



INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

EQUIPO EDITORIAL

Dirección

Dr. Jorge Silveira

Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

CONSEJO EDITORIAL

Dra. Sofia Barrios

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

MBA. Ing. Mariela De Giuda

Gerente de Tecnología y Gestión, Laboratorio Tecnológico
del Uruguay (LATU), Uruguay

Dr. Andrés Dieste

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez

Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay

PhD. Federico Harte

Profesor adjunto de Food Science, Penn State University,
Estados Unidos

MSc. Rosa Márquez

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo Méndez

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Química Biológica, Uruguay

PhD. Laura Moya Silva

Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez

INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel Volpe

Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio
Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

EDICIÓN

Carla Rizzotto

Edición revista INNOTEC, Centro de Información Técnica,
Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

Administración de OJS y gestión de información

Lic. Lorena Fiori

Centro de Información Técnica. Laboratorio
Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

EDITOR ASOCIADO

Dr. Ernesto Brugnoli

Oceanografía y Ecología Marina, Instituto de Ecología y
Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la
República

ACERCA DE INNOTEC

INNOTEC es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

Editada en Montevideo, Uruguay, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

El objetivo de la revista es la divulgación y transferencia del conocimiento en las áreas de Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria. INNOTEC está dirigida a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Redalyc, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



La colección completa se puede consultar en línea en <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No-Comercial 4.0 Internacional.

Los conceptos y opiniones vertidas en los artículos aquí publicados, así como el uso que otros puedan hacer de ellos, son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan el punto de vista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

INNOTEC - NÚMERO 21

Enero-Junio de 2021

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave:

INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado:

Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724,

internos 1314 y 1350

innotec@latu.org.uy

<http://www.latu.org.uy>

<http://ojs.latu.org.uy>

DISEÑO Y ARMADO

Happen Marketing

hola@happenmarketing.com

<https://happenmarketing.com>

En esta edición se incluye el artículo “El aporte de la ciencia ciudadana para generar un monitoreo visual de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba, Argentina”, basado en una investigación cuyo resumen fue presentado oralmente en el Foro sobre Mitigación de Eutrofización y Taller sobre Cianobacterias, que se realizó del 27 al 29 de noviembre de 2019, en el Complejo Hidroeléctrico Salto Grande (Argentina-Uruguay).

También se incluyen en este número el artículo “Dinámica larval del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes, río Santa Lucía, Uruguay” y el artículo de revisión “Ventajas y límites de la variabilidad morfológica para el establecimiento, la colonización y la expansión del bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* en Sudamérica”, ambos basados en investigaciones cuyos resúmenes fueron presentados oralmente en el Simposio “Ecología y manejo del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en Uruguay”, que se llevó adelante el 17 de diciembre de 2019, organizado por Oceanografía y Ecología Marina, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

SUMARIO

Artículos

- 10 **Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición**
Comparison of the size of gold nanoparticles using different measurement techniques and protocols
Botasini, Santiago
- 25 **Estudio comparativo de la densidad del agua y su aplicación en el presupuesto de incertidumbre para calibraciones en volumen**
Comparative study of the density of water and its application in the uncertainty budget for the volumen determination
Sica, Andrea; Preste, Sheila; Almeida, Gabriel; Esteves, Romina
- 36 **Digitalización y robotización del proceso de calibración de bloques patrón por comparación mecánica**
Digitalization and robotization of gauge blocks calibration by mechanical comparison
Constantino, Pablo; Acquarone, Alejandro
- 52 **Revalorización del descarte originado por la producción de jugo de manzana como ingrediente funcional en la formulación de premezclas para horneados**
Apple juice by-product used as a functional ingredient in bakery premixes formulation
Trias, Julieta; Curutchet, Ana; Arcia, Patricia; Cozzano, Sonia
- 68 **Determinación del contenido de antioxidantes naturales en frutos secos**
Natural antioxidant content in different nuts
Irigaray, Bruno; Callejas, Nicolás; Estradé, Dolores; Rebellato, Cecilia; Vieitez, Ignacio
- 89 **Hacia un monitoreo continuo de variables oceanográficas en el Parque Nacional Isla de Flores, Uruguay**
Towards continuous monitoring of oceanographic variables in Isla de Flores National Park, Uruguay
Trinchin, Romina; Manta, Gastón; Santana, Rafael; Rubio, Luis; Horta, Sebastián; Passadore, Cecilia; De Mello, Cecilia; Szephegyi, María Nube; Barreiro, Marcelo
- 109 **El aporte de la ciencia ciudadana para generar un monitoreo visual de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba, Argentina**
The contribution of citizen science to generate a visual monitoring of cyanobacteria in Los Molinos reservoir, Córdoba, Argentina
Bazán, Raquel; Cossavella, Ana; Calvimonte, Helena; Díaz Lozada, José; García, Carlos Marcelo; Carnicelli, Gabriel; Casas, Agustina; Jose, Greta; Gers Calamuchita; Escuela Alfonsina Storni
- 132 **Dinámica larval del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes, río Santa Lucía, Uruguay**
Larval development of golden mussel *Limnoperna fortunei* in Aguas Corrientes reservoir, Santa Lucía river, Uruguay
Somma, Andrea; Nogueira, Lucía; González-Madina, Lucía; Langone, José A.

Revisión

- 153 **Ventajas y límites de la variabilidad morfofisiológica para el establecimiento, la colonización y la expansión del bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* en Sudamérica**
Benefits and limits of morphophysiological variability for the establishment, colonization, and expansion of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* in South America
Paolucci, Esteban Marcelo

POLÍTICA EDITORIAL DEL LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales. Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas del LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>) o a contactarse con el Centro de Información Técnica del LATU a través del correo electrónico innotec@latu.org.uy para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

CÓDIGO ÉTICO DE INNOTEC

La revista INNOTEC adhiere a los principios publicados por COPE (Committee on Publication Ethics) en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct> y promueve así la conducta ética de todos los participantes del proceso editorial: autores, revisores y equipo editorial.

Los autores se comprometen a:

- Enviar artículos originales, de su autoría y que no infrinjan derechos de propiedad intelectual y/o derecho de imagen y/o de datos personales de terceros, e inéditos, que no hayan sido presentados simultáneamente a otra publicación.
- Asegurar la veracidad de los datos presentados en su investigación.
- Asegurar la integridad de su investigación, evitando la publicación de resultados parciales.
- Consignar a los autores en base al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

Los revisores se comprometen a:

- Declarar que no existe conflictos de interés para la evaluación de un artículo.
- Realizar su evaluación respondiendo a criterios objetivos y respetando su independencia académica.
- Asegurar la confidencialidad tanto del contenido del artículo como del resultado de su evaluación.
- Preservar el anonimato en todo el proceso, apelando al editor como intermediario de cualquier comunicación con los autores.
- Respetar los tiempos acordados con los editores de la revista para la realización de su trabajo.

El equipo editorial se compromete a:

- Asegurar la honestidad y transparencia de todo el proceso editorial, desde la presentación del artículo, evaluación por pares y publicación en las condiciones pautadas.
- Seleccionar los revisores idóneos para cada trabajo.
- Garantizar la independencia de criterio de los revisores en el ejercicio de su rol.
- Asegurar el anonimato de todas las partes involucradas en el proceso de arbitraje por pares.
- Mediar en posibles conflictos de interés con el apoyo del consejo editorial.
- Velar por el cumplimiento de los plazos acordados en cada fase del proceso.
- Difundir los números publicados en las redes académicas y bases bibliográficas de su entorno local y regional.
- Controlar el cumplimiento de los requisitos por parte de los autores y la actuación acorde de los árbitros.
- Identificar casos de incumplimiento de los compromisos éticos enumerados en este código y penalizar a sus responsables con sanciones que van de la suspensión del infractor en su rol en el proceso editorial a la difusión de una rectificación pública y la remoción del artículo.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA PUBLICAR EN INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en español e inglés. Los campos temáticos que aborda responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU: Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

Esta publicación semestral arbitrada por un comité de revisores externos recopila las investigaciones realizadas en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

INNOTEC no cobra cargos de ningún tipo por el envío de originales ni por su procesamiento. El tiempo estimado para los procesos de evaluación y publicación es de 8 a 12 semanas.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

- (a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones en la web: <http://ojs.latu.org.uy>.
- (b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En este paso se considera la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.
- (c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.
- (d) Se asignan los árbitros, independientes y externos, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.
- (e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente. Los artículos son publicados en OJS y se distribuyen bajo la modalidad de acceso abierto. Los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 4.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

Los autores están autorizados a realizar una publicación simultánea en sistemas de autoarchivo o repositorios institucionales.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

PROCESO DE REVISIÓN

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso. El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla. Cada artículo es revisado por un mínimo de dos árbitros. Los comentarios y recomendaciones de los evaluadores son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU; no obstante, el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, prestigio académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que una vez completo es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

NORMAS DE PRESENTACIÓN Y ENVÍO DE LOS TEXTOS

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta dirijase al correo electrónico de referencia innotec@latu.org.uy.

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS, pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

DEFINICIONES:

Autor. Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.

Resumen. Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

Introducción. Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

Materiales y Métodos. Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

Resultados. Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.

Discusión y conclusiones. Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo con respecto al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

Agradecimientos. Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

Referencias. Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

LOS ARTÍCULOS DEBEN PRESENTAR:

Título del artículo en mayúsculas y minúsculas, en inglés, español y portugués.

Nombre completo de todos los autores (solo en metadatos de OJS), ingresados en orden decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen y empresa de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes. Los autores deberán contar con un número de registro en ORCID, que se consigna en OJS al ingresar los autores en metadatos. Para más información sobre ORCID y su relevancia para los autores puede consultar esta página: <https://orcid.org/>.

Resumen en inglés, español y portugués, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

Palabras clave, en inglés, español y portugués, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes, (ver sección Estilo y formato de citas y referencias en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato.doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

Secciones. Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

Fórmulas, figuras, tablas e imágenes. Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión).

Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte superior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla, no dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas. Además de estar insertadas en el artículo, cada figura y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

ESTILO DE CITAS Y REFERENCIAS SEGÚN EL SISTEMA HARVARD

Si el texto está en inglés utilizar «and» en lugar de «y», «In:» en lugar de «En:», «[Accessed: day month year]» en lugar de «[Consulta: día mes año]» y «Available at:» en lugar de «Disponible en:»

Ejemplos usuales de citas

Registro de citas textuales

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

Registro de cita ideológica o paráfrasis

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

Ejemplos usuales de referencias monografías (libros)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. *Título del libro* en cursiva. N^o de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; N^o). ISBN (Este último si se posee)

Bobbio, Norberto, 1958. *Autobiografía*. Madrid: Taurus. ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. *Barley for food and health: science, technology, and products*. Nueva York: John Wiley & Sons

Revistas como un todo

Título de la publicación en cursiva. Responsabilidad. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN

Boletín Económico. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979- . ISSN: 0210-3737

Artículos de revistas

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen (Número), páginas. DOI (siempre que el artículo lo posea).

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp.625-638. DOI: 10.1109/12.689643

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*, (143), pp.33-37.

Normas

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. *No. o código de la norma: Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. *UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. *UNIT-ISO 9001: Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT.

Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

Responsabilidad principal, año. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado. DOI (siempre que el material lo posea)

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfah.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

Patentes

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P., 2009. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.

Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición

Comparison of the size of gold nanoparticles using different measurement techniques and protocols

Comparaçãõ do tamanho de nanopartículas de ouro usando diferentes técnicas e protocolos de mediçãõ

RECIBIDO: 23/7/2020 → APROBADO: 13/10/2020 ✉ sbotasini@fcien.edu.uy

 BOTASINI, SANTIAGO (1)

(1) LABORATORIO DE BIOMATERIALES, INSTITUTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Con el avance de la nanotecnología, tanto en el ámbito académico como comercial, ha crecido la necesidad de contar con técnicas y protocolos de caracterización de nanopartículas. Si bien existen varios métodos de medida, el “verdadero” tamaño de las nanopartículas no puede entenderse en términos absolutos, sino que está relacionado con la forma y el tipo de nanomaterial, además de la técnica y los protocolos o criterios asociados a estas mediciones. En otras palabras, cuando hablamos del tamaño de una partícula debemos tener presente dos preguntas básicas: ¿qué estamos midiendo? y ¿cómo medimos? Desde el punto de vista de la metrología, es importante centrar la discusión en los criterios a tener en cuenta y en los parámetros adicionales que debemos reportar a la hora de presentar un resultado de tamaño de nanopartículas. El presente trabajo muestra, a título comparativo, la caracterización de nanopartículas homogéneas de oro empleando diferentes técnicas y criterios de medida para los métodos de rutina DLS, UV-VIS y HR-TEM. Los resultados muestran que cuando hablamos del tamaño de partículas es necesario hacer referencia al modelo empleado, así como también a los criterios elegidos a la hora de realizar el recuento.

PALABRAS CLAVE: partículas homogéneas, síntesis, coloides, nanometrología.

ABSTRACT

With the increasing advance of nanotechnology, both in the academic and commercial areas, the need for nanoparticle characterization techniques and

protocols has grown. Although there are several measurement methods, the “true” size of nanoparticles cannot be understood in absolute terms but related to the material, the technique and to the protocols or criteria associated with these measurements. In other words, when we talk about the size of a particle, we must take into account two basic questions: what are we measuring? and how do we measure? From the metrological point of view, it is important to discuss the criteria to take into account, and which additional parameters should we report when presenting a nanoparticle size result. The present work shows, comparatively, the characterization of the size of homogeneous gold nanoparticles, using different techniques and measurement criteria with DLS, UV-VIS and HR-TEM methods. The results show how the definition of size is important to establish a result, as well as the criteria chosen when performing the particle counting.

KEYWORDS: homogeneous particles, synthesis, colloids, nanometrology.

RESUMO

Com o crescente avanço da nanotecnologia, tanto na esfera acadêmica quanto comercial, aumentou a necessidade de técnicas e protocolos de caracterização de nanopartículas. Embora existam vários métodos de medição, o tamanho “verdadeiro” das nanopartículas não pode ser entendido em termos absolutos, mas está relacionado ao tipo de material de cada técnica e aos protocolos ou critérios associados a essas medidas. Em outras palavras, quando falamos sobre o tamanho de uma partícula, devemos ter em mente duas perguntas básicas: o que estamos medindo? e como medimos? Do ponto de vista da metrologia, é importante focar a discussão nos critérios a serem levados em consideração e quais parâmetros adicionais devemos reportar ao apresentar um resultado de tamanho de nanopartícula. O presente trabalho mostra, para fins comparativos, a caracterização do tamanho de nanopartículas homogêneas de ouro, utilizando diferentes técnicas e critérios de medição para os métodos rotineiros de DLS, UV-VIS e HR-TEM. Os resultados mostram como, quando falamos em tamanho de partículas, é necessário fazer referência ao modelo utilizado, bem como aos critérios escolhidos ao fazer a contagem.

PALAVRAS-CHAVE: partículas homogêneas, síntese, coloides, nanometrologia.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha extendido el uso de nanopartículas de oro y plata con diversos fines, desde la química analítica y la ingeniería hasta la medicina. Estas nanopartículas aparecen en un gran número de aplicaciones comerciales, aprovechando las propiedades únicas que surgen de la naturaleza nanométrica del material, las cuales varían en función de sus características fisicoquímicas como la concentración, la distribución de tamaño, la composición, la forma, las propiedades de superficie (como área superficial, carga y química de superficie), la aglomeración y la naturaleza del material (Rasmussen, et al., 2018). Si bien existen técnicas y protocolos estandarizados para la caracterización de algunas nanoestructuras específicas, todavía no existen protocolos nacionales o internacionales generalizados para la evaluación de estas propiedades (Eaton, et al., 2017; Rogers, et al., 2018; Minelli, et al.,

2019). Una de las razones de esta carencia técnica es la gran diversidad de materiales; aun limitando el tipo de nanoestructura al caso específico de las nanopartículas de oro, también se evidencia la falta de estándares que permitan la comparación de medidas entre distintos laboratorios y la validación de nuevas técnicas y criterios a ser adoptados para la caracterización de las dispersiones coloidales. Salvo algunas excepciones de productos particulares, es sabido que en materia de regulación, tanto en nuestro país como en varios otros, existe un vacío legal al tratar los nanomateriales como meros productos químicos; y los pocos intentos que hay en materia de normativas son regulaciones blandas y voluntarias, que, aunque importantes, resultan insuficientes (Tanaka, 2019). En general, la toxicidad se reduce a especificar la identidad o naturaleza química del material y la dosis o concentración, cuando para el caso de los nanomateriales es necesario considerar también el tamaño, la forma y el agente estabilizante (en el caso de dispersiones coloidales).

El problema de la falta de protocolos y políticas regulatorias no es solamente legal, sino que tiene un origen técnico debido a la dificultad de generar procedimientos y materiales de referencia generalizados (Domingos, et al., 2009; Rogers, et al., 2018). A modo de ejemplo, pequeños cambios de tamaño de las nanopartículas pueden producir modificaciones drásticas en las propiedades. En particular, la carencia de materiales de referencia y de patrones de medida a nivel internacional dificulta la validación de las técnicas de laboratorio. Este problema se acentúa con el hecho de que la nanotecnología es un área de investigación dinámica, donde nuevos métodos de medición se siguen desarrollando y mejorando de forma continua, lo cual también impone un obstáculo en la generación de consensos internacionales sobre cuáles propiedades merecen ser medidas y cuál es la mejor forma de hacerlo. Para el caso de las nanopartículas metálicas de oro y plata, el National Institute of Standards and Technology (NIST), de Estados Unidos, solamente cuenta con estándares para algunos tamaños determinados (10, 30 y 60 nm SRM 8011, SRM 8012 y SRM 8013 respectivamente) (Bienert, et al., 2009; Nelson, et al., 2013).

Dentro de este contexto, desde el Laboratorio de Biomateriales hemos estado trabajando en aportar nuestro grano de arena para solucionar algunos de los desafíos que presenta el área. En particular, se ha trabajado en la detección de nanopartículas de plata a través del proyecto “Determinación de material nanoparticulado de plata (nano silver) en productos comerciales”, financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), e implementado por Santiago Botasini y Eduardo Méndez en 2020. En concreto, se desarrolló un protocolo analítico basado en las señales electroquímicas de la oxidación de las nanopartículas de plata, cuyo uso se ha extendido en diversos productos comerciales tales como agentes antibacterianos. Nuestro proyecto más reciente en materia de nanometrología, titulado “Fabricación de estándares de nanopartículas” y financiado por el Fondo Carlos Vaz Ferreira, se enfocó en la síntesis de nanopartículas de oro con similares prestaciones a las comerciales en términos de alta homogeneidad (bajo índice de polidispersión) y estabilidad de la muestra frente a la agregación (detectado por un cambio en el diámetro de la partícula).

En este sentido, el siguiente desafío consiste en generar un mayor conocimiento técnico que permita servir de insumo para la generación de protocolos de calidad,

a fin de evaluar las propiedades de las nanopartículas tanto a nivel de producción de laboratorio como de su implementación en productos comerciales.

Si bien las medidas de distribución de tamaño son una práctica de rutina de los laboratorios que trabajan con nanoestructuras, muchas veces los criterios de medición elegidos no se especifican y la medida queda a merced del analista. Incluso en algunos ejemplos, el recuento de partículas se realiza de forma manual sobre imágenes de microscopía electrónica (Hinterwirth, et al., 2013). Dentro de este contexto, el presente trabajo aborda la discusión sobre los criterios y protocolos comúnmente empleados para el recuento de nanopartículas por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) y su comparación con otras técnicas de rutina a nivel de laboratorio, como son las medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) y la espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de oro ultra-homogéneas

Todos los materiales empleados fueron de pureza analítica: ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma-Aldrich), citrato de sodio di-hidratado (99%, Carlo-Erba), hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Anedra). Todas las soluciones se prepararon empleando agua ultrapura (resistividad $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Mili Q).

La síntesis de nanopartículas se realizó mediante el método de Turkevich (Turkevich, 1985), con algunas modificaciones (Méndez y Botasini, 2019): 65 μL de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 50 mg mL^{-1} fue rápidamente adicionada en 50 mL de una disolución de NaOH ligeramente alcalina a pH 7.5 – 8.0, en un balón de 100 mL. La solución resultante se calentó a ebullición y luego se agregaron 86 μL de una disolución 114 mg mL^{-1} de citrato de sodio di-hidratado. El color de la solución cambió rápidamente de amarillo a azul y finalmente a rojo. El tiempo de reacción fue de 20 minutos, tras lo cual la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez sintetizadas, las nanopartículas fueron filtradas consecutivamente, empleando filtros Whatman Anotop de tamaño de poro nominal 0.2 μm y 0.02 μm , para asegurar la mínima dispersión de tamaños.

Medidas por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM)

Se realizaron las medidas en un microscopio electrónico modelo JEM 2100, a temperatura ambiente (ca. 24 °C), en una grilla de carbono sobre la que se depositó una dispersión coloidal de nanopartículas con una absorbancia de ca. 1. La muestra se dejó secar por ca. 40 min. La tensión eléctrica de aceleración aplicada fue de 200 kV mediante un filamento de hexaboruro de lantano.

El procesamiento de imágenes se realizó mediante el software libre ImageJ, versión 1-8-0_112 (National Institutes of Health y Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, 2019).

La obtención de imágenes se realizó de forma aleatoria a fin de tener una representación objetiva del tamaño de la muestra, evitando los bordes de la grilla o

aglomeramientos de partículas que no permiten aplicar un recuento automático. El siguiente paso consistió en establecer la escala de la imagen (relación píxeles/distancia) empleando las herramientas del programa ImageJ.

Para el cálculo de tamaños, primero se convirtió la imagen a formato binario. Utilizando las herramientas del software se realizó un recuento automático de las partículas, excluyendo las partículas que se encontraban sobre los bordes de la imagen (esto se realiza de forma automática con el software).

Se evaluó el comportamiento empleando criterios distintos de circularidad. En todos los casos se impuso una restricción de tamaño mínimo de 1 nm² de área (para evitar el recuento de píxeles aislados), pero no hubo ninguna restricción de tamaño máximo. La circularidad se define según la siguiente expresión:

$$Circularidad = 4\pi (Área/Perímetro^2)$$

Para cada imagen se obtuvieron los mensurandos: área, diámetro de Feret y diámetro mínimo de Feret. La distribución de tamaños de la población se estimó empleando las herramientas estadísticas del software Origin (OriginLab, 2020). Se ajustaron los resultados a una función gaussiana para el cálculo del diámetro equivalente (obtenido a partir del área de cada partícula) y el diámetro de Feret.

Medidas por dispersión de luz (DLS)

Las medidas de las muestras sintetizadas se realizaron en un equipo marca Brookhaven, modelo ZPlus, siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 22412 (International Organization for Standardization, 2017).

Medidas espectrofotométricas (UV-Vis)

Las medidas se realizaron en una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico, en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-1603, empleando agua ultrapura como blanco, y barriendo el espectro entre 350 nm – 900 nm.

Simulaciones de los espectros de nanopartículas

La simulación de los espectros de las nanopartículas de oro se realizó mediante el software MiePlot v4.6, el cual computó la absorción y la dispersión por sección de una esfera de oro en función de la longitud de onda incidente sobre la nanopartícula. El programa empleó el algoritmo BHMIE para la resolución de las ecuaciones de Mie que describen el comportamiento óptico de los espectros de nanopartículas (Bohren y Huffman, 2004; Laven, 2018). El medio se simuló mediante el algoritmo de Segelstein, que tomó en cuenta la componente real e imaginaria del índice de refracción del agua a diferentes longitudes de onda. (Segelstein, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de comenzar con la comparación de los distintos criterios de medida, lo primero que debemos considerar es la relación entre el objeto real y el mensurando que define su tamaño. En este sentido, no hay que perder de vista que las nanopartículas son cuerpos tridimensionales, mientras que las medidas se basan en mediciones sobre una imagen bidimensional (mediciones por HR-TEM), o bien en la aproximación de este cuerpo a esferas perfectas (medidas por DLS y simulaciones basadas en la teoría de Mie). Esta limitante siempre está presente y debe ser tomada en cuenta a la hora de definir el tamaño de las nanopartículas. Aun cuando el objeto de estudio sea esférico y homogéneo, en cualquiera de las técnicas la determinación del tamaño medido no siempre se correlaciona con el tamaño real de la partícula. A modo de ejemplo, mientras que en la microscopía TEM el tamaño corresponde a la medida de la “sombra” o la proyección de la imagen definida por el núcleo metálico (Figura 1), el diámetro medido por DLS será, en cambio, el diámetro hidrodinámico, definido no solamente por el tamaño del núcleo metálico sino también por la doble capa eléctrica que se genera entre la superficie de la partícula y el seno de la solución. Los cambios en la estructura de la superficie de la nanopartícula y/o en la concentración de electrolitos del medio modifican el tamaño de la doble capa eléctrica y, por tanto, el radio hidrodinámico.

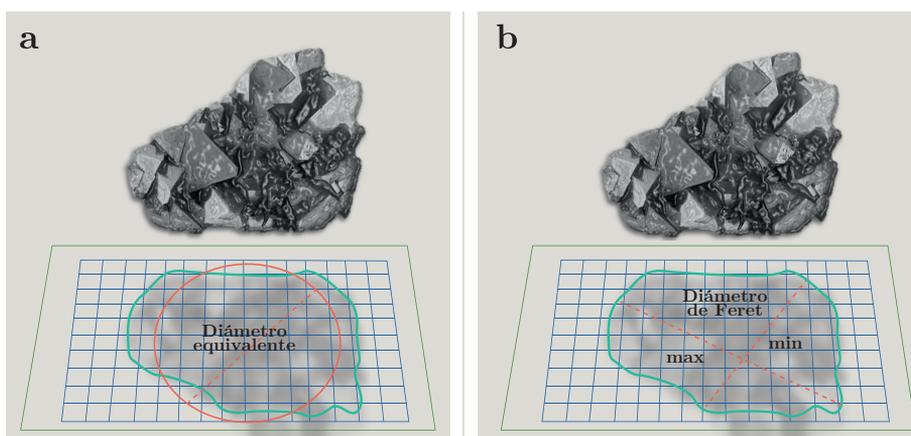


Figura 1. (a) Diámetro equivalente definido como el diámetro del círculo cuya área es igual al área de la proyección de la partícula sobre la pantalla. (b) Diámetro de Feret definido como la distancia entre los dos planos paralelos que restringen el objeto perpendicular a esa dirección. Se define un máximo y mínimo. El diámetro de Feret es el promedio entre el diámetro máximo y mínimo.

La Tabla 1 exhibe la comparación de las medidas por microscopía electrónica sobre una misma muestra, a distintos grados de magnificación y circularidad empleadas en el recuento automático para los dos mensurandos propuestos: el diámetro equivalente y el diámetro de Feret (Figura 1). Para cualquiera de las tres relaciones de tamaño,

al restringir la circularidad el tamaño medio es menor. Este efecto se debe a que, en ausencia de restricciones, el recuento considera no solamente las partículas libres sino también los agregados (Figura 2), mientras que al establecer un valor de circularidad se limita el recuento de estas aglomeraciones. En contrapartida, el número total de nanopartículas decrece de forma considerable. Este efecto incrementa para una magnificación mayor de la imagen (mayor relación píxel/nm), lo cual sugiere que a menor aumento se pierde la información de borde de la partícula y, por lo tanto, aparenta tener una circularidad mayor. El criterio elegido deberá ser dependiente de la relación píxel/nm de la imagen. Tanto el mínimo y máximo tamaño como la circularidad tienen que establecerse cuidadosamente porque influyen directamente en la distribución del tamaño y, por consiguiente, en el diámetro promedio. A su vez, la circularidad depende del área y del perímetro. En el cálculo de este último, cambios en la calidad de la imagen, en la resolución o en el brillo pueden llegar a afectar la circularidad de la partícula y, por tanto, el tamaño medido.

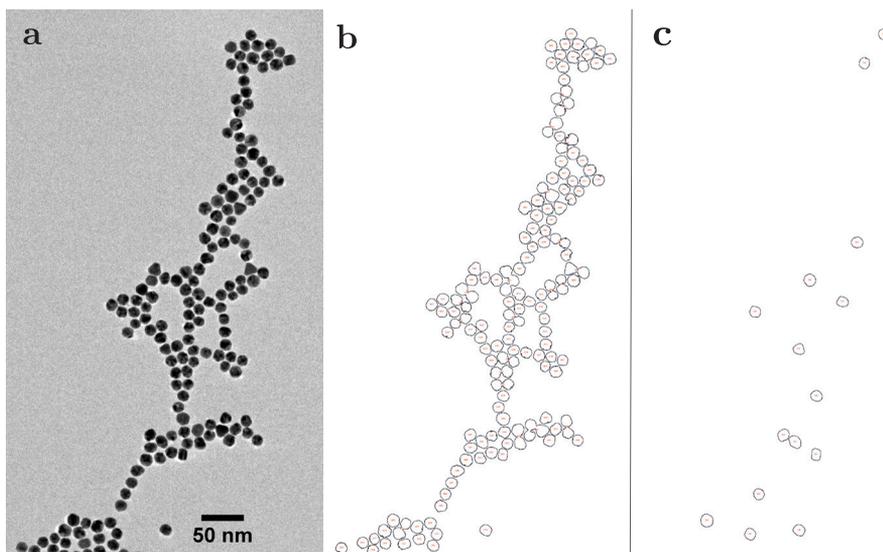


Figura 2. (a) Nanopartículas de oro a 4.0842 píxel/nm y las nanopartículas contadas para una circularidad de (b) 0 y (c) 0.7.

Tabla 1. Recuentos de tamaños de nanopartículas empleando distintos criterios.

| Forma de recuento | Número de partículas contadas | Relación de tamaño píxel/nm | Circularidad | Diámetro de Feret promedio (nm) | Desviación estándar (nm) | Diámetro equivalente promedio (nm) | Desviación estándar (nm) | Diámetro de Feret de la distribución (nm) | Desviación estándar (nm) | Diámetro equivalente de la distribución (nm) | Desviación estándar (nm) |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|--|--------------------------|
| Automático | 628 | 9.7718 | 0 | 19.50 | 9.61 | 15.4 | 4.90 | 15.1 | 1.09 | 13.4 | 0.97 |
| Automático | 28 | 9.7718 | 0.5 | 14.89 | 1.03 | 13.74 | 0.94 | --- | --- | --- | --- |
| Automático | 0 | --- | 0.7 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Automático | 4356 | 4.0842 | 0 | 20.02 | 9.94 | 15.76 | 5.07 | 14.32* | 1.06* | *12.94 | 0.89 |
| Automático | 2755 | 4.0842 | 0.5 | 14.47 | 1.36 | 13.14 | 1.13 | 14.27 | 1.05 | 12.92 | 0.90 |
| Automático | 750 | 4.0842 | 0.7 | 14.46 | 1.17 | 13.26 | 1.08 | 14.27 | 1.03 | 13.05 | 0.96 |
| Automático | 1585 | 2.4592 | 0 | 16.65 | 5.35 | 14.22 | 2.81 | 15.07 | 1.09 | 13.40 | 0.97 |
| Automático | 1335 | 2.4592 | 0.5 | 15.29 | 1.25 | 13.66 | 1.12 | 15.16 | 1.12 | 13.50 | 0.10 |
| Automático | 269 | 2.4592 | 0.7 | 15.31 | 1.62 | 13.81 | 1.44 | 15.08 | 1.11 | 13.60 | 1.02 |
| Manual | 520 | 2.4592 | --- | 16.01 | 1.29 | 15.19 | 1.22 | 15.79 | 1.30 | 15.09 | 1.29 |

*El recuento automático arrojó 3 poblaciones, debido a que en la imagen aparecen varios grupos de nanopartículas superpuestas. El cálculo de distribución se realizó en función de la población mayoritaria.
 **Los espacios vacíos de la tabla se deben a una alta restricción en la circularidad de las partículas que restringe el número de partículas contadas.

No se encontraron diferencias significativas en los valores calculados a partir de los promedios de tamaños y los valores arrojados de ajustes gaussianos de los histogramas de distribución de tamaño. Sin embargo, cabe destacar que el análisis de la distribución de tamaños permite distinguir la presencia de una o más poblaciones, como es el caso de las medidas sin restricción de circularidad. Sin el dato de circularidad, el análisis de tamaño puede estar considerando los agregados y

no necesariamente partículas individuales. En este sentido, el análisis gráfico de los histogramas provee información sobre la homogeneidad y/o la habilidad del programa para distinguir entre los distintos tamaños (Figura 3).

El recuento manual mostró resultados sin diferencias significativas respecto al recuento automático. Sin embargo, el histograma reflejó cómo los valores vuelcan hacia la derecha de la media, lo cual explicaría por qué algunos autores obtienen ajustes de tipo Log-Normal en lugar de funciones gaussianas (Amendola y Meneghetti, 2009; Brito-Silva, et al., 2013). Si bien la elección del modelo de ajuste depende del análisis sistemático de la bondad de ajuste de los modelos empleados (Rice, et al., 2013), el recuento manual o bien un recuento automático que no tenga ninguna restricción de tamaño o circularidad podrían ser responsables de introducir un sesgo. Para el caso del recuento manual, podría existir una tendencia del analista de sobreestimar el tamaño de las partículas más pequeñas, (Figura 4), siendo que es más sencillo delimitar el perímetro de cada imagen cuanto más grande sean las partículas, pero se dificulta para el caso de partículas pequeñas. Esto podría favorecer el posterior ajuste de distribuciones que puedan presentar ciertas asimetrías, como sucede con el caso de log-normal. Esta observación también ha sido documentada por otros autores (Domingos, et al., 2009).

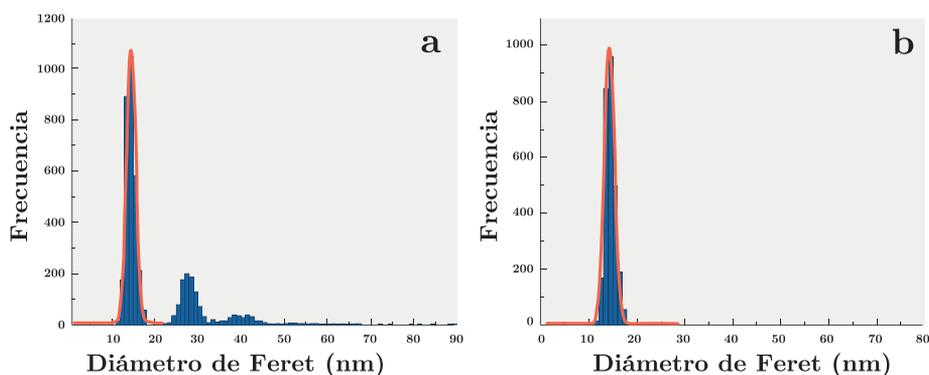


Figura 3. (a) Recuento de nanopartículas sin restricción de tamaño, (b) recuento con un filtro de circularidad de 0.5. La curva naranja representa el ajuste gaussiano.

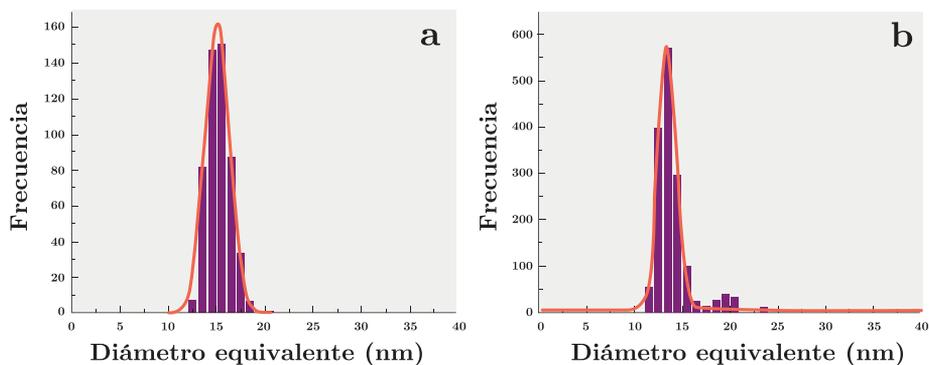


Figura 4. (a) Distribución de nanopartículas mediante el recuento manual y (b) recuento automático realizado para el mismo grado de relación píxel/nm. La curva naranja representa el ajuste gaussiano.

