguna razón química, dicha interacción queda comprobada y podría ser utilizada para mejorar el proceso de asentamiento y crecimiento de mitílidos en los centros de cultivo.



BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, A. C., Copp, B. R., Appleton, D. R., Kelly, S., & Jeffs, A. G. (2006). Chemical cues promote settlement in larvae of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Aquaculture International*, 14(4), 405-412. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9041-y>
- Alfaro, A. C., & Jeffs, A. G. (2002). Small-scale mussel settlement patterns within morphologically distinct substrata at Ninety Mile Beach, northern New Zealand. *Malacologia*, 44, 1-15.
- Alfaro, A. C., Jeffs, A. G., & Creese, R. G. (2004). Bottom-drifting algal/mussel spat associations along a sandy coastal region in northern New Zealand. *Aquaculture*, 241(1-4), 269-290. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.029>
- Alfaro, A. C., Young, T., & Ganesan, A. (2011). Regulatory effects of mussel (*Aulacomya maoriana* Iredale 1915) larval settlement by neuroactive compounds, amino acids and bacterial biofilms. *Aquaculture*, 322-323, 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.038>
- Bao, W. Y., Satuito, C. G., Yang, J., & Kitamura, H. (2006). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Marine Biology*, 150(4), 565-574. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0383-4>
- Bazes, A., Silkina, A., Douzenel, P., Faÿ, F., Kervarec, N., Morin, D., Berge, J.-P., & Bourgougnon, N. (2009). Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9382-9>
- Bonar, D. B., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M., & Fitt, W. (1990). Control of Oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bulletin of Marine Science*, 46, 484-498.
- Bueno, M., Gallegos, R., Mendiola, J., & Ibañez, H. (2019). Downstream green processes for recovery of bioactives from algae. En A. Hallmann & P. Rampelotto (Eds.), *Grand Challenges in Algae Biotechnology* (pp. 399-425). Springer International Publishing.
- Bulleri, F., Airoidi, L., Branca, G. M., & Abbiati, M. (2006). Positive effects of the introduced green alga, *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*, on recruitment and survival of mussels. *Marine Biology*, 148(6), 1213-1220. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0181-4>
- Cáceres-Martínez, J., Robledo, J., & Figueras, A. (1994). Settlement and post-larvae behaviour of *Mytilus galloprovincialis*: Field and laboratory experiments. *Marine Ecology Progress Series*, 112, 107-117. <https://doi.org/10.3354/meps112107>

- Camus, P. A., & Andrade, Y. N. (1999). Diversidad de comunidades intermareales rocosas del norte de Chile y el efecto potencial de la surgencia costera. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 389-410.
- Carpizo-Iltuarte, E. (2002). Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas*, 28(2), 157-166. <https://doi.org/10.7773/cm.v28i2.217>
- Chen, C. Y. (2004). Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga *Bangia atropurpurea*. *Water Research*, 38(4), 1014-1018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.029>
- Coon, S. L., Fitt, W. K., & Bonar, D. B. (1990). Competence and delay of metamorphosis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 106(3), 379-387. <https://doi.org/10.1007/BF01344316>
- Dobretsov, S. V. (1999). Effects of macroalgae and biofilm on settlement of blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Biofouling*, 14(2), 153-165. <https://doi.org/10.1080/08927019909378406>
- Eyster, L. S., & Pechenik, J. A. (1987). Attachment of *Mytilus edulis* L. larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 144, 99-110.
- Figuerola, E. (2005). Biodiversidad marina: Valoración, usos y perspectivas: hacia dónde va Chile? Editorial Universitaria.
- Fundación Chile. (2017). "Validación del potencial de desarrollo de un centro de producción de semillas de *Mytilus chilensis*, (estudio de pre factibilidad)- programa estratégico industria Mitilicultora" (p. 108) [Informe final]. <http://www.mejillondechile.cl/wp-content/uploads/2017/12/Informe-Final-Centro-produccion-semilla-FCH.pdf>
- Gansbiller, C. M. (2013). Inducción de la fijación en moluscos bivalvos: Genes Homeobox y su conservación en bivalvos [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidade de Santiago de Compostela]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=119659>
- García, X. (2012, agosto 5). Mitilicultura en peligro. *Aqua*. <http://www.aqua.cl/reportajes/mitilicultura-en-peligro/>
- Godoy, K. (2020). Asentamiento primario de semillas de mitílidos en algas rojas (Rhodophytas) [Seminario de Título, para optar al título de Bióloga marina]. Universidad de Concepción.
- Gosling, E. (2015). *Marine Bivalve Molluscs (second)*. Wiley Blackwell.
- Hadfield, M., & Paul, V. (2001). Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. En J. McClintock & B. Baker (Eds.), *Marine Chemical Ecology* (pp. 431-461). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420036602.ch13>
- Harrold, C., Lisin, S., Light, K., & Tudor, S. (1991). Isolating settlement from recruitment of sea urchins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 147(1), 81-94. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90038-X)
- Hayakawa, J., Kawamura, T., Horii, T., & Watanabe, Y. (2007). Settlement of larval top shell *Turbo (Batillus) cornutus* in response to several marine