Entre los dos mensurandos ensayados, tanto el diámetro equivalente como el diámetro de Feret (o el promedio de ambos, en el caso que sean medidos) pueden ser empleados para la determinación del tamaño de partícula; aunque para los casos en los cuales no se establece ninguna restricción, el diámetro de Feret es más sensible a la presencia de agregados.

Si bien la medida por TEM es considerada la mejor herramienta para la determinación del tamaño de las partículas, presenta -además de las dificultades mencionadas- un costo considerable tanto en tiempo como en dinero para ser empleada como técnica de rutina. En este sentido, se requieren técnicas más sencillas y rápidas para medir el tamaño de una dispersión coloidal, como las medidas por DLS. Esta última brinda buenos resultados para muestras monodispersas. En particular, los trabajos de Souza y otros (2016) exponen cómo esta técnica arroja valores ligeramente superiores en tamaño a las medidas por TEM, siendo este incremento cercano al 20% de la medida para el caso de muestras homogéneas. En nuestro caso se verifica esta relación (Souza, et al., 2016). La diferencia entre el diámetro efectivo promedio (17.67 nm, Tabla 2) y los valores medidos por HR-TEM es de aproximadamente un 20% de la medida de DLS (14.14 nm). Sin embargo, esta estimación no necesariamente se debe cumplir en todos los casos, y dependerá en gran medida de la presencia o no de agregados y del tamaño de la doble capa eléctrica. No hay que perder de vista que el DLS mide el radio hidrodinámico (Figura 5) y el espesor de la doble capa eléctrica puede variar en función de la carga superficial, el agente de recubrimiento, el pH y la fuerza iónica de la solución.

También es relevante mencionar que para muestras polidispersas, los resultados pueden sobreestimar en mucha mayor medida el tamaño de las partículas (Meli, et al., 2012; Fissan, et al., 2014; Soliwoda, et al., 2015; Eaton, et al., 2017). En contrapartida, dada la alta sensibilidad del DLS para detectar partículas de mayor tamaño, hacen a la técnica útil para la evaluación del grado de homogeneidad de una muestra (Khlebtsov y Khlebtsov, 2011). Si bien las medidas por microscopía electrónica se usan para determinar la homogeneidad de las partículas, se tienen que considerar algunas limitaciones, tales como la dificultad de cuantificar un gran número de partículas o imágenes dudosas debido a la presencia de agregados u orientación de las partículas. Cuando se caracterizan muestras muy homogéneas, otras técnicas que puedan analizar grandes cantidades de nanopartículas son capaces de proporcionar resultados más repetibles.

Tabla 2. Medidas por DLS de las nanopartículas ultra-homogéneas sintetizadas por el método de Turkevich modificado.

| Medida | Diámetro equivalente hidrodinámico (nm) | Polidispersión |
|----------------------------|---|----------------|
| 1 | 17.98 | 0.01 |
| 2 | 17.97 | 0.01 |
| 3 | 17.86 | 0.03 |
| 4 | 17.62 | 0.03 |
| 5 | 17.55 | 0.03 |
| 6 | 17.08 | 0.03 |
| Promedio | 17.67 | 0.02 |
| Desviación estándar | 0.34 | 0.01 |

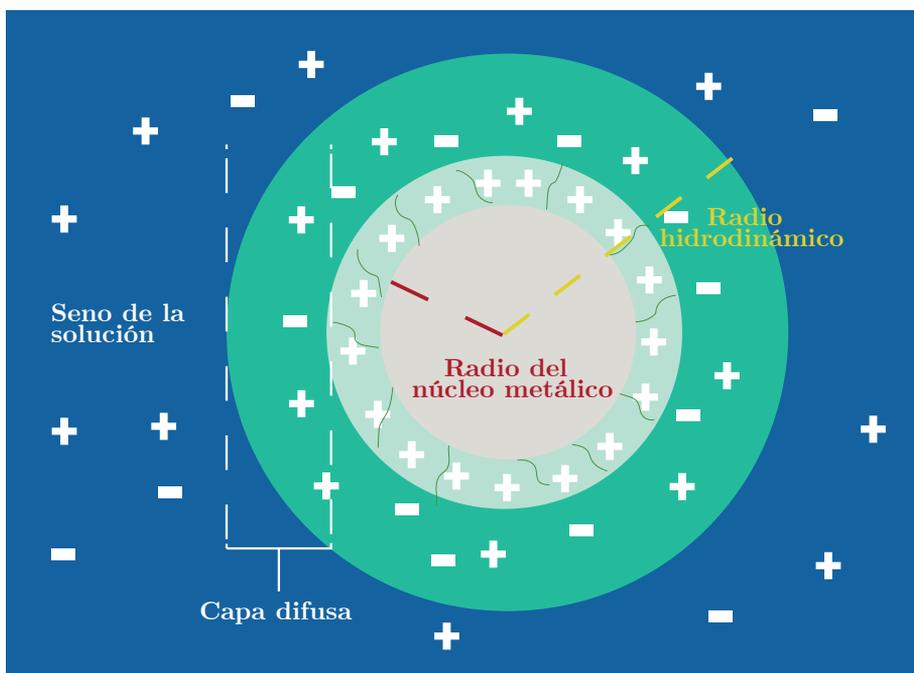


Figura 5. Esquema de la doble capa eléctrica que define el radio hidrodinámico de la nanopartícula entre el núcleo metálico junto con el agente de recubrimiento con sus cargas superficiales y el seno de la solución.

Las nanopartículas de oro son conocidas por tener un efecto de resonancia del plasmón característico, mostrando máximos a ca. 520 nm cuando las nanopartículas se encuentran libres. Sin embargo, dependiendo del tamaño de partícula, las soluciones pueden presentar ligeros corrimientos del máximo debido a cambios en la resonancia del plasmón y a variaciones en el coeficiente de extinción molar (Liu, et al., 2007). La banda de atenuación (absorción + dispersión) puede simularse computacionalmente a partir de las ecuaciones de Mie que describen los espectros de absorción de nanopartículas de oro esféricas. La Figura 6 muestra el espectro de la síntesis de nanopartículas y su comparación con las simulaciones, donde -de acuerdo con la posición del máximo- las nanopartículas tendrían un tamaño inferior a 20 nm de diámetro. Por debajo de este valor no es posible distinguir diferencias significativas. Si bien esta comparación es semi-cualitativa, permite estimar de forma rápida el tamaño de la partícula. Asimismo, los corrimientos de los máximos de absorción son también comúnmente empleados como prueba de la existencia de cambios de ligando al funcionalizar las nanopartículas. (Amendola y Meneghetti, 2009). Estos cambios son de tan solo unos pocos nanómetros, por lo que se debe tener especial cuidado al presentar este tipo de evidencia, y las medidas espectrofotométricas deben hacerse en condiciones de alta sensibilidad.

También es importante mencionar que las medidas simuladas solamente tienen en cuenta poblaciones perfectamente monodispersas, por lo que solo es útil para la caracterización de muestras homogéneas, dado que para poblaciones polidispersas las señales podrán presentar un mayor ancho medio de pico y/o corrimientos en la banda del plasmón, (Hinterwirth, et al., 2013; Shard, et al., 2018). En este caso

particular, la predicción de tamaño por debajo de los 20 nm de diámetro concuerda con los resultados obtenidos por las otras técnicas; sin embargo, estos valores solamente deben ser considerados de forma cualitativa dado que las simulaciones de Mie no muestran corrimientos significativos para tamaños inferiores a los 20 nm, y la posición del máximo también depende del grado de polidispersión de la muestra, por lo que solamente es válido para distribuciones homogéneas.

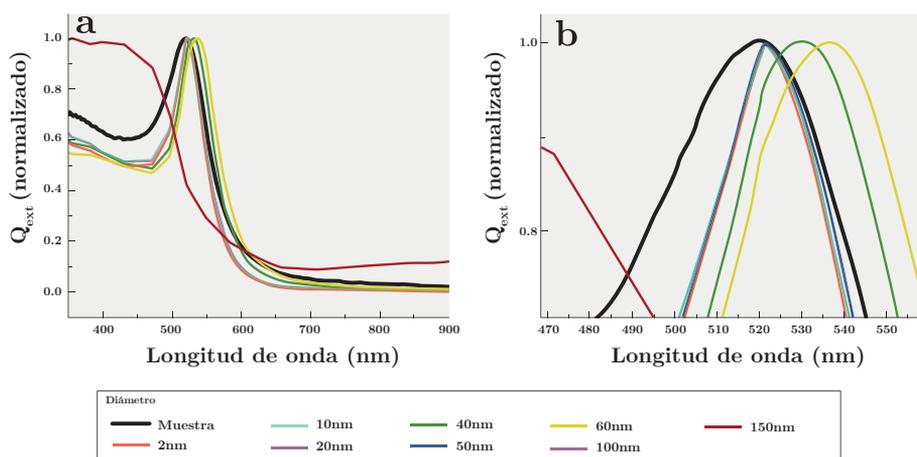


Figura 6. Simulaciones de nanopartículas de oro empleando el programa Mie Plot y su comparación con la síntesis de nanopartículas ultra-homogéneas. Los resultados muestran que de acuerdo con la posición del máximo de absorción la muestra tiene una población cuyo diámetro es inferior a los 20 nm.

CONCLUSIONES

En resumen, tanto la técnica empleada como el procesamiento de los datos son importantes a la hora de determinar el tamaño de las nanopartículas. Diferentes métodos de procesamiento de las imágenes por HR-TEM determinan ligeros corrimientos de tamaños que pueden aumentar significativamente para el caso de muestras complejas. En este sentido, es necesario establecer protocolos que permitan homogeneizar las medidas. El procesamiento automático podría ser una solución, aunque debe estar necesariamente acompañado de un proceso de inspección cualitativo para evitar el recuento de partículas agregadas. La magnificación entendida como la relación distancia/píxel es importante a la hora de reportar el tamaño de las partículas dado que afecta el valor de circularidad.

El uso de otras técnicas de rutina aporta resultados complementarios a las medidas por microscopía electrónica. Particularmente, las medidas por DLS brindan una buena estimación del tamaño para partículas monodispersas de oro recubiertas de citrato de sodio, aunque aún no hay un método consensuado para poder relacionar la medida del radio hidrodinámico con el radio obtenido por microscopía electrónica. Es una técnica sensible a cambios en el grado de polidispersión de la muestra, por lo que puede emplearse para estudiar el grado de homogeneidad, siendo más representativa que las medidas por HR-TEM ya que se trata de un método

de “conjunto”. Por su parte, los análisis por UV-Vis podrían servir como medida primaria y cualitativa para evaluar el tamaño de las partículas, así como también detectar grandes agregados, los cuales podrían interpretarse como partículas más grandes que generarían corrimientos del máximo de absorbancia a longitudes de onda mayores. Sin embargo, nuestros resultados indican que esta técnica no sería adecuada para estimar el tamaño de partículas por debajo de los 20 nm.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la participación del Dr. Eduardo Méndez y del Lic. Pablo Fagúndez por su contribución en la discusión de los resultados. También se agradece al Dr. Ruben Lazos, del Centro Nacional de Metrología de México, cuya iniciativa en realizar ensayos de intercomparación de medidas por microscopía electrónica sirvieron de inspiración para la discusión y realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Amendola, V. y Meneghetti, M., 2009. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. En: *Journal of Physical Chemistry C*, 113(11), pp.4277–4285. <https://doi.org/10.1021/jp8082425>
- Bienert, R., Emmerling, F. y Thünemann, A.F., 2009. The size distribution of “gold standard” nanoparticles. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6), pp.1651–1660. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3049-5>
- Brito-Silva, A.M., Sobral-Filho, R.G., Barbosa-Silva, R., de Araújo, C.B., Galembeck, A. y Brolo, A.G., 2013. Improved synthesis of gold and silver nanoshells. En: *Langmuir*, 29(13), pp.4366–4372. <https://doi.org/10.1021/la3050626>
- Bohren, C. y Huffman, D., 2004. *Absorption and scattering of light by small particles*. Derby: Wiley.
- Domingos, R.F., Baalousha, M., Ju-Nam, Y., Reid, M., Tufenkji, N., Lead, J., Leppard, G. y Wilkinson, K., 2009. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. En: *Environ Sci Technol*, 43, pp.7277–7284. <https://doi.org/10.1021/es900249m>
- Eaton, P., Quaresma, P., Soares, C., Neves, C., de Almeida, M.P., Pereira, E. y West, P., 2017. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. En: *Ultramicroscopy*, 182, pp.179–190. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>
- Fissan, H., Ristig, S., Kaminski, H., Asbacha, C. y Eppelbc, M., 2014. Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. En: *Analytical Methods*, 6(18), pp.7324–7334. doi: <https://doi.org/10.1039/c4ay01203h>

- International Organization for Standardization, 2017. ISO 22412: *Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)*. Ginebra: ISO.
- Hinterwirth, H., Wiedmer, S., Moilanen, M., Lehner, A., Allmaier, G., Waitz, T., Lindner, W. y Lämmerhofer, M., 2013. Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles. En: *Journal of Separation Science*, 36(17), pp.2952–2961. doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201300460>.
- Khlebtsov, B.N. y Khlebtsov, N.G., 2011. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. En: *Colloid Journal*, 73(1), pp.118–127. doi: <https://doi.org/10.1134/S1061933X11010078>
- Laven, P., 2018. *MiePlot* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J. y Huo, Q., 2007. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), pp.3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>
- Meli, F., Klein, T., Buhr, E., Frase, C., Gleber, G., Krumrey, M., Duta, A., Duta, S., Korpelainen, V., Bellotti, R., Picotto, G., Boyd, R. y Cuenat, A., 2012. Traceable size determination of nanoparticles, a comparison among European metrology institutes. En: *Measurement Science and Technology*, 23(12). doi: <https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/12/125005>
- Méndez, Eduardo y Botasini, Santiago, 2019. Synthesis of ultra-homogeneous gold nanoparticles. En: *Proceedings of the World Congress on New Technologies*, (NewTech'19). Lisboa: International ASET. pp. 11159. DOI: <https://doi.org/10.11159/icnfa19.152>.
- Minelli, C., Bartczak, D., Peters, R., Rissler, J., Undas, A., Sikora, A., Sjöström, E., Goenaga-Infante, H. y Shard, A., 2019. Sticky measurement problem: number concentration of agglomerated nanoparticles. En: *Langmuir*, 35(14), pp.4927–4935. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04209>
- National Institutes of Health y Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, 2019. *ImageJ* [En línea]. Versión 1-8-0_112. Bethesda: NIH. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>
- Nelson, B.C., Atha, D., Elliott, J., Marquis, B., Petersen, E., Cleveland, D., Watson, S., Tseng, I., Dillon, A., Theodore, M. y Jackman, J., 2013. NIST gold nanoparticle reference materials do not induce oxidative DNA damage. En: *Nanotoxicology*, 7(1), pp.21–29. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626537>.

OriginLab, 2020. *Origin Lab* [En línea]. Northampton: Originlab. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.originlab.com/>

Rasmussen, K., Rauscher, H., Mech, A., Riego Sintes, J., Gilliland, D., Gonzales, M., Kearns, P., Moss, K., Visser, M., Groenewold, M. y Bleeker, E.A.J., 2018. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. En: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, pp.8-28.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.019>

Rice, S.B., Chan, C., Brown, S.C., Eschbach, P., Han, L., Ensor, D.S., Stefaniak, A.B., Bonevich, J., Vladár, A. E., Hight Walker, A.R., Zheng, J., Starnes, C., Stromberg, A., Ye, J. y Grulke, E.A., 2013. Particle size distributions by transmission electron microscopy: an interlaboratory comparison case study. En: *Metrologia*, 50(6), pp.663–678. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/50/6/663>

Rogers, K.R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A., Al-Abed, S., Potter, P., Gitipour, A., Radwan, I., Nelson, C. y Bradham, K., 2018. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. En: *Science of the Total Environment*, 619–620, pp.1375–1384.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>

Segelstein, D., 1981. *The complex refractive index of water*. Kansas City: University of Missouri.

Shard, A.G., Wright, L. y Minelli, C., 2018. Robust and accurate measurements of gold nanoparticle concentrations using UV-visible spectrophotometry. En: *Biointerphases*, 13(6), p.061002. <https://doi.org/10.1116/1.5054780>

Soliwoda, K., Rosowski, Marcin, Tomaszewska, Emilia, Tkacz-Szczesna, Beata, Celichowski, Grzegorz, Psarski, Maciej y Grobelny, Jaroslaw, 2015. Synthesis of monodisperse gold nanoparticles via electrospray-assisted chemical reduction method in cyclohexane. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, pp.148–153. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.04.040>

Souza, T.G.F., Ciminelli, V.S.T. y Mohallem, N.D.S., 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. En: *Journal of Physics: Conference Series*, 733(1).
doi: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>.

Tanaka, L.S., 2019. Regulación blanda, normas técnicas y armonización regulatoria internacional, para la nanotecnología. En: *Mundo Nano*, 13(24), pp.1-27.
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.24.69621>

Turkevich, J., 1985. Colloidal gold. Part II. En: *Gold Bull*, 18, pp.125–131.
<https://doi.org/10.1007/BF03214694>

Estudio comparativo de la densidad del agua y su aplicación en el presupuesto de incertidumbre para calibraciones en volumen

Comparative study of the density of water and its application in the uncertainty budget for the volume determination

Estudo comparativo da densidade da água e sua aplicação no orçamento de incerteza para calibrações de volumen

RECIBIDO: 3/9/2020 → APROBADO: 6/11/2020 ✉ asica@latu.org.uy

✉ SICA, ANDREA(1); PRESTE, SHEILA(1); ALMEIDA, GABRIEL(1); ESTEVES, ROMINA(1).
(1) DEPARTAMENTO DE METROLOGÍA FÍSICA, LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY (LATU). MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Dentro de la magnitud volumen, el método de calibración de mejor precisión es el gravimétrico. Para la calibración se usa un líquido de densidad conocida. En este método, el líquido de calibración utilizado es el agua destilada, ya que tiene ampliamente estudiada la variación de la densidad con relación a la temperatura. Para los cálculos de volumen a la temperatura de referencia, se utiliza la densidad del agua destilada obtenida a partir del uso de modelos matemáticos como, por ejemplo, la ecuación de Tanaka (Tanaka, et al., 2001). Si bien existen requisitos para el agua destilada (grado 3) en la norma ISO 3696 (International Organization for Standardization, 1987), y el laboratorio debe realizar los estudios periódicos de conductividad del agua utilizada, es necesario estudiar el apartamiento del valor de la densidad real del agua destilada con el valor obtenido mediante el uso de la ecuación de Tanaka. Además, es importante determinar si se debe considerar este apartamiento del valor de densidad (calculado por el modelo de Tanaka y medido por densímetro de oscilación) en la estimación de incertidumbre en las calibraciones de volumen por método gravimétricos.

PALABRAS CLAVE: Tanaka, método gravimétrico.

ABSTRACT

In the quantity of volume, gravimetric method is considered the best accuracy method for the quantitative determination of an analyte based on its mass. The distilled water is selected as calibration liquid because it is well known how its

density changes with temperature. For volume calculation at reference temperature, the water density value is obtained by known mathematic models, for example, Tanaka equation (Tanaka, et al., 2001). According to ISO 3696 (International Organization for Standardization, 1987), there are requirements for water (Grade 3), the lab needs to perform periodic studies of conductivity, but it is necessary to study the water density deviation and comparing this value with that obtained by Tanaka equation. If this deviation value (calculated by Tanaka Equation vs Oscillation – type density meter) is significant, it must be considered in the uncertainty estimation for volume calibration using gravimetric method.

KEYWORDS: Tanaka, gravimetric method.

RESUMO

Dentro da magnitude volume, o método de calibração mais preciso é o gravimétrico. Um líquido de densidade conhecida é usado para calibração. Nesse método, o líquido de calibração utilizado é a água destilada, que tem a variação da densidade em relação à temperatura amplamente estudada. Para cálculos de volume na temperatura de referência, utiliza-se a densidade da água destilada obtida com o uso de modelos matemáticos como a equação de Tanaka (Tanaka, et al., 2001). Embora existam requisitos para água destilada (grau 3) na norma ISO 3696 (International Organization for Standardization, 1987), e o laboratório realiza estudos periódicos de condutividade da água utilizada, é necessário estudar o afastamento do valor da densidade real da água destilada com o valor obtido usando a equação de Tanaka. Além disso, é importante determinar se este desvio do valor de densidade (calculado pelo modelo de Tanaka e medido por densímetro de oscilação) deve ser considerado na estimativa da incerteza nas calibrações de volume pelo método gravimétrico.

PALAVRAS-CHAVE: Tanaka, método gravimétrico.

INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Volumen del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), las calibraciones de material volumétrico se realizan utilizando el método gravimétrico. Para el caso del material volumétrico aforado o graduado, se calibra utilizando como referencia la norma ISO 4787 (International Organization for Standardization, 2010); mientras que para el material volumétrico accionado por pistón, se realiza la calibración mediante métodos basados en la ISO 8655-6 (International Organization for Standardization, 2002). Estas normas indican el uso de agua destilada grado 3 (de acuerdo con la norma ISO 3696, International Organization for Standardization, 1987) como líquido de calibración.

Para los cálculos de volumen de los materiales volumétricos, se necesita conocer el valor de la densidad del agua a la temperatura de calibración y con la masa contenida o entregada por el material. Tal es así que es necesario conocer el valor de densidad a la temperatura correspondiente con muy buena exactitud. Para ello pueden utilizarse varias ecuaciones que modelan la densidad del agua con respecto a la temperatura. En nuestro laboratorio se utiliza la ecuación de densidad propuesta

por el modelo de Tanaka (Tanaka, et al., 2001), el cual es el más utilizado por laboratorios pares. Esta ecuación se presenta a continuación:

$$\rho_{\text{agua}} = a_5 \left[1 - \frac{(t + a_1)^2 (t + a_2)}{a_3(t + a_4)} \right] F_c + C_{\text{ad}}$$

Ecuación 1

Donde:

t es el valor de la temperatura del agua en °C; F_c y C_{ad} son variables que dependen de la temperatura (t) y/o de la presión (p); $a_1 = -3,983\ 035$ °C; $a_2 = 301,797$ °C; $a_3 = 522\ 528,9$ °C²; $a_4 = 69,348\ 81$ °C; $a_5 = 999,972$ kg · m⁻³.

F_c es el factor de corrección por compresibilidad cuya ecuación se presenta a continuación:

$$F_c = [1 + (k_0 + k_1 t + k_2 t^2)(p - p_0)]$$

Ecuación 2

Donde:

p = presión atmosférica en Pa; $p_0 = 101\ 325$ Pa; $k_0 = 50,74 \times 10^{-11}$ Pa⁻¹; $k_1 = -0,326 \times 10^{-11}$ Pa⁻¹ · °C; $k_2 = 0,004\ 16 \times 10^{-11}$ Pa⁻¹ · °C².

C_{ad} es el factor de corrección por aire disuelto en el agua, se calcula de la siguiente manera:

$$C_{\text{ad}} = s_0 + s_1 \cdot t$$

Ecuación 3

Donde:

$s_0 = -4,612 \times 10^{-3}$ kg · m⁻³; $s_1 = 0,106 \times 10^{-3}$ kg · m⁻³ · °C⁻¹.

Se realiza la evaluación de los F_c para las presiones atmosféricas que se presentan en Uruguay, y se constata que este factor es despreciable tanto para el cálculo como para la incertidumbre dentro de los valores trabajados, por lo que no se lo tendrá en cuenta en los cálculos.

Si bien se realizan controles periódicos al agua destilada usada en el laboratorio de volumen, tanto de pH como de conductividad, es necesario conocer los apartamientos de la densidad real del agua con respecto a los valores de la densidad calculados con la ecuación de Tanaka.

La cuantificación de este apartamiento permite determinar si está comprendido en la incertidumbre por el uso de la ecuación de Tanaka o si debe ser considerado como una componente más del presupuesto de incertidumbre en la calibración de material volumétrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para el estudio comparativo se utilizan los siguientes equipos:

-Densímetro de oscilación, marca Anton Paar, modelo DMA 4500 M, serie 81600397. Este densímetro fue calibrado por el método de comparación, según los lineamientos establecidos en la guía SIM para la calibración de densímetros de tipo oscilatorios SIM MWG7/cg-02/v.00 (Sistema Interamericano de Metrología, 2016). Se utilizaron como patrones Materiales de Referencia Certificados; Polialfaolefina Certificado N^o CNM-MR-730-0290/2019, de fecha agosto de 2019; y agua de Certificado N^oC NM-MR-730-0330/2019, de fecha setiembre de 2019, emitidos por CENAM. El sensor de temperatura del densímetro fue calibrado con un termómetro de resistencia de platino estándar (ITS 90), trazable al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través del certificado PTB 7.4-1.1-12-63, del 25/04/2014.

-Patrón sólido de volumen, sinker de cuarzo, N^o LATU 18381, calibrado por PTB según certificado 1.82-2017A028, del 07/12/2017.

-Soporte de platino para el patrón de volumen.

-Balanza analítica, capacidad: 200 g, división 0,1 mg (con posibilidad para pesada por debajo del platillo), N^o LATU 5139, calibrada con patrones trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través del certificado BIPM N^o 3, de enero de 2018.

-Termómetro Pt100, con división 0,02 °C, calibrado con un termómetro de resistencia de platino estándar (ITS 90), trazable al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través del certificado PTB 7.4-1.1-12-63, del 25/04/2014.

-Probeta con camisa conectada a baño termostatzado (caracterizado) para mantener la temperatura del agua destilada.

-Termohigrómetro digital, N^o LATU 21805, calibrado con un termómetro de resistencia de platino estándar (ITS 90), trazable al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través del certificado PTB 7.4-1.1-12-63, del 25/04/2014.

-Termohigrómetro digital, marca Testo, modelo 608-H1 (N^o LATU 36057), calibrado con un termómetro de resistencia de platino estándar (ITS 90), trazable al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través del certificado PTB 7.4-1.1-12-63, del 25/04/2014.

-Barómetro digital marca Omega, modelo DPI 740 (N^o LATU 24765), calibrado con un barómetro trazable a patrones primarios según Certificado CNM-CC-720-576/2017, del 10/11/17, y BIPM N^o 3, de enero del año 2018.

Métodos

En una primera etapa de este estudio, se realiza la comparación de los resultados obtenidos de la medición de la densidad del agua destilada a 20 °C con tres métodos diferentes que se detallan a continuación:

-Medidas con el densímetro de oscilación de una muestra de agua destilada de uso del laboratorio a 20 °C.

-Cálculo de la densidad del agua destilada usando la ecuación de Tanaka a 20 °C.

-Medidas con el patrón sólido de volumen de la densidad del agua a 20 °C.

Se toma una muestra de 2000 ml de agua destilada y desionizada a 20 °C. Se reservan 100 ml de esta muestra (m1) para hacer la determinación de la densidad con la medición en el densímetro de oscilación. Con el agua destilada restante se completa el volumen de la probeta con camisa para la determinación de la densidad por pesada hidrostática. Para esta determinación se utiliza el procedimiento descrito a continuación:

- Se enciende el baño termostatzado con recirculación por la camisa del recipiente de calibración a la temperatura requerida, dos horas antes de comenzar las mediciones. Se verifica el valor del punto final alcanzado y la estabilidad de la temperatura con el termómetro de control. No debe existir una deriva superior a 0,02 °C en 15 minutos.
- Se ajusta la balanza analítica con su pesa interna y se verifica el ajuste con la pesa de verificación.
- Se toma el dato de presión ambiental y se registra.
- Se cuelga el soporte del patrón de volumen y se deja estabilizar su temperatura 10 minutos, luego de los cuales se tara la balanza.
- Se cuelga el patrón de volumen dentro del líquido utilizando el soporte.
- Se deja estabilizar la temperatura del patrón por 60 minutos, para que adquiera la temperatura del líquido.
- Se registra la temperatura del líquido.
- Se lee la balanza.
- Se retira el patrón del soporte y se lee la balanza para verificar derivas de cero.
- Se repiten los cinco pasos anteriores por lo menos 4 veces (promedio de las lecturas = L_{Bal}).
- Se lee nuevamente la temperatura del líquido.
- Se verifica que la variación esté en tolerancia (no mayor a 0,03 °C).

Con los datos recabados se realiza el cálculo de la densidad del agua según la siguiente ecuación:

$$\rho_{liq,t_0} = \left[\frac{m_p + \frac{\pi D \gamma_{liq}}{g} - \left(1 - \frac{\rho_{al}}{\rho_{pa}}\right) \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho_c}\right) L_{Bal} / \left(1 - \frac{\rho_{a0}}{\rho_{pa}}\right)}{V_{pt_0} (1 + \alpha_p (t - t_0))} \right] * (1 + \alpha_{liq} (t - t_0))$$

Ecuación 4

Donde:

m_p es la masa del patrón de densidad; D son las diferencias de los diámetros del hilo antes y después de colgar el patrón; γ_{liq} es la tensión superficial del líquido cuya densidad queremos determinar; ρ_{al} es la densidad del aire en el momento del ajuste; ρ_0 es la densidad del aire de referencia igual a 1,2 kg/m³; ρ_c es la densidad de la pesa de referencia igual a 8 000 kg/m³; ρ_{pa} es la densidad de la pesa de ajuste; L_{Bal} es la indicación de la balanza de la pesada hidrostática; $V_{(pt_0)}$ es el volumen del patrón de densidad a la temperatura de referencia; α_p es el coeficiente volumétrico de dilatación térmica del patrón; α_{liq} es el coeficiente volumétrico de dilatación térmica del líquido cuya densidad queremos medir; t_0 es la temperatura de referencia en °C; t es la temperatura a la cual se hace la pesada hidrostática en °C; g es la aceleración local de la gravedad.

Para el caso de las medidas realizadas, la diferencia D es próxima a cero debido a las características del dispositivo con el que se cuelga el patrón, por lo que no se toma en cuenta este factor para el cálculo.

El laboratorio realiza una evaluación verificando que, con base en las características del dispositivo utilizado, las presiones atmosféricas que se presentan en Uruguay y las características del laboratorio son despreciables para este estudio dentro de las incertidumbres determinadas, la corrección debida al menisco, la compresibilidad del líquido y la corrección debida a la gravedad, por lo que no se presentan en la ecuación 4.

La densidad del aire se calcula según lo establecido en la fórmula revisada CIPM-2007 (Picard, et al., 2008), utilizándose la versión simplificada exponencial indicada en la OIML R 111-1 y OIML R 111-2 (International Organization of Legal Metrology, 2004a; International Organization of Legal Metrology, 2004b). El procedimiento de medición de la densidad del agua destilada con el densímetro de oscilación es el siguiente:

- La muestra (m1) de aproximadamente 100 ml de agua destilada desionizada se coloca junto al densímetro de oscilación media hora antes de realizar las mediciones.
- Se toma otra muestra de agua destilada desionizada de aproximadamente 100 ml (m2), se le retira el aire disuelto mediante el uso de un sonicador durante aproximadamente 15 minutos.
- Con la muestra de agua m2 se realizan las verificaciones iniciales y finales del densímetro de oscilación. Luego de que la verificación inicial cumple con los límites establecidos para el control del densímetro, se procede a la realización de las medidas de la densidad del agua destilada a 20 °C.
- Se realizan 10 medidas consecutivas de la muestra de agua destilada m1. Cada medición se realiza con parte de la muestra m1 inyectada cada vez.
- Se registra la densidad medida y la temperatura del agua durante la medición.
- Se registran las condiciones ambientales al inicio y al final de las mediciones.

Como en el laboratorio de volumen se realizan calibraciones en el intervalo de 21 °C \pm 2 °C, la segunda parte de este estudio consiste en ampliar las mediciones de densidad del agua destilada a las temperaturas de 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C y 23 °C. De esta forma, se cubre todo el intervalo de temperatura de trabajo del laboratorio. Este método se realiza comparando los resultados medidos con el densímetro de oscilación y con los calculados mediante la aplicación de la ecuación de Takana. Las medidas de la densidad con el densímetro de oscilación se realizan de forma similar a las realizadas en la primera parte de este estudio, pero realizando 10 medidas de densidad del agua destilada para las temperaturas mencionadas anteriormente y realizando el promedio de los valores.

RESULTADOS

En todos los casos, la incertidumbre fue determinada de acuerdo con la Guide for the Expression of Uncertainty in Measurements JCGM 100:2008 (BIPM, et al., 2008), siendo el valor de incertidumbre total expandida la calculada como la suma cuadrática de las componentes tipo A y tipo B, con un factor de cobertura correspondiente a una probabilidad de 95,45 % ($\sim k=2$). Para el cálculo no se tomaron en cuenta componentes debidas a efectos de inestabilidad a largo plazo.

Los resultados obtenidos de la medición de la densidad de una muestra de agua destilada a 20 °C, usando el patrón sólido de volumen, el densímetro de oscilación y la ecuación de Tanaka se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1. Resultados de la densidad de la misma muestra de agua destilada determinada mediante el método de pesada hidrostática, densímetro de oscilación y ecuación de Tanaka.

| Forma de determinación | $\rho / g \cdot cm^{-3}$ | $U / g \cdot cm^{-3} (k = 2)$ | $t / ^\circ C$ |
|------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------|
| Patrón sólido | 0,998 196 | 0,000 014 | 19,98 |
| Densímetro oscilación | 0,998 222 | 0,000 038 | 20,00 |
| Ecuación de Tanaka | 0,998 201 | 0,000 010 | 20,00 |

En la Figura 1 se muestran los valores obtenidos en la Tabla 1, para los diferentes métodos utilizados.

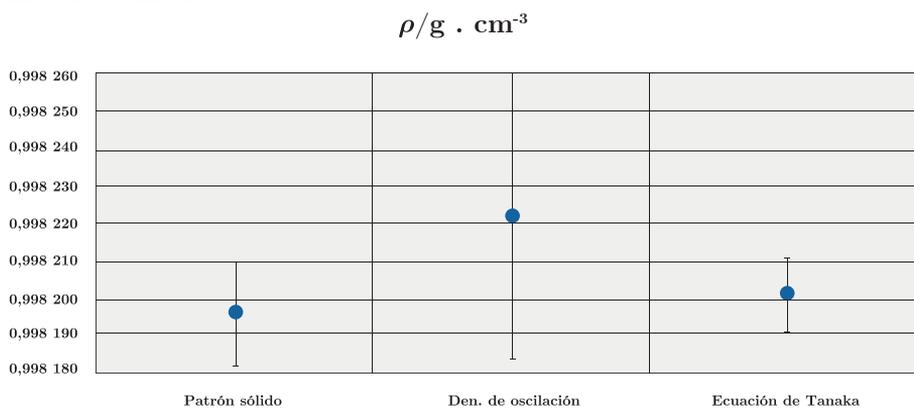


Figura 1. Resultados de la densidad de la misma muestra de agua destilada determinada mediante el método de pesada hidrostática, densímetro de oscilación y ecuación de Tanaka.

A partir de los resultados obtenidos se calculan los errores normalizados entre las densidades determinadas, los valores se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Valor absoluto de los errores normalizados de comparación del valor de densidad a 20 °C determinados mediante el método de pesada hidrostática, densímetro de oscilación y ecuación de Takana.

| Valores comparados | $ E_n $ |
|---------------------------------------|---------|
| Patrón Sólido – Ec. Tanaka | 0,29 |
| Patrón Sólido – Densímetro oscilación | 0,03 |
| Densímetro oscilación – Ec. Tanaka | 0,53 |

Los resultados de la medición de la densidad del agua destilada promedio a 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C y 23 °C con el densímetro de oscilación se muestran en la Tabla 3, la incertidumbre de la medición es la correspondiente a la incertidumbre de calibración del densímetro de oscilación:

Tabla 3. Resultados de la medición de la densidad con el densímetro de oscilación a las temperaturas de la segunda parte del estudio.

| $t / ^\circ\text{C}$ | $\bar{\rho} / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ | $U / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ($k = 2$) |
|----------------------|--|--|
| 19 | 0,998 424 | $3,8 \times 10^{-5}$ |
| 20 | 0,998 231 | $3,8 \times 10^{-5}$ |
| 21 | 0,998 027 | $3,8 \times 10^{-5}$ |
| 22 | 0,997 803 | $3,8 \times 10^{-5}$ |
| 23 | 0,997 575 | $3,8 \times 10^{-5}$ |

Se calculan las densidades con la ecuación de Tanaka para cada una de las temperaturas de estudio. Para la incertidumbre del cálculo de la densidad del agua mediante el uso de la ecuación de Tanaka, se consideró la incertidumbre debida a la medición de la temperatura (la incertidumbre de los gradientes de temperatura del volumen de agua durante la medición, la incertidumbre de la calibración del sensor de temperatura y la resolución del sensor de temperatura), la incertidumbre debida al aire disuelto en el agua destilada y la incertidumbre debida al ajuste de la ecuación de Tanaka. No se consideró la incertidumbre debida al factor de compresibilidad debido a que la misma es despreciable frente a las otras fuentes de incertidumbre. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Densidades calculadas con la ecuación de Tanaka a cada temperatura con sus respectivas incertidumbres.

| $t / ^\circ\text{C}$ | $\rho / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ | $U / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ($k = 2$) |
|----------------------|--|--|
| 19 | 0,998 403 0 | $6,2 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 0,998 201 7 | $6,5 \times 10^{-6}$ |
| 21 | 0,997 994 2 | $6,8 \times 10^{-6}$ |
| 22 | 0,997 772 3 | $7,2 \times 10^{-6}$ |
| 23 | 0,997 540 3 | $7,5 \times 10^{-6}$ |

En la Figura 2 se grafican los resultados obtenidos utilizando el densímetro de oscilación en color azul y utilizando la ecuación de Tanaka en color naranja, para una mejor visualización de estos.

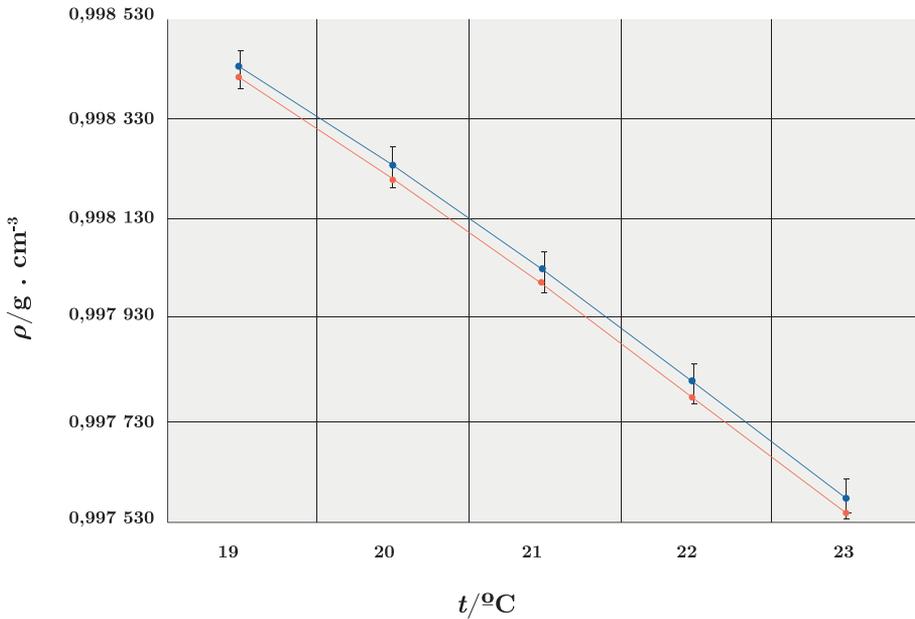


Figura 2. Resultados de la medición de la densidad con el densímetro de oscilación y la calculada con la ecuación de Tanaka a las temperaturas de la segunda parte del estudio.

Se calculan los valores absolutos de los errores normalizados entre las densidades medidas con el densímetro de oscilación y las calculadas con la ecuación de Tanaka y se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Errores normalizados entre la densidad promedio medida con el densímetro de oscilación y la calculada con la ecuación de Tanaka a cada temperatura.

| $t / ^\circ\text{C}$ | $ E_n $ |
|----------------------|---------|
| 19 | 0,54 |
| 20 | 0,75 |
| 21 | 0,84 |
| 22 | 0,79 |
| 23 | 0,89 |

DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio se observa que los tres métodos de determinación de la densidad del agua destilada (ecuación de Tanaka, densímetro de oscilación y pesada hidrostática utilizando patrón sólido de volumen) son comparables a 20 °C, ya que el error normalizado entre ellos es menor que uno.

En los resultados obtenidos en la segunda parte de este estudio se observa que los métodos de determinación de la densidad del agua destilada (ecuación de Tanaka y densímetro de oscilación) son comparables a todas las temperaturas desde 19 °C a 23 °C.

Comparando las medidas realizadas a 20 °C se observa una diferencia del valor de la densidad del agua destilada de aproximadamente $0,9 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Estas diferencias se pueden atribuir a que las mediciones fueron realizadas en distintas muestras de agua y en diferentes fechas, pero no se consideran en los valores de incertidumbre calculados ya que estas se encuentran dentro de la incertidumbre de la medición de densidad con el densímetro de oscilación.

Es importante observar que la incertidumbre de medición con el densímetro de oscilación es aproximadamente cinco veces mayor que la obtenida calculando la densidad del agua con la ecuación de Tanaka. El cálculo del error normalizado usa estas incertidumbres ya que pondera las diferencias con respecto a las incertidumbres consideradas. Dada la diferencia considerable entre las incertidumbres calculadas por los tres métodos, es necesario incluir un nuevo componente en la incertidumbre de calibración de volumen por el método gravimétrico. Este nuevo componente proviene del valor de la incertidumbre de las mediciones de densidad de este estudio con el densímetro de oscilación. El valor de incertidumbre estándar a usar es $u = 1,9 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Metrología Química del LATU que nos abrió las puertas de su laboratorio inorgánico y nos permitió realizar las mediciones con el densímetro de oscilación. A nuestros colegas metrólogos del departamento de Metrología Física del LATU que revisaron este artículo.

REFERENCIAS

BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP y OIML, 2008. *JCGM 100:2008. GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement*. [s.l.]: JCGM. [Consulta: 04 de agosto de 2020]. Disponible en:
https://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf

International Organization of Legal Metrology, 2004a. *OIML R 111-1. Weights of classes E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3 and M3. Part 1: Metrological and technical requirements* [En línea]. Paris: Secrétariat-rapporteur OIML. [Consulta: 04 de agosto de 2020].
Disponible en: https://www.oiml.org/en/files/pdf_r/r111-1-e04.pdf

- International Organization of Legal Metrology, 2004b. *OIML R 111-2: Weights of classes E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3 and M3. Part 1: Test report format* [En línea]. Paris: Secrétariat-rapporteur OIML. [Consulta: 08-2020]. Disponible en: https://www.oiml.org/en/files/pdf_r/r111-2-e04.pdf
- International Organization for Standardization, 2002. ISO 8655-6: *Gravimetric methods for the determination of measurement error*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2010. ISO 4787: *Laboratory glassware-Volumetric instruments-Methods for testing of capacity and for use*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 1987. ISO 3696: *Water for analytical laboratory use – Specification and test methods*. Ginebra: ISO.
- Picard, A., Davis, R.S., Gläser, M. y Fujii, K., 2008. Revised formula for the density of moist air (CIPM 2007). En: *Metrologia*, 45(2), pp.149-155.
DOI: 10.1088/0026-1397/45/2/004
- Sistema Interamericano de Metrología, 2016. *Guía SIM para la calibración de densímetros de tipo oscilatorio. SIM MWG7/cg-02/v.00* [En línea]. Querétaro: México. [Consulta: 04 de agosto de 2020].
Disponible en: <https://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/>
- Tanaka, M., Girard, G., Davis, D., Peuto, A. y Bignell, N., 2001. *Recommended table for the density of water between 0 °C and 40 °C based on recent experimental reports*. En: *Metrología*, 38(4), pp.301-309.

Digitalización y robotización del proceso de calibración de bloques patrón por comparación mecánica

Digitalization and robotization of gauge blocks calibration by mechanical comparison

Digitalização e robotização do processo de calibração de blocos padrão por comparação mecânica

RECIBIDO: 13/7/2020 → APROBADO: 13/11/2020 ✉ pconstan@latu.org.uy

✉ CONSTANTINO, PABLO (1); ACQUARONE, ALEJANDRO (1)
(1) DEPARTAMENTO DE METROLOGÍA FÍSICA, LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY (LATU). MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

El proceso de calibración de bloques patrón de longitud ISO 3650 por comparación mecánica implica no solo una gran exigencia en la estabilización de las condiciones ambientales, sino también un tiempo de ensayo significativo para el técnico que opera el comparador y realiza la calibración de cada bloque. Un reciente desarrollo en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), como Instituto Metrológico Nacional, permite realizar la totalidad del proceso en forma autónoma por medio de un sistema robotizado, realizado con elementos simples de hardware y controlado por un software a medida para administrar el flujo de trabajo y las acciones del comparador. El software realiza el control del hardware durante el proceso y la toma de datos automática, tanto de las condiciones ambientales como de las lecturas del comparador. Además, permite realizar el tratamiento de datos y la obtención de resultados de calibración con su incertidumbre asociada en forma automática y sin participación del técnico. El presente trabajo describe en detalle las características del sistema de calibración automatizado, los elementos utilizados para la automatización mecánica, su ensamblaje y la estrategia de software utilizado para la administración del sistema.

PALABRAS CLAVE: metrología, software, dimensional, longitud.

ABSTRACT

The process of calibration of ISO 3650 gauge blocks by mechanical comparison includes not only a significant demands on the stabilization of environmental conditions, but also a significant test time for the technician who operates the comparator and performs the calibration of each block. A recent development at Laboratorio Tecnológico del

Uruguay (LATU), in its role of National Metrology Institute of Uruguay, allows the entire process to be autonomously carried out by means of a robotic system built with simple hardware components, and controlled by custom-made software to manage workflow and gauge block comparator actions. The software performs hardware control during the process, and automatic data acquisition of the environmental conditions as well as comparator readings. Finally, this software performs automatic data processing and calibration results with their associated uncertainty without any technician involvement. This work describes in detail the characteristics of the automated calibration system, the elements used for mechanical automation, its assembly and the software strategy used for system administration.

KEYWORDS: metrology, software, dimensional, length.

RESUMO

O processo de calibração do blocos padrão ISO 3650 por comparação mecânica envolve não apenas uma grande demanda de estabilização das condições ambientais, mas também um tempo de teste significativo para o técnico que opera o comparador e realiza a calibração de cada bloco. Um recente desenvolvimento no Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) em sua função de Instituto Nacional de Metrologia do Uruguai, permite que todo o processo seja realizado de forma autônoma, por meio de um sistema robótico feito com simples elementos de hardware, e controlado por software feito sob medida para gerenciar o fluxo de trabalho e ações de comparação. O software controla o hardware durante o processo e a coleta automática de dados, tanto das condições ambientais quanto das leituras do comparador. Além disso, este software permite o tratamento dos dados e a obtenção dos resultados da calibração com sua incerteza associada de forma automática e sem a participação do técnico. Este trabalho descreve em detalhes as características do sistema de calibração automatizada, os elementos utilizados para a automação mecânica, sua montagem e a estratégia de software utilizada para a administração do sistema.

PALAVRAS-CHAVE: metrologia, software, dimensional, comprimento.

INTRODUCCIÓN

El LATU, como Instituto Metrológico Nacional, lleva algunos años en el proceso de transformación digital de muchos ensayos para los que no existía una herramienta de software adecuada, o no había sido adquirida con el equipo. En otros casos, si bien existía software propietario, eran obsoletos o presentaban limitaciones operativas o técnicas tales que no les permitía cumplir los requisitos o necesidades actuales de un laboratorio nacional de metrología, por lo que se requería una adecuación del software de control a los actuales procesos de calibración. El objetivo del LATU no radica únicamente en una mejora sensible de la calidad de los resultados, producto de una reducción del riesgo asociado al error humano en la toma o transcripción de datos o a la variabilidad inherente a las acciones técnicas del operador de los equipos. En muchos casos se intenta mejorar la eficiencia operativa de los técnicos para responder de mejor forma a la demanda creciente del mercado. En relación con la metrología dimensional, el laboratorio ha desarrollado hace algunos años un softwa-

re que permite la captura automática de datos en el proceso de calibración de bloques patrón por comparación mecánica, que es el servicio de mayor precisión ofrecido en el I.N.M. (Instituto Nacional de Metrología) para esta magnitud (Constantino, et al., 2018, pp.58-59). La digitalización de este proceso en particular ha redundado en una disminución significativa del riesgo operativo de ensayo; sin embargo, el esfuerzo dedicado al desarrollo no permitió reducir la carga de trabajo en este ensayo ya que igualmente se requería la participación del operador para posicionar la plantilla del comparador en los diferentes puntos de medida (Constantino, et al., 2018, pp.62-63). En 2019 se realizó un nuevo avance en la robotización de este proceso a partir de elementos de hardware simples que, junto con importantes modificaciones al software desarrollado previamente, permitió reducir gran parte de la dedicación horaria del técnico en las distintas etapas del proceso. Por otra parte, al prescindir de un operador que ejecute manualmente los movimientos del comparador, se elimina también la influencia potencial del mismo en las condiciones ambientales y la temperatura de los patrones, obteniendo una mejora en la calidad de los resultados mediante la disminución de su incertidumbre. Este trabajo aborda la estrategia utilizada para automatizar el proceso, no solo en relación al desarrollo del software sino también al hardware elegido para la automatización mecánica y las acciones tomadas para una validación efectiva del proceso automatizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Patrones e instrumentos

Bloques patrón ISO 3650. Los bloques patrón de longitud son medidas materializadas que corresponden a fracciones de la unidad internacional de longitud, el metro. Al estar definido el metro en el SI (Sistema Internacional de Unidades) como la distancia recorrida por la luz en el vacío en $1/299792458$ de segundo, es necesario contar para los más diversos usos en distancias inferiores a 1m con medidas materializadas, es decir, piezas palpables cuyas medidas sean trazables a la unidad internacional. Los bloques patrón son prismas de sección rectangular, de diferentes materiales (acero, cerámica, carburo de tungsteno, etcétera), que cuentan con dos caras planas y paralelas entre las cuales está definida la longitud del bloque. Al utilizarse para distintos fines, con diferentes requisitos en cuanto a exactitud y paralelismo, los bloques son clasificados según cuatro grados: k, 0, 1 y 2, siendo el grado k, el de mejores características metrológicas. Los patrones nacionales de longitud, que dan sustento a las CMC del LATU en el área, son bloques patrón de acero, grado k, marca Mitutoyo, trazables a la definición del metro por medio de su calibración por interferometría absoluta (BIPM, 2019), llevada a cabo en el Centro Nacional de Metrología de México. Estos patrones nacionales de longitud fueron los bloques empleados en este trabajo.

Comparador de bloques. En el LATU, la calibración de los bloques patrón ISO 3650 se realiza por el método de comparación mecánica. Este proceso consiste en colocar dos bloques de igual longitud nominal en un comparador de bloques. Uno de ellos es el bloque de referencia (calibrado, con un error bien determinado) y el otro, el bloque que se pretende calibrar (también llamado bloque incógnita o muestra). De

este modo, se puede determinar con mucha precisión la longitud real del bloque incógnita (ensayo de longitud central, LC) por medio de varias series de medidas realizadas con los palpadores inductivos del comparador sobre el bloque de referencia y sobre el bloque bajo calibración. Además, el proceso también permite establecer para ese bloque bajo ensayo cuáles son las máximas variaciones, en más (f_m) y en menos (f_n), de las cuatro esquinas del bloque respecto de la longitud central (ensayo de variación de longitud, VL). El laboratorio dimensional del LATU cuenta con un comparador de bloques marca Mahr, modelo 826, con detector electrónico de doble palpador inductivo marca Millitron, modelo 1240. El equipo permite calibrar bloques de longitud nominal entre 0,5 y 100 mm.

Medición de temperatura. Al estar midiendo diferencias de longitud tan pequeñas (del orden de los nanómetros), y teniendo en cuenta que los materiales utilizados para los bloques e instrumentos se dilatan con el aumento de la temperatura, se deben extremar los cuidados para minimizar los cambios de temperatura (del laboratorio y de la radiación del técnico sobre los instrumentos y patrones). El control y mantenimiento de las condiciones ambientales en las horas previas y durante la calibración de bloques patrón es clave, tanto para la obtención de resultados adecuados como para minimizar el impacto de las componentes referidas a condiciones ambientales en la incertidumbre asociada a los mismos. En el laboratorio de Longitud del LATU, la temperatura se debe mantener estable y dentro de los límites de $(20 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, las 24 horas del día. Esto significa que, en caso de existir fluctuaciones dentro de esos límites, no pueden ser bruscas ya que la temperatura del comparador y accesorios debe ser la misma que la de los bloques, a fin de asegurar que durante las mediciones no haya alguno de los componentes del sistema que se esté dilatando o contrayendo. También es importante destacar que a medida que nos alejamos de dicha temperatura de referencia, la incertidumbre de medida de la calibración se va incrementando, poniendo en riesgo la calidad de las mediciones. Los termómetros utilizados son dos PT100 marca Hoffman, con un lector Fluke 1529 Chub E. Los termómetros fueron diseñados de manera que se puedan fijar firmemente a cada uno de los bloques intervinientes en la calibración una vez colocados en la plantilla del comparador.

Métodos

Modelo matemático para la determinación de la longitud central. La longitud central (LC) se determina por diferencia respecto a la longitud central de un patrón de referencia calibrado. El ensayo consiste en tomar cinco series de medidas de la longitud central del patrón de referencia (Cp) y cinco del bloque muestra (Cx). Estas medidas se realizan en secuencia Cp Cx Cp para eliminar los efectos de deriva en las mediciones. La ecuación 1 expresa el modelo de cálculo del ensayo.

$$lx = lp + \delta Lp + \Delta l + \delta Lc - L(\bar{\alpha} \cdot \delta t + \delta \alpha \cdot \Delta \bar{t}) - \delta Lv \quad [\text{Ec 1}]$$

Donde: lx es la longitud central del bloque muestra a $20 ^\circ\text{C}$; lp es la longitud central del bloque de referencia; δLp es la deriva del bloque de referencia; Δl es la

lectura del comparador que corresponde a la diferencia de longitud entre ambos bloques; δL_c es la contribución a la incertidumbre referida a desajustes del comparador; L es la longitud nominal; $\bar{\alpha}$ es el promedio de coeficientes de dilatación térmica; δt es la diferencia de temperatura entre bloques; $\delta\alpha$ es la diferencia de coeficientes de expansión térmica de los bloques; $\Delta\bar{t}$ es la desviación del promedio de temperatura de los bloques respecto de la temperatura de referencia; y δL_v es la corrección debida al desvío geométrico de la longitud central (Centro Español de Metrología, 2000).

Modelo de estimación de incertidumbre en la longitud central. Aplicando en la expresión de la ecuación 1 las reglas establecidas en la guía JCGM 100:2008 para la expresión de la incertidumbre de medida (BIPM, et al., 2008), y luego de obtener los coeficientes de sensibilidad por derivación parcial de los parámetros de entrada, se obtiene la siguiente expresión para la incertidumbre típica:

$$u_{Lx} = \sqrt{(u_{ip}^2 + u_{\delta L_p}^2 + u_{\Delta l}^2 + u_{\delta L_c}^2 + (-L \cdot \bar{\alpha})^2 u_{\delta t}^2 + (-L \cdot \Delta \bar{t})^2 u_{\delta \alpha}^2 + (-L)^2 u_{(\delta \alpha, \Delta t)}^2 + u_{\delta L_v}^2)} \quad [\text{Ec 2}]$$

Estimación de variación en longitud. La variación en longitud (VL) corresponde a la máxima diferencia de longitud medida en cinco distintos puntos de la cara de medida del bloque bajo ensayo, el centro (X) y las cuatro esquinas (E_1 , E_2 , E_3 y E_4), a aproximadamente 1,5 mm de la cara lateral. El ensayo consiste en la toma de cinco series de lecturas en secuencia Cx E_1 E_2 E_3 E_4 Cx en el bloque muestra. ΔL_{E_i} es la diferencia entre cada esquina y el promedio de la medida de centros y se informan en este caso $f_o = \max(\Delta L_{E_i})$ y $f_u = \min(\Delta L_{E_i})$.

Secuencia de ensayo

El flujo de trabajo durante la comparación de bloques se realiza de acuerdo con varias acciones que deben ser llevadas a cabo en forma secuencial. Cuando el operador las realiza manualmente, la observación de los movimientos que realiza el equipo permite que las acciones se hagan con seguridad y no impliquen riesgo para los patrones (bloques) ni para los palpadores del comparador.

Existen dos aspectos diferentes en la automatización del ensayo de calibración de bloques patrón por comparación mecánica. En primer lugar, la secuencia de acciones que responden al flujo de trabajo de la comparación, como son los tiempos de estabilización, los puntos a medir entre las caras de los patrones, los momentos de toma de temperatura, la secuencia de ensayos de longitud central y la variación en longitud. Estas acciones son determinadas a partir de medidas de tiempo y del punto leído. Por ejemplo, en el caso de la longitud central, nuestro proceso de estudio consta de 5 repeticiones de cada serie de medidas, que comprende una toma de datos del punto central del patrón, el punto central de la muestra y nuevamente el punto central del patrón. Esto puede verse también como 15 lecturas, donde cada una de ellas será tomada en una posición específica de los bloques. Si a esto sumamos la estabilización en temperatura y las lecturas de temperatura al inicio y final del ensayo, el flujo de trabajo lo podemos ver como una secuencia de acciones simples.



Figura 1. Flujo de trabajo en el ensayo de longitud central

Si se va a realizar también el ensayo de variación en longitud, puede agregarse una secuencia similar a continuación de esta, donde el único paso diferente serán las lecturas específicas de la serie correspondientes a este ensayo en el bloque bajo calibración (centro–4 extremos–centro) en 5 repeticiones; esto es, 30 lecturas en las posiciones definidas. Estas secuencias de acciones permanecen fijas en todas las calibraciones y no dependen de los valores leídos ni de lo que ocurra durante la calibración, por lo tanto, se definen estas secuencias a nivel de código de software. El final de cada acción que dispara la siguiente es, entonces, el límite de un temporizador para los períodos de estabilización, el dato de temperatura o lectura efectivamente tomado durante el ensayo.

Existe un segundo aspecto de la automatización mucho más complejo que el anterior, ya que intenta sustituir el trabajo del operador sobre el comparador mecánico y refiere específicamente a las acciones que determinan la toma de una lectura en una posición específica del patrón de referencia o el bloque bajo calibración. Por ejemplo, si el último punto leído fue el N° 7 del ensayo de VL, se entiende que el palpador está apoyado en el centro del bloque bajo calibración donde se tomó una lectura y debe leerse a continuación la lectura N° 8 sobre el primer vértice del mismo. Para realizar esta acción, durante el proceso manual el operador acciona el pedal de la bomba que contrae los palpadores y verifica visualmente que se levante, luego de esto posiciona la plantilla en el nuevo punto y libera la bomba para que los palpadores se extiendan realizando la lectura. La correcta automatización de este movimiento implica no solo accionar la bomba y realizar movimientos secuenciales en la plantilla, sino también tomar decisiones a partir de la verificación continua de los valores en el equipo Millitron. Más allá de que la contracción de los palpadores no es instantánea, podrían producirse fugas o fallas en el sistema neumático del pedal que imposibiliten la correcta contracción de los palpadores. Este aspecto implica un riesgo muy alto, ya que realizar el movimiento en la plantilla sin que los palpadores estén contraídos producirá probablemente un daño permanente en los palpadores o en los patrones. El movimiento debe iniciarse solamente si la lectura del equipo Millitron es superior a un valor establecido previamente, que corresponderá a un valor seguro de contracción de los palpadores.

Automatización mecánica

Generalidades. El objetivo de este trabajo es realizar la automatización completa del ensayo. Del estudio del flujo de trabajo y de las acciones realizadas por el técnico sobre los equipos se determina la necesidad de automatizar las partes del sistema indicadas con círculos en la Figura 2.

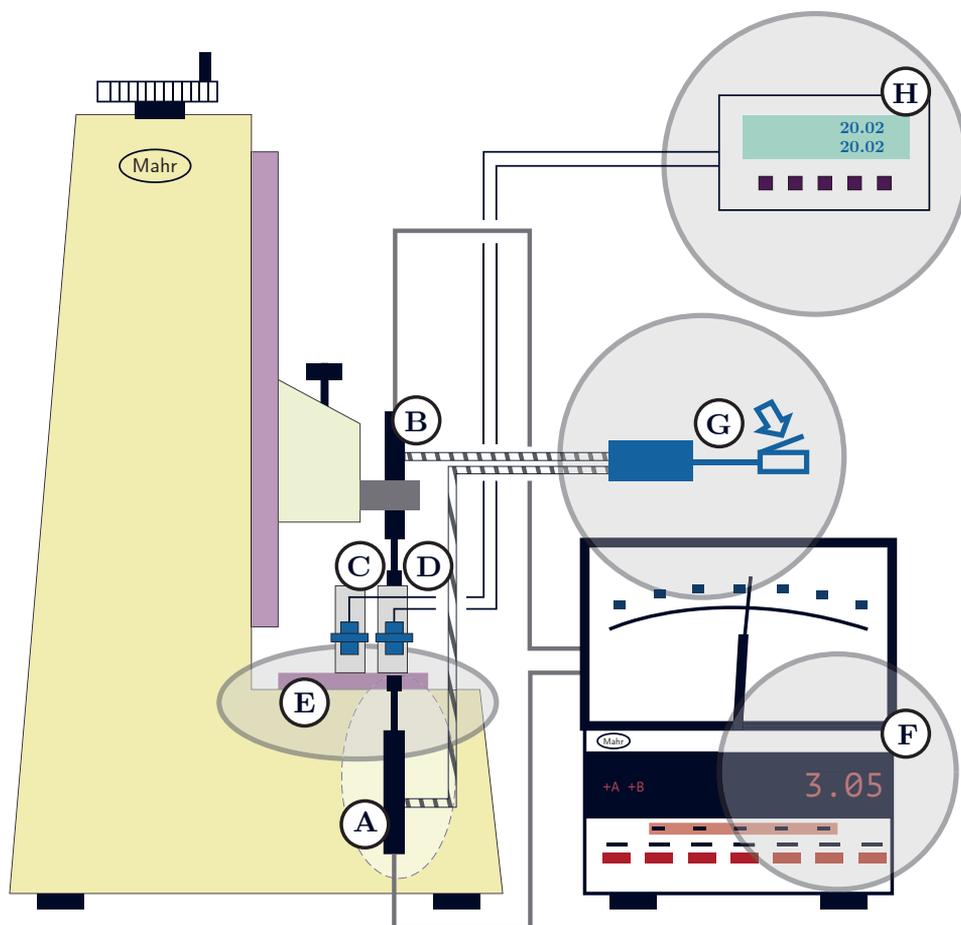


Figura 2. Sistema de calibración de bloques y partes automatizables.

En la Figura 2 se indican las partes principales del sistema, donde A es el palpador inferior, B es el palpador superior, C es el patrón de referencia, D es el bloque bajo calibración, E es la plantilla de posicionamiento, F es el dispositivo de lectura Millitron, G es el pedal de la bomba neumática para la contracción de los palpadores, y H es el display de los termómetros de contacto. En esta figura se observa que para una independencia completa del técnico sobre el sistema se requiere la automatización de cuatro partes del sistema. Dos de ellas -termómetros de contacto y lectura del Millitron- requieren únicamente la captura de datos a través del puerto serie. En el caso de la plantilla de movimientos y el pedal de la bomba de contracción para los palpadores inductivos, se requiere en ambos casos la adición de algún hardware que cuente con conexión a PC. De este modo es posible controlar en forma remota su movimiento y su operación, ya que el sistema original no cuenta con esta posibilidad.

Automatización de los palpadores. Para la contracción de los palpadores, el comparador utiliza una bomba neumática que se acciona con un pedal asociado a ella mediante un tubo flexible. Se decidió utilizar esta misma bomba en el sistema automatizado, por lo que se debe sustituir el pedal con un hardware alternativo que pueda controlarse remotamente. Sin embargo, las funciones de este pedal no pueden anularse ya que su uso puede ser necesario tras un corte de energía o una falla de software.

También es necesario el accionamiento manual al momento de manipular los bloques patrón o reposicionar manualmente la plantilla.

El pedal conecta y desconecta dos pulsadores a la vez, tal como se muestra en la parte superior de la Figura 3. Uno de ellos activa la bomba neumática, mientras que el otro cierra una válvula que permite contraer los palpadores al hacer vacío sobre el sistema. Al soltarlo se producen las acciones inversas. Para controlar remotamente esta operación, se intercala una placa Arduino Uno, conteniendo como componentes un relé que acciona la bomba y una electroválvula normal abierta en serie con la válvula del pedal, que debe cerrarse al accionar la bomba y liberarse al desconectarla. En el software de la placa Arduino se codifican estas acciones en simultáneo para que desde la aplicación de control se opere como una única acción. La Figura 3 muestra el mecanismo del pedal y la opción automática utilizada.

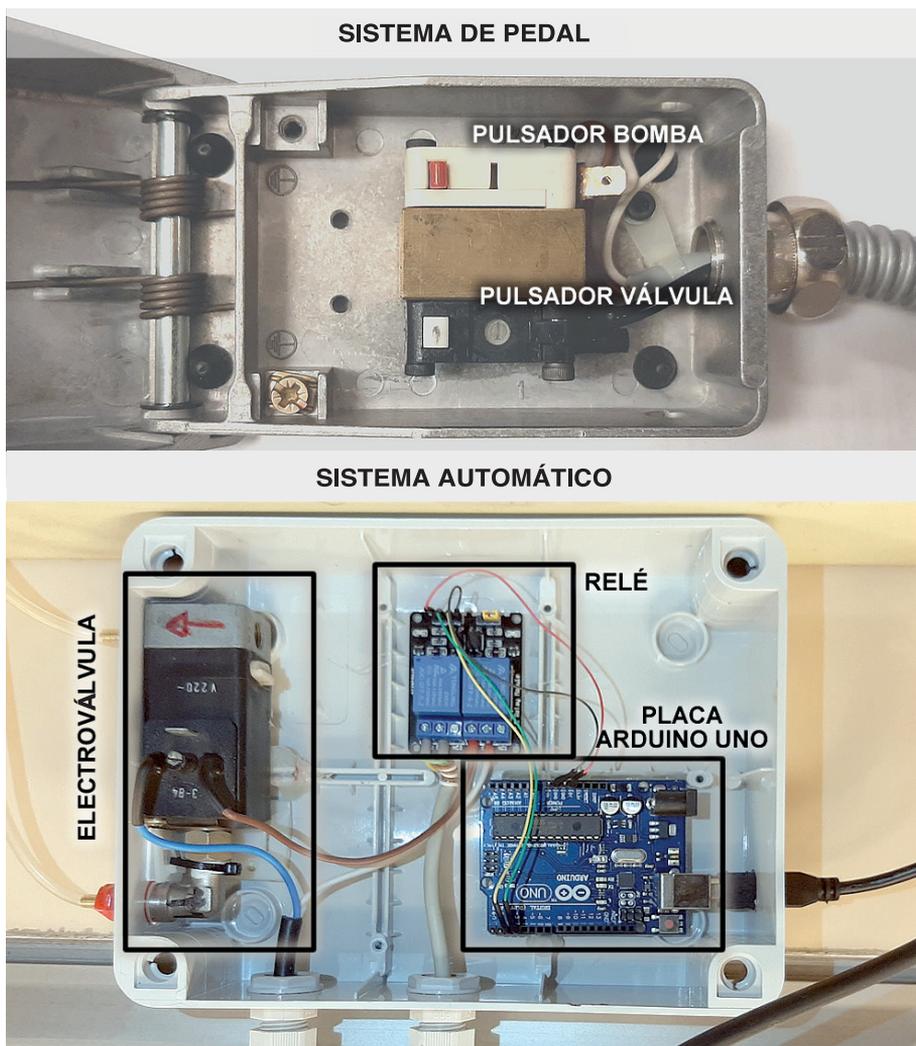


Figura 3. Sistema para accionamiento de palpadores. Arriba: interior del pedal de activación (sistema manual); abajo: hardware agregado (sistema automático).

Automatización de la plantilla de movimientos. La plantilla para el posicionamiento de bloques es operada en forma manual con una perilla o un mando lateral con movimientos lineales y rotatorios, que se traducen en la plantilla como movimientos en direcciones perpendiculares del plano horizontal. Estos movimientos están limitados por un rodamiento confinado en un recorte central de la misma, con secciones curvas que permiten situar la plantilla en los puntos repetibles de medida, tal cual se indica en la Figura 4.

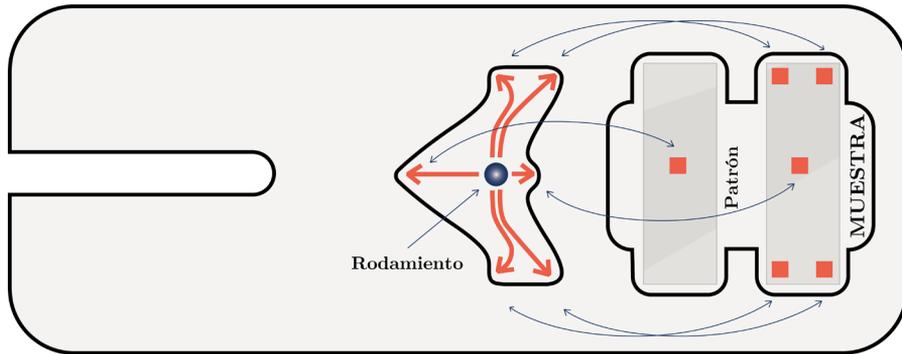


Figura 4. Plantilla de la mesa de medida del comparador, indicando los movimientos posibles y su equivalencia en puntos de medida.

En este caso también es necesario mantener la posibilidad de operación manual, por lo tanto, para su automatización se utilizó un actuador lineal-rotatorio, sustituyendo la perilla por una pieza moleteada de tornería que permite fijar los vástagos del comparador y del pistón del actuador, al mismo tiempo que permite su operación manual sin cambiarla o desasociar partes del sistema. La pieza se diseñó a medida, de acuerdo con las características de los vástagos, como muestra la Figura 5.