- algae. *Fisheries Science*, 73(2), 371-377. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01344.x>
- Holmberg, F. E. (2012). Identificación de la estructura genética poblacional de semillas de chorito *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) entre centros de captación natural en la Región de los Lagos [Tesis para Optar al Título de Ingeniero en Acuicultura.]. Universidad Austral de Chile.
- Johnson, C., Sutton, D., Olson, R., & Giddins, R. (1991). Settlement of crown-of-thorns starfish: Role of bacteria on surfaces of coralline algae and a hypothesis for deepwater recruitment. *Marine Ecology Progress Series*, 71, 143-162. <https://doi.org/10.3354/meps071143>
- Kajihara, T., & Oka, M. (1980). Seasonal occurrence of marine mussel plantigrades in Tokyo harbor. *Nippon Suidan Gakkaishi*, 46(2), 145-148. <https://doi.org/10.2331/suisan.46.145>
- Keough, M. J., & Downes, B. J. (1982). Recruitment of marine invertebrates: The role of active larval choices and early mortality. *Oecologia*, 54(3), 348-352. <https://doi.org/10.1007/BF00380003>
- Kitamura, H., Kitahara, S., & Koh, H. B. (1993). The induction of larval settlement and metamorphosis of two sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispira*, by free fatty acids extracted from the coralline red alga *Corallina pilulifera*. *Marine Biology*, 115(3), 387-392. <https://doi.org/10.1007/BF00349836>
- Krug, P. J., & Manzi, A. E. (1999). Waterborne and surface-associated carbohydrates as settlement cues for larvae of the specialist marine herbivore *Alderia modesta*. *The Biological Bulletin*, 197(1), 94-103. <https://doi.org/10.2307/1543000>
- Matsumura, K., Nagano, M., & Fusetani, N. (1998). Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *The Journal of Experimental Zoology*, 281(1), 12-20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980501\)281:1<12::AID-JEZ3>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980501)281:1<12::AID-JEZ3>3.0.CO;2-F)
- Mejillon de Chile. (2015). La industria del mejillón. Chile, el principal exportador mundial de mejillones. Mejillón de Chile. <http://www.mejillondechile.cl/industria/>
- Mercado, J. M., Carmona, R., & Niell, F. X. (1998). Bryozoans increase available CO₂ for photosynthesis in *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyceae). *Journal of Phycology*, 34(6), 925-927. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340925.x>
- Moreno, C. A. (1995). Macroalgae as a refuge from predation for recruits of the mussel *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) in Southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 191(2), 181-193. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00050-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00050-2)

- Moreno, Carlos A., Lunecke, K. M., López, M. I., & Lepez, M. I. (1986). The response of an intertidal *Concholepas concholepas* (Gastropoda) population to protection from man in Southern Chile and the effects on benthic sessile assemblages. *Oikos*, 46(3), 359. <https://doi.org/10.2307/3565835>
- Morse, A., & Morse, D. (1984). Recruitment and metamorphosis of *Haliotis linnaeus* larvae are induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 75, 191-215. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90166-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90166-7)
- Moss, G. (1999). Factors affecting settlement and early post-settlement survival of the New Zealand abalone *Haliotis australis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 33(2), 271-278. <https://doi.org/10.1080/00288330.1999.9516876>
- Murillo H., V., González M., R., Soto B., M., Espinoza A., C., & Pesse L., N. (2008). Diagnóstico y Proyección de las Actividades de Acuicultura entre Arica y Taltal (Informe final corregido FIP N  2008-34; p. 82). Instituto de fomento pesquero/División investigación en acuicultura. http://www.subpesca.cl/fipa/613/articulos-89244_informe_final.pdf
- Musquiz, L. (2017, mayo 9). Productores ven repunte en envíos de mejillones, tras ca da del precio. [Diario Digital]. *Economía y Negocio (El Mercurio)*. <http://www.economiaynegocios.cl/noticias/noticias.asp?id=358961>
- Namikoshi, M., Fujiwara, T., Nishikawa, T., & Ukai, K. (2006). Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Marine Drugs*, 4(4), 290-297. <https://doi.org/10.3390/md404290>
- Oliva, L. (2015). Estudio de valorización económica para modelo de gestión de centros semilleros de mejillón en base a pago por servicio ambiental (Informe de avance N.  1; p. 35). http://www.fundacionchinquihue.cl/web/wp-content/uploads/2016/01/valorizacion_economica_para_modelos_gestion.pdf
- Ortiz, J. (2011). Composición nutricional y funcional de las algas rodofíceas chilenas (p. 32) [Monografía]. Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121460>
- Painter, T. J. (1983). Algal polysaccharides. En *The Polysaccharides* (Vol. 2, pp. 195-285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065602-8.50009-1>
- Pearce, C. M., & Scheibling, R. E. (1990). Induction of metamorphosis of larvae of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, by coralline red algae. *The Biological Bulletin*, 179(3), 304-311. <https://doi.org/10.2307/1542322>
- Pennington, J. T., & Hadfield, M. G. (1989). Larvae of a nudibranch mollusc (*Phestilla sibogae*) metamorphose when exposed to common organic solvents. *The Biological Bulletin*, 177(3), 350-355.

<https://doi.org/10.2307/1541594>

- Petersen, J. (1984). Larval settlement behavior in competing species: *Mytilus californianus* Conrad and *M. edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 82, 147-159. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90100-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90100-X)
- Plaza, H., Ortuzar, Y., Gonzalez, M., & Aros, J. (2005). Estado de situación y perspectivas de la industria del chorito.
- Ramírez, S. C., & Cáceres-Martínez, J. (1999). Settlement of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck on artificial substrates in Bahía de Todos Santos B.C., Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 18(1), 33-39.
- Ramorino, L., & Campos, B. (1983). Larvas y postlarvas de Mytilidae de Chile (Mollusca: Bivalvia). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 19(2), 143-1953.
- Recabarren, P. (2012). Utilización de la técnica de tinción de Rojo Neutro para la categorización de la condición de vivo-moribundo-muerto de *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) (Copépoda: Caligidae) en bioensayos de sensibilidad a los antiparasitarios. Universidad Austral de Chile.
- Riofrío, O. L. (2013). Efecto de la variabilidad térmica sobre la biología vegetativa y reproductiva de *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing (Rhodophyta) en la bahía de Ancón, Perú. [Tesis para optar el Título Profesional de: Biólogo]. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
- Rodríguez, S., Ojeda, F. P., & Inestrosa, N. (1992). Inductores químicos del asentamiento de invertebrados marinos bentónicos: Importancia y necesidad de su estudio en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 65, 297-310.
- Ruiz, M., Tarifeño, E., Llanos-Rivera, A., Padgett, C., & Campos, B. (2008). Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(1), Article 1. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572008000100006>
- Salinas-Rodríguez, A., Manrique-Espinoza, B., & Sosa-Rubí, S. G. (2009). Análisis estadístico para datos de conteo: Aplicaciones para el uso de los servicios de salud. *Salud Pública de México*, 51(5). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000500007>
- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia*, 3, 277--316. <https://doi.org/10.1007/bf00390380>
- Soto, E. H., Báez, P., Ramírez, M. E., Letelier, S., Naretto, J., & Rebolledo, A. (2012). Biotopos marinos intermareales entre Canal Trinidad y Canal Smyth, Sur de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2), 177-191. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000200002>
- Steinberg, P. D., & de Nys, R. (2002). Chemical mediation of colonization of