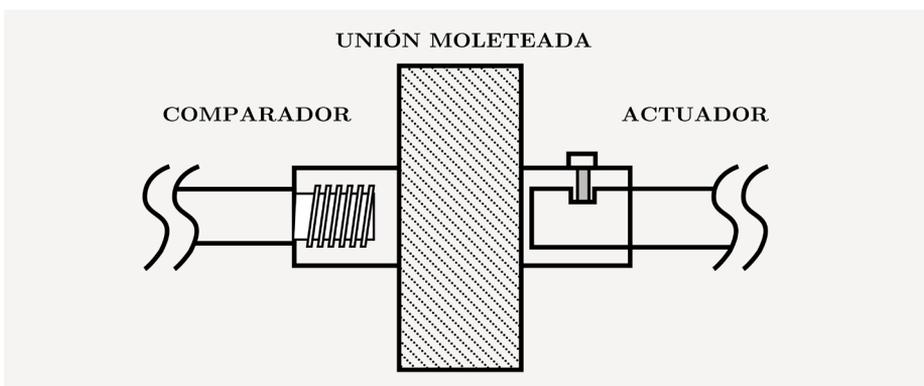


Figura 5. Pieza para unión del actuador lineal-rotatorio.

Se tuvo especial cuidado en asegurar una correcta linealidad entre el vástago del mando del comparador, el pistón del actuador y la pieza de unión, ya que un pequeño sesgo en la dirección aumentaría significativamente el torque necesario para

mover la plantilla, además de acelerar el deterioro de las partes móviles, tanto del comparador mecánico como del actuador. El actuador elegido es un equipo marca SMAC, modelo LAR55-050-75-1FSA, serie AAR3515, con un controlador marca SMAC, modelo LAC-55, serie Y4450. Para la elección del modelo, se midió el par torsional máximo del mando manual, eligiendo un actuador cuya capacidad de movimientos no quedara limitada por la resistencia del mando. Este tipo de actuadores cuenta con comunicación a través del puerto serie, permite controlar el eje lineal y de giro independientemente, así como la obtención de valores de posición para ambos ejes en tiempo real.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Configuración del sistema

El sistema se configuró de acuerdo con las descripciones indicadas en la sección Materiales y métodos. La Figura 6 muestra el hardware general del sistema de calibración de bloques por comparación mecánica.

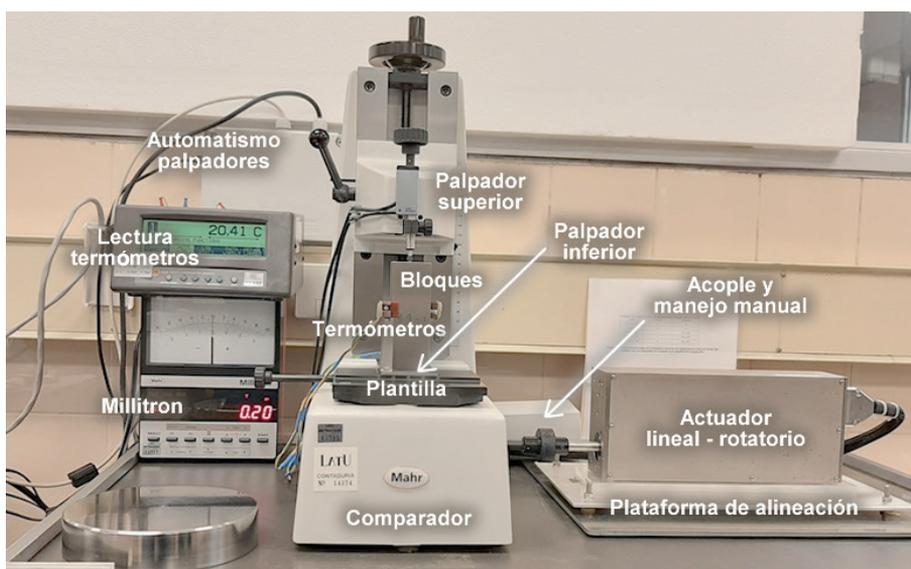


Figura 6. Descripción del hardware del sistema de calibración automatizado.

Interfaz de trabajo

Previo a la automatización, el laboratorio había desarrollado un software para la captura de datos en este mismo proceso, utilizando un lenguaje de propósito general (Delphi 7) en sistema operativo Windows. Para el proceso automatizado no se realizó un nuevo software, sino que se modificó el código existente agregando nuevas rutinas para el control del hardware. Para disminuir la curva de aprendizaje, se intentó no modificar la interfaz del software desarrollado previamente para la captura de datos de este software previo, exceptuando únicamente el agregado de una opción para activar el modo de robot y otra para la captura automática de

lecturas de temperatura. Todas las acciones del operador, registro de patrones y configuración de los ensayos, entre otros, se realizan en las mismas ventanas que para el método manual (Figura 7).

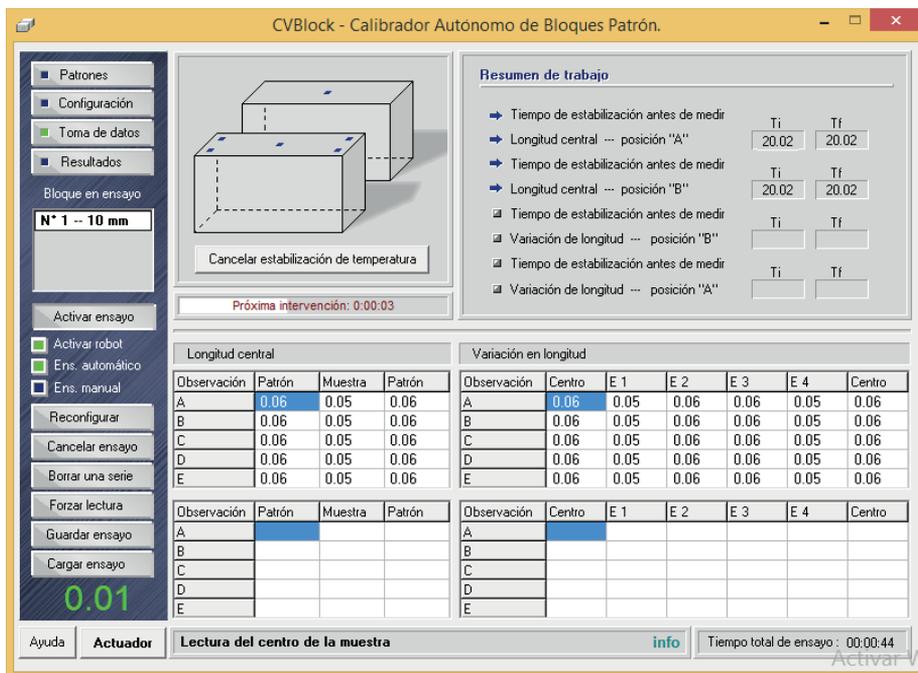


Figura 7. Ventana principal del software de automatización y control.

En las pruebas operativas se observó que bloques de distintos tamaños podían tener una conducta diferente al movimiento del actuador. Por ejemplo, en bloques de 100 mm, al detenerse el desplazamiento de la plantilla, los bloques quedaban oscilando unos segundos antes de alcanzar el reposo, lo que podría arrojar resultados de medida erróneos en caso de que el palpador haga contacto con un bloque en movimiento. Para anular este efecto indeseado se programó un tiempo de espera configurable en la interfaz del software, el que se ejecuta al finalizar el desplazamiento de la plantilla, previo a liberar los palpadores. Previo al inicio del ensayo se indica este tiempo de espera según la longitud nominal de los bloques. El actuador utilizado para el sistema cuenta con un controlador PID en cada eje de movimiento, por tanto, se aprovechó esta cualidad y se dispuso una ventana adicional (Figura 8) a las existentes en el software para modificar tanto los parámetros del PID como realizar otros movimientos en el actuador, independientemente de la ejecución del programa, para reubicar los bloques o manipular el equipo.

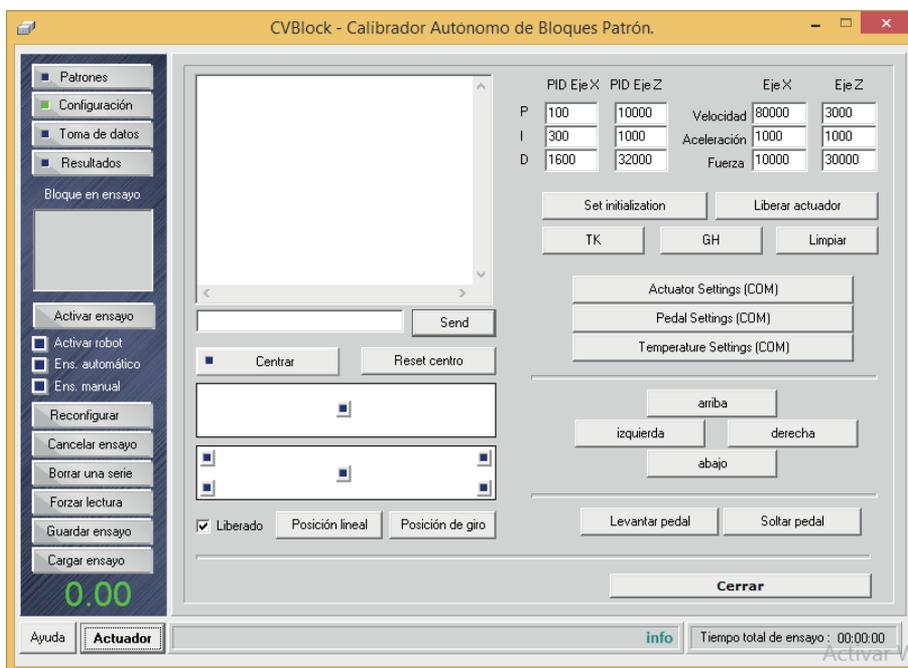


Figura 8. Ventana de comandos del actuador y el pedal.

Módulos de control

Las rutinas necesarias para el control de las acciones mecánicas del equipo y la toma de temperaturas se insertaron dentro del código fuente del software, desarrollado previamente para la captura de datos del comparador. Para la temperatura, el desarrollo consistió simplemente en sustituir el ingreso manual de datos de temperatura por una captura directa del equipo Fluke. En la interfaz del software se agregaron además opciones de “Temperatura automática” y “Activar robot” para permitir alternar estas características entre el modo manual y el automático. Habiendo determinado y programado las acciones relacionadas a la calibración, se debieron realizar adicionalmente algunos cambios y mejoras, tanto en la mecánica del sistema como en el software, para realizar las operaciones de posicionamiento y la lectura en forma segura de modo que no se produjeran daños en el equipo ni acciones inesperadas relacionadas con características del equipo o fallas del sistema. Se detallan a continuación algunas características que debieron corregirse en la configuración básica del sistema para evitar situaciones riesgosas para los equipos involucrados.

Eliminación del sistema de vuelta al origen: se observó que el actuador eléctrico, en su configuración de fábrica, fuerza la vuelta al origen del pistón en forma predeterminada, retrayéndose bruscamente cuando se corta la energía eléctrica. Esta conducta responde a que el mecanismo del actuador cuenta con un resorte interno que realiza una fuerza continua de contracción sobre el pistón. Este movimiento imprevisto se traduce en el sistema como una fuerza lateral significativa sobre la plantilla, por lo que se debió evitar

que ocurriera. Para esto se abrió la cubierta metálica del actuador y se retiró dicho resorte. De esta forma, el actuador permanecerá en la posición en que se encuentre al cortarse la energía.

Determinación de coordenadas de ensayo: cada vez que el actuador se reinicia, las coordenadas de posición de ambos ejes se inicializan en cero. Esto impide que se pueda trabajar en forma predeterminada con las coordenadas del actuador, debiéndose obtener nuevas referencias cada vez que se reinicia el equipo. Para obtener entonces las coordenadas en los puntos de trabajo, se desarrolló una rutina que dispara un recorrido alcanzando topes y centros, registrando todas estas coordenadas para ambos ejes. Este proceso de determinación de coordenadas se dispara automáticamente al momento de seleccionar la opción “Activar robot”, impidiendo toda actividad en el sistema hasta que finalice el recorrido.

Realización de un movimiento del actuador y toma de lectura: como se dijo en la sección anterior, es necesario asegurarse de que los palpadores estén suficientemente contraídos antes de iniciar el movimiento; por lo tanto, cada movimiento realiza una secuencia de operaciones que requieren un monitoreo en tiempo real, tanto de las coordenadas del actuador como de la lectura del equipo Millitron, la cual es representativa de la separación entre los palpadores. Esto se logró estableciendo una lectura de seguridad (LS) correspondiente a una apertura mínima de palpadores que permita mover la plantilla, y una lectura máxima de contacto (LM) que responde al máximo esperable si los palpadores están en contacto con el bloque. Si consideramos tomar un dato del Millitron en la posición A, establecida en coordenadas (XA,XA), donde x es la posición lineal y z la posición de giro, el flujo de acciones del software necesarias está determinado por el flujograma de la Figura 9.

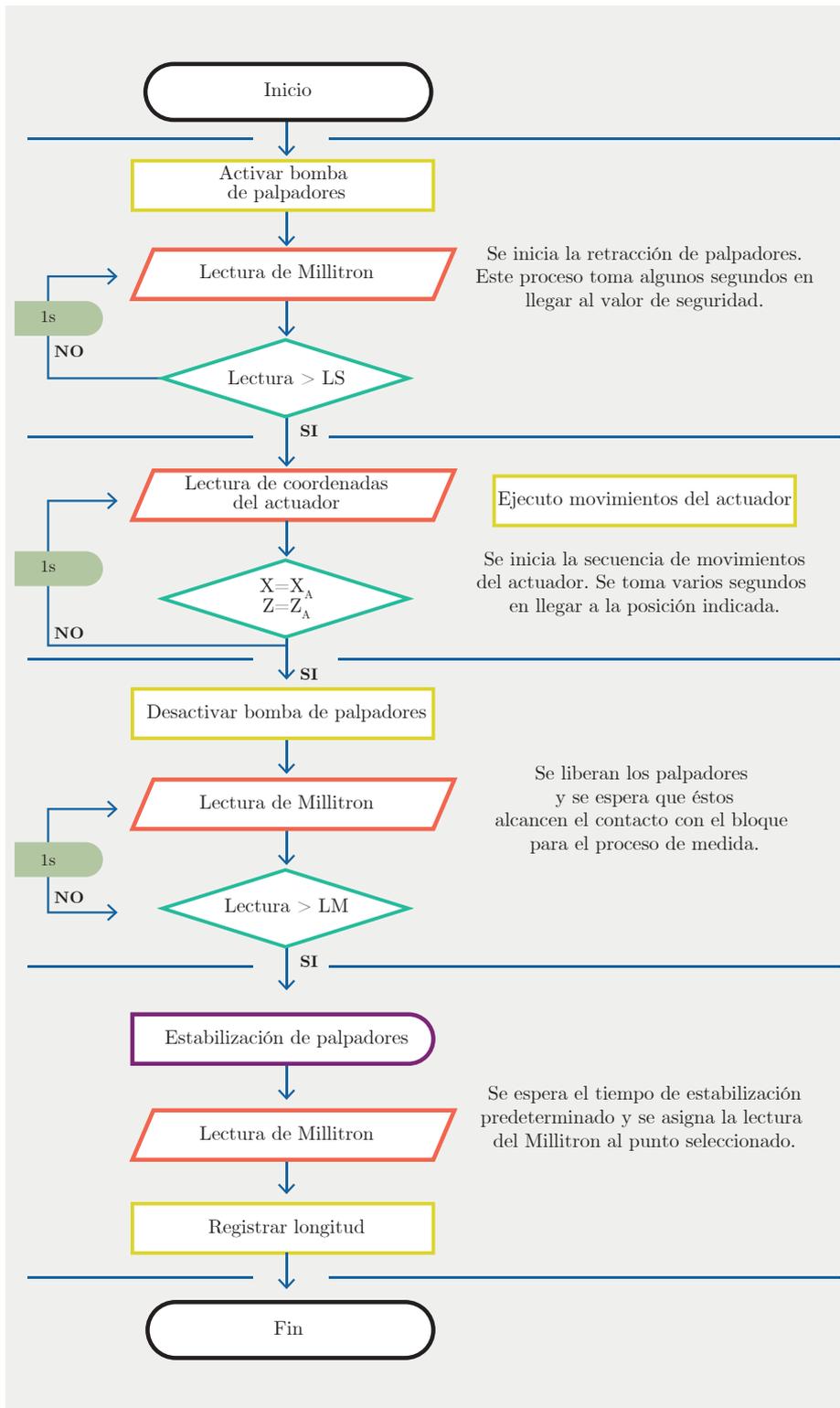


Figura 9. Flujograma para la toma de una lectura.

Resultados experimentales

Se realizaron medidas comparativas de longitud central para el ensayo manual y, repitiendo 3 veces el ensayo automático, en calibraciones de bloques de 3 longitudes nominales a fin de determinar si existían diferencias significativas en la incertidumbre obtenida o un sesgo en los resultados de calibración. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados comparativos de ensayo manual y ensayo automático.

| Longitud nominal [mm] | Ensayo | Desvío en longitud central ($l_c - l_n$) [nm] | Incertidumbre expandida [nm] | En |
|-----------------------|----------|---|------------------------------|-----|
| 0,5 | Manual | -0,023 | 0,043 | |
| | Autom. 1 | -0,020 | 0,043 | 0,0 |
| | Autom. 2 | -0,017 | 0,043 | 0,0 |
| | Autom. 3 | -0,023 | 0,043 | 0,1 |
| 50 | Manual | 0,198 | 0,106 | |
| | Autom. 1 | 0,173 | 0,081 | 0,2 |
| | Autom. 2 | 0,207 | 0,082 | 0,3 |
| | Autom. 3 | 0,174 | 0,083 | 0,3 |
| 100 | Manual | 0,128 | 0,087 | |
| | Autom. 1 | 0,132 | 0,090 | 0,0 |
| | Autom. 2 | 0,134 | 0,085 | 0,0 |
| | Autom. 3 | 0,130 | 0,076 | 0,0 |

La última columna de la tabla 1 muestra el error normalizado (En) obtenido entre los resultados del ensayo manual y cada uno de los automáticos. Los valores de En indican que los resultados pueden considerarse equivalentes. Por otra parte, el ensayo automático no arrojó incertidumbres sensiblemente menores que las obtenidas en el ensayo manual, por lo que puede considerarse que para las condiciones de trabajo del LATU los efectos inherentes al operador no representaron una componente significativa de incertidumbre.

CONCLUSIONES

Se ha incrementado el potencial del proceso de calibración de bloques patrón de longitud por medio del agregado de algunos elementos de hardware específicos y del desarrollo de un software a medida, utilizando un lenguaje de propósito general. Este proceso automatizado tiene las mismas condiciones de calidad e incertidumbre que el proceso manual, permitiendo reducir casi totalmente el tiempo del operador frente al

equipo de calibración. Únicamente se necesita colocar adecuadamente los bloques en el equipo e iniciar el robot desde la interfaz del software. Luego, en caso del ensayo a dos caras, deben girarse los bloques antes del ensayo de longitud central previo al ensayo de la cara B.

Las pruebas de comparación de resultados entre el método manual y el automático no arrojaron diferencias entre ambos métodos, por lo que recientemente se optó por participar en la comparación internacional de bloques patrón SIM.L-S.7.2019 en el marco del SIM, remitiendo los datos obtenidos por medio del método automatizado. Se prevé que los resultados de esta comparación estarán disponibles para mediados del año 2021. Resultados aceptables en este ejercicio permitirán validar la exactitud del método.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Jorge Venis, Alberto Ceretta y Miguel Delbono, del departamento de Ingeniería y Mantenimiento del LATU, por su constante apoyo en la solución de aspectos de mecánica y electrónica durante el proyecto.

REFERENCIAS

BIPM, 2019. Mise en pratique for the definition of the metre in the *SI*. En: *BIPM. SI Brochure. Appendix 2*. 9na ed. Cedex: BIPM.

BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP y OIML, 2008. *JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. [s.l.]: JCGM.

Centro Español de Metrología, 2000. *Procedimiento DI-014 para la calibración de bloques patrón longitudinales por comparación mecánica ($L \leq 100$ mm)*. Madrid: CEM.

Constantino, Pablo, Acquarone, Alejandro, Mazini, Marcos, Robatto, Ofelia, Ponticorbo, Verónica y Fajardo, Simone, 2018. Cuatro experiencias de automatización en Metrología y su impacto en el riesgo de calidad y la eficiencia operativa. En: *INNOTEC*, 16, pp.56-63. <https://www.doi.org/10.26461/16.03>

Revalorización del descarte originado por la producción de jugo de manzana como ingrediente funcional en la formulación de premezclas para horneados

Apple juice by-product used as a functional ingredient in bakery premixes formulation

Reavaliação de resíduos causados pela produção de suco de maçã como ingrediente funcional na formulação de pré-misturas de panificação

RECIBIDO: 1/9/2020 → APROBADO: 3/11/2020 ✉ parcia@latitud.org.uy

✎ TRÍAS, JULIETA (1); CURUTCHET, ANA (1); ARCIA, PATRICIA (1)(2); COZZANO, SONIA (1)
(1) ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA, FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍAS UCU. MONTEVIDEO, URUGUAY.
(2) LATITUD - FUNDACIÓN LATU. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Este estudio evaluó el uso de bagazo de manzana, principal subproducto de la industria del jugo, como ingrediente funcional en premezclas para horneados. Esta materia prima tiene alto contenido de fibra, lo que le otorga un gran potencial nutricional para mejorar la formulación de productos. El bagazo fue secado y molido para obtener harina de manzana. Se desarrollaron premezclas para muffins, tortas y galletas enriquecidas en fibra mediante sustitución parcial de harina de trigo por harina de manzana, con el fin de obtener un producto que podría ser etiquetado como “fuente de fibra”. Si bien la fibra tuvo un efecto negativo en las características sensoriales, los productos desarrollados fueron aceptables y percibidos como saludables. La torta fue el producto más aceptable, siendo seleccionado para hacer un estudio con productos de las marcas líderes del mercado. La premezcla desarrollada contribuye a la generación de otro concepto de producto, ya que fue percibida como diferente cuando se comparó con otros productos comerciales similares, aunque obtuvo una aceptabilidad comparable. El desarrollo de premezclas utilizando este subproducto constituye una categoría de alimentos funcionales que satisface las necesidades de los consumidores y de la industria, permitiendo transformar un problema ambiental en un potencial retorno económico, contribuyendo a la salud de los consumidores.

PALABRAS CLAVE: desarrollo de productos, subproducto, economía circular, aceptabilidad, fibra alimentaria.

ABSTRACT

This work evaluated the use of apple juice by-product as a functional ingredient in healthy baking premixes. Due to its high fiber content, this raw material was decided to be used as an enrichment strategy for food product formulation. Apple pomace was obtained as a by-product of the juice industry and was dried and ground to obtain apple flour. Premixes for fiber enriched muffins, cakes and biscuits were developed by partially substituting wheat flour for apple flour to obtain a product that could be labeled as “source of fiber”. The products developed were satisfactorily evaluated, but even if fiber had a negative effect on the sensory characteristics of the products, it also caused them to be perceived as healthy. Considering that the cake was the product with the highest acceptability, it was selected to make a comparative study with competing market-leading products. This comparison revealed that the developed premix contributes to the preparation of another product concept, since it was described differently than commercial products, but with comparable acceptability. Finally, it can be said that the development of premixes using apple juice by-product constitutes a new category of functional foods, which satisfies both the needs of consumers and those of the industry, making it possible to transform an environmental problem into a potential economic return for companies.

KEYWORDS: product development, by-product, circular economy, acceptability, fiber.

RESUMO

Este estudo avaliou o uso do bagaço de maçã como ingrediente funcional em misturas para panificação. Essa matéria-prima possui alto teor de fibras, o que lhe confere grande potencial nutricional para melhorar a formulação dos produtos. O bagaço da maçã é um subproduto da indústria de sucos, era seco e moído para a obtenção da farinha de maçã. As pré-misturas enriquecidas com fibras para muffins, bolos e biscoitos foram desenvolvidas substituindo parcialmente a farinha de maçã pela farinha de trigo, a fim de se obter um produto que pudesse ser rotulado como “fonte de fibra”. Os produtos desenvolvidos foram aceitáveis, embora a fibra tenha um efeito negativo nas características sensoriais, também fez com que fossem percebidos como saudáveis. O bolo foi o produto mais aceitável, ele foi selecionado para um estudo com produtos líderes de mercado. A pré-mistura desenvolvida constitui outro conceito de produto, pois foi percebida de forma diferente das comerciais, mas com aceitabilidade comparável. O desenvolvimento de pré-misturas a partir desse subproduto constitui uma categoria de alimentos funcionais que satisfaz as necessidades dos consumidores e da indústria, possibilitando transformar um problema ambiental em potencial retorno econômico, contribuindo para a saúde dos consumidores.

PALAVRAS-CHAVE: desenvolvimento de produto, subproduto, economia circular, aceitabilidade, fibra dietética.

INTRODUCCIÓN

Durante el procesamiento de jugo de manzana se genera un residuo (bagazo de manzana) que consta de cáscara, pulpa, semillas y tallos, el cual representa entre un 25 y 30% del peso original de la fruta (Rabetafika, et al., 2014). A escala mundial se procesan 11 millones de toneladas de manzanas al año (USDA, 2018), generándose 3.3 millones de toneladas anuales de bagazo de manzana que las industrias deben disponer de manera adecuada. Este subproducto es usualmente destinado a compostaje, o utilizado como relleno de suelos y para alimentación animal, causando serios problemas ambientales y pérdidas para las industrias debido al costo asociado al tratamiento y transporte del residuo (Dhillon, et al., 2013). Así, resulta de vital importancia utilizar este subproducto con el fin de mejorar la economía del proceso y su sustentabilidad.

Si bien el bagazo de manzana es considerado un residuo, contiene importantes cantidades de nutrientes y componentes bioactivos sin explotar. Este subproducto es una importante fuente de fibra dietética, considerando que cerca de un 40% de su peso seco es fibra (Alongui, et al., 2019).

La fibra dietética posee numerosos efectos benéficos para la salud, pudiendo contribuir en el tratamiento de la arteriosclerosis por obesidad, enfermedades cardiovasculares, cáncer de intestino grueso y diabetes al disminuir el nivel de absorción de la glucosa. Tiene el potencial de unirse al ácido clorhídrico, los iones metálicos y el colesterol en el estómago, y de estimular el crecimiento de la microflora probiótica en los intestinos (Kruczek, et al., 2017). La fibra insoluble actúa como agente espesante, normalizando la motilidad intestinal y previniendo el estreñimiento, mientras que los efectos de la fibra soluble están asociados con la disminución de la absorción del colesterol y la glucosa a nivel intestinal (Selani, et al., 2014). Una ingesta adecuada de fibra dietética total ronda los 28 y 25 gramos por día para hombres y mujeres, respectivamente (USDA, 2007).

Por otro lado, durante los últimos años los hábitos alimenticios han cambiado considerablemente, llevando a la población a un consumo excesivo de azúcares altamente refinados y alimentos de alta densidad calórica. Este cambio en la dieta, junto con el estilo de vida sedentario, se ha correlacionado con la creciente incidencia de enfermedades metabólicas crónicas como la obesidad y la diabetes de tipo 2. De hecho, el número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Las preocupaciones por las dietas saludables centradas en alimentos de bajo aporte calórico y nutricionalmente equilibrados comprometen a la industria a desarrollar alimentos que combinen conveniencia y nutrición. En esta línea, algunos investigadores han utilizado subproductos de origen frutal para el desarrollo de alimentos funcionales, como galletas con alto contenido de fibra y antioxidantes a partir del bagazo de arándanos (Pérez, et al., 2017) o pasta con harina de bananas verdes que permite aumentar el grado de carbohidratos no digeribles del producto (Ovando-Matrinez, et al., 2009).

Resulta entonces atractiva la idea de producir una harina de manzana a partir del subproducto en cuestión, y utilizarlo como estrategia de enriquecimiento en productos horneados, que son de gran consumo, aunque de los más pobres desde el punto de vista nutricional.

En este contexto, el objetivo general del presente estudio se centra en el aprovechamiento y la revalorización del subproducto generado por la producción de jugo de manzana a través de su uso como ingrediente funcional en el desarrollo de nuevos productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la harina de manzana

El bagazo de manzana fue obtenido como subproducto de la producción de jugo, y provisto por la empresa MIS OLIVOS S.A. (Natural Tree). Las variedades empleadas en la producción fueron Royal Gala, Early Red One, Red Chiff, Dana Red y Granny Smith, cultivadas y procesadas en Uruguay. La harina de manzana fue obtenida mediante secado del bagazo, inmediatamente después de su obtención, en un horno de convección a 70°C durante 8 horas, seguido de una etapa de molido con un molinillo de laboratorio, conservando la fracción que pasó a través de una malla de 1 mm. La harina de manzana obtenida fue conservada en una cámara de frío a -18°C hasta su utilización.

El tiempo y la temperatura de secado fueron seleccionados con el objetivo de eliminar el cianuro de hidrógeno que pueda haberse formado (Rawat, et al., 2015).

Desarrollo de premezclas

Ensayos Preliminares

Teniendo en cuenta que la harina de manzana elaborada tiene un contenido significativo de fibra dietética (38.5 g/100 g) y azúcares naturales (47.5 g/100 g, como carbohidratos totales) (determinado en trabajos previos, datos no publicados), se utilizó como ingrediente funcional para la formulación de premezclas para hornearlos ricos en fibra y reducidos en azúcar agregado.

Se formularon premezclas para galletas, muffins y tortas, con sustitución parcial de harina de trigo por harina de manzana, para estudiar los efectos de este ingrediente en las características sensoriales del producto. El porcentaje de sustitución se eligió de manera tal que el producto pudiera etiquetarse como “fuente de fibra”, que corresponde a un contenido de 2.5 g de fibra por porción de producto listo para consumo, según el reglamento Mercosur, (Mercosur, 2012). Los ingredientes básicos para la elaboración de las premezclas fueron obtenidos en el mercado local. Las formulaciones para cada producto pueden verse en la Tabla 1, así como su reconstitución con agua, aceite y huevos.

Tabla 1. Composición de las premezclas y del producto listo para consumo.

| Ingrediente | Cantidad en la premezcla (%) | | | Cantidad en el producto listo para consumo (%) | | |
|---------------------------|------------------------------|-------|--------|--|-------|--------|
| | Galleta | Torta | Muffin | Galleta | Torta | Muffin |
| Harina de trigo | 33,06 | 35,67 | 28,93 | 21,47 | 20,68 | 18,97 |
| Harina de manzana | 44,08 | 23,18 | 20,11 | 28,62 | 13,44 | 13,18 |
| Edulcorante* | 1,76 | - | - | 1,14 | - | - |
| Azúcar | 16,53 | 31,21 | 49,04 | 10,73 | 18,09 | 32,15 |
| Polvo de hornear | 2,37 | 4,46 | 1,93 | 1,54 | 2,58 | 1,26 |
| Leche en polvo descremada | - | 3,57 | - | - | 2,07 | - |
| Canela | 2,20 | 1,92 | - | 1,43 | 0,50 | - |
| Aceite vegetal | - | - | - | 10,73 | 7,75 | 9,18 |
| Huevos | - | - | - | 17,89 | 12,92 | 11,48 |
| Agua | - | - | - | 6,44 | 21,97 | 13,78 |

* Splenda

Para todas las formulaciones se mezclaron los ingredientes secos de tal manera que se obtuvieron 182 g, 222 g y 286 g de polvo para la galleta, la torta y el muffin, respectivamente.

Para las galletas, se mezcló el polvo con 18 ml de agua, 30 g de aceite y un huevo, se estiró la masa de 5 mm de espesor y se cortaron las galletas de 5 cm de diámetro, para luego ser horneadas a 180°C, durante 16 minutos.

Para la torta, se mezcló el polvo con 85 ml de agua, 30 g de aceite y un huevo, se colocó la masa en una tartera de 22 cm de diámetro y fue horneada a 170°C, durante 15 minutos.

Para los muffins, se mezcló el polvo con 60 ml de agua, 40 g de aceite y un huevo, se colocó la masa en moldes y se horneó a 170°C, durante 15 minutos.

Formulación final

En base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se eligió la torta para continuar con los estudios de aceptación en relación a otras tortas comerciales, pero se reformuló eliminando la canela de su composición ya que fue motivo de rechazo por gran parte de los consumidores.

Nuevamente, para la elaboración del producto se mezclaron los ingredientes secos de manera tal que se obtuvieron 222 g de polvo, a los cuales se agregaron 85 ml de agua, 30 g de aceite y un huevo. La masa obtenida fue colocada en una tartera de 22 cm de diámetro y horneada a 170°C, durante 15 minutos.

Evaluación sensorial

Ensayos Preliminares

Se llevó a cabo una evaluación sensorial para estudiar la aceptabilidad de los productos desarrollados. La evaluación consistió en tres sesiones en las que cada formulación (galleta, muffin y torta) fue evaluada en cuanto a su aceptabilidad general y dulzor. Cada producto fue evaluado por estudiantes y trabajadores de la Universidad Católica del Uruguay. En la evaluación de galletas participaron 77 consumidores, 60% hombres y 40% mujeres, con edades entre 17 y 70 años. En la evaluación de muffins participaron 70 consumidores, 50% hombres y 50% mujeres, con edades entre 18 y 60 años. Y en la evaluación de tortas participaron 80 consumidores, 51% hombres y 49% mujeres, con edades entre 14 y 63 años.

Durante cada sesión, las muestras fueron servidas en platos plásticos utilizando números aleatorios de tres dígitos para su codificación. La aceptabilidad general fue evaluada con una escala hedónica de nueve puntos, desde 1 (“me disgusta muchísimo”) a 9 (“me gusta muchísimo”). El dulzor se evaluó mediante escalas de adecuación JAR (“just about right”), con una escala hedónica de siete puntos, donde 1 correspondía a “poco dulce”, 4 a “lo justo” y 7 a “demasiado dulce”.

Cada prueba incluía además entre 14 y 17 atributos para ser marcados por los consumidores bajo la consigna “marque todo lo que corresponde” (CATA). CATA es una técnica que se utiliza cada vez más en la investigación de la aceptabilidad de los alimentos, que consiste en una lista de múltiples atributos entre los cuales los encuestados deben seleccionar los que consideren aplicables a las muestras que se evalúan. La principal ventaja de este tipo de cuestionario es que permite seleccionar múltiples opciones en lugar de obligar a los consumidores a centrar su atención en atributos específicos para evaluar (Tarrega, et al., 2016).

Formulación final y comparación con productos del mercado

Con el objetivo de comparar la torta elaborada con la premezcla experimental con las tortas de las premezclas más vendidas en el mercado, se llevó a cabo una evaluación sensorial que consistió en una única sesión en la que la torta experimental fue servida junto con tres tortas de premezcla comerciales, dos de vainilla (tortas 1 y 2) y una de naranja (torta 3).

La evaluación fue realizada por 104 estudiantes y trabajadores de la Universidad Católica del Uruguay, de los cuales el 58% eran hombres y el 42% mujeres, cuyas edades estaban comprendidas entre 17 y 60 años.

Las muestras fueron servidas en platos plásticos, codificadas utilizando números aleatorios de tres dígitos, presentadas en orden aleatorio de presentación entre los consumidores. La aceptabilidad general fue evaluada en una escala hedónica de nueve puntos, desde 1 (“me disgusta muchísimo”) a 9 (“me gusta muchísimo”). El dulzor se evaluó mediante el uso de escalas JAR (“just about right”) de adecuación, en una escala hedónica de siete puntos, donde 1 correspondía a “poco dulce”, 4 a “lo justo” y 7 a “demasiado dulce”.