- seaweed surface. *Journal of Phycology*, 38(4), 621-629. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.02042.x>
- Stott, A. E., Takeuchi, T., & Koike, Y. (2004). Testing various substances that have been bound to plastic plates with agar to induce larval settlement and metamorphosis of abalone *Haliotis discus discus* (Reeve). *Aquaculture*, 231(1-4), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.004>
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. (2005). Diagnóstico económico y social de la acuicultura en Chile (Informe final (Volumen I) FIP N° 2002-24; p. 185). http://www.subpesca.cl/fipa/613/articles-89006_informe_final.pdf
- Subsecretaria de Pesca y Acuicultura. (2014). Balance de gestión del sector acuicultor nacional, para el período 2010-2013 (p. 254). SUBPESCA. http://www.subpesca.cl/portal/618/articles-82688_documento.pdf
- Suenaga, K., Hori, H., Ishida, H., Nukaya, H., Roberts, R. D., & Tsuji, K. (2004). Inducing substance for abalone larval metamorphosis from the crustose coralline alga *Hydrolithon samoense*. *Fisheries Science*, 70(2), 342-344. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2003.00811.x>
- Swanson, R., Williamson, J., De Nys, R., Kumar, N., Bucknall, M. P., & Steinberg, P. D. (2004). Induction of settlement of larvae of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by histamine from a host alga. *The Biological Bulletin*, 206(3), 161-172. <https://doi.org/10.2307/1543640>
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A., Haik, Y., & Farid, M. (2014). Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.02.034>
- Tarifeño, E., Galleguillos, R., Gardner, J., Lépéz, I., Arriagada, D., Llanos, A., Astete, S., Ferrada, S., Rodríguez, S., & Gacitúa, S. (2005). Presencia del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) en las costas de la región del Biobío, Chile. XXV Congreso de Ciencias del Mar - XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Viña del Mar, Chile. [http://www.schcm.cl/web/images/congresos/\(25\)%20XXV%20Congreso%20de%20%20Ciencias%20del%20Mar%202005.pdf](http://www.schcm.cl/web/images/congresos/(25)%20XXV%20Congreso%20de%20%20Ciencias%20del%20Mar%202005.pdf)
- Tarifeño, Eduardo, Galleguillos, R., Llanos-Rivera, A., Arriagada, D., Ferrada, S., Canales-Aguirre, C. B., & Seguel, M. (2012). Erroneous identification of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) as the specie, *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) in the Bay of Concepcion, Chile. *Gayana (Concepción)*, 76(2), 167-172. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382012000300010>
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Tebben, J., Motti, C. A., Siboni, N., Tapiolas, D. M., Negri, A. P., Schupp, P. J., Kitamura, M., Hatta, M., Steinberg, P. D., & Harder, T. (2015). Chemical mediation of coral larval settlement by crustose coralline algae. *Scientific Reports*, 5(1), 10803. <https://doi.org/10.1038/srep10803>

- The European market for mussels | GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019, enero 29). <http://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resource-%20detail/en/c/338588/>
- Toonen, R. J., & Pawlik, J. R. (1996). Settlement of the tube worm *Hydroides dianthus* (Polychaeta: Serpulidae): cues for gregarious settlement. *Marine Biology*, 126(4), 725-733. <https://doi.org/10.1007/BF00351339>
- Torres, S., Cajas, D., Palfner, G., Astuya, A., Aballay, A., Pérez, C., Hernández, V., & Becerra, J. (2017). Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. *Natural Product Research*, 31(4), 473-476. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1185717>
- Toro, J., Ojeda, J., Vergara, A., Castro, G., & Alcalán, A. (2005). Molecular characterization of the chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1117-1121. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1117:MCOTCB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1117:MCOTCB]2.0.CO;2)
- Trapido-Rosenthal, H. G., & Morse, D. E. (1984). L- α , ω -Diamino acids facilitate GABA induction of larval metamorphosis in a gastropod mollusc (*Haliotis rufescens*). *Journal of Comparative Physiology B*, 155, 403–414. <https://doi.org/10.1007/BF00684669>
- Turner, E. J., Zimmer-Faust, R. K., Palmer, M. A., Luckenbach, M., & Pentchef, N. D. (1994). Settlement of oyster (*Crassostrea virginica*) larvae: Effects of water flow and a water-soluble chemical cue. 39(7), 1579-1593. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.7.1579>
- Vásquez, V., Martínez, R., & Bernal, C. (2019). Enzyme-assisted extraction of proteins from the seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Chondracanthus chamissoi*: Characterization of the extracts and their bioactive potential. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1999-2010. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1712-y>
- Vidal, L., & O’Ryan, C. (2015). Chicorea de mar (*Chondracanthus chamissoi*): Situación y perspectivas. [Documento temático]. Innova Chile de CORFO.
- Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. (2012). Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.016>
- Williams, E., Craigie, A., Yeates, A., & Degnan, S. (2008). Articulated coralline algae of the genus *Amphiroa* are highly effective natural inducers of settlement in the tropical abalone *Haliotis asinina*. *The Biological Bulletin*, 215(1), 98-107. <https://doi.org/10.2307/25470687>
- Williamson, J., De Nys, R., Kumar, N., Carson, D., & Steinberg, P. (2000). Induction of metamorphosis in the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from the algal host *Delisea pulchra*. *The Biological Bulletin*, 198(3), 332-345. <https://doi.org/10.2307/1542689>

- Wright, J., & Boxshall, A. (1999). The influence of small-scale flow and chemical cues on the settlement of two congeneric barnacle species. *Marine Ecology Progress Series*, 183, 179-187.
<https://doi.org/10.3354/meps183179>
- Yang, J., Satuito, C., Bao, W., & Kitamura, H. (2007). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on different macroalgae. *Marine Biology*, 152(5), 1121-1132.
<https://doi.org/10.1007/s00227-007-0759-0>



ANEXOS

Tabla A1: Base de datos experimento *in vitro*

Tratamiento	Larvas vivas	Larvas posadas	Larvas asentadas	Larvas muertas	Total larvas
Blanco	17	16	1	1	18
Blanco	15	14	1	4	19
Blanco	17	15	2	5	22
Blanco	10	8	1	12	22
Blanco	5	5	0	14	19
Blanco	4	2	2	16	20
Control	20	15	5	1	21
Control	18	17	1	0	18
Control	17	12	5	2	19
Control	16	12	4	0	16
Control	8	7	1	10	18
Control	16	14	2	0	16
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	18	13	5	4	22
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	18	16	2	2	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	14	12	2	4	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	14	12	2	4	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	17	13	4	3	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	18	18	0	1	19
E. T. C.	16	8	8	3	19