Cada prueba incluía además 21 atributos para ser marcados por los consumidores bajo la consigna “marque todo lo que corresponda” (CATA), es decir, debiendo marcar todos aquellos atributos que consideran adecuados para describir a la muestra.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la aceptabilidad de las muestras, y se utilizó la prueba de Tukey para hallar diferencias significativas entre las medias ($p = 0,05$). Para cada muestra, las frecuencias para “poco dulce”, “muy dulce” y “lo justo” en la pregunta JAR de dulzor fueron calculadas. La frecuencia de mención de cada uno de los términos de la pregunta CATA fue determinada, y se utilizaron las pruebas Q de Cochran y diferencia crítica de Sheskin para determinar diferencias significativas dentro de las muestras para cada término. Finalmente, se utilizó en Análisis de Componentes Principales para relacionar la aceptabilidad de las muestras con los términos de la pregunta CATA. Los análisis fueron realizados utilizando el programa XLSTAT Versión 2011 (Addinsoft, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos Preliminares

En la Figura 1 se puede observar una fotografía de los productos desarrollados listos para consumir. Todas las formulaciones poseen un color amarronado y una textura visual arenosa. El color observado en los productos desarrollados es consistente con los resultados obtenidos por Alongui y otros (2019), que obtuvieron un mayor grado de pardeamiento en galletas con harina de manzana al compararlas con la formulación de referencia. Esta diferencia fue atribuida no solo a la diferencia de color provista por la materia prima sino también a la presencia de concentraciones más altas de fructosa y glucosa que intervienen en las reacciones de Maillard, generando una mayor concentración de melanoidinas y otros productos de la reacción, que a su vez intervienen en el sabor del producto.

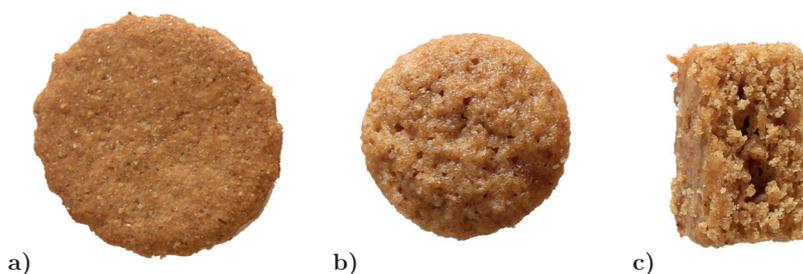


Figura 1. Fotografía de los productos listos para consumo: a) Galleta; b) Muffin; c) Torta.

Del análisis de la evaluación de la aceptabilidad para los tres productos ensayados, se observa que la galleta y el muffin no alcanzaron un valor aceptable en la escala seleccionada (5.29 y 5.11, respectivamente) de acuerdo con Muñoz y otros (1992), quienes consideran un puntaje de 6.0 en una escala hedónica de 9 puntos como un límite comercial o de calidad. En el caso de la torta, su aceptabilidad fue de 6.63.

La aceptabilidad observada en los productos desarrollados en este estudio fue más baja que la que obtuvieron productos similares en investigaciones realizadas por otros autores. Mir y otros (2017) obtuvieron valores comprendidos entre 7.25 y 7.57 en galletas a base de arroz enriquecidas con distintas concentraciones de harina de manzana, y Singh y otros (2012) reportaron valores entre 6.22 y 6.35 para tortas formuladas con distintas concentraciones de salvado de maíz. Sin embargo, estos autores observaron que el grado de aceptabilidad decrecía conforme aumentaba la concentración de fibra, lo cual permite explicar la baja aceptabilidad obtenida en los productos formulados, teniendo en cuenta que poseen un mayor porcentaje de sustitución de harina de trigo por harina rica en fibra que en los estudios mencionados anteriormente.

De acuerdo al análisis de frecuencias calculadas para la pregunta JAR, la mayoría de los consumidores percibió el dulzor de la torta como justo (65.0%), mientras que la galleta y el muffin fueron clasificados como no suficientemente dulces (36.8% y 31.4% respectivamente). Se esperaba que la galleta fuera percibida como menos dulce, teniendo en cuenta que es la formulación con mayor porcentaje de harina de manzana y menor contenido de azúcar. Sin embargo, aunque el muffin fue formulado con el contenido más alto de azúcar, también fue clasificado como no suficientemente dulce. La frecuencia de uso de los términos que los consumidores hallaron adecuados para describir a cada formulación se muestra en la Tabla 2. Entre los más relevantes, la galleta fue percibida como seca, la torta fue percibida como húmeda, tierna, sabrosa, esponjosa y de sabor intenso, y el muffin fue percibido como tierno, húmedo, con retrogusto y blando. Muchos consumidores percibieron que la torta tenía un sabor intenso debido a la canela. De hecho, una gran parte de ellos escribió en la evaluación “demasiada canela”.

Tabla 2. Frecuencia de uso (%) de los términos sensoriales incluidos en la pregunta CATA para las premezclas desarrolladas.

| Atributo | Frecuencia relativa (%) | | |
|------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Galleta | Torta | Muffin |
| Tierno | 5 ^{a,b} | 61^f | 56^d |
| Húmedo | 4 ^{a,b} | 48^{e,f} | 33^{c,d} |
| Seco | 68^f | 16 ^{a,b,c,d} | 21 ^{a,b,c} |
| Sabroso | 35 ^{d,e} | 60^f | - |
| Desagradable | 1 ^a | 1 ^a | 10 ^{a,b} |
| Sabor a fruta | 19 ^{a,b,c,d,e} | 14 ^{a,b,c} | 26 ^{a,b,c} |
| Amargo | 19 ^{a,b,c,d,e} | 8 ^{a,b} | 20 ^{a,b,c} |
| Sabor intenso | 25 ^{b,c,d,e} | 40^{d,e,f} | 23 ^{a,b,c} |
| Retrogusto | 29 ^{c,d,e} | 29 ^{b,c,d,e} | 39^{c,d} |
| Desmenuzable | 14 ^{a,b,c,d} | 18 ^{a,b,c,d} | 24 ^{a,b,c} |
| Ácido | 1 ^a | - | - |
| Grasoso | 3 ^{a,b} | - | 11 ^{a,b} |
| Poco sabor | 19 ^{a,b,c,d,e} | 5 ^{a,b} | 16 ^{a,b,c} |
| Saludable | 39^e | 33^{c,d,e} | 30 ^{b,c} |
| Blando | 9 ^{a,b,c} | - | 34^{c,d} |
| Crocante | 8 ^{a,b,c} | - | - |
| Arenoso | 25 ^{b,c,d,e} | 6 ^{a,b} | - |
| Esponjoso | - | 63^f | - |
| Apelmazado | - | 3 ^a | 4 ^a |
| Sabor artificial | - | - | 17 ^{a,b,c} |

Las letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$ prueba Q de Cochran). En negrita figuran aquellos porcentajes más relevantes para cada producto.

Por otro lado, es interesante mencionar que cerca del 30% de los consumidores percibieron todas las formulaciones como saludables. De acuerdo con Dhingra y otros (2012), la incorporación de fibra en los productos puede cambiar su consistencia, textura, comportamiento reológico y características sensoriales. Según Yue y Waring, (1998), los consumidores a menudo perciben que la fibra tiene un sabor fuerte y una textura áspera, y que provoca una sensación de sequedad en boca. El color oscuro, una desagradable sensación en boca y el enmascaramiento del sabor son los atributos negativos asociados a los productos con alto contenido de fibra, que a su vez son relacionados con productos menos gustosos, pero más saludables, razón por la cual los consumidores eligieron el término “saludable” para describir las muestras.

Premezcla final y comparación con productos del mercado

La Figura 2 muestra una fotografía de los productos evaluados. A simple vista, se puede observar una diferencia significativa entre el color de la torta elaborada con la premezcla experimental y las tortas elaboradas con las premezclas comerciales. La torta experimental resultó mucho más oscura; como se mencionó anteriormente, se debe principalmente al color marrón de la harina de manzana, pero también puede deberse

a un mayor grado de ocurrencia de las reacciones de Maillard por el aumento de las concentraciones de glucosa y fructosa (Alongui, et al., 2019). A su vez, la premezcla experimental se ve menos esponjosa que las demás, con una textura visualmente más rugosa, lo cual también puede deberse a la incorporación de fibra. Según Quiles y otros (2018), los principales problemas generados por la incorporación de fibra de bagazo de frutas en productos horneados provienen de los efectos perjudiciales que genera la fibra en la creación de una estructura aireada. En general, la sustitución de la harina de trigo por fibra disminuye el desarrollo del producto, y debido a la mayor densidad, la textura de los productos finales se vuelve más firme, gomosa y menos cohesiva. De hecho, la textura es el atributo sensorial más influenciado por la presencia de fibra en tortas y muffins, siendo el principal motivo de rechazo de estos productos frente a los convencionales.

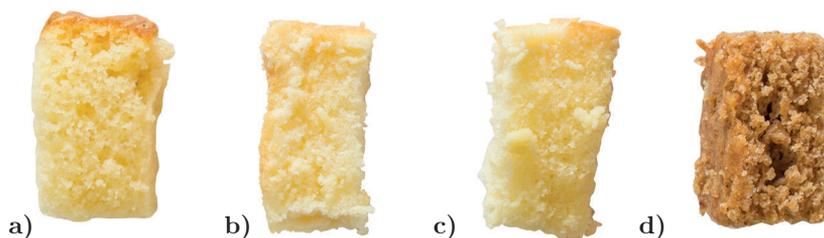


Figura 2: Fotografía de los productos involucrados en la comparación: a) Torta 1; b) Torta 2; c) Torta 3; d) Torta experimental.

De acuerdo con el análisis de la aceptabilidad, no se encontraron diferencias significativas entre la torta experimental (5.34) y la torta 2 (5.82), pero si con las tortas 1 (6.70) y 3 (6.68) ($p = 0.05\%$). En esta instancia, la aceptabilidad de la torta elaborada con la premezcla experimental fue menor que en la evaluación realizada en los ensayos preliminares, y no alcanzó el límite comercial establecido por Muñoz y otros (1992). Esto puede deberse al hecho de que, en este caso, la torta experimental fue evaluada junto con tortas con un contenido más alto de grasa y azúcar, lo cual está relacionado con una mayor aceptabilidad general (Baixauli, et al., 2008). Otra posibilidad es que la canela agregada en la primera formulación estuviese enmascarando algún sabor no deseado de la harina de manzana. Aun así, la aceptabilidad de la torta experimental no mostró diferencias significativas con una de las tortas elaboradas con premezclas líderes del mercado, lo que permite decir que existe una oportunidad en el mercado para este producto, aun no habiendo alcanzado el límite comercial mencionado anteriormente. Por otro lado, estos puntajes fueron obtenidos realizando evaluaciones en ciego, con lo cual los consumidores pierden de vista el valor agregado que brinda la información nutricional del producto, lo que podría afectar la aceptabilidad y/o el interés de compra.

Respecto a las frecuencias calculadas para cada sección en la pregunta JAR, el dulzor de todas las tortas fue mayoritariamente clasificado como “lo justo” (torta experimental, 52.4%; torta 1, 56.3%; torta 2, 44.2%; torta 3, 61.2%). Sin embargo, las tortas comerciales tuvieron mayores porcentajes en la sección de “muy dulce”

(torta 1, 30.1%; torta 2, 26.9%; torta 3, 33.0%), mientras que la torta experimental tuvo mayor frecuencia en la sección de “poco dulce” (41.7%). Estos resultados son consistentes con el contenido de azúcar de cada formulación, teniendo en cuenta que la premezcla de la torta experimental fue formulada para tener un menor contenido de azúcares que los productos convencionales, resultando en un menor grado de dulzor.

Por otro lado, como la torta experimental fue comparada con formulaciones con un mayor contenido de azúcar, era de esperarse que fuera percibida como menos dulce que cuando fue evaluada de manera individual.

Los porcentajes de términos que los consumidores hallaron adecuados para describir a cada muestra se pueden observar en la Tabla 3. De los 21 términos incluidos en la pregunta, 17 mostraron diferencias significativas entre las muestras, particularmente entre la torta experimental y las comerciales, para los atributos sabor extraño, húmeda, seca, arenosa, tierna, saludable, dulce, esponjosa, fácil de masticar y fibrosa. De acuerdo con los porcentajes de términos que los consumidores hallaron adecuados para describir a cada muestra, se observa que, en general, los consumidores percibieron diferencias en las características sensoriales y no sensoriales de las tortas evaluadas.

Tabla 3. Frecuencia de uso (%) de los términos sensoriales incluidos en la pregunta CATA para la comparación de productos.

| Atributo | Frecuencia % | | | |
|---------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Torta Experimental | Torta 1 | Torta 2 | Torta 3 |
| Casera | 42 ^a | 50 ^a | 42 ^a | 43 ^a |
| Sabor extraño | 33 ^b | 4 ^a | 4 ^a | 10 ^a |
| Apelmazada | 12 ^{ab} | 6 ^a | 19 ^b | 14 ^{ab} |
| Sabrosa | 17 ^a | 50 ^b | 29 ^a | 50 ^b |
| Retrogusto | 22 ^b | 12 ^{ab} | 9 ^a | 14 ^{ab} |
| Alta en calorías | 3 ^a | 5 ^a | 6 ^a | 7 ^a |
| Húmeda | 13 ^a | 60 ^c | 41 ^b | 69 ^c |
| Seca | 44 ^b | 5 ^a | 12 ^a | 3 ^a |
| Desagradable | 4 ^a | 0 ^a | 1 ^a | 0 ^a |
| Sabor intenso | 3 ^a | 8 ^a | 4 ^a | 29 ^b |
| Arenosa | 39 ^b | 5 ^a | 3 ^a | 1 ^a |
| Tierna | 19 ^a | 60 ^b | 53 ^b | 52 ^b |
| Poco sabor | 19 ^{bc} | 9 ^{ab} | 25 ^c | 4 ^a |
| Sabor a fruta | 11 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 64 ^b |
| Saludable | 32 ^b | 8 ^a | 11 ^a | 13 ^a |
| Dulce | 13 ^a | 43 ^b | 31 ^b | 44 ^b |
| Esponjosa | 21 ^a | 83 ^c | 68 ^{bc} | 62 ^b |
| Fácil de masticar | 34 ^a | 63 ^b | 59 ^b | 55 ^b |
| Amarga | 6 ^b | 0 ^a | 2 ^{ab} | 0 ^a |
| Difícil de masticar | 2 ^a | 2 ^a | 4 ^a | 4 ^a |
| Fibrosa | 30 ^b | 1 ^a | 0 ^a | 0 ^a |

Valores con letras iguales para una misma fila no presentan diferencias significativas (prueba Q de Cochran).

El Análisis de Componentes Principales (PCA) permitió identificar dos grupos distintos de muestras (Figura 3), en los cuales los primeros dos componentes del PCA explicaron un 85.5% de la variabilidad de los datos. El primer grupo, compuesto por las tortas elaboradas con premezclas comerciales, está fuertemente representado por los atributos esponjosa, húmeda, tierna y dulce, mientras que el segundo grupo, compuesto únicamente por la premezcla experimental, parece estar fuertemente representado por atributos como sabor extraño, arenosa, fibrosa, seca y saludable.

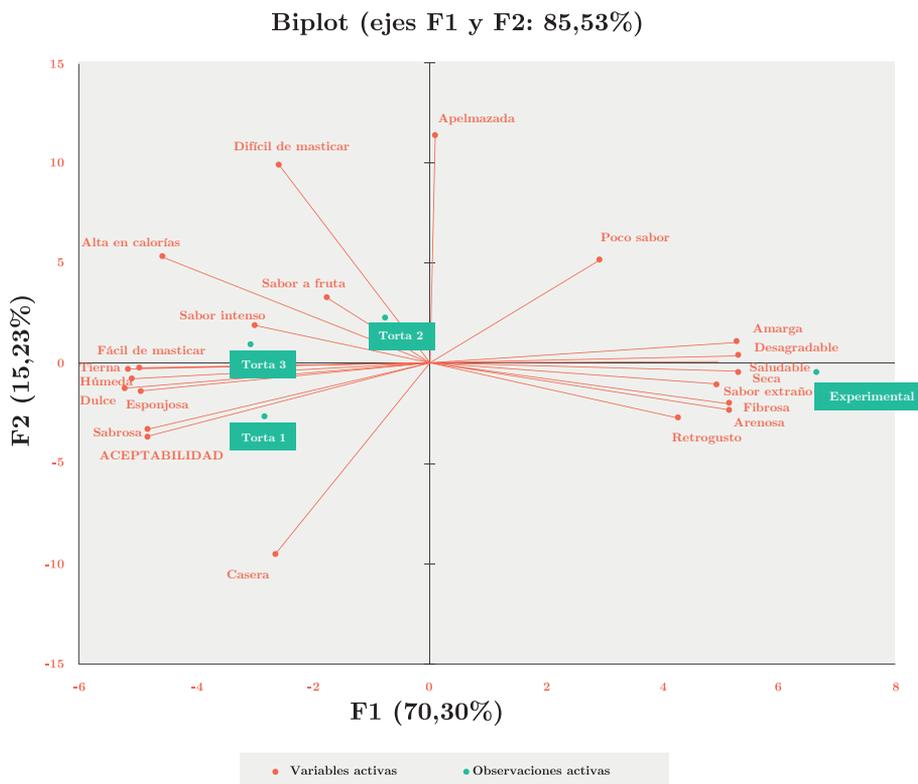


Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCA) de la matriz formada por muestras como filas y términos de la pregunta CATA como columnas.

En general se observa que los términos utilizados para describir la torta experimental fueron los que se emplean usualmente para describir los productos con alto contenido de fibra, resultando en características que hicieron que los consumidores rechazaran el producto al compararlo con las tortas comerciales. Esto es consistente con los resultados obtenidos por Baixauli y otros (2008), que estudiaron la aceptabilidad general y la percepción “saludable” de tres tipos de muffins (normal, integral y enriquecido), notando que el muffin integral era el que tenía menor aceptabilidad debido a las características consideradas negativas, impartidas por la fibra. Por otro lado, estas características también hicieron que los consumidores percibieron el producto como más saludable.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza en los datos de aceptabilidad ya mencionados, las tortas 1 y 3 tuvieron los mayores puntajes de aceptabilidad

general, por lo que los términos esponjosa, húmeda, tierna y dulce podrían ser considerados como atributos que tienen un impacto positivo en la aceptabilidad, mientras que arenosa, sabor extraño y seca tendrían un impacto negativo.

Respecto al análisis de términos vinculados a atributos que tienen un impacto positivo en la aceptabilidad, y aquellos que por el contrario tienen un impacto negativo, los resultados observados en este trabajo concuerdan con lo encontrado por otros autores. Según un estudio realizado por Tarrega y otros (2016) en bizcochuelos, observaron que sabor extraño es el atributo con peor impacto en la aceptabilidad, seguido de poco sabor y seca, mientras que esponjosa, fácil de masticar, dulce y tierna son atributos que tienen un impacto positivo. Por otro lado, Baixauli y otros (2008) reportaron que la aceptabilidad general está correlacionada negativamente con la conciencia de la salud cuando no se provee información a los consumidores. La relación negativa entre este término no sensorial y la aceptabilidad puede indicar que la falta de placer al ingerir la muestra, acompañado de su textura y color, lleva al consumidor a pensar que la muestra es saludable, lo que proviene del conflicto usualmente percibido entre una alimentación saludable y una alimentación disfrutable. Este comportamiento también se observó en la evaluación realizada en este estudio, donde la torta experimental tuvo una aceptabilidad menor que las comerciales y fue percibida como saludable por gran parte de los consumidores.

Además, todas las tortas fueron clasificadas como caseras, lo cual es razonable considerando que se trata de productos que son parcialmente preparados en el hogar de los consumidores.

Un hecho fundamental a tener en cuenta es que las evaluaciones fueron realizadas en “ciego”, es decir, el consumidor no contaba con la información (por ejemplo, nutricional) del producto, aspecto que se debería profundizar en otros estudios. Estudios posteriores con información nutricional deberían llevarse a cabo para evaluar el impacto de esta información en la aceptabilidad del producto y ver si existe un mercado potencial dispuesto a comprometer el sabor de los alimentos a cambio de posibles beneficios para la salud a largo plazo. De hecho, Baixauli y otros (2008) reportaron que incluso si el grado de aceptabilidad permanece inalterado al realizar evaluaciones con y sin información, el interés de compra y la tendencia a recomendar el producto puede aumentar si se espera un beneficio para la salud.

CONCLUSIONES

El desarrollo de premezclas utilizando un subproducto, como el bagazo de manzana, constituye una nueva categoría de alimento funcional que satisface tanto necesidades de los consumidores como de la industria. Se trata de un producto práctico, casi listo para consumir, de alto valor agregado y cuyo proceso de recategorización de residuo a nuevo ingrediente es amigable con el medio ambiente.

Sin embargo, aunque el uso de bagazo de manzana permite desarrollar alimentos que podrían etiquetarse como “fuente en fibra”, esta tiene un efecto negativo en las características sensoriales de los productos desarrollados. Los productos horneados enriquecidos en fibra se caracterizan por tener una textura áspera, sabor intenso y generar una sensación de sequedad en boca, que son motivo de rechazo por gran parte de los consumidores, quienes prefirieron las formulaciones comerciales.

En este sentido, deberían llevarse a cabo investigaciones más profundas para evaluar el impacto que tendría la información nutricional en la aceptabilidad del producto, pudiendo así determinar su viabilidad económica.

Finalmente, se puede decir que la reutilización de subproductos de la agroindustria podría no solo contribuir a reducir los descartes y limitar el impacto ambiental de la producción de alimentos, sino que también puede formar parte de una estrategia para combatir la incidencia de enfermedades asociadas a una alimentación inadecuada.

AGRADECIMIENTOS

A Natural Tree por proveernos de la materia prima para realizar todos los desarrollos realizados en el marco de este proyecto.

REFERENCIAS

- Addinsoft, 2011. *XLSTAT 2011*. Versión 2011.1. Nueva York: Addinsoft.
- Alongui, M., Melchior, S. y Anese, M., 2019. Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingredient. En: *LWT*, 100, pp.300-305. DOI: www.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.068.
- Baixaui, R., Salvador, A., Hough, G. y Fiszman, S.M., 2008. How information about fiber (traditional and resistant starch) influences consumer acceptance of muffins. En: *Food Quality and Preference*, 19, pp.628-635. DOI: www.doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.05.002.
- Dhillon, G.S., Kaur, S. y Kaur Brar, S., 2013. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. En: *Renew and Sustainable Energy Reviews*, 27, pp.789-805. DOI: www.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.046.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H. y Patil, R.T., 2012. Dietary fiber in foods: a review. En: *Food Science and Technology*, 49(3), pp.255-266. DOI: www.doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5.
- Kruczek, M., Gumul, D., Kacaniova, M., Ivanishova, E., Marecek, J. y Gambus, H., 2017. Industrial apple pomace by-products as a potential source of pro-health compounds in functional food. En: *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 7(1), pp.22-26.
- MERCOSUR, 2012. *Reglamento Técnico MERCOSUR MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12. Sobre información nutricional complementaria (Declaraciones de propiedades nutricionales)* [En línea]. Buenos Aires: MERCOSUR. [Consulta: 13 de agosto de 2017]. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/pry33a1_t.pdf

- Mir, S.A., Don Bosco, S.J., Shah, M.A., Santhalakshmy, S. y Mir, M.M., 2017. Effect of apple pomace on quality characteristics of brown rice based cracker. En: *Journal of the Saudi Society of Agriculture Science*, 16(1), pp.25-32. DOI: www.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.01.001.
- Muñoz, A.M., Civille, G.V. y Carr, B.T., 1992. Introduction. En: Muñoz, Alejandra M., ed. *Sensory evaluation in quality control*. Nueva York: Springer. pp.1-22. ISBN 978-1-4899-2653-1.
- Ovando-Matrinez, M., Sayago-Ayerdi, S., Agama-Acevedo, E., Goñi, I. y Bello-Pérez, L.A., 2009. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. En: *Food Chemistry*; 113(1), pp.121-126. DOI: www.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.035.
- Organización Mundial de la Salud, OMS, 2018. *Diabetes* [En línea]. Copenhague: OMS. [Consultado: 12 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Pérez, C., Tagliani, C., Arcia, P., Cozzano, S. y Curutchet, A., 2017. Blueberry by-product used as an ingredient in the development of functional cookies. En: *Food Science and Technology*; 24(4), pp.301-308. DOI: www.doi.org/10.1177/1082013217748729
- Quiles, A., Campbell, G.M., Struck, S., Rohm, H. y Hernando, I., 2018. Fiber from fruit pomace: a review of applications in cereal-based products. En: *Journal Food Reviews International*, 34(2), pp.162-181. DOI: www.doi.org/10.1080/87559129.2016.1261299.
- Rabetafika, H.N., Bchir, B., Blecker, C. y Richel, A., 2014. Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: current situation and perspectives. En: *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), pp.99-114. DOI: www.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.004
- Rawat, K., Nirmala, C. y Bisht, M.S., 2015. Processing techniques for reduction of cyanogenic glycosides from bamboo shoots [En línea]. En: World Bamboo Organization. *10th World Bamboo Congress*. Damyang, Korea (17-22 de setiembre de 2015). Damyang: WBO. [Consulta: 29 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://worldbamboo.net/wbcx/Sessions/Theme%20Food%20Pharmaceuticals/Kanchan,%20Rawat,%20C.%20Nirmala%20M.S.%20Bisht.pdf>
- Selani, M., Canniatti, S.G., Dos Santos, C.T., Ratnayake, W.S., Flores, R.A. y Bianchini, A., 2014. Characterization and potential application of pineapple pomace in an extruded product for fiber enhancement. En: *Food Chemistry*, 163, pp.23-30. DOI: www.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.076.

- Singh, M., Liu, S.X. y Vaughn, S.F., 2012. Effect of corn bran as dietary fiber addition on baking and sensory quality. En: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*; 1(4), pp.48-352. DOI: www.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.02.005.
- Tarrega, A., Quiles. A., Morell. P., Fiszman. S. y Hernando, I., 2016. Importance of consumer perceptions in fiber/enriched food products. A case study with sponge cakes. En: *Food & Function*; 8(2), pp.574-583.
DOI: www.doi.org/10.1039/C6FO01022A.
- USDA, 2018. *Fresh deciduous fruit: world markets and trades (apples, grapes & pears)*. Washington: Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis.
- USDA, 2007. *The food supply and dietary fiber: its availability and effect on health*. Washington: Center for Nutrition Policy and Promotion.
- Yue, P. y Waring, S., 1998. Functionality of resistant starch in food applications. En: *Food Australia*, 50(12), pp.615-621.

Determinación del contenido de antioxidantes naturales en frutos secos

Natural antioxidant content in different nuts

Determinação do conteúdo de antioxidantes naturais em frutos secos

RECIBIDO: 10/8/2020 → APROBADO: 16/11/2020 ✉ ivieitez@fq.edu.uy

✉ IRIGARAY, BRUNO (1); CALLEJAS, NICOLÁS (1); ESTRADÉ, DOLORES (1); REBELLATO, CECILIA (1); VIEITEZ, IGNACIO (1).
(1) DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Los frutos secos contienen un alto contenido de ácido oleico y/o ácidos poliinsaturados, por lo que su ingesta reduce los niveles de colesterol total y colesterol LDL en sangre, lo que se asocia a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares. A su vez, los frutos secos podrían tener efectos beneficiosos en la salud humana debido a la presencia de antioxidantes (polifenoles y tocoferoles). En el presente trabajo se determinó el contenido de lípidos, el perfil en ácidos grasos y el contenido de polifenoles y tocoferoles de algunos frutos secos: nueces, nueces pecan, avellanas, almendras, maní, pistachos y castañas de cajú. Se optimizó la extracción de los polifenoles en avellanas mediante la utilización de diferentes mezclas de solventes y distintas condiciones de temperatura y tiempos de extracción. Con la mezcla agua/acetona (80:20) a 25 °C, durante 24 horas, se obtuvo el mayor contenido de polifenoles. El contenido de polifenoles de los extractos obtenidos de los frutos secos presentó valores en el rango entre 427 ppm (almendras) y 8805 ppm (nueces), mientras que el contenido de tocoferoles, entre 160 ppm (castañas de cajú) y 358 ppm (nueces). Se concluye que los frutos secos analizados poseen contenidos importantes de antioxidantes, pero en cantidades diferentes. Además, la cáscara ofrece una barrera para enlentecer los procesos de oxidación del aceite presente en el fruto.

PALABRAS CLAVE: ácidos grasos, polifenoles, tocoferoles, oxidación.

ABSTRACT

Nuts contain a high content of oleic acid and/or polyunsaturated acids, so their intake reduces the level of total cholesterol and LDL cholesterol in the blood, which is associated with a lower incidence of cardiovascular diseases. Besides, nuts

could have beneficial effects on human health due to the presence of antioxidants (polyphenols and tocopherols). In this study, lipid content, fatty acid profile and polyphenols and tocopherols content of some nuts were determined: walnuts, pecans, hazelnuts, almonds, peanuts, pistachios and cashews. The extraction of polyphenols in hazelnuts was optimized by using different mixtures of solvents as well as several conditions of temperature and extraction times. The mixture water/acetone (80:20) at 25 °C during 24 hours showed the highest content of polyphenols. The polyphenol content of the extracts obtained from the nuts showed values in the range between 427 ppm (almonds) and 8805 ppm (walnuts), while the content of tocopherols, ranges between 160 ppm (cashews) and 358 ppm (walnuts). Thus, the analyzed nuts have important antioxidant contents but in different amounts. Furthermore, the nutshell offers a barrier to slow down the oxidation processes of the oil present in the product.

KEYWORDS: fatty acids, polyphenols, tocopherols, oxidation.

RESUMO

Os frutos secos possuem alto teor de ácido oleico e/ou ácidos poliinsaturados, razão pela qual sua ingestão reduz os níveis de colesterol total e LDL no sangue, que está associado à menor incidência de doenças cardiovasculares. Além disso, os frutos secos poderiam apresentar efeitos benéficos à saúde humana devido à presença de antioxidantes (polifenóis e tocoferóis). No presente trabalho, foram determinados o teor de lipídios, o perfil de ácidos graxos e o teor de polifenóis e tocoferóis de alguns frutos secos: nozes, noz-pecã, avelã, amêndoa, amendoim, pistache e castanha de caju. A extração dos polifenóis nas avelãs foi otimizada pelo uso de diferentes misturas de solventes em diferentes condições de temperatura e tempos de extração. Com a mistura água/acetona (80:20) a 25 °C por 24 horas, obteve-se o maior teor de polifenóis. O teor de polifenóis dos extratos obtidos dos frutos secos apresentou valores na faixa de 427 ppm (amêndoas) a 8805 ppm (nozes), enquanto o teor de tocoferol, entre 160 ppm (castanha de caju) e 358 ppm (nozes). Consequentemente, os frutos secos analisados têm um conteúdo antioxidante significativo, mas em quantidades diferentes. Além disso, a casca oferece uma barreira para retardar os processos de oxidação do óleo presente.

PALAVRAS-CHAVE: ácidos graxos, polifenóis, tocoferóis, oxidação.

INTRODUCCIÓN

Los frutos secos son alimentos grasos tradicionalmente asociados a la dieta mediterránea. Su consumo habitual, en dosis moderadas, reduce los niveles de colesterol total y de colesterol LDL en sangre y se los asocia, junto con otros alimentos, a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Garrido, et al., 2007, Chang, et al., 2016, Bitok y Sabaté, 2018). En julio del 2003, la FDA autorizó a los productores de estos alimentos a exhibir sus propiedades benéficas declarando que el consumo de 42 gramos diarios de muchos de estos frutos como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Miraliakbari y Shahidi, 2008a). En general, los aceites derivados de frutos secos son

ricos en ácidos grasos monoinsaturados (entre los cuales predomina el ácido oleico), en menor cantidad en ácidos grasos poliinsaturados (predominantemente ácido linoleico), y en una cantidad muy baja en ácidos grasos saturados (Miraliakbari y Shahidi, 2008a, 2008b).

Además de su contenido y perfil lipídico, los efectos beneficiosos de los frutos secos en la salud humana se atribuyen a la presencia, entre otros, de compuestos con actividad antioxidante (Göncüoğlu y Gökmen, 2017). Estos compuestos antioxidantes se encuentran tanto en la semilla como en las diferentes cubiertas que recubren al fruto, evitando o retrasando la oxidación de los ácidos grasos (Garrido, et al., 2007). Dentro de los antioxidantes naturales presentes se encuentran los polifenoles y los tocoferoles. Estudios previos señalan que los polifenoles poseen efectos antioxidantes, que previenen determinadas patologías como enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer, entre otros (Contini, et al., 2008). En tanto, los tocoferoles presentan tanto actividad antioxidante *in vitro*, protegiendo de la oxidación al aceite y a los alimentos que los contienen, como actividad *in vivo*, protegiendo a células y tejidos humanos frente a los radicales libres. El α -tocoferol presenta máxima actividad *in vivo*, mientras los demás tocoferoles (β , γ y δ -tocoferol) otorgan gran protección a los aceites y, en consecuencia, a los alimentos que los contienen (del Moral Navarrete, 2016). Un review reciente (Machado De Souza, et al., 2017) es importante para entender los efectos de los frutos secos sobre la salud humana.

El agregado de antioxidantes a los alimentos es uno de los métodos más efectivos para retrasar la oxidación lipídica. Ello mejora la estabilidad oxidativa de los lípidos y, por ende, aumenta la vida útil de los alimentos de manera de prevenir la pérdida de calidad sensorial y nutricional. Los antioxidantes sintéticos como BHA (Butilhidroxi-anisol), BHT (Butilhidroxi-tolueno), TBHQ (Terbutilhidroquinona) y PG (Galato de propilo) son utilizados habitualmente en muchos alimentos para prevenir la rancidez de las grasas y/o aceites. Estos antioxidantes presentan una serie de desventajas, por ejemplo: poseen diferente volatilidad y se descomponen fácilmente a altas temperaturas, lo que restringe su uso (Maestro y Borja, 1993). Además, existe una preocupación cada vez mayor respecto a los peligros potenciales que pueden causar los antioxidantes sintéticos debido a su posible toxicidad y a la presunción de una posible acción como promotores de la carcinogénesis (Namiki, 1990, Pokorny, 1991). En nuestro país se permite el uso de ciertas cantidades de BHA, BHT y TBHQ como aditivos en algunos alimentos, ejerciendo la función de antioxidantes. Los límites en grasas y aceites son de 100 mg/Kg para el BHA, y 200 mg/Kg para BHT y TBHQ. Por lo tanto, existe interés en aumentar el uso de antioxidantes naturales ya que se presume que podrían ser más seguros para la salud humana (Nepote, et al., 2002).

Los polifenoles y tocoferoles son antioxidantes naturales, y se clasifican como primarios ya que intervienen directamente en la interrupción de la cadena de oxidación mediante la donación de hidrogeniones: no detienen la formación de los radicales libres que se generan en la oxidación sino que, al reaccionar con ellos, los estabilizan y se producen radicales del antioxidante que son menos activos, o sea que el antioxidante se consume durante la reacción de oxidación (Badui, 2006; Armenteros, et al., 2012).

Existen diversos factores que afectan la eficiencia de extracción de distintos compuestos, entre los que se encuentran: la naturaleza del material del cual se extrae, los solventes empleados en el procedimiento y las condiciones en las que se realiza la extracción (tiempo, temperatura, etcétera) (Kumar y Keum, 2016). Muchos investigadores han estudiado diversos sistemas de solventes con el objetivo de analizar dicha influencia, pero un análisis bibliográfico detallado permite comprobar que los solventes más utilizados y convenientes para la extracción de compuestos fenólicos son soluciones metanólicas, etanólicas y acetónicas al 70-80% (Contini, et al., 2008). Además, los mismos presentan distintas polaridades, factor que se espera influya de manera importante en la extracción de estos compuestos (Delgado, et al., 2010).