<i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)					
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	13	9	4	6	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	23	13	10	1	24
E. T. C. <i>chamissoi</i> (0,1mg/mL)	16	12	4	2	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	15	13	2	3	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	11	11	0	9	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	14	14	0	5	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	13	11	2	7	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	14	11	3	5	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	15	13	2	5	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	16	15	1	4	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	11	10	1	8	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	16	15	1	3	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (1mg/mL)	14	12	2	5	19
E. T. C. <i>chamissoi</i>	3	3	0	17	20

(5mg/mL)					
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	0	0	0	18	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	4	2	2	16	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	0	0	0	18	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	6	6	0	13	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	5	5	0	16	21
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	4	3	1	15	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	7	7	0	12	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	3	3	0	19	22
E. T. C. <i>chamissoi</i> (5mg/mL)	1	1	0	17	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	19	19
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	22	22
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	20	20

E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	22	22
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	18	18
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E. T. C. <i>chamissoi</i> (10mg/mL)	0	0	0	22	22
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	15	13	2	5	20
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	18	18	0	2	20
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	14	12	2	5	19
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	17	17	0	1	18
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	14	13	1	4	18
E.T. C. implexa (0,1mg/mL)	12	12	0	5	17
E.T. C. implexa (1mg/mL)	15	14	1	5	20
E.T. C. implexa (1mg/mL)	2	2	0	16	18
E.T. C. implexa (1mg/mL)	1	1	0	19	20
E.T. C. implexa (1mg/mL)	4	3	1	15	19
E.T. C. implexa (1mg/mL)	2	2	0	16	18
E.T. C. implexa (1mg/mL)	3	3	0	17	20
E.T. C. implexa (5mg/mL)	5	5	0	15	20
E.T. C. implexa (5mg/mL)	3	3	0	19	22

E.T. C. implexa (5mg/mL)	6	5	0	12	18
E.T. C. implexa (5mg/mL)	5	4	1	14	19
E.T. C. implexa (5mg/mL)	5	5	0	15	20
E.T. C. implexa (5mg/mL)	0	0	0	19	19
E.T. C. implexa (10mg/mL)	1	1	0	20	21
E.T. C. implexa (10mg/mL)	0	0	0	18	18
E.T. C. implexa (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E.T. C. implexa (10mg/mL)	0	0	0	20	20
E.T. C. implexa (10mg/mL)	0	0	0	18	18
E.T. C. implexa (10mg/mL)	0	0	0	17	17

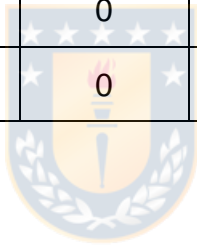


Tabla A2: Base de datos experimento en terreno

Tratamiento	Malla	Rango de Tamaño (mm)	Tipo de choro	Q de choros
Blanco	1	0.5 - 1.0	A	0
Blanco	1	1.0 - 1.5	A	4
Blanco	1	1.5 - 2.0	A	2
Blanco	1	2.0 - 2.5	A	1
Blanco	1	> 2.5	A	0
Blanco	1	0.5 - 1.0	B	34
Blanco	1	1.0 - 1.5	B	21
Blanco	1	1.5 - 2.0	B	0
Blanco	1	2.0 - 2.5	B	0
Blanco	1	> 2.5	B	0
Blanco	1	0.5 - 1.0	C	1
Blanco	1	1.0 - 1.5	C	0
Blanco	1	1.5 - 2.0	C	0
Blanco	1	2.0 - 2.5	C	0
Blanco	1	> 2.5	C	0
Blanco	2	0.5 - 1.0	A	0
Blanco	2	1.0 - 1.5	A	8
Blanco	2	1.5 - 2.0	A	5
Blanco	2	2.0 - 2.5	A	2
Blanco	2	> 2.5	A	0
Blanco	2	0.5 - 1.0	B	50
Blanco	2	1.0 - 1.5	B	16
Blanco	2	1.5 - 2.0	B	0
Blanco	2	2.0 - 2.5	B	0
Blanco	2	> 2.5	B	0
Blanco	2	0.5 - 1.0	C	1
Blanco	2	1.0 - 1.5	C	3
Blanco	2	1.5 - 2.0	C	0
Blanco	2	2.0 - 2.5	C	0
Blanco	2	> 2.5	C	0
Blanco	3	0.5 - 1.0	A	0

Blanco	3	1.0 - 1.5	A	3
Blanco	3	1.5 - 2.0	A	5
Blanco	3	2.0 - 2.5	A	1
Blanco	3	> 2.5	A	0
Blanco	3	0.5 - 1.0	B	35
Blanco	3	1.0 - 1.5	B	9
Blanco	3	1.5 - 2.0	B	0
Blanco	3	2.0 - 2.5	B	0
Blanco	3	> 2.5	B	0
Blanco	3	0.5 - 1.0	C	1
Blanco	3	1.0 - 1.5	C	4
Blanco	3	1.5 - 2.0	C	0
Blanco	3	2.0 - 2.5	C	0
Blanco	3	> 2.5	C	0
Blanco	4	0.5 - 1.0	A	3
Blanco	4	1.0 - 1.5	A	5
Blanco	4	1.5 - 2.0	A	7
Blanco	4	2.0 - 2.5	A	1
Blanco	4	> 2.5	A	0
Blanco	4	0.5 - 1.0	B	56
Blanco	4	1.0 - 1.5	B	14
Blanco	4	1.5 - 2.0	B	1
Blanco	4	2.0 - 2.5	B	0
Blanco	4	> 2.5	B	0
Blanco	4	0.5 - 1.0	C	0
Blanco	4	1.0 - 1.5	C	0
Blanco	4	1.5 - 2.0	C	0
Blanco	4	2.0 - 2.5	C	0
Blanco	4	> 2.5	C	0
Blanco	5	0.5 - 1.0	A	3
Blanco	5	1.0 - 1.5	A	3
Blanco	5	1.5 - 2.0	A	6
Blanco	5	2.0 - 2.5	A	1
Blanco	5	> 2.5	A	2
Blanco	5	0.5 - 1.0	B	39
Blanco	5	1.0 - 1.5	B	19
Blanco	5	1.5 - 2.0	B	4

Blanco	5	2.0 - 2.5	B	2
Blanco	5	> 2.5	B	1
Blanco	5	0.5 - 1.0	C	4
Blanco	5	1.0 - 1.5	C	1
Blanco	5	1.5 - 2.0	C	1
Blanco	5	2.0 - 2.5	C	0
Blanco	5	> 2.5	C	1
Control	1	0.5 - 1.0	A	3
Control	1	1.0 - 1.5	A	4
Control	1	1.5 - 2.0	A	6
Control	1	2.0 - 2.5	A	2
Control	1	> 2.5	A	0
Control	1	0.5 - 1.0	B	66
Control	1	1.0 - 1.5	B	41
Control	1	1.5 - 2.0	B	3
Control	1	2.0 - 2.5	B	1
Control	1	> 2.5	B	0
Control	1	0.5 - 1.0	C	10
Control	1	1.0 - 1.5	C	2
Control	1	1.5 - 2.0	C	1
Control	1	2.0 - 2.5	C	0
Control	1	> 2.5	C	0
Control	2	0.5 - 1.0	A	0
Control	2	1.0 - 1.5	A	1
Control	2	1.5 - 2.0	A	5
Control	2	2.0 - 2.5	A	0
Control	2	> 2.5	A	0
Control	2	0.5 - 1.0	B	38
Control	2	1.0 - 1.5	B	35
Control	2	1.5 - 2.0	B	4
Control	2	2.0 - 2.5	B	0
Control	2	> 2.5	B	0
Control	2	0.5 - 1.0	C	7
Control	2	1.0 - 1.5	C	4
Control	2	1.5 - 2.0	C	0
Control	2	2.0 - 2.5	C	0
Control	2	> 2.5	C	0

Control	3	0.5 - 1.0	A	6
Control	3	1.0 - 1.5	A	4
Control	3	1.5 - 2.0	A	14
Control	3	2.0 - 2.5	A	2
Control	3	> 2.5	A	0
Control	3	0.5 - 1.0	B	85
Control	3	1.0 - 1.5	B	23
Control	3	1.5 - 2.0	B	2
Control	3	2.0 - 2.5	B	0
Control	3	> 2.5	B	0
Control	3	0.5 - 1.0	C	5
Control	3	1.0 - 1.5	C	3
Control	3	1.5 - 2.0	C	1
Control	3	2.0 - 2.5	C	0
Control	3	> 2.5	C	0
Control	4	0.5 - 1.0	A	7
Control	4	1.0 - 1.5	A	4
Control	4	1.5 - 2.0	A	5
Control	4	2.0 - 2.5	A	0
Control	4	> 2.5	A	0
Control	4	0.5 - 1.0	B	81
Control	4	1.0 - 1.5	B	30
Control	4	1.5 - 2.0	B	3
Control	4	2.0 - 2.5	B	1
Control	4	> 2.5	B	0
Control	4	0.5 - 1.0	C	2
Control	4	1.0 - 1.5	C	5
Control	4	1.5 - 2.0	C	0
Control	4	2.0 - 2.5	C	0
Control	4	> 2.5	C	0
Control	5	0.5 - 1.0	A	3
Control	5	1.0 - 1.5	A	4
Control	5	1.5 - 2.0	A	11
Control	5	2.0 - 2.5	A	3
Control	5	> 2.5	A	0
Control	5	0.5 - 1.0	B	92
Control	5	1.0 - 1.5	B	21

Control	5	1.5 - 2.0	B	0
Control	5	2.0 - 2.5	B	0
Control	5	> 2.5	B	0
Control	5	0.5 - 1.0	C	12
Control	5	1.0 - 1.5	C	3
Control	5	1.5 - 2.0	C	0
Control	5	2.0 - 2.5	C	0
Control	5	> 2.5	C	0
Extracto Total	1	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Total	1	1.0 - 1.5	A	5
Extracto Total	1	1.5 - 2.0	A	4
Extracto Total	1	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Total	1	> 2.5	A	0
Extracto Total	1	0.5 - 1.0	B	44
Extracto Total	1	1.0 - 1.5	B	20
Extracto Total	1	1.5 - 2.0	B	3
Extracto Total	1	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Total	1	> 2.5	B	0
Extracto Total	1	0.5 - 1.0	C	3
Extracto Total	1	1.0 - 1.5	C	9
Extracto Total	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Total	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Total	1	> 2.5	C	0
Extracto Total	2	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Total	2	1.0 - 1.5	A	9
Extracto Total	2	1.5 - 2.0	A	4
Extracto Total	2	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Total	2	> 2.5	A	0
Extracto Total	2	0.5 - 1.0	B	80
Extracto Total	2	1.0 - 1.5	B	29
Extracto Total	2	1.5 - 2.0	B	1
Extracto Total	2	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Total	2	> 2.5	B	0
Extracto Total	2	0.5 - 1.0	C	2
Extracto Total	2	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Total	2	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Total	2	2.0 - 2.5	C	0

Extracto Total	2	> 2.5	C	0
Extracto Total	3	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Total	3	1.0 - 1.5	A	2
Extracto Total	3	1.5 - 2.0	A	3
Extracto Total	3	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Total	3	> 2.5	A	1
Extracto Total	3	0.5 - 1.0	B	49
Extracto Total	3	1.0 - 1.5	B	58
Extracto Total	3	1.5 - 2.0	B	19
Extracto Total	3	2.0 - 2.5	B	2
Extracto Total	3	> 2.5	B	0
Extracto Total	3	0.5 - 1.0	C	1
Extracto Total	3	1.0 - 1.5	C	10
Extracto Total	3	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Total	3	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Total	3	> 2.5	C	0
Extracto Total	4	0.5 - 1.0	A	5
Extracto Total	4	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Total	4	1.5 - 2.0	A	2
Extracto Total	4	2.0 - 2.5	A	3
Extracto Total	4	> 2.5	A	0
Extracto Total	4	0.5 - 1.0	B	40
Extracto Total	4	1.0 - 1.5	B	17
Extracto Total	4	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Total	4	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Total	4	> 2.5	B	0
Extracto Total	4	0.5 - 1.0	C	6
Extracto Total	4	1.0 - 1.5	C	5
Extracto Total	4	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Total	4	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Total	4	> 2.5	C	0
Extracto Total	5	0.5 - 1.0	A	4
Extracto Total	5	1.0 - 1.5	A	0
Extracto Total	5	1.5 - 2.0	A	8
Extracto Total	5	2.0 - 2.5	A	4
Extracto Total	5	> 2.5	A	0
Extracto Total	5	0.5 - 1.0	B	42