Delgado y otros (2010) utilizaron los siguientes solventes y condiciones para la extracción de polifenoles en avellanas: agua en ebullición (45 minutos), metanol a temperatura ambiente (24 hs.), metanol a temperatura ambiente (48 hs.), agua/acetona (80:20) (24 hs.), agua/acetona (80:20) (48 hs.), agua/acetona (80:20) (72 hs.), encontrando que las condiciones dadas por el agua en ebullición durante 45 minutos fueron las que determinaron los mayores contenidos de polifenoles totales (44.3 ± 7.7 mg GAE/g extracto). Las extracciones con metanol siempre mostraron las menores concentraciones, observando además que un aumento en el tiempo de extracción condujo a una reducción del contenido de polifenoles (9.82-12.1 mg GAE/g extracto). Respecto a los extractos obtenidos con la solución de acetona, se observó que el tiempo de contacto de 24 horas es aparentemente suficiente para la extracción de polifenoles, dado que no se presentaron variaciones significativas en las tres extracciones realizadas en diferentes tiempos de extracción.

Garrido y otros (2007) realizaron un estudio similar sobre distintos subproductos del procesado de la almendra (piel, cáscara y mesocarpio), utilizando 8 mezclas de extracción diferentes durante 3 minutos en baño de ultrasonido: metanol/HCl (1000:1), metanol/agua (50:50), [metanol/HCl (1000:1)/agua] (50:50), acetona/agua (50:50), [acetona/HCl (1000:1)/agua] (50:50), acetona/agua (80:20), [acetona/HCl (1000:1)/agua] (80:20), agua en ebullición. Los resultados muestran diferencias respecto a cuál solvente permite obtener la mayor concentración de polifenoles en las distintas partes del fruto: en la piel, la mezcla acetona (acidulada y no acidulada)/agua (50:50) y acetona acidulada/agua (80:20); en la cáscara, la mezcla acetona (acidulada y no acidulada)/agua (80:20); y en el mesocarpio, la mezcla acetona (acidulada y no acidulada)/agua (50:50). Gao y otros (2019) utilizaron como solventes de extracción en nueces: hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, mezcla cloroformo/metanol, (2:1) y acetona. Los autores determinaron que el acetato de etilo fue el mejor solvente para extraer lípidos de nuez (68.3%), mientras que la extracción con hexano dio comparativamente menor contenido de ácido linoleico (62.9%), la mezcla cloroformo/metanol fue adecuada para extraer tocoferoles (578,0 mg/kg) y finalmente en la extracción con acetona se obtuvo el mayor contenido de polifenoles (98,1 mg GAE/kg).

En el estudio desarrollado por Miraliakbari y Shahidi (2008a) se utiliza el método HPLC para determinar el contenido de tocoferoles totales en almendras, avellanas, nueces pecan, pistachos y nueces, entre otros, utilizando hexano como

solvente de extracción. Sus resultados muestran que el aceite de avellana presenta el mayor contenido de tocoferoles totales (461.8 ± 1.9 mg/kg de aceite), seguido por el aceite de nuez pecan (453.9 ± 1.8 mg/kg de aceite), el aceite de nuez (402.3 ± 1.9 mg/kg de aceite), el aceite de pistacho (334.3 ± 1.7 mg/kg de aceite) y por último el aceite de almendra (243.8 ± 1.1 mg/kg de aceite). Stuetz y otros (2017) determinaron que el contenido de α tocoferoles es elevado en las almendras y las avellanas, mientras que los pistachos y las nueces son ricos en γ tocoferoles.

Por todo lo expuesto anteriormente, resulta de interés la extracción y cuantificación de polifenoles y tocoferoles presentes en diferentes frutos secos comercializados en Uruguay mediante HPLC, y el estudio de la estabilidad de los aceites derivados de los mismos con el tiempo. Además, se consideró la extracción y cuantificación de polifenoles y tocoferoles en maníes, antes y después de diferentes procesos de cocción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos secos utilizados fueron los siguientes: almendras (con cáscara), avellanas, castañas de cajú, nueces (con cáscara), nueces pecan (con cáscara), maní (con cáscara) y pistachos adquiridos crudos en comercios locales. Es importante resaltar que, para asegurar un muestreo representativo en todos los ensayos que posteriormente se detallan, se molieron entre 20-30 unidades de cada fruto seco, y luego se extrajo de esta muestra la masa necesaria para cada análisis.

Extracción de aceite: se pesó 0.5 g de fruto seco finamente molido y se agregó 25 mL de una mezcla hexano/isopropanol (3:2, vol/vol) (Hara y Radin, 1978). Se realizó la extracción a temperatura ambiente con agitación magnética vigorosa, por 1,5 horas, en tubos con tapa a rosca. El extracto resultante se centrifugó a 3000 rpm, por 10 minutos (a temperatura ambiente), en una centrífuga marca Hermle, modelo Z 200A, y posteriormente se extrajo la fase líquida a un segundo tubo con tapa a rosca. El primer tubo se lavó dos veces con 5 mL de hexano/isopropanol, los extractos orgánicos restantes se juntaron en el segundo tubo para luego realizar la eliminación del solvente mediante venteo con nitrógeno. Los aceites obtenidos fueron almacenados en freezer hasta el momento de los análisis.

Para caracterizar los aceites de los diferentes frutos secos desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos, se utilizó cromatografía de gases, siendo nitrógeno el gas portador, por lo que primeramente se derivatizó la materia grasa extraída según la técnica IUPAC 2.301 (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987). Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Shimadzu, modelo 14B, equipado con una columna marca Supelco SP2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2 μ m) con el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial de 90 °C, durante 2 minutos, aumento hasta 175 °C con una velocidad de 20 °C/min y permanencia durante 35 minutos a esa temperatura; aumento de temperatura desde 175 °C hasta 240 °C con una velocidad de 15 °C/min, y permanencia a esa temperatura final durante 25 minutos.

Optimización del método de extracción de polifenoles en avellanas: se pesaron 6 g. de avellana finamente molida y se agregó el volumen de solvente correspondiente en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, según la condición a ensayar. Posteriormente, se agitó la mezcla durante el tiempo y temperatura establecidos por

medio de un agitador magnético. El extracto resultante fue filtrado a vacío, incluyendo tres etapas de lavado del residuo con 5 mL del solvente en ensayo, y luego fue eliminado mediante liofilización, utilizando un Liofilizador Chirst alpha 1-4/Loc-1m. Los extractos obtenidos fueron almacenados en freezer hasta el momento del análisis. Las condiciones de extracción ensayadas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes condiciones de extracción de polifenoles ensayadas en avellanas.

| Solvente | Temperatura (°C) | Tiempo (h) | Volumen (mL) |
|----------------------|------------------|------------|--------------|
| Agua | 100 | 1 | 250 |
| Agua | 50 | 24 | 250 |
| Agua | 25 | 24 | 50 |
| Acetona | 25 | 24 | 60 |
| Agua/Acetona (80/20) | 25 | 24 | 60 |
| Metanol | 25 | 24 | 60 |
| Agua/Metanol (80/20) | 25 | 24 | 60 |
| Etanol | 25 | 24 | 60 |
| Agua/Etanol (80/20) | 25 | 24 | 60 |

Determinación de polifenoles totales: para el análisis de polifenoles totales, la extracción se realizó con una mezcla agua/acetona, dado que resultó ser el método óptimo de extracción en avellanas. Se pesó 6 g del fruto seco finamente molido y se agregó 60 mL de agua/acetona (80:20) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente, se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente por medio de un agitador magnético. El extracto resultante se filtró a vacío en un embudo Büchner con papel de filtro. Se realizaron tres etapas de lavado del residuo con 5 mL de mezcla, y el solvente fue eliminado mediante liofilización, utilizando un Liofilizador Chirst alpha 1-4/Loc-1m. Los extractos obtenidos fueron almacenados en freezer hasta el momento del análisis.

Análisis de polifenoles totales en el extracto: la determinación del contenido total de polifenoles se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo Shimadzu, modelo 20-A, equipado con un detector de arreglo de diodos y con una columna Macherey-Nagel C18 (250 × 4,6 mm, 100 µm) a 40 °C. Se pesaron 10 mg del extracto obtenido en el liofilizador en un vial y se adicionó 1 mL de mezcla metanol/agua (80:20). La detección de los polifenoles fue realizada a una longitud de onda de 280 nm, según el método descrito por Jakopic y otros (2011). Para la cuantificación de los polifenoles se utilizó como estándar externo ácido siríngico (Sigma Aldrich).

Análisis de tocoferoles totales: la determinación del contenido total de tocoferoles se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo marca Shimadzu, modelo 20 A, equipado con un detector de fluorescencia modelo RF 20A XS y con una columna Macherey-Nagel C18 (250 × 4,6 mm, 100 µm) a 40 °C. Se pesaron 30 mg de aceite en un vial y se adicionó 1 mL de isopropanol (calidad HPLC). Se inyectó 50 µL de muestra y se registró el cromatograma a una longitud de onda de excitación de 290 nm y a una longitud de onda de emisión de 330 nm, utilizando como fase móvil acetonitrilo, metanol, isopropanol y agua bajo condiciones descritas en Andrikopoulos y otros (1991). La cuantificación de los tocoferoles se realizó mediante la utilización de una curva de calibración, que fue realizada con estándares de tocoferoles α , β , γ γ δ (Sigma Aldrich).

Estabilidad oxidativa del aceite obtenido de los diferentes frutos secos: se estudió la influencia que tienen en el deterioro oxidativo, el tiempo de almacenamiento y el contenido de tocoferoles en las distintas muestras (almendras, avellanas, castañas de cajú, maní, nueces, nueces pecan y pistachos). Las nueces, nueces pecan, maní y almendras fueron compradas con cáscara con el objetivo de evaluar la protección adicional que pudiese brindarle al fruto; para ello, se realizaron los análisis de estabilidad sobre la misma muestra de estos frutos con y sin cáscara. El primer día se retiró la cáscara para obtener la cantidad necesaria estimada para los análisis sin cáscara, y fueron almacenados de esta forma durante el tiempo de estudio. También fueron almacenados los frutos con cáscara desde el primer día. Tanto los frutos con y sin cáscara fueron guardados a temperatura ambiente en bandejas plásticas con tapa agujereada para permitir el intercambio de oxígeno y simular las condiciones reales de almacenamiento. El tiempo de estudio fue de 6 meses, tomándose muestras de las bandejas plásticas cada dos meses para los análisis correspondientes.

Determinación del Índice de Peróxidos: para la determinación del Índice de Peróxidos se utilizó como referencia la técnica AOCS Cd 8-53 (American Oil Chemists' Society, 1998).

Determinación del contenido de polifenoles y tocoferoles totales en maní expuesto a diferentes tratamientos térmicos: se estudió la influencia que tienen distintos tratamientos térmicos de tostado en el contenido de polifenoles y tocoferoles totales en las distintas partes que constituyen el maní. Los tratamientos seleccionados fueron horno a 200 °C, durante 20 minutos, y microondas a potencia máxima (potencia de salida de microonda 800 W, potencia nominal 1200 W, frecuencia de microonda 2450 MHz), durante 4 minutos. Estos tratamientos fueron comparados con los frutos sin ningún tipo de proceso de tostado. Con el objetivo de establecer qué parte del maní tiene mayor contenido de estos antioxidantes y evaluar en cuáles el tratamiento tiene mayor incidencia, se sometieron a los procedimientos antes citados la piel, el fruto y la cáscara separadamente. En el caso del estudio del maní sin tratamiento térmico, se analizaron la piel y el fruto en su conjunto, y la cáscara, por separado debido a la dificultad de extraer la piel del fruto que no ha sido sometido a un proceso de tostado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de grasa y la composición en ácidos grasos de los aceites.

Entre los frutos secos en estudio, la nuez pecan presentó el mayor contenido de lípidos (73,2 %). El contenido de lípidos en orden decreciente fue el siguiente: nueces pecan (73,2%) > nueces (65,9%) > avellanas (60,4%) > pistachos (54,5%) > maní (51,4%) > almendras (48,3%) > castañas (48,1%). Kornsteiner y otros (2006) estudiaron el contenido de lípidos (por el método de Soxhlet) de algunos frutos secos y sus resultados muestran que el porcentaje varía desde 60,2% en avellanas, 56,7% en almendras, 64,2 % en nueces, 71,8 % en nueces pecan, 52,8 % en pistachos, 47,1 % en castañas de cajú y 51,6 % en maní. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los mencionados anteriormente y también a los reportados por otros autores, con variaciones dependiendo del origen y el estado de los frutos secos (referido al momento de la vida útil del fruto en que se realiza la determinación del contenido de lípidos) (Miraliakbari y Shahidi, 2008b). Los ácidos grasos que se identificaron como mayoritarios son el ácido oleico (18:1), con valores que oscilan entre 14,2% para nueces y 84,7% para avellanas, y el ácido linoleico (18:2), con contenidos en el rango de 6,6% para avellanas y 63% para nueces. El ácido oleico fue el mayoritario en todas las muestras analizadas, a excepción del aceite de nuez que contiene ácido linoleico en forma predominante (63%). De las muestras analizadas, el aceite de avellana presentó el mayor contenido de ácido oleico (84,7%), seguido del aceite de almendras (72,0%). El aceite de nuez fue el de menor porcentaje de ácido oleico (14,2%), pero resultó el más rico en ácido linoleico (63%) y linolénico (13,2%). Entre los aceites en estudio, el de pistacho mostró los mayores porcentajes de ácido palmítico (12,2%), mientras que el aceite de castañas de cajú fue el más rico en ácido esteárico (7,1%). Teniendo en cuenta la totalidad de los ácidos grasos saturados, el aceite de maní presentó el mayor porcentaje (20%) (Figura 1). La composición en ácidos grasos determinada en este estudio es similar a la reportada por Miraliakbari y Shahidi (2008b), donde las extracciones fueron realizadas con Hexano o con una mezcla cloroformo/metanol y determinaron para los aceites de avellana y almendra un 83,4% y 69,9% de ácido oleico, respectivamente, y para el aceite de nuez pecan un 37,7% de ácido linoleico. También, en esta investigación, el aceite de nuez resultó el menos concentrado en ácido oleico (12,1%), en tanto las concentraciones del ácido linoleico y del linolénico fueron de 49,6% y 12,9%, respectivamente.

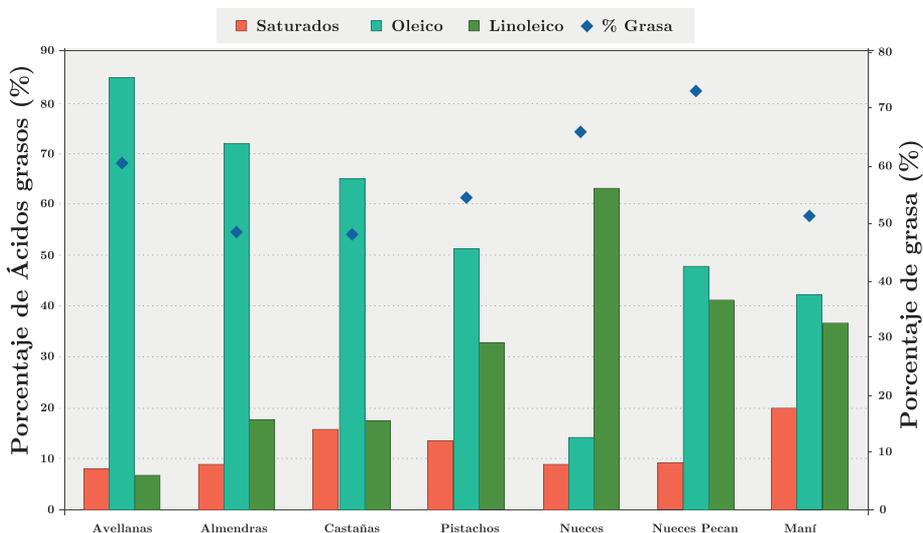


Figura 1. Composición en ácidos grasos (% m/m) de los aceites obtenidos

Optimización de la extracción de polifenoles: se seleccionaron como solventes de extracción agua, acetona, metanol, etanol y soluciones metanólicas, etanólicas y acetoónicas al 80% (v/v) (20 % de agua) para evaluar la incidencia de estos solventes en la concentración de polifenoles en los extractos resultantes. Para ello se seleccionó la avellana como el fruto seco a utilizar, ya que existen trabajos previos donde se identifican y cuantifican los polifenoles por cromatografía líquida de alta resolución (Jakopic, et al., 2011). Un factor que incide en la eficiencia de extracción es la temperatura, ya que un aumento de la misma provoca el incremento de la velocidad de extracción debido a que los compuestos aumentan su solubilidad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los compuestos en estudio son termolábiles y, por lo tanto, pueden degradarse durante el proceso de extracción o perder propiedades que los hacen interesantes para su uso, información que se consideró al momento de determinar los tiempos de extracción a utilizar para cada temperatura.

Por lo expuesto anteriormente, resulta de interés el estudio de la temperatura para conocer la condición más adecuada para realizar la extracción. Se ensayaron 3 temperaturas diferentes utilizando agua como solvente: 25 °C (24 horas), 50 °C (24 horas) y 100 °C (1 hora). En el caso de la extracción con agua a ebullición (100 °C), un tiempo de 24 horas provocaría la degradación de los antioxidantes, disminuyendo su recuperación. Por esta razón, el tiempo de extracción se redujo considerablemente a 1 hora. La Figura 2a muestra los resultados obtenidos. Como se observa, la condición que resultó en extractos más concentrados en polifenoles es la que utiliza una temperatura de 50 °C (24 horas), con 1691 ppm, seguida de aquella llevada a cabo a 25 °C (24 horas), con 1305 ppm; la condición menos favorable para la extracción fue la que utiliza agua en ebullición (1 hora), con 971 ppm. Otros investigadores han estudiado la concentración de polifenoles en extractos obtenidos utilizando mezclas de solventes con agua, observándose resultados acertados en la extracción (Contini, et al., 2008). En consecuencia, para la extracción de compuestos fenólicos se ensayaron 3 mezclas de solven-

tes con agua: agua/acetona (80/20) (v/v), agua/metanol (80/20) (v/v) y agua/etanol (80/20) (v/v), con fin de determinar cuáles de los solventes y mezclas resultaron óptimos para la extracción de polifenoles. La Figura 2b muestra los resultados obtenidos utilizando las mezclas ensayadas. Los resultados permiten concluir que la extracción llevada a cabo con la mezcla agua/acetona (80/20), durante 24 horas y a temperatura ambiente (25 °C), fue la que resultó más eficiente para la extracción de polifenoles en avellanas, con 3786 ppm en el extracto. Por este motivo, se eligieron estas condiciones de extracción (mezcla de solventes, temperatura, tiempo) para desarrollar los análisis que permiten determinar el contenido de polifenoles en los distintos frutos secos. Sin embargo, debe tenerse presente que la condición determinada no necesariamente tiene que ser la más eficiente para el resto de los frutos secos analizados. Por otra parte, la solución agua/etanol (80/20) mostró ser la menos adecuada en la extracción, con 410 ppm en el extracto. Respecto al solvente más adecuado en la extracción de polifenoles, Delgado y otros (2010) observaron que el orden respecto a la eficiencia de extracción que muestran los distintos solventes y condiciones utilizadas es: agua en ebullición (45 min) > solución de acetona al 80 % (v/v) (24, 48 y 72 horas dado que no presentaron diferencias significativas) > metanol (24 horas) > metanol (48 horas). Los autores atribuyen estos resultados a la polaridad de los solventes, concluyendo que los solventes más polares como el agua extraen mejor los polifenoles, seguido de solventes con mayor tendencia a participar en interacciones dipolares. Los autores proponen también que los solventes con mayor tendencia a participar en interacciones de hidrógeno, como el metanol, son menos eficientes en la extracción de polifenoles en avellanas. Además, se debe tener en cuenta que, al tratarse de una mezcla de solventes, la condición más eficiente para la extracción es debido a las interacciones con los grupos funcionales de los polifenoles.

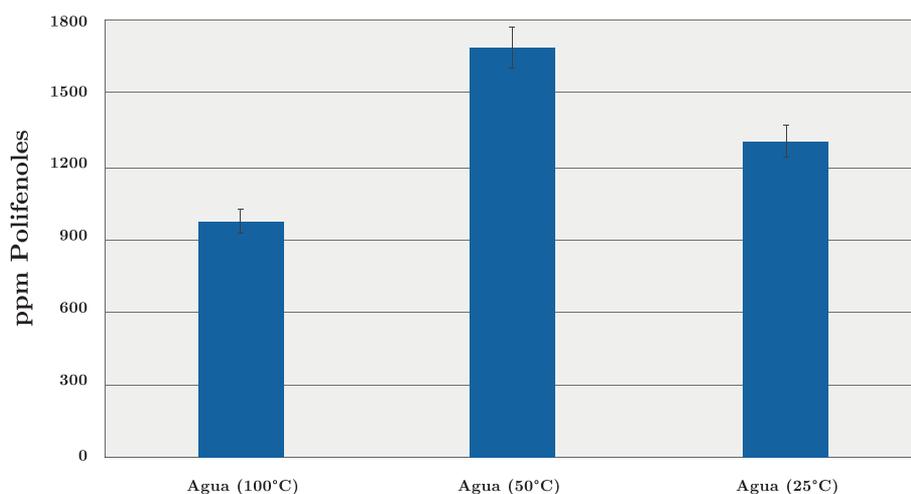


Figura 2a. Contenido de polifenoles en extractos de avellana (ppm) utilizando agua como solvente de extracción a diferentes temperaturas y tiempos: 100 °C (1 hora), 50 °C (24 horas) y temperatura ambiente (24 horas).

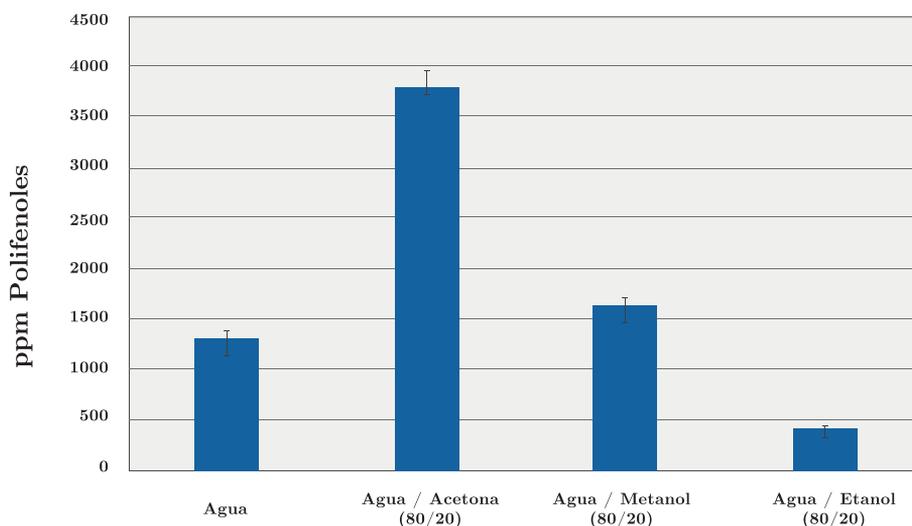


Figura 2b: Contenido de polifenoles en extractos de avellana (ppm) obtenidos a partir de agua como solvente de extracción y mezclas de extracción distintos solventes: agua/acetona (80/20), agua/metanol (80/20, v/v) y agua/etanol (80/20), a 25 °C durante 24 horas.

Contenido inicial de polifenoles y tocoferoles en distintos frutos secos:

los análisis del contenido de polifenoles y tocoferoles contribuyen a comprender y explicar la evolución de dichos antioxidantes naturales en el fruto durante el almacenamiento. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que no todos los polifenoles presentan la misma protección como antioxidantes naturales. Es conocido que la actividad antioxidante de una determinada molécula se ve afectada por la naturaleza del grupo funcional responsable de dicha actividad y de las características de los diferentes grupos funcionales enlazados a él, lo que ha sido reportado para antioxidantes con diferentes estructuras químicas (López-Giraldo, et al., 2009).

Los resultados referentes al contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos de los frutos secos en estudio se presentan en la Figura 3. La concentración de polifenoles totales en los extractos presentó una variación entre 427 ppm (almendras) y 8805 ppm (nueces). Por lo tanto, el extracto de nuez resultó el más concentrado en polifenoles totales. El contenido de polifenoles totales en los extractos en orden decreciente fue: nueces (8805 ppm) > avellanas (3786 ppm) > nueces pecan (1475 ppm) > maní (1453 ppm) > castañas de cajú (654 ppm) > pistachos (450 ppm) > almendras (427 ppm).

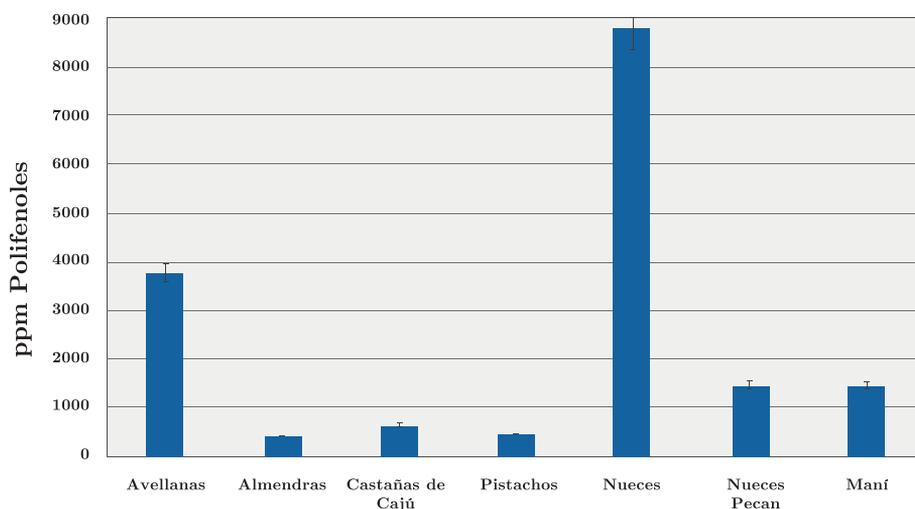


Figura 3. Contenido de polifenoles totales en los extractos de distintos frutos secos (ppm).

Respecto a la distribución del contenido de tocoferoles de cada tipo (Figura 5), se observa que los α -, β - y γ -tocoferoles se detectaron en todos los aceites de los frutos secos en estudio, siendo el α -tocoferol el predominante en almendras y avellanas (94% y 55%, respectivamente), mientras que el β - y γ -tocoferol lo fueron en pistachos (90%), nueces pecan (96%), nueces (88%), maní (84%) y castañas de cajú (92%). El δ -tocoferol fue detectado en menor proporción en la mayoría de los aceites en estudio, a excepción del aceite de almendra. La variación de los diferentes tocoferoles presentes en los frutos secos fue: α -tocoferol entre 1% (nueces) y 94% (almendras), β - y γ tocoferoles entre 6% (almendras) y 96% (nueces pecan), y δ -tocoferol entre 0% (almendras) y 11% (nueces). Estos resultados son similares a los reportados en el trabajo de Stuetz y otros (2017).

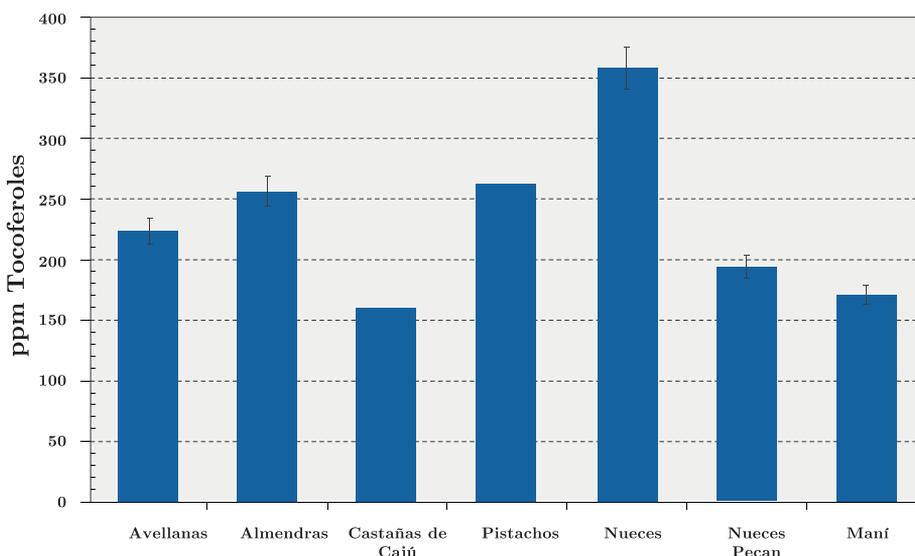


Figura 4. Contenido de tocoferoles totales en los aceites de distintos frutos secos (ppm).

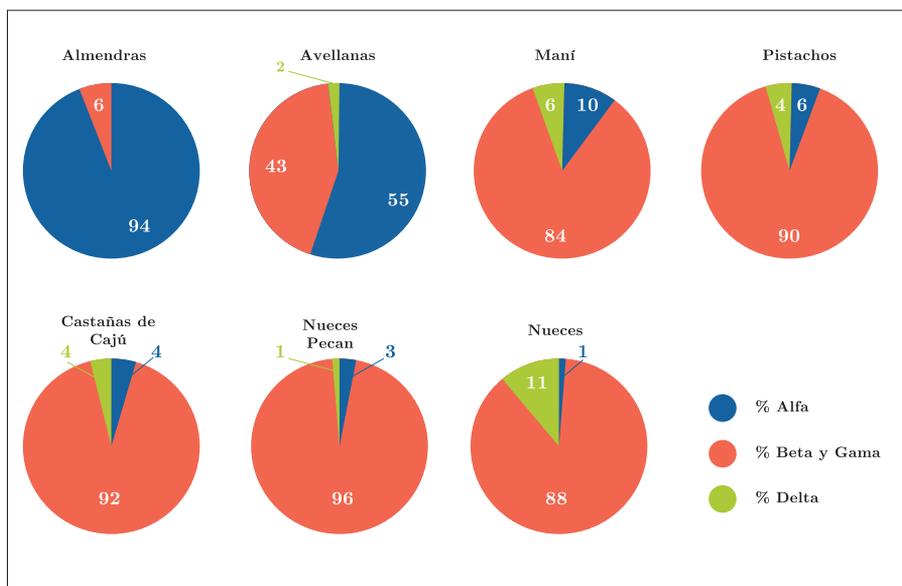


Figura 5. Distribución en porcentaje de α -, $\beta + \gamma$ y δ -tocoferoles en los aceites extraídos de distintos frutos secos.

Evolución de los parámetros de oxidación con el transcurso del tiempo: la Figura 6 muestra los resultados del índice de peróxidos y el contenido de tocoferoles totales para los aceites obtenidos de los diferentes frutos secos durante los meses de almacenamiento (mes 1, mes 3 y mes 6). Estos resultados muestran que el orden de estabilidad respecto a la oxidación primaria en el último mes de estudio (mes 6) para los frutos sin cáscara es el siguiente: almendras > nueces > maní > castañas de cajú > avellanas > pistachos > nueces pecan. El índice de peróxidos aumenta durante el período de almacenamiento de los frutos secos. Esto indica un deterioro creciente del aceite contenido en ellos a medida que transcurre el tiempo. El Reglamento Bromatológico Nacional establece que los aceites comestibles refinados no son aptos para el consumo cuando tienen un índice de peróxidos superior a 10 meq O_2 /kg de aceite (Uruguay. Ministerio de Salud Pública, 1994). Considerando el valor anteriormente mencionado, todos los aceites extraídos de los frutos secos cumplen con esta normativa en el mes 1. El único aceite que mantiene un índice de peróxidos por debajo de 10 meq O_2 /kg durante todo el estudio es el de almendras. En general, para todos los frutos secos el contenido de tocoferoles presentes en los aceites de los mismos disminuye apreciablemente durante los meses de almacenamiento. Esto mostraría una relación inversa con el índice de peróxidos a lo largo de los meses de almacenamiento. Es claro en el caso del aceite de nuez, en el cual el índice de peróxidos al final del estudio se duplica respecto al inicial, mientras que el contenido de tocoferoles se reduce a la mitad aproximadamente, siendo este aceite el que presenta mayor disminución al final del estudio (mes 6).

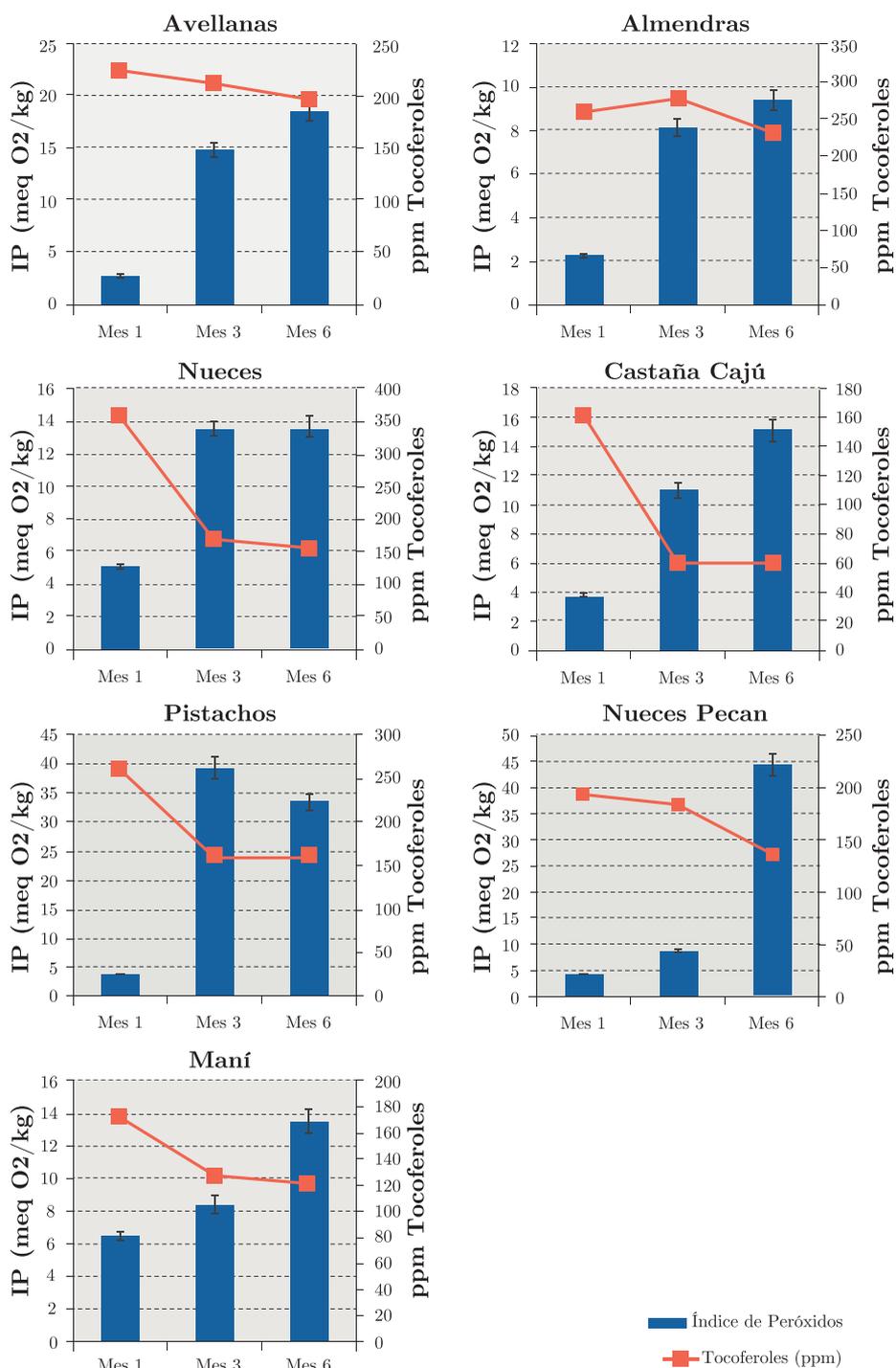


Figura 6. Índice de peróxidos y contenido de tocoferoles totales durante los meses de almacenamiento para los aceites de los diferentes frutos secos.

Determinación del contenido de polifenoles y tocoferoles en maníes antes y después de diferentes procesos de cocción: un gran número de frutos secos es consumido luego de un proceso de tostado. Esta es una forma de procesamiento que puede originar cambios en los componentes, la textura, el color, el sabor y la

aparición, según el grado de tostado de los productos; pero fundamentalmente se puede ver afectado el contenido de antioxidantes naturales presentes. Por lo tanto, resulta de interés la extracción y cuantificación de polifenoles y tocoferoles presentes antes y después de su cocción para evaluar cómo afecta al contenido en antioxidantes naturales.

De acuerdo con la Figura 7, el contenido de polifenoles en los maníes con piel sin tratamiento de cocción fue de 480 ppm, mientras que en la piel y en la cáscara el contenido fue de 732 y 138 ppm, respectivamente. En consecuencia, la presencia tanto de la piel como de la cáscara ofrecen un contenido adicional de antioxidantes que contribuye a enlentecer los procesos de oxidación del aceite presente en el maní. Locatelli y otros (2010) señalan que la piel y la cáscara de frutas, vegetales y semillas pueden contribuir en su protección contra los procesos oxidativos. Locatelli y otros (2010) afirman también que la cáscara es una barrera de defensa clave en las semillas de las plantas y que además la mayoría contiene polifenoles y taninos. Por lo tanto, los resultados del presente estudio coinciden con lo esperado según lo anteriormente citado.

Cuando los maníes enteros son calentados en un horno de convección, se puede observar que el contenido de polifenoles disminuye en el maní sin piel (323 ppm) y en la cáscara (64 ppm). Sin embargo, en la piel se observa un incremento (1878 ppm). Resultados similares (pero con menor efecto del tratamiento de calentamiento respecto a los resultados obtenidos sin tratamiento de cocción) se observan cuando el proceso de calentamiento se realiza en un horno de microondas: el contenido de polifenoles en la piel fue de 1066 ppm, mientras que en el maní sin piel y en la cáscara el contenido fue de 462 y 106 ppm, respectivamente.

Chandrasekara y Shahidi (2011) presentaron resultados con una tendencia similar, con procesos de cocción a baja temperatura (70 °C, 6 horas) y alta temperatura (130 °C, 33 minutos) para castañas de cajú, donde encontraron un aumento en la concentración de los compuestos fenólicos y de las propiedades antioxidantes en la semilla y en la piel. Las concentraciones de polifenoles totales en la piel y semilla crudas fueron 269 y 0.1 mg GAE/g, respectivamente; mientras que en tostadas a baja temperatura el contenido de polifenoles totales fue de 309 en piel y 0.5 mg GAE/g en semilla. Cuando la piel y semilla se tostaron a alta temperatura, los valores obtenidos fueron 348 y 0.5 mg GAE/g, respectivamente (Chandrasekara y Shahidi, 2011). En dicha investigación se muestra, por tanto, que el procesamiento térmico aumenta el contenido de polifenoles totales de la piel y la semilla. Estos aumentos se atribuyen a que el proceso de tostado ayudaría a la liberación de compuestos fenólicos, los que tienen mayor solubilidad en el solvente de extracción (etanol). Además, dado que la piel y la semilla de castañas contienen proteínas y azúcares, es posible el desarrollo de la reacción de Maillard durante el tostado con la formación de compuestos que contribuyen al contenido de polifenoles totales y a la actividad antioxidante (Chandrasekara y Shahidi, 2011). Los autores resaltan que las capas externas como la piel o cáscara de extractos vegetales contienen mayores concentraciones de compuestos fenólicos, dado que actúan como agentes de

defensa contra patógenos, parásitos, entre otros, y contribuyen al color de las plantas. Además, sus estudios muestran que el procesado térmico aumenta el contenido de polifenoles totales en piel y semilla. Los resultados mostrados están en concordancia con estudios similares realizados con otro tipo de frutos secos como maní y avellanas (Yu, et al., 2005, Locatelli, et al., 2010) y en la revisión realizada por Chang y otros (2016). Estudios complementarios deberían realizarse para comprender los mecanismos físicos y/o bioquímicos de estos cambios producidos durante el calentamiento de los frutos secos.

Respecto al contenido de tocoferoles totales (Figura 8), el contenido en los maníes con piel sin tratamiento de cocción fue de 83 ppm. En los extractos obtenidos de la piel y la cáscara, el contenido fue de 132 y 103 ppm, respectivamente. Se observa que cuando los maníes enteros son calentados, ya sea en un horno de convección o en un horno de microondas, el contenido total de tocoferoles disminuye en la cáscara a valores de 46 y 89 ppm, respectivamente. Al igual que en la determinación del contenido de polifenoles, el efecto es más pronunciado en el calentamiento a 180 °C por un período de tiempo más extenso. En cambio, en la piel se observa un aumento en el contenido de tocoferoles (como en el caso de los polifenoles), alcanzando valores de 160 y 222 ppm para la cocción en horno de convección y de microondas, respectivamente. Por tanto, la piel de los maníes resulta una fuente rica en compuestos fenólicos y tocoferoles, los cuales ayudan a proteger al maní de los procesos oxidativos.

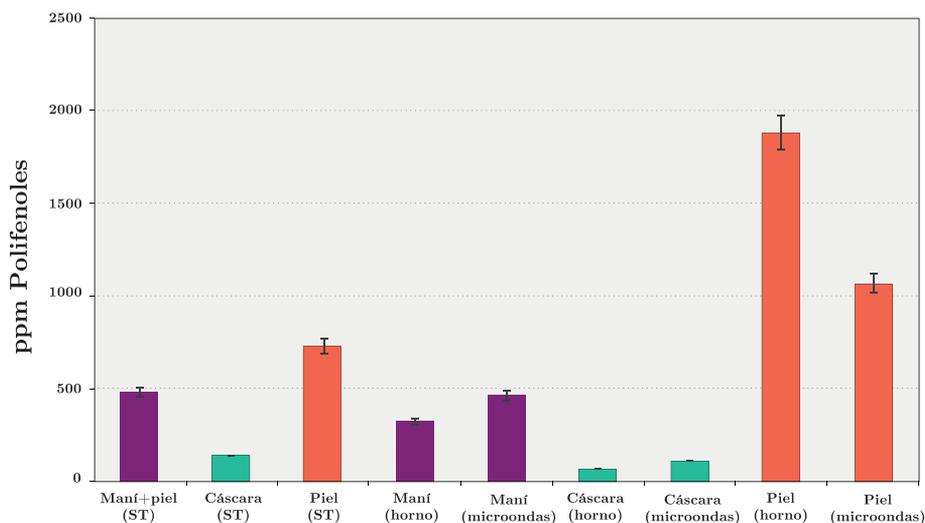


Figura 7. Contenido de polifenoles totales (ppm) en los maníes, en la cáscara de los maníes y en la piel de los maníes, sin tratamiento de cocción (ST), con cocción en horno de convección y con cocción en horno de microondas.

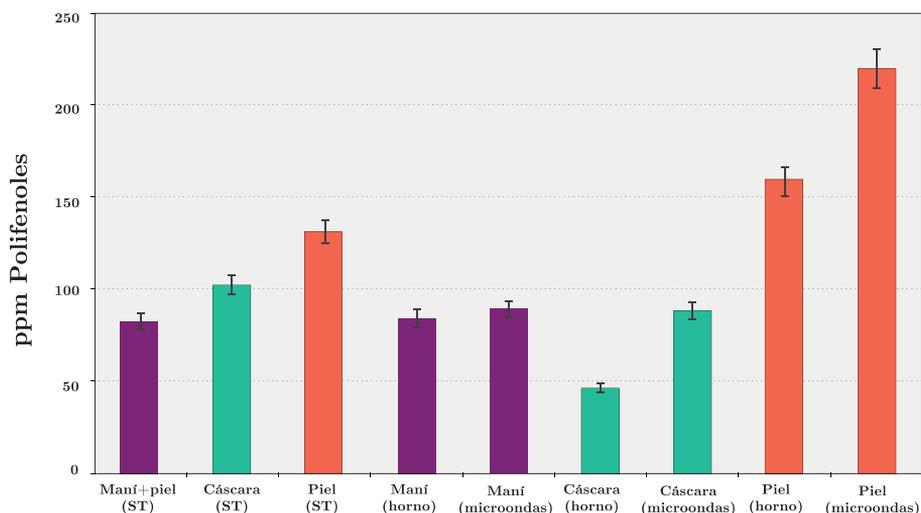


Figura 8. Contenido de tocoferoles totales (ppm): en los maníes, en la cáscara de los maníes y en la piel de los maníes, sin tratamiento de cocción (ST), con cocción en horno de convección y con cocción en horno de microondas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que los frutos secos analizados son una fuente rica de lípidos que contienen ácidos grasos insaturados y antioxidantes naturales. Entre los frutos secos analizados (almendras, avellanas, castañas de cajú, maní, nueces, nueces pecan y pistachos), la nuez pecan fue la que presentó mayor porcentaje de lípidos. Desde el punto de vista nutricional, es interesante identificar los ácidos grasos poliinsaturados debido a sus conocidos efectos sobre el control del colesterol, entre otros. Así, los resultados muestran que en todos los aceites, a excepción del aceite de nuez, el ácido graso predominante es el ácido oleico. Los aceites de nuez pecan y maní contienen cantidades similares de ácido oleico y ácido linoleico, mientras que en las nueces el ácido graso predominante es el linoleico.

Desde el punto de vista de los antioxidantes, se concluye que el extracto de nuez resultó ser el más concentrado en polifenoles totales, seguido del extracto de avellana y nuez pecan. En cuanto a los tocoferoles totales, también el extracto de nuez resultó ser el más concentrado, seguido del de pistachos y almendras. Por lo tanto, entre los frutos secos estudiados el más atractivo es la nuez, dada su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes naturales (polifenoles y tocoferoles). De acuerdo con los resultados presentados en el presente estudio, estos antioxidantes naturales protegerían al fruto de las reacciones de oxidación, aunque sería necesario realizar estudios adicionales que permitieran verificar que su consumo, en dosis establecidas, genera los mismos beneficios en el consumidor tras su ingesta.

El estudio de la estabilidad de los aceites extraídos de los frutos secos almacenados muestra que el índice de peróxidos aumentó durante el tiempo de almacenamiento,

y evidencia el avance de la oxidación primaria de los aceites (el aceite de almendras fue el único aceite que mantuvo un índice de peróxidos por debajo de 10 meq O₂/kg durante todo el estudio). En cambio, el contenido de tocoferoles disminuyó en general para todos los frutos secos.

El estudio realizado sobre maníes muestra, por un lado, que el contenido de polifenoles y tocoferoles fue superior en la piel que en el fruto y en la cáscara. Aunque la cáscara presentó menor concentración de antioxidantes naturales que el fruto, también actuaría de barrera para los procesos oxidativos gracias a la presencia de estos antioxidantes. Por otra parte, las distintas formas de tostado analizadas en los maníes (horno con convección y horno microondas) determinaron que el contenido de polifenoles y tocoferoles disminuyera en el fruto y en la cáscara con respecto al producto sin cocción; mientras que el contenido en la piel se incrementó luego del procesamiento. Esto podría determinar que si se pretende dar utilidad a la piel de los maníes, los cuales generalmente son comercializados pelados, sería interesante realizar un tratamiento de tostado previo a la extracción de los antioxidantes para aumentar el porcentaje de recuperación. En cambio, si se pretende aumentar el consumo de maní en la dieta por sus propiedades beneficiosas, sería más recomendable ingerirlos con piel debido a una mayor concentración de antioxidantes naturales en la misma.

REFERENCIAS

- Andrikopoulos, N.K., Brueschweiler, H., Felber, H. y Taeschler, Ch., 1991. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(6), pp.359-364.
<https://www.doi.org/10.1007/BF02663750>
- American Oil Chemists' Society, 1998. *Official methods and recommended practices*. 6ta. ed. Champaign: AOCS. Método Cd 8-53.
- Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M. y Ventanas, J., 2012. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. En: *Eurocarne*, 207, pp.63-73.
- Badui Dergal, S., 2006. Lípidos. En: Badui Dergal, S., ed. *Química de los alimentos*. 4ta ed. México: Pearson Educación. pp.245-300.
- Bitok, E. y Sabaté, J., 2018. Nuts and cardiovascular disease. En: *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61, pp.33-37. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.05.003>
- Chandrasekara, N. y Shahidi, F., 2011. Effect of roasting and phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.5006-5014.
<https://doi.org/10.1021/jf2000772>

- Chang, S.K., Alasalvar, C., Bolling, B.W. y Shahidi, F., 2016. Nuts and their co-products: the impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. En: *Journal of Functional Foods*, 26, pp.88-122. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.029>
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. y Anelli, G., 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. En: *Food Chemistry*, 110, pp.659-669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.060>
- del Moral Navarrete, L., 2016. *Estudio genético y molecular del contenido en tocoferoles en semillas de girasol*. Córdoba: Universidad de Córdoba. (Tesis Doctoral).
- Delgado, T., Malheiro, R., Pereira, J. A. y Ramalhosa, E., 2010. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potencial in relation to other nuts. En: *Industrial Crops and Products*, 32, pp.621-626. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.019>
- Gao, P., Liu, R., Jin, Q. y Wang, X., 2019. Comparison of solvents for extraction of walnut oils: Lipid yield, lipid compositions, minor-component content, and antioxidant capacity. En: *LWT - Food Science and Technology*, 110, pp.346-352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.100>
- Garrido, I., Monagas, M., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B., 2007. Extracción de antioxidantes a partir de subproductos del procesado de la almendra. En: *Grasas y Aceites*, 58(2), pp.130-135. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i2.76>
- Göncüoğlu Taş, N. y Gökmen, V., 2017. Phenolic compounds in natural and roasted nuts and their skins: a brief review. En: *Current Opinion in Food Science*, 14, pp.103-109. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.001>
- Hara, A. y Radin, N.S., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. En: *Analytical Biochemistry*, 90, pp.420-426. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5)
- International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987. *Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives*. 7ma. ed. Oxford: IUPAC. Standard Method 2.301.
- Jakopic, J., Mikulic Petkovsek, M., Likožar, A., Solar, A., Stampar, F. y Veberic, R., 2011. HPLC-MS identification of phenols in hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels. En: *Food Chemistry*, 124, pp.1100-1106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.011>

- Kornsteiner, M., Wagner, K. y Elmadfa, I., 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. En: *Food Chemistry*, 98, pp.381-387.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.033>
- Kumar Saini, S. y Keum, Y.S., 2016. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: a review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. En: *Food Research International*, 82, pp.59-70.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.025>
- Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.D., Martelli, A., Stevigny, C. y Arlorio, M., 2010. Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nacciola piemonte PGI): impact of different roasting conditions. En: *Food Chemistry*, 119, pp.1647-1655.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.048>
- López-Giraldo, L., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E. y Villeneuve, P., 2009. Kinetic and Stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. En: *Food Chemistry*, 57, pp.863-870. <https://doi.org/10.1021/jf803148z>
- Machado De Souza, R.G., Machado Schincaglia, R., Duarte Pimentel, G. y Mota, F.J., 2017. Nuts and human health outcomes: a systematic review. En: *Nutrients*, 9(12), pp.1311. <https://doi.org/10.3390/nu9121311>
- Maestro, R. y Borja, R., 1993. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. En: *Grasas y Aceites*, 44(2), pp.101-106.
<https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i2.1105>
- Miraliakbari, H. y Shahidi, F., 2008a. Oxidative Stability of tree nut oils. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.4751-4759.
<https://doi.org/10.1021/jf8000982>
- Miraliakbari, H. y Shahidi, F., 2008b. Lipid class composition, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents. En: *Journal of Food Lipids*, 15, pp.81-96. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2007.00104.x>
- Namiki, M., 1990. Antioxidants/antimutagens in food. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, pp.273. <https://doi.org/10.1080/10408399009527528>
- Nepote, V., Grosso, N.R. y Guzman, C., 2002. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. En: *Grasas y Aceites*, 53(4), pp.391-395.
<https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i4.335>
- Pokorny, J., 1991. Natural antioxidant for food use. En: *Trends in Food Science & Technology*, 2, pp.223-227.

Stuetz, W., Schlörmann, W. y Gleis, M., 2017. B-vitamins, carotenoids and alfa/delta tocopherol in raw and roasted nuts. En: *Food Chemistry*, 90, pp.222-227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.065>

Uruguay. Ministerio de Salud Pública, 1994. *Reglamento bromatológico nacional, decreto 315/994* [En línea]. Cap. 17. Montevideo: IMPO. pp.147-151. [Consulta: 15 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>

Yu, J., Ahmedna, M. y Goktepe, I., 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. En: *Food Chemistry*, 90, pp.199-206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.048>

Hacia un monitoreo continuo de variables oceanográficas en el Parque Nacional Isla de Flores, Uruguay

Towards continuous monitoring of oceanographic variables in Isla de Flores National Park, Uruguay

Rumo ao monitoramento contínuo de variáveis oceanográficas no Parque Nacional Isla de Flores, Uruguai

RECIBIDO: 27/7/2020 → APROBADO: 21/10/2020 ✉ r.trinchin@inumet.gub.uy

✉ TRINCHIN, ROMINA (1) (2); MANTA, GASTÓN (1); SANTANA, RAFAEL (1); RUBIO, LUIS (3); HORTA, SEBASTIÁN (4); PASSADORE, CECILIA (3); DE MELLO, CECILIA (1); SZEPHEGYI, MARÍA NUBE (3); BARREIRO, MARCELO (1)

(1) DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) INSTITUTO URUGUAYO DE METEOROLOGÍA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(3) DEPARTAMENTO DE GESTIÓN COSTERA Y MARINA, MINISTERIO DE AMBIENTE. MONTEVIDEO, URUGUAY.

(4) DIVISIÓN SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DE LA DIRECCIÓN NACIONAL DE MEDIO AMBIENTE, MINISTERIO DE AMBIENTE. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Las mediciones continuas de variables ambientales en zonas costeras son fundamentales para comprender la compleja dinámica de los procesos oceanográficos y atmosféricos, así como mejorar la comprensión del medio marino para fines operativos y de conservación que se puedan integrar en un proceso de planificación espacial marina. En Uruguay se han llevado adelante distintos esfuerzos para la generación de este tipo de información *in situ*, pero en su mayoría no lograron mantenerse en el tiempo, principalmente por los altos costos operativos y de mantenimiento de sensores específicos. En este trabajo se presentan los resultados preliminares de más de un año de mediciones continuas de temperatura y salinidad en el Río de la Plata, obtenidos a partir de soluciones de bajo costo y un fuerte trabajo de coordinación multiinstitucional entre la academia y organismos del Estado. Las mediciones fueron obtenidas a partir de la instalación de sensores DST-CTD en el Parque Nacional Isla de Flores, un sitio clave para el muestreo de la zona exterior del Río de la Plata. Se destaca el valor de contar con este tipo de información, y se discute la importancia y complejidad de la implementación de un sistema de monitoreo continuo a largo plazo.

PALABRAS CLAVE: mediciones *in situ*, DST-CTD, Río de la Plata.

ABSTRACT

Continuous measurements of environmental conditions in coastal zones are key to understanding oceanographic and atmospheric processes, as well as improving the understanding of the marine environment for operational and conservation purposes that can be integrated into a marine spatial planning process. Several efforts have been made in Uruguay in order to achieve these goals, but they have not sustained over time due to high operative and maintenance costs of specific sensors. This work presents the first results of more than a year of continuous measurements of temperature and salinity in the Río de la Plata obtained using a low cost solution and through a high-commitment multi-institutional teamwork between the academy and state agencies. Measurements were obtained with a DST-CTD sensor installed in Isla de Flores National Park, a key sampling point for the external zone of Río de la Plata. The relevance of having this type of information is presented and the need for the implementation of a continuous long-term monitoring system is discussed.

KEYWORDS: *in situ* measurements, DST-CTD, Río de la Plata.

RESUMO

Medições contínuas de variáveis ambientais nas áreas costeiras são essenciais para entender a complexidade na dinâmica dos processos oceanográficos e atmosféricos, e para melhorar a compreensão do ambiente marinho para fins operacionais e de conservação que podem ser integrados num processo de planejamento espacial marinho. No Uruguai, diferentes esforços foram feitos para gerar esse tipo de informação *in situ*, mas a maioria não pôde ser conservada ao longo do tempo, principalmente devido aos altos custos operacionais e de manutenção de sensores específicos. Este trabalho apresenta os resultados preliminares de mais de um ano de medições contínuas de temperatura e salinidade no Rio de la Plata, as quais foram obtidas a partir de soluções de baixo custo e um forte trabalho de coordenação multi-institucional entre a academia e as agências estaduais. As medidas foram obtidas com sensores DST-CTD instalados no Parque Nacional Isla de Flores, uma importante locação para amostragem da área externa do Rio de la Plata. O valor de ter esse tipo de informação é destacado e discute-se a importância e a complexidade da implementação de um sistema de monitoramento contínuo de longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: medições *in situ*, DST-CTD, Río de la Plata.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de monitoreo continuo del medio marino son de gran relevancia para mejorar pronósticos de tiempo y detectar efectos de cambio climático; así como entender procesos físicos, químicos y biológicos que allí ocurren, y predecir los efectos de las actividades humanas en los ecosistemas marinos (Soreide, et al., 2001; Merchant, et al., 2019). Asimismo, son un insumo importante para la gestión de actividades marítimas operativas.

La generación de series temporales largas de variables medidas *in situ* cobra particular relevancia para complementar los datos que se pueden obtener a partir del

registro por sensoramiento remoto o de los datos de reanálisis atmosféricos y oceánicos. En particular, el dato satelital nos brinda información de la superficie con una gran cobertura espacial que suele tener varias ausencias de datos cuando hay nubosidad. En cambio, con la medición *in situ*, aunque la cobertura espacial de los mismos suele ser muy reducida, obtenemos datos de alta precisión (Merchant, et al., 2019).

Asimismo, es necesario comparar los datos satelitales y de reanálisis con mediciones *in situ* para validarlos, especialmente en áreas costeras, y para ello se requiere contar con series temporales largas y de alta frecuencia (Bao, et al., 2019; Merchant, et al., 2019). Esta información cobra aún mayor relevancia si consideramos que se puede correlacionar con otro tipo de información, como la meteorológica y la biogeoquímica, para ampliar el monitoreo a nivel ecosistémico. De esta manera se fortalecen distintas actividades que se desarrollan en la costa, como las logísticas, de investigación, de explotación de recursos naturales, de conservación y de seguridad en el mar, contribuyendo así a procesos de planificación del espacio costero-marino (Echevarría, et al., 2016).

A nivel global, existe una gran cantidad de proyectos dirigidos a monitorear los océanos de manera continua a partir de distintos abordajes (por ejemplo, PIRATA, Argo, etcétera.; Merchant, et al., 2019). Sin embargo, están dirigidos a monitorear el océano abierto, quedando el monitoreo de las zonas costeras restringido a los esfuerzos realizados a nivel nacional o regional (por ejemplo, SiMCosta, s.d.). En Uruguay, existen antecedentes de proyectos binacionales que implementaron boyas oceanográficas en el Río de la Plata, en puntos alejados de la línea de costa (por ejemplo, Oyarvide, Pilote Norden, Boya Oceanográfica; Simionato, et al., 2011; Santoro et al., 2013; Fossati, et al., 2014), pero los monitoreos se vieron interrumpidos por diversas razones, entre ellas los altos costos de mantenimiento en las aguas turbias del Río de la Plata (Simionato, et al., 2011). Otras iniciativas privadas de recolección de datos *in situ*, vinculadas a emprendimientos económicos de diversa índole (regasificadora, planta de celulosa Montes del Plata, central térmica de Punta del Tigre, etcétera), funcionaron durante tiempos acotados y los datos allí generados son de difícil acceso.

El estuario Río de la Plata desemboca en el océano Atlántico, tiene una gran extensión (320 km de largo y su ancho varía entre 38 km en la naciente y 230 km en su desembocadura al océano), poca profundidad (media 10 m), y es micromareal (<1 m, Framiñan, et al., 1999; Santoro, et al., 2013). Fluye hacia la plataforma continental de Uruguay y Argentina, transportando aguas de los ríos Paraná y Uruguay, con un caudal de descarga medio de 22.000 m³/s, el cual presenta una baja estacionalidad y gran variabilidad interanual (Piola, et al., 2005). El estuario es muy susceptible a forzantes atmosféricos (Guerrero, et al., 1997; Simionato, et al., 2004; Meccia et al., 2013), por lo que la circulación en este sistema está principalmente determinada por la acción de los vientos locales y vientos remotos (Simionato, et al., 2008; Santoro, et al., 2013; Fossati, et al., 2014). Estos aspectos determinan que sea un estuario muy dinámico, caracterizado por tener una marcada variabilidad espacio-temporal y ser altamente productivo (Guerrero y Piola, 1997; Acha, et al., 2008).

Las características de este sistema determinan que la salinidad constituya una variable sumamente relevante en el área, ya que está estrechamente vinculada a la descarga del Río de la Plata y al viento, los cuales determinan una mayor o menor presencia de agua salobre. Asimismo, estas condiciones repercuten directamente en

aspectos vinculados a la calidad del agua (por ejemplo, floraciones de cianobacterias), la balneabilidad de las playas, la distribución de especies y los recursos pesqueros, entre otros (Jaureguizar, et al., 2003; Paesch, et al., 2014; Martínez, et al., 2017; Kruk, et al., 2019). Además de la salinidad, la temperatura del agua de mar es otra variable de gran importancia que permite caracterizar las propiedades del agua y la dinámica local.

En los últimos años se ha registrado un gran avance en los productos de sensoramiento remoto para medir estos parámetros físicos del océano, pero aún es necesario dirigir esfuerzos locales para generar mediciones continuas *in situ* (Bao, et al., 2019; Merchant, et al., 2019). En particular, los productos satelitales de temperatura superficial del mar (TSM) para la costa uruguaya capturan adecuadamente su variabilidad en distintas escalas, aunque tienden a suavizarlas (Simionato, et al., 2010; Manta, et al., 2018; Trinchin, et al., 2019). A pesar de que existen productos disponibles con gran resolución espacial (1 km) y resolución temporal diaria (por ejemplo, GHSST, Chin, et al., 2017), aún no es posible acceder a analizar la variabilidad durante el día. Por otro lado, si bien los productos satelitales de salinidad superficial han presentado gran desarrollo en los últimos años, incrementando su resolución espacial ($0.5^\circ \times 0.5^\circ$) y temporal (composición de 7 días para nuestra región, por ejemplo, los provenientes de los sensores SMOS o Aquarius), aún no hay mediciones remotas de salinidad cercanas a todas las costas del mundo; y en los casos donde sí hay, todavía no son confiables (Bao, et al., 2019).

Actualmente, Uruguay no cuenta con programas de monitoreo oceanográfico continuo de alta frecuencia (por ejemplo, un dato por hora). Existen algunos esfuerzos dirigidos a monitoreos de playas que son realizados por instituciones académicas o gobiernos departamentales (por ejemplo, ver referencias de datos usados en Kruk, et al., 2019; Lercari y Defeo, 2006), campañas específicas llevadas adelante por otras instituciones del gobierno o la universidad (por ejemplo, Ortega y Martínez, 2007), y monitoreo en tiempo real de altura del nivel del mar que se realiza con fines operativos a través de mareógrafos de la Administración Nacional de Puertos, (Uruguay. Administración Nacional de Puertos, s.d.).

En este contexto, a fines de 2018, con el fin de avanzar hacia la implementación de sistemas de monitoreo continuo en la costa uruguaya, así como poder contar con series temporales de datos *in situ* para investigación en ciencias del mar, nace una iniciativa producto del trabajo multiinstitucional entre el Departamento de Ciencias de la Atmósfera de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República), el Departamento de Gestión Costera y Marina y la División Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la Dirección Nacional de Medio Ambiente, ambas del Ministerio de Ambiente, y el Instituto Uruguayo de Meteorología, con el apoyo del Ministerio de Defensa Nacional (a través del Servicio de Balizamiento de la Armada y la Prefectura Nacional Naval). Este trabajo tiene como objetivo presentar la información generada en los primeros 16 meses de registro continuo de variables *in situ* y sentar las bases para un proceso colaborativo interinstitucional de largo plazo. Además, se discute la correlación de la temperatura con datos satelitales de TSM, se caracteriza el ciclo diario y estacional de la temperatura *in situ*, y se analizan casos de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del instrumental e instalación

El instrumental consiste en sensores DST-CTDs de la marca STAR ODDI, con su *data logger* específico para programarlos y descargar los datos en una computadora. El *data logger* incluye una caja de comunicación que lee la información del sensor, y un programa específico (SeaStar) para pre-procesar y descargar esa información en formato digital (Figura 1a y b). Los DST-CTDs son equipos que registran las variables conductividad, temperatura y profundidad. Estos equipos son apropiados para su uso en zonas costeras, amarrados a un sitio o adheridos a redes, por lo cual son muy resistentes y versátiles. El rango de conductividad que se registra con distintos equipos es de 0.3-63 mS/cm y el rango de profundidad para el que están diseñados es de 1-500 m; según las características del sistema debe optarse por la versión del sensor que mide en un rango óptimo. El software calcula automáticamente la salinidad (PSS-78) a partir de las mediciones de conductividad y temperatura en unidades prácticas de salinidad (psu). La frecuencia de tiempo con que se toman las mediciones puede variar de un segundo a horas, y puede ser preestablecida por el usuario, adecuándose al objeto de estudio. Los registros se guardan en una memoria interna con una referencia reloj en tiempo real del momento en que se tomó la medición. Una particularidad que presentan estos sensores es que son muy pequeños (50 mm x 15 mm), lo cual los hace muy prácticos de transportar; poseen una vida útil que varía de acuerdo con el uso que reciban; y si bien pueden ser recalibrados, la batería no es renovable.

Para la instalación de los sensores se diseñó un dispositivo de amarre tipo “cachimba”, el cual consiste en un tubo sujetado al muelle a través del cual se introduce el sensor en su cápsula amarrado a un cabo (Figura 1c). De esta manera se evita la deriva del sensor por efecto del viento o las corrientes. Asimismo, este dispositivo permite que el sensor fluctúe su nivel con las variaciones del mar, ubicándose siempre cerca de la superficie, de modo que no se observan variaciones significativas en la temperatura o salinidad asociadas a la cota de medición. Además, facilita el acceso a los sensores para descargar la información.

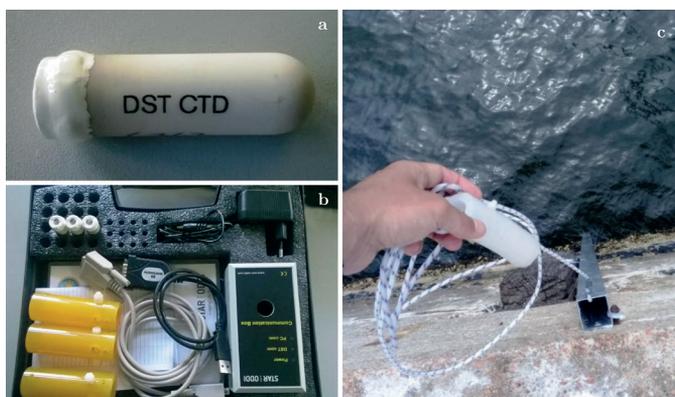


Figura 1. a) Sensor DST-CTD, b) Equipo *data logger* y cápsulas de protección de los sensores, c) Sistema de amarre al muelle tipo “cachimba”.

El equipo está colocado en el muelle de la Isla de Flores, ubicado a 11 km de la costa, frente al límite entre Montevideo y Canelones ($34^{\circ}56'00.7''\text{S}$ - $55^{\circ}55'02.8''\text{W}$; Figura 2). La isla y un radio de 2 millas náuticas fueron ingresados en 2018 al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), declarándose Parque Nacional Isla de Flores (PNIF) a través del Decreto N° 43/08, del 26 de febrero de 2018 (Uruguay, 2018). El PNIF tiene una superficie total de 5.749 hectáreas (aproximadamente 35 ha corresponden a superficie terrestre) y presenta un faro activo que cuenta con personal a cargo, que hace turnos y cambia cada 15 días. Esta dinámica facilita el acceso frecuente a la isla, por lo que -con el apoyo de la armada- embarcamos en esos viajes para realizar la limpieza y descarga de los datos quincenalmente. El PNIF, por su distancia a la costa y su ubicación en la zona exterior del Río de la Plata, constituye un lugar clave para el monitoreo debido a que se localiza en una zona de máximos gradientes de temperatura y salinidad (Guerrero, et al., 2010). Asimismo, este sitio presenta la ventaja, respecto a otro punto de la costa, de no verse directamente afectado por la vertiente y escorrentía de aportes pluviales de la ciudad que podrían disminuir la salinidad.



Figura 2. Área de estudio: a) Ubicación del Parque Nacional Isla de Flores, b) Vista de imagen satelital tomada de Copernicus Sentinel-2 mission y c) Vista en perspectiva aérea de una parte de la isla. Se indican en letras mayúsculas los sitios donde se colocaron los sensores en distintos puntos del muelle (A, B y C), los colores semáforo indican la preferencia del sitio, siendo el verde el más adecuado.

Los distintos sitios del muelle donde se fueron colocando los sensores variaron en cuanto al desempeño observado en su funcionamiento (Figura 2c). En primera instancia, los sensores se colocaron en el sitio de mayor resguardo del muelle (Figura 2c, sitio A, indicado en rojo, del 29/11/2018 al 12/12/2018), ubicación que fue posteriormente descartada debido a que se registraron períodos en los que el sensor quedaba fuera del agua (por la poca profundidad en la que se encontraba). En una segunda instancia, el sensor se colocó en un sitio también resguardado por el muelle, fijado a un tubo que también quedaba expuesto ante eventos de bajante;

allí estuvo entre el 12/12/2018 y el 28/12/2018 (Figura 2c, sitio B). Finalmente, el 28/12/2018 fue movido a un tercer sitio con mayor exposición a los vientos y condiciones del mar severas (Figura 2c, sitio C), donde permaneció hasta el 27/1/2019, cuando luego de una tormenta se perdió. El 6/2/2019 se colocó un nuevo sensor en el sitio C (Figura 2c), donde registró datos hasta el mediodía del 6/3/2019. Entre el 6/3/2019 y el 3/5/2019, debido a una falla no identificada del sensor, no se obtuvieron mediciones. El 3/5/2019 se retomaron las mediciones en el sitio C, donde permaneció hasta el 30/4/2020. En todos los casos, los sensores fueron programados para tomar mediciones cada 30 minutos y se utilizaron DST-CTDs de diferentes rangos de conductividad (13-63 mS/cm, 3-37 mS/cm, 0.3-5 mS/cm). En la Tabla 1 se indica el rango de conductividad del sensor, el sitio y el tiempo de permanencia en cada sitio.