Extracto Total	5	1.0 - 1.5	B	38
Extracto Total	5	1.5 - 2.0	B	3
Extracto Total	5	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Total	5	> 2.5	B	0
Extracto Total	5	0.5 - 1.0	C	4
Extracto Total	5	1.0 - 1.5	C	7
Extracto Total	5	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Total	5	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Total	5	> 2.5	C	0
Extracto Polar Total	1	0.5 - 1.0	A	0
Extracto Polar Total	1	1.0 - 1.5	A	3
Extracto Polar Total	1	1.5 - 2.0	A	5
Extracto Polar Total	1	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Polar Total	1	> 2.5	A	0
Extracto Polar Total	1	0.5 - 1.0	B	39
Extracto Polar Total	1	1.0 - 1.5	B	25
Extracto Polar Total	1	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Polar Total	1	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Polar Total	1	> 2.5	B	0
Extracto Polar Total	1	0.5 - 1.0	C	2
Extracto Polar Total	1	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Polar Total	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Polar Total	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Polar Total	1	> 2.5	C	0

Extracto Polar Total	2	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Polar Total	2	1.0 - 1.5	A	3
Extracto Polar Total	2	1.5 - 2.0	A	10
Extracto Polar Total	2	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Polar Total	2	> 2.5	A	0
Extracto Polar Total	2	0.5 - 1.0	B	27
Extracto Polar Total	2	1.0 - 1.5	B	25
Extracto Polar Total	2	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Polar Total	2	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Polar Total	2	> 2.5	B	0
Extracto Polar Total	2	0.5 - 1.0	C	5
Extracto Polar Total	2	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Polar Total	2	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Polar Total	2	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Polar Total	2	> 2.5	C	0
Extracto Polar Total	3	0.5 - 1.0	A	3
Extracto Polar Total	3	1.0 - 1.5	A	0
Extracto Polar Total	3	1.5 - 2.0	A	8
Extracto Polar Total	3	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Polar Total	3	> 2.5	A	0

Extracto Polar Total	3	0.5 - 1.0	B	21
Extracto Polar Total	3	1.0 - 1.5	B	31
Extracto Polar Total	3	1.5 - 2.0	B	6
Extracto Polar Total	3	2.0 - 2.5	B	2
Extracto Polar Total	3	> 2.5	B	0
Extracto Polar Total	3	0.5 - 1.0	C	3
Extracto Polar Total	3	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Polar Total	3	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Polar Total	3	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Polar Total	3	> 2.5	C	0
Extracto Polar Total	4	0.5 - 1.0	A	0
Extracto Polar Total	4	1.0 - 1.5	A	7
Extracto Polar Total	4	1.5 - 2.0	A	5
Extracto Polar Total	4	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Polar Total	4	> 2.5	A	1
Extracto Polar Total	4	0.5 - 1.0	B	36
Extracto Polar Total	4	1.0 - 1.5	B	13
Extracto Polar Total	4	1.5 - 2.0	B	0
Extracto Polar Total	4	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Polar Total	4	> 2.5	B	0

Extracto Polar Total	4	0.5 - 1.0	C	3
Extracto Polar Total	4	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Polar Total	4	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Polar Total	4	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Polar Total	4	> 2.5	C	0
Extracto Polar Total	5	0.5 - 1.0	A	5
Extracto Polar Total	5	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Polar Total	5	1.5 - 2.0	A	10
Extracto Polar Total	5	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Polar Total	5	> 2.5	A	0
Extracto Polar Total	5	0.5 - 1.0	B	67
Extracto Polar Total	5	1.0 - 1.5	B	57
Extracto Polar Total	5	1.5 - 2.0	B	9
Extracto Polar Total	5	2.0 - 2.5	B	3
Extracto Polar Total	5	> 2.5	B	0
Extracto Polar Total	5	0.5 - 1.0	C	8
Extracto Polar Total	5	1.0 - 1.5	C	10
Extracto Polar Total	5	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Polar Total	5	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Polar Total	5	> 2.5	C	0

Extracto Hexano	1	0.5 - 1.0	A	0
Extracto Hexano	1	1.0 - 1.5	A	7
Extracto Hexano	1	1.5 - 2.0	A	8
Extracto Hexano	1	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Hexano	1	> 2.5	A	0
Extracto Hexano	1	0.5 - 1.0	B	66
Extracto Hexano	1	1.0 - 1.5	B	24
Extracto Hexano	1	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Hexano	1	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Hexano	1	> 2.5	B	0
Extracto Hexano	1	0.5 - 1.0	C	8
Extracto Hexano	1	1.0 - 1.5	C	14
Extracto Hexano	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Hexano	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Hexano	1	> 2.5	C	0
Extracto Hexano	2	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Hexano	2	1.0 - 1.5	A	2
Extracto Hexano	2	1.5 - 2.0	A	11
Extracto Hexano	2	2.0 - 2.5	A	4
Extracto Hexano	2	> 2.5	A	0
Extracto Hexano	2	0.5 - 1.0	B	66
Extracto Hexano	2	1.0 - 1.5	B	63
Extracto Hexano	2	1.5 - 2.0	B	12
Extracto Hexano	2	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Hexano	2	> 2.5	B	1
Extracto Hexano	2	0.5 - 1.0	C	6
Extracto Hexano	2	1.0 - 1.5	C	7
Extracto Hexano	2	1.5 - 2.0	C	1
Extracto Hexano	2	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Hexano	2	> 2.5	C	0
Extracto Hexano	3	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Hexano	3	1.0 - 1.5	A	7
Extracto Hexano	3	1.5 - 2.0	A	2
Extracto Hexano	3	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Hexano	3	> 2.5	A	0
Extracto Hexano	3	0.5 - 1.0	B	63
Extracto Hexano	3	1.0 - 1.5	B	19

Extracto Hexano	3	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Hexano	3	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Hexano	3	> 2.5	B	0
Extracto Hexano	3	0.5 - 1.0	C	2
Extracto Hexano	3	1.0 - 1.5	C	5
Extracto Hexano	3	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Hexano	3	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Hexano	3	> 2.5	C	0
Extracto Hexano	4	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Hexano	4	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Hexano	4	1.5 - 2.0	A	4
Extracto Hexano	4	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Hexano	4	> 2.5	A	0
Extracto Hexano	4	0.5 - 1.0	B	33
Extracto Hexano	4	1.0 - 1.5	B	45
Extracto Hexano	4	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Hexano	4	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Hexano	4	> 2.5	B	0
Extracto Hexano	4	0.5 - 1.0	C	6
Extracto Hexano	4	1.0 - 1.5	C	0
Extracto Hexano	4	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Hexano	4	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Hexano	4	> 2.5	C	0
Extracto Hexano	5	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Hexano	5	1.0 - 1.5	A	3
Extracto Hexano	5	1.5 - 2.0	A	6
Extracto Hexano	5	2.0 - 2.5	A	3
Extracto Hexano	5	> 2.5	A	0
Extracto Hexano	5	0.5 - 1.0	B	65
Extracto Hexano	5	1.0 - 1.5	B	29
Extracto Hexano	5	1.5 - 2.0	B	6
Extracto Hexano	5	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Hexano	5	> 2.5	B	0
Extracto Hexano	5	0.5 - 1.0	C	9
Extracto Hexano	5	1.0 - 1.5	C	0
Extracto Hexano	5	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Hexano	5	2.0 - 2.5	C	0

Extracto Hexano	5	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	1	0.5 - 1.0	A	7
Extracto Fracción Polar 1	1	1.0 - 1.5	A	6
Extracto Fracción Polar 1	1	1.5 - 2.0	A	6
Extracto Fracción Polar 1	1	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Fracción Polar 1	1	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 1	1	0.5 - 1.0	B	60
Extracto Fracción Polar 1	1	1.0 - 1.5	B	27
Extracto Fracción Polar 1	1	1.5 - 2.0	B	1
Extracto Fracción Polar 1	1	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Fracción Polar 1	1	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	1	0.5 - 1.0	C	7
Extracto Fracción Polar 1	1	1.0 - 1.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 1	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	1	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	2	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Fracción Polar 1	2	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Fracción Polar 1	2	1.5 - 2.0	A	7
Extracto Fracción Polar 1	2	2.0 - 2.5	A	3

Extracto Fracción Polar 1	2	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 1	2	0.5 - 1.0	B	55
Extracto Fracción Polar 1	2	1.0 - 1.5	B	46
Extracto Fracción Polar 1	2	1.5 - 2.0	B	7
Extracto Fracción Polar 1	2	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Fracción Polar 1	2	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	2	0.5 - 1.0	C	4
Extracto Fracción Polar 1	2	1.0 - 1.5	C	1
Extracto Fracción Polar 1	2	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 1	2	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	2	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	3	0.5 - 1.0	A	3
Extracto Fracción Polar 1	3	1.0 - 1.5	A	2
Extracto Fracción Polar 1	3	1.5 - 2.0	A	1
Extracto Fracción Polar 1	3	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Fracción Polar 1	3	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 1	3	0.5 - 1.0	B	33
Extracto Fracción Polar 1	3	1.0 - 1.5	B	17
Extracto Fracción Polar 1	3	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Fracción Polar 1	3	2.0 - 2.5	B	2

Extracto Fracción Polar 1	3	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	3	0.5 - 1.0	C	3
Extracto Fracción Polar 1	3	1.0 - 1.5	C	3
Extracto Fracción Polar 1	3	1.5 - 2.0	C	1
Extracto Fracción Polar 1	3	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	3	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	4	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Fracción Polar 1	4	1.0 - 1.5	A	2
Extracto Fracción Polar 1	4	1.5 - 2.0	A	6
Extracto Fracción Polar 1	4	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 1	4	> 2.5	A	2
Extracto Fracción Polar 1	4	0.5 - 1.0	B	47
Extracto Fracción Polar 1	4	1.0 - 1.5	B	29
Extracto Fracción Polar 1	4	1.5 - 2.0	B	1
Extracto Fracción Polar 1	4	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	4	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	4	0.5 - 1.0	C	3
Extracto Fracción Polar 1	4	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Fracción Polar 1	4	1.5 - 2.0	C	1
Extracto Fracción Polar 1	4	2.0 - 2.5	C	0

Extracto Fracción Polar 1	4	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	5	0.5 - 1.0	A	4
Extracto Fracción Polar 1	5	1.0 - 1.5	A	4
Extracto Fracción Polar 1	5	1.5 - 2.0	A	3
Extracto Fracción Polar 1	5	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 1	5	> 2.5	A	3
Extracto Fracción Polar 1	5	0.5 - 1.0	B	52
Extracto Fracción Polar 1	5	1.0 - 1.5	B	66
Extracto Fracción Polar 1	5	1.5 - 2.0	B	9
Extracto Fracción Polar 1	5	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	5	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 1	5	0.5 - 1.0	C	14
Extracto Fracción Polar 1	5	1.0 - 1.5	C	12
Extracto Fracción Polar 1	5	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 1	5	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 1	5	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	1	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Fracción Polar 2	1	1.0 - 1.5	A	0
Extracto Fracción Polar 2	1	1.5 - 2.0	A	4
Extracto Fracción Polar 2	1	2.0 - 2.5	A	2

Extracto Fracción Polar 2	1	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 2	1	0.5 - 1.0	B	21
Extracto Fracción Polar 2	1	1.0 - 1.5	B	17
Extracto Fracción Polar 2	1	1.5 - 2.0	B	3
Extracto Fracción Polar 2	1	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Fracción Polar 2	1	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	1	0.5 - 1.0	C	1
Extracto Fracción Polar 2	1	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Fracción Polar 2	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 2	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	1	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	2	0.5 - 1.0	A	1
Extracto Fracción Polar 2	2	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Fracción Polar 2	2	1.5 - 2.0	A	2
Extracto Fracción Polar 2	2	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 2	2	> 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 2	2	0.5 - 1.0	B	16
Extracto Fracción Polar 2	2	1.0 - 1.5	B	6
Extracto Fracción Polar 2	2	1.5 - 2.0	B	1
Extracto Fracción Polar 2	2	2.0 - 2.5	B	0

Extracto Fracción Polar 2	2	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	2	0.5 - 1.0	C	0
Extracto Fracción Polar 2	2	1.0 - 1.5	C	4
Extracto Fracción Polar 2	2	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 2	2	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	2	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	3	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Fracción Polar 2	3	1.0 - 1.5	A	8
Extracto Fracción Polar 2	3	1.5 - 2.0	A	9
Extracto Fracción Polar 2	3	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Fracción Polar 2	3	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 2	3	0.5 - 1.0	B	74
Extracto Fracción Polar 2	3	1.0 - 1.5	B	19
Extracto Fracción Polar 2	3	1.5 - 2.0	B	1
Extracto Fracción Polar 2	3	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	3	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	3	0.5 - 1.0	C	7
Extracto Fracción Polar 2	3	1.0 - 1.5	C	4
Extracto Fracción Polar 2	3	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 2	3	2.0 - 2.5	C	0

Extracto Fracción Polar 2	3	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	4	0.5 - 1.0	A	3
Extracto Fracción Polar 2	4	1.0 - 1.5	A	11
Extracto Fracción Polar 2	4	1.5 - 2.0	A	9
Extracto Fracción Polar 2	4	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 2	4	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 2	4	0.5 - 1.0	B	94
Extracto Fracción Polar 2	4	1.0 - 1.5	B	26
Extracto Fracción Polar 2	4	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Fracción Polar 2	4	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Fracción Polar 2	4	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	4	0.5 - 1.0	C	13
Extracto Fracción Polar 2	4	1.0 - 1.5	C	4
Extracto Fracción Polar 2	4	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 2	4	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	4	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	5	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Fracción Polar 2	5	1.0 - 1.5	A	3
Extracto Fracción Polar 2	5	1.5 - 2.0	A	10
Extracto Fracción Polar 2	5	2.0 - 2.5	A	4

Extracto Fracción Polar 2	5	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 2	5	0.5 - 1.0	B	50
Extracto Fracción Polar 2	5	1.0 - 1.5	B	65
Extracto Fracción Polar 2	5	1.5 - 2.0	B	14
Extracto Fracción Polar 2	5	2.0 - 2.5	B	5
Extracto Fracción Polar 2	5	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 2	5	0.5 - 1.0	C	7
Extracto Fracción Polar 2	5	1.0 - 1.5	C	8
Extracto Fracción Polar 2	5	1.5 - 2.0	C	2
Extracto Fracción Polar 2	5	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 2	5	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	1	0.5 - 1.0	A	0
Extracto Fracción Polar 3	1	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Fracción Polar 3	1	1.5 - 2.0	A	2
Extracto Fracción Polar 3	1	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 3	1	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	1	0.5 - 1.0	B	40
Extracto Fracción Polar 3	1	1.0 - 1.5	B	22
Extracto Fracción Polar 3	1	1.5 - 2.0	B	7
Extracto Fracción Polar 3	1	2.0 - 2.5	B	0

Extracto Fracción Polar 3	1	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	1	0.5 - 1.0	C	6
Extracto Fracción Polar 3	1	1.0 - 1.5	C	3
Extracto Fracción Polar 3	1	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	1	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	1	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	2	0.5 - 1.0	A	6
Extracto Fracción Polar 3	2	1.0 - 1.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	2	1.5 - 2.0	A	3
Extracto Fracción Polar 3	2	2.0 - 2.5	A	2
Extracto Fracción Polar 3	2	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	2	0.5 - 1.0	B	28
Extracto Fracción Polar 3	2	1.0 - 1.5	B	17
Extracto Fracción Polar 3	2	1.5 - 2.0	B	3
Extracto Fracción Polar 3	2	2.0 - 2.5	B	1
Extracto Fracción Polar 3	2	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	2	0.5 - 1.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	2	1.0 - 1.5	C	1
Extracto Fracción Polar 3	2	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	2	2.0 - 2.5	C	0

Extracto Fracción Polar 3	2	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	3	0.5 - 1.0	A	4
Extracto Fracción Polar 3	3	1.0 - 1.5	A	1
Extracto Fracción Polar 3	3	1.5 - 2.0	A	3
Extracto Fracción Polar 3	3	2.0 - 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	3	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	3	0.5 - 1.0	B	14
Extracto Fracción Polar 3	3	1.0 - 1.5	B	11
Extracto Fracción Polar 3	3	1.5 - 2.0	B	0
Extracto Fracción Polar 3	3	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	3	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	3	0.5 - 1.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	3	1.0 - 1.5	C	1
Extracto Fracción Polar 3	3	1.5 - 2.0	C	1
Extracto Fracción Polar 3	3	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	3	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	4	0.5 - 1.0	A	3
Extracto Fracción Polar 3	4	1.0 - 1.5	A	2
Extracto Fracción Polar 3	4	1.5 - 2.0	A	9
Extracto Fracción Polar 3	4	2.0 - 2.5	A	3

Extracto Fracción Polar 3	4	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	4	0.5 - 1.0	B	50
Extracto Fracción Polar 3	4	1.0 - 1.5	B	32
Extracto Fracción Polar 3	4	1.5 - 2.0	B	2
Extracto Fracción Polar 3	4	2.0 - 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	4	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	4	0.5 - 1.0	C	1
Extracto Fracción Polar 3	4	1.0 - 1.5	C	10
Extracto Fracción Polar 3	4	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	4	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	4	> 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	5	0.5 - 1.0	A	2
Extracto Fracción Polar 3	5	1.0 - 1.5	A	3
Extracto Fracción Polar 3	5	1.5 - 2.0	A	7
Extracto Fracción Polar 3	5	2.0 - 2.5	A	1
Extracto Fracción Polar 3	5	> 2.5	A	0
Extracto Fracción Polar 3	5	0.5 - 1.0	B	38
Extracto Fracción Polar 3	5	1.0 - 1.5	B	23
Extracto Fracción Polar 3	5	1.5 - 2.0	B	5
Extracto Fracción Polar 3	5	2.0 - 2.5	B	0

Extracto Fracción Polar 3	5	> 2.5	B	0
Extracto Fracción Polar 3	5	0.5 - 1.0	C	5
Extracto Fracción Polar 3	5	1.0 - 1.5	C	2
Extracto Fracción Polar 3	5	1.5 - 2.0	C	0
Extracto Fracción Polar 3	5	2.0 - 2.5	C	0
Extracto Fracción Polar 3	5	> 2.5	C	0