Tabla 1. Ubicación y característica de los sensores utilizados en distintos sitios del muelle de Isla de Flores.

| Rango de conductividad (mS/cm) | Sitio | Período de medición | | Comentarios |
|--------------------------------|-------|---------------------|----------|---|
| | | Inicio | Fin | |
| 13-63 | A | 29/11/18 | 12/12/18 | Exposición al aire frecuente. Sedimentos en la celda de conductividad a la semana |
| 13-63 | B | 12/12/18 | 28/12/18 | Exposición al aire en eventos de muy bajo nivel del mar |
| 3-37 y 13-63 | | 30/4/20 | 19/5/20 | |
| 3-37 | C | 28/12/18 | 27/1/19 | Periodo sin medición por pérdida del equipo luego de una tormenta |
| | | 27/1/19 | 5/2/19 | |
| 3-37 | | 6/2/19 | 6/3/19 | |
| 3-37 | | 6/3/19 | 3/5/19 | El sensor no registró medidas debido a una falla no identificada |
| 3-37 | | 3/5/19 | 30/4/20 | |
| 0.3-5 | | 22/8/19 | 30/4/20 | |

Tratamiento y análisis de los datos

En esta sección se detalla el procesamiento de datos realizado para generar la base de datos en paso temporal horario, a partir de un total de 33.368 registros por variable tomados cada media hora, en el período comprendido entre el 29 de noviembre de 2018 y el 30 de abril de 2020. En primer lugar, se eliminaron los datos en los que se detectó que el sensor había quedado expuesto al aire. Esta condición se identificó cuando la conductividad fue <3 mS/cm, siendo este el límite de detección inferior para los sensores de conductividad 3-37 mS/cm. Estos casos representaron 4.371 registros (13,1%) y se concentraron en el primer período, cuando el sensor se ubicó en el sitio A, lo que motivó el cambio de su ubicación al sitio B (Figura 2).

En segundo lugar, se calcularon medias horarias a partir de los datos cada 30 minutos. En varios períodos hubo mediciones duplicadas únicamente para la temperatura, ya que se colocaron dos sensores en el mismo sitio con el fin de tener replicabilidad. En el caso de la salinidad, no se obtuvo réplica de la medición válida porque el segundo sensor era para un rango de conductividad muy bajo (0,3-5 mS/cm), correspondiente a cuerpos de agua dulce. Esta información se descartó debido a que las mediciones no resultaron adecuadas para este tipo de sistema.

Las mediciones *in situ* se compararon con datos satelitales GHRSSST-MUR de 1 km de resolución horizontal y frecuencia diaria (Chin, et al., 2017). Se calculó el promedio diario de temperatura medido en el PNIF, y se realizó un análisis de regresión lineal con cada punto de la grilla de datos satelitales en el Río de la Plata y océano adyacente. Luego se graficó el R^2 ajustado, que representa el porcentaje de varianza explicada por el modelo de regresión lineal. Esto se realizó para el período con datos medidos, sin considerar los datos faltantes, alcanzando un total de 512 datos diarios.

A los efectos de completar la serie de temperatura, en los dos períodos que se descontinuaron las mediciones se consideró un método simple de imputación que usa los datos satelitales GHRSSST-MUR, altamente correlacionados con los datos *in situ*. La metodología consistió en sumar el ciclo diario promedio calculado a partir de las observaciones *in situ* al dato satelital durante los períodos en los cuales no hay datos *in situ*. La salinidad no se pudo completar.

El porcentaje de datos faltantes respecto del tamaño de la serie horaria para el período muestreado fue del 20%, tanto para salinidad como para temperatura. La profundidad podría constituir una variable adecuada para descartar valores atípicos, ya que cuando ésta es cero indicaría exposición al aire. Sin embargo, este indicador no es robusto en aguas someras ya que la precisión del instrumento es de $\pm 0.6\%$ del rango de profundidad en que puede medir el sensor. Es decir, pueden darse situaciones en que el valor esté cercano a cero, pero -de todas maneras- tener un dato válido de conductividad ya que entra en el margen de error del instrumento.

Por último, se generó una clasificación binomial de datos denominados válidos y estimados. Para la salinidad, los estimados son aquellos datos que el sensor midió fuera de los límites de precisión de conductividad, según el fabricante. Estos datos se corresponden con valores bajos de salinidad que, si bien siguen la tendencia de los datos válidos cercanos, deben ser utilizados con cautela en caso de buscar una precisión del orden de 1 psu. Se identificaron así dos períodos: uno con un sensor cuyo límite inferior es cercano a los 7,5 psu y otro cuyo límite es cercano a los 2 psu. Los datos de temperatura medidos fueron todos válidos, ya que el sensor es más robusto, a excepción de los casos en el que se identificó que estaba expuesto al aire. Los datos estimados de temperatura responden principalmente a los completados con los datos satelitales.

RESULTADOS

Base de datos generada

Hasta la fecha, se cuenta con un 80% de cobertura de datos entre el 28 de noviembre de 2018 y el 30 de abril de 2020, con una frecuencia de muestreo de 30 minutos. En la Figura 3 se observa la serie original de datos sin procesar (Figura 3a) y la serie de datos procesada, donde se aprecia el período de datos imputados a partir del registro satelital (Figura 3b). En las Figuras 3c y 3d se grafican las series de temperatura y salinidad, respectivamente, indicando la clasificación de calidad realizada para cada uno de los valores obtenidos de cada variable. En la Tabla 2 se presentan los estadísticos descriptivos de las series completas generadas. La temperatura media fue de 17,15 °C, tomando como referencia un año de datos; y el desvío estándar, de 4,41 °C, variando entre 8,76 y 27,20 °C. La salinidad media fue de 13,02 psu; y el desvío, de 6,07 psu, variando entre 0,009 y 29,33 psu (Tabla 2).

El ciclo diario de la serie completa de TSM se puede ver en la Figura 4, presentando una amplitud pico a pico de 1 °C, siendo el mínimo a las 8 y el máximo a las 17 horas. Primavera tiene la mayor amplitud de ciclo diario de temperatura, con 1,35 °C; luego siguen verano y otoño; mientras que invierno tiene la menor amplitud, con un valor de 0,65 °C, la mitad que durante primavera.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de las series completas de temperatura y salinidad en Isla de Flores

| | Media | Desvío estándar | Rango |
|------------------|-------|-----------------|--------------|
| Temperatura (°C) | 17,15 | 4,41 | 8,76 - 27,20 |
| Salinidad (psu) | 13,02 | 6,07 | 0,09 - 29,33 |

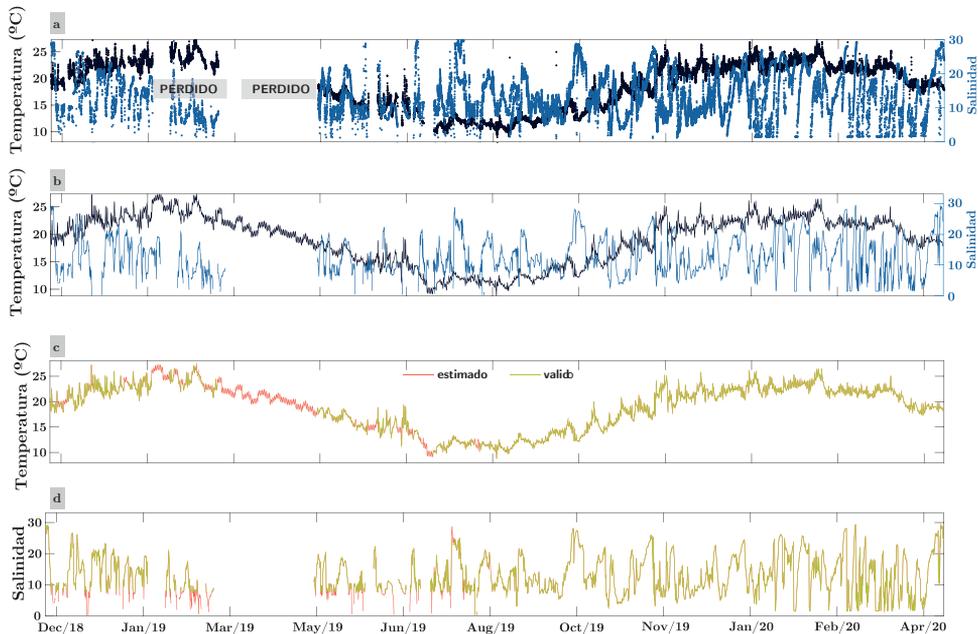


Figura 3. Serie temporal de temperatura y salinidad en Isla de Flores.
 a) Datos sin procesar con frecuencia de 30 min en el cual hay varios fuera de rango y duplicados. b) Datos procesados con frecuencia horaria, donde la temperatura fue completada con mediciones satelitales y el ciclo diario calculado en la Figura 4. En c) y en d) se presentan la temperatura y la salinidad respectivamente, indicando en verde los datos clasificados como datos válidos y en naranja los datos estimados.

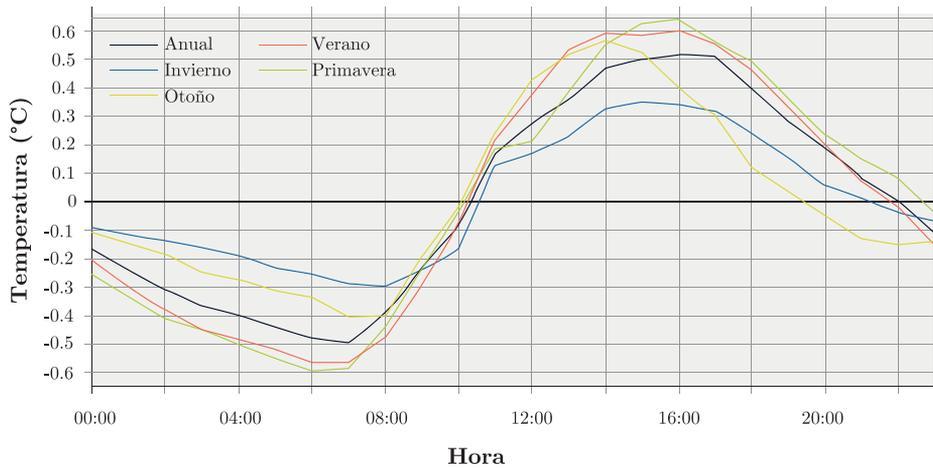


Figura 4. Ciclo diario de anomalía de temperatura superficial del mar en el Parque Nacional Isla de Flores a escala estacional y para todo el año.

Comparación con registro satelital

La serie de datos de temperatura *in situ* generada en paso temporal diario se muestra en la Figura 5, graficada junto a la serie histórica de temperatura obteni-

da a partir de datos satelitales para el punto de grilla más cercano a Isla de Flores. Se aprecia una alta correlación en el ciclo anual y la variabilidad diaria.

La correlación de la temperatura en el PNIF con el campo espacial de temperatura satelital tiene un R^2 de 0.98 en la región cercana a la isla, indicando una alta covariabilidad. Esta gran correlación nos permitió usar la serie satelital para completar la serie *in situ*. Al remover el ciclo estacional calculado a partir del registro histórico satelital, la correlación entre las anomalías diarias de las medidas *in situ* y satelitales tienen $R^2=0.65$. En ambos casos, la correlación es estadísticamente significativa. En la correlación con los datos sin remover el ciclo estacional se puede apreciar cuán representativa es la medida *in situ* dentro del estuario (Figura 6a). La misma caracteriza adecuadamente el ciclo estacional abarcando la costa de Montevideo, Canelones y en menor medida alguna porción de la costa de Maldonado (limitado hasta el balneario Solís), donde la medición representa un 96% de la varianza. Destacan la costa este de Montevideo y la mitad de Canelones hacia el oeste, donde representa el 98% de la varianza. Se destaca también la mayor correlación hacia el este con respecto al oeste, en la gran bahía que se forma entre Punta Carretas y Solís, en Maldonado. En el caso de la correlación con el ciclo estacional removido se visualiza otra estructura espacial (Figura 6b).

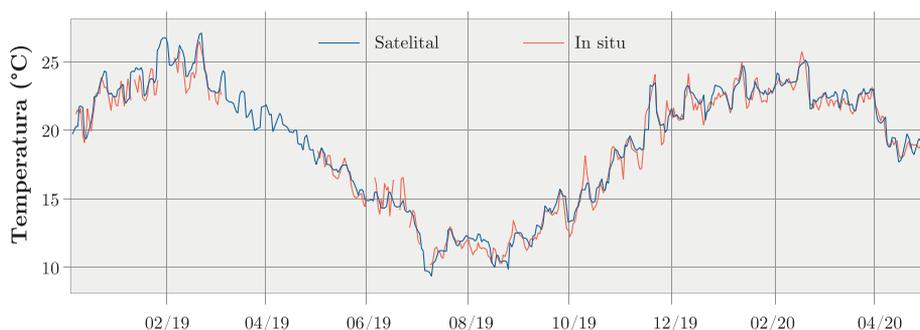


Figura 5. Serie temporal de temperatura superficial del mar a partir de mediciones satelitales diarias (azul) en Isla de Flores y promedios diarios de mediciones *in situ* (rojo) en el mismo punto.

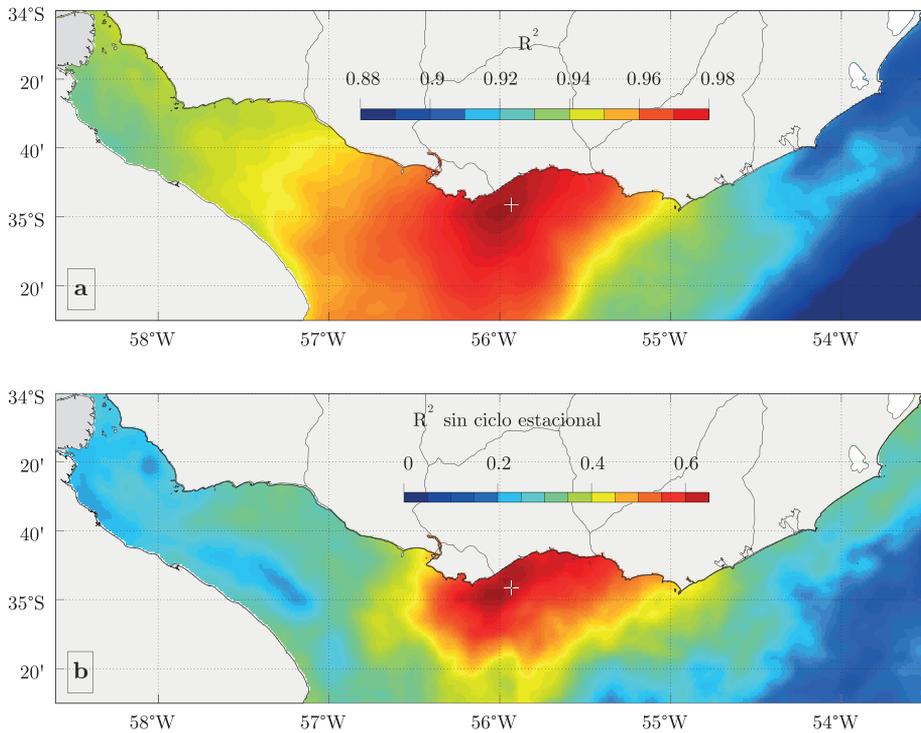


Figura 6. a) Coeficiente de determinación R^2 para el modelo de regresión lineal entre cada punto de grilla de los datos satelitales de temperatura superficial del mar (SST MUR 1 km) y los promedios diarios de temperatura medidos en el Parque Nacional Isla de Flores. La cruz blanca indica la posición de las mediciones *in situ*. b) Idem del anterior, pero removiendo el ciclo estacional en los datos.

DISCUSIÓN

Según el relevamiento bibliográfico realizado, es probable que esta base de datos constituya a nivel nacional uno de los registros más largos de las variables temperatura y salinidad medidos *in situ* de forma continua, en alta frecuencia y validados, para el Río de la Plata. La misma captura adecuadamente la variabilidad estacional y diaria de la TSM. La experiencia mostró que, para obtener un dato de salinidad fiable, es preciso que el mantenimiento de los equipos y la descarga de la información sea al menos cada 15 a 40 días, ya que los sedimentos del río obstruyen la celda de conductividad del sensor, perjudicando las mediciones. El tiempo que demora en comenzar la obstrucción depende de varios factores, como la estación del año, la profundidad a la que se encuentra el sensor o la circulación de agua que tiene. Esto se observa en la serie de datos como una deriva hacia valores y fluctuaciones de conductividad cada vez menores. Cabe mencionar que para obtener la información se requiere acceder al equipo y a la descarga de los datos utilizando equipamiento específico (computadora, un *datalogger* y *software*) y recursos humanos capacitados, lo cual se puede presentar como una dificultad a la hora de acceder a la información con la frecuencia sugerida para mejorar las mediciones de salinidad.

Aportes de la base de datos al monitoreo de procesos oceanográficos costeros

A partir de estas mediciones es posible identificar eventos de interés ambiental, como los eventos extremos de TSM, dentro de los cuales se destacan las olas de calor marinas, que pueden ser más intensas de lo que indica el registro satelital para esta región (Manta, et al., 2018). Otro evento de interés son las surgencias costeras. La surgencia, el afloramiento o el upwelling son términos utilizados para denominar al proceso oceanográfico que consiste en el movimiento de agua desde capas subsuperficiales hacia la superficie, lo cual favorece el aporte de nutrientes, determinando en general zonas altamente productivas de importancia pesquera (Kämpf y Chapman, 2016). Este proceso es consecuencia de la acción combinada de los vientos y la rotación de la Tierra (Tomczak, 1998). Existen varios trabajos que analizan la dinámica y las características de este tipo de eventos en la costa de Uruguay, utilizando distintos tipos de datos (Framiñan, et al., 1999; Pimenta, et al., 2008; Simionato, et al., 2010; Trinchin, et al., 2019); sin embargo, ninguno de ellos cuenta con series continuas medidas *in situ*.

En particular, en la serie que se presenta en la Figura 3b se aprecia el período comprendido entre el 25 de septiembre y el 10 de octubre de 2019, cuando ocurre un descenso pronunciado de temperatura que tiene asociado un aumento de salinidad. Este comportamiento es característico de lo que ocurre en eventos de surgencia, evidenciados en esta región a través de mediciones durante campañas oceanográficas (Pimenta, et al., 2008) y de análisis de modelación numérica (Mecchia, et al., 2013; De Mello, et al., en revisión). En la identificación de este tipo de fenómeno, los sensores satelitales son muchas veces limitantes en cuanto a resolución espacial y no logran captarlos, o los subestiman en intensidad (Meneghesso, et al., 2020), principalmente cuando no son muy intensos o están comenzando a desarrollarse. Por ello, las mediciones *in situ* continuas constituyen una fuente de información de gran utilidad para investigar las surgencias desde su inicio hasta alcanzar su máxima extensión e intensidad.

Los eventos de surgencia son posibles de identificar a partir de las series de datos de temperatura y salinidad generados en este trabajo. Estos se identifican en períodos donde se observa un aumento de la salinidad y una disminución de la temperatura, los cuales se pueden corroborar espacialmente en el registro satelital. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 7 el composite de anomalías de TSM entre los días 29 de septiembre y 1 de octubre de 2019, calculadas con respecto a la media móvil centrada de 30 días, utilizando los datos SST MUR 1 km (GHRSSST, Chin, et al., 2017). Allí se aprecia una región de menor temperatura respecto a las zonas aledañas, que ocurre principalmente desde Canelones hasta Punta del Este, o sea el patrón que caracteriza las surgencias estuarinas (Trinchin, et al., 2019). Cabe destacar la similitud del patrón con la Figura 6c. Esto convierte al PNIF en un punto estratégico para el monitoreo de este tipo de procesos oceanográficos. Por último, las mediciones *in situ* presentan una oportunidad para evaluar el rol que pueden tener la zona acuática del PNIF y la surgencia en la dinámica de especies que habitan la zona, en particular aquellas que son de interés comercial. Este tipo

de datos potencia la generación de información relevante para el diseño de medidas de manejo de los recursos y la conservación de las especies.

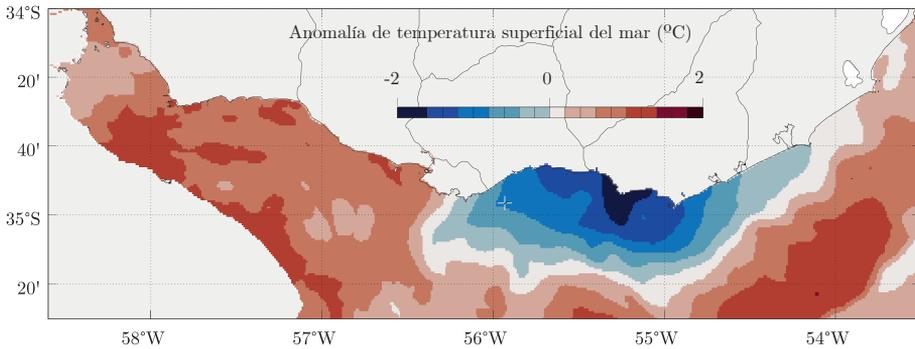


Figura 7. Composite de evento de surgencia estuarina entre el 29 de septiembre y 1 de octubre de 2019, visualizado espacialmente a partir de datos satelitales (SST MUR 1 km).

Este tipo de información generada también es un aporte importante para mejorar la comprensión de fenómenos meteorológicos locales tales como la brisa, popularmente conocida como virazón. La brisa marina es el viento generado por el calentamiento diferencial del agua y la tierra, que tiene consecuencias directas en las condiciones meteorológicas locales y en otros procesos como, por ejemplo, la retención de contaminantes en el aire (Simpson, 1994). Estudios locales de la brisa marina han evidenciado que representa un componente importante de los vientos en la costa. La brisa tiende a ser subestimada por los modelos numéricos atmosféricos, por lo que se necesitan mediciones locales de temperatura del agua y aire para su mejor comprensión (Manta, et al., en prensa).

La serie de datos generada abarca el período en que ocurrió el mayor evento de floración de cianobacterias en la costa uruguaya, que tuvo lugar a fines de enero y principios de febrero de 2019, alcanzando regiones como la costa atlántica de Rocha (Kruk, et al., 2019). Durante este evento se observó una caída en la salinidad y un aumento abrupto en la temperatura, consecuencia de la advección de aguas provenientes del estuario. En este sentido, contar con sensores para realizar mediciones continuas de temperatura y salinidad del agua resultan claves para continuar el estudio de estos eventos y lograr una mejor comprensión.

Aportes de la base de datos a compromisos internacionales y regionales

Este tipo de iniciativa se presenta como un desafío y una oportunidad para promover a nivel nacional otras iniciativas que aporten a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de Naciones Unidas; en particular al objetivo ODS 14, cobrando particular importancia en 2021-2030, cuando dará inicio la Década Internacional de las Ciencias Oceánicas promovida por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO. Esto busca potenciar internacionalmente las ciencias, con particular énfasis en la construcción de una base de datos científica abierta y accesible sobre

el océano, integrando datos e información fiable procedente de todos los océanos del mundo (Comisión Oceanográfica Intergubernamental, 2017). Esta iniciativa internacional se presenta como un marco para que los Estados Miembros, como lo es Uruguay a través de la Comisión Uruguaya de Oceanografía, coordinen y consoliden las observaciones e investigaciones que se necesitan para lograr el ODS 14.

Por otro lado, Uruguay es miembro de la Alianza Regional en Oceanografía para el Atlántico Sudoccidental Superior y Tropical (marzo 2005, OCEATLAN), liderada a nivel nacional por el Servicio de Hidrografía, Oceanografía y Meteorología de la Armada, y en la cual también participa la Universidad de la República a través de la Facultad de Ciencias. Esta alianza representa el esfuerzo regional de instituciones de Argentina, Brasil y Uruguay, empeñadas en la planificación y la implementación de un sistema oceanográfico operacional con el propósito de monitorear e investigar los procesos oceánicos (OCEATLAN, s.d.). Por medio de esta alianza Uruguay se comunica con el programa *Global Ocean Observing System* (GOOS, s.d.). Este programa de COI es un sistema colaborativo de observaciones oceánicas que se sustenta en una gran red internacional que integra observaciones *in situ*, satelitales, a los gobiernos, agencias de ONU y científicos de todo el mundo. En particular, las observaciones en red y la gestión de datos son coordinadas por la Comisión Técnica Conjunta de Oceanografía y Meteorología Marina, conformada por la COI y la Organización Meteorológica Mundial (OMM). Esta alianza se ha conformado recientemente para aumentar la generación de mediciones en el océano con el fin de fortalecer el conocimiento del sistema climático (Pinaridi, et al., 2019). En este contexto, iniciativas consolidadas que cuenten con apoyo gubernamental, como la descrita en este trabajo, además de ser un gran aporte para las ciencias oceánicas y ambientales a nivel nacional y regional, también constituirán un gran insumo para nutrir los programas y acuerdos internacionales a los que Uruguay ha adherido.

CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados surgen del trabajo colaborativo y coordinado entre la academia e instituciones del Estado para lograr un monitoreo continuo de variables oceanográficas en la costa de Uruguay. Se logró generar una serie temporal de salinidad sin precedentes que será de utilidad para ampliar la comprensión y el conocimiento de la dinámica de procesos oceanográficos en el Río de la Plata, los cuales aportarán a establecer medidas de gestión para la conservación de la fauna en un área marina protegida del SNAP, el Parque Nacional Isla de Flores. En cuanto a la temperatura, se logró evidenciar su alta correlación con un producto satelital particular, y se caracterizó el ciclo diario de temperatura. Combinando los datos *in situ* con los satelitales, es posible reconstruir una serie temporal horaria con un alto grado de confianza.

Los equipos utilizados, de bajo costo y fácil utilización, permitieron obtener mediciones muy confiables de temperatura; mientras que en el caso de la salinidad se obtuvo una serie de datos un poco menos confiable, pero de un importante valor. Los equipos de medición oceánicos suelen ser equipos de alto costo y requieren mantenimiento. Los equipos aquí utilizados son alternativas relativamente económicas que contemplan una adecuada relación calidad/precio. Proyectando

la continuidad del monitoreo a largo plazo, una alternativa es considerar la posibilidad de adquirir equipos más completos que puedan transmitir la información remotamente, de modo de poder incorporar un monitoreo en tiempo real por medio del cual se pueda acceder a la información a través de un sitio web. Asimismo, considerar la posibilidad de implementar un sistema en el que se puedan incorporar sucesivamente nuevos sensores que registren distintas variables físicas y biogeoquímicas, de modo de generar un monitoreo de diferentes variables ambientales que permitan alcanzar un monitoreo oceanográfico integral. En este sentido, a modo de consolidación de una estación de monitoreo permanente de las condiciones físico-químicas y biológicas en el Río de la Plata, el PNIF, además de constituir un sitio clave por su ubicación, también facilita la logística de amarre y el acceso de equipos. Además de las instituciones involucradas, se identifican al sector productivo pesquero, a la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, a la Universidad de la República y al Servicio de Hidrografía, Oceanografía y Meteorología de la Armada como actores relevantes que se beneficiarían de la continuidad y profundización de esta iniciativa.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Balizamiento de la Armada y a los fareros, por el apoyo logístico. A la Administración Nacional de Puertos (Ing. Fabián Barbato) por la disponibilidad de la información de altura del nivel del mar y vientos, generada por sus equipos instalados en el PNIF. Agradecemos especialmente a Irene Machado y Daniel Conde por el préstamo de sensores y equipo de descarga, y a Ernesto Brugnoli y Pablo Muniz (Sección de Oceanografía y Ecología Marina de la Facultad de Ciencias-UdelaR) por el préstamo del YSI castaway CTD para contrastar mediciones *in situ* en algunas de las obtenciones de datos. A Santiago de Mello por su invaluable ayuda en la instalación del sistema cachimba.

REFERENCIAS

- Acha, E.M., Mianzan, H., Guerrero, R.J.C., Giberto D., Montoya N. y Carignan M., 2008. An overview of physical and ecological processes in the Rio de la Plata Estuary. En: *Continental Shelf Research*, 28(13), pp.1579–1588. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.01.031>
- Bao, S., Wang, H., Zhang, R., Yan, H. y Chen, J., 2019. Comparison of satellite-derived sea surface salinity products from SMOS, Aquarius, and SMAP. En: *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 124(3), pp.1932-1944. <https://doi.org/10.1029/2019JC014937>
- Chin, T. M., Vazquez-Cuervo, J. y Armstrong, E.M., 2017. A multi-scale high-resolution analysis of global sea surface temperature. En: *Remote Sensing of Environment*, 200, pp.154-169. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2017.07.029>

Comisión Oceanográfica Intergubernamental, 2017. *El océano que necesitamos para el futuro que queremos: propuesta para una Década Internacional dedicada a las Ciencias Oceánicas para el Desarrollo Sostenible (2021-2030)* [En línea]. [s.l.]: UNESCO. [Consulta: 10 de junio de 2020]. Disponible en: https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247898_spa

De Mello, C., Barreiro, M., Ortega, L., Trinchin, R. y Manta, G. en prensa. Numerical study of upwelling along the Uruguayan coast: the role of wind forcing and bottom topography in upwelling mechanism En: *Regional Studies in Marine Science*.

Echevarría, L., Gómez, A., Gómez Erache, M. y Tejera, R., 2016. *La planificación espacial marina como herramienta de gestión*. Montevideo: Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República. (Interdisciplinarias 2015).

Framiñan, M.B., Etala, M.P., Acha, E.M., Guerrero, R.A., Lasta, C.A. y Brown, O.B., 1999. Physical characteristics and processes of the Río de la Plata estuary. En: Perillo, Gerardo M.E., Piccolo, María Cintia y Pino-Quivira, Mario, eds. *Estuaries of South America*. Berlín: Springer. pp.161-194. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60131-6_8

Fossati, M., Santoro, P., Mosquera, R., Martínez, C., Ghiardo, F., Ezzattib, P. y Piedra-Cueva, I., 2014. Dinámica de flujo, del campo salino y de los sedimentos finos en el Río de la Plata. En: *Ribagua*, 1(1), pp.48-63. [https://doi.org/10.1016/S2386-3781\(15\)30007-4](https://doi.org/10.1016/S2386-3781(15)30007-4)

GOOS, s.d. *Global Ocean Observing System* [En línea]. Paris: UNESCO. [Consulta: 30 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.goosocean.org/>

Guerrero, R.A., Acha, E.M., Framin, M.B. y Lasta, C.A., 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata Estuary, Argentina. En: *Continental Shelf Research*, 17(7), pp.727-742. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(96\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(96)00061-1)

Guerrero, R.A. y Piola, A.R., 1997. Masas de agua en la plataforma continental. En: Boschi, E.E., ed. *El mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 1. Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales* [En línea]. Mar del Plata: INIDEP. pp.107-118. [Consulta: 25 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.inidep.edu.ar/wordpress/?page_id=846

Guerrero, R.A., Piola, A.R., Molinari, G.N., Osiroff A.P. y Jáuregui, S.I., 2010. *Climatología de temperatura y salinidad en el Río de la Plata y su frente marítimo Argentina-Uruguay*. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). 95 p. ISBN 978-987-1443-03-1

- Jaureguizar, A.J., Menni, R., Bremec, C., Mianzan, H. y Lasta, C., 2003. Fish assemblage and environmental patterns in the Rio de la Plata estuary. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56(5-6), pp.921-933.
[https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(02\)00288-3](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00288-3)
- Kämpf, J. y Chapman, P., 2016. *Upwelling systems of the world*. Berna: Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-42524-5>
- Kruk, C., Martínez, A., de la Escalera, G. M., Trinchin, R., Manta, G., Segura, Á. M. y Gabito, L., 2019. Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. En: *INNOTECH*, (18), pp.36-68.
<https://doi.org/10.26461/18.06>
- Lercari, D. y Defeo, O., 2006. Large-scale diversity and abundance trends in sandy beach macrofauna along full gradients of salinity and morphodynamics. En: *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 68, pp.27-35. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.12.017>
- Manta, G., de Mello, S., Trinchin, R., Badagian, J. y Barreiro, M., 2018. The 2017 record marine heatwave in the Southwestern Atlantic Shelf. En: *Geophysical Research Letters*, 45(22), pp.12,449-12,456. <https://doi.org/10.1029/2018GL081070>
- Manta, G., Barreiro, M. y Renom, M., en prensa. Climatología de la brisa marina en Uruguay. En: *Meteorológica*.
- Martínez, A., Méndez, S., Fabre, A. y Ortega, L., 2017. Intensificación de floraciones de dinoflagelados marinos en Uruguay. En: *INNOTECH*, (13), pp.19-25.
<https://doi.org/10.26461/13.02>
- Meccia, V.L., Simionato, C.G. y Guerrero, R.A., 2013. The Rio de la Plata estuary response to wind variability in synoptic timescale: salinity fields and salt wedge structure. En: *Journal of Coastal Research*, 29(1), pp.61-77.
<https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-11-00063.1>
- Meneghesso, C., Seabra, R., Broitman, B.R., Wethey, D.S., Burrows, M.T., Chan, B.K. y Sousa, L.L., 2020. Remotely-sensed L4 SST underestimates the thermal fingerprint of coastal upwelling. En: *Remote Sensing of Environment*, 237, 111588. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111588>
- Merchant, C.J., Minnett, P.J., Beggs, H., Corlett, G.K., Gentemann, C., Harris, A.R. y Maturi, E., 2019. Global sea surface temperature. En: Hulley, Glynn C. y Ghent, Darren, eds. *Taking the temperature of the earth*. Amsterdam: Elsevier. pp.5-55. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01600-2>
- OCEATLAN, s.d. *Alianza Regional en Oceanografía para el Atlántico Sudoccidental Superior y Tropical (OCEATLAN)* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 10 de junio de 2020]. Disponible en: <http://www.oceatlan.org/>

- Ortega, L. y Martínez, A., 2007. Multiannual and seasonal variability of water masses and fronts over the Uruguayan shelf. En: *Journal of Coastal Research*, (233), pp.618-629. <https://doi.org/10.2112/04-0221.1>
- Paesch, L., Norbis, W. y Inchausti, P., 2014. Effects of fishing and climate variability on spatio-temporal dynamics of demersal chondrichthyans in the Río de la Plata, SW Atlantic. En: *Marine Ecology Progress Series*, 508, pp.187-200. <https://doi.org/10.3354/meps10878>
- Pimenta, F., Garvine, R.W. y Münchow, A., 2008. Observations of coastal upwelling off Uruguay downshelf of the Plata estuary, South America. En: *Journal of Marine Research*, 66(6), pp.835-872.
- Pinardi, N., Stander, J., Legler, D. M., O'Brien, K., Boyer, T., Cuff, T. y Burger, E., 2019. The Joint IOC (of UNESCO) and WMO collaborative effort for met-ocean services. En: *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00410>
- Piola, A.R., Matano, R.P., Palma, E.D., Möller, O.O. y Campos, E.J., 2005. The influence of the Plata River discharge on the western South Atlantic shelf. En: *Geophysical Research Letters*, 32(1). <https://doi.org/10.1029/2004GL021638>
- Santoro, P.E., Fossati, M. y Piedra-Cueva, I., 2013. Study of the meteorological tide in the Río de la Plata. En: *Continental Shelf Research*, 60, pp.51-63. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2013.04.018>
- SiMCosta, [s.d]. Portal SiMCosta [En línea]. [s.l.]: Portal SiMCosta. [Consulta: 30 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://simcosta.furg.br/home>
- Simionato, C.G., Dragani, W., Meccia, V. y Nuñez, M., 2004. A numerical study of the barotropic circulation of the Río de la Plata estuary: sensitivity to bathymetry, the Earth's rotation and low frequency wind variability. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61(2), pp.261-273. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.05.005>
- Simionato, C.G., Berasategui, A., Meccia, V.L., Acha, M. y Mianzan, H., 2008. Short time-scale wind forced variability in the Río de la Plata Estuary and its role on ichthyoplankton retention. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(2), pp.211-226. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.07.03>
- Simionato, C.G., Tejedor, M.L.C., Campetella, C., Guerrero, R. y Moreira, D., 2010. Patterns of sea surface temperature variability on seasonal to sub-annual scales at and offshore the Río de la Plata estuary. En: *Continental Shelf Research*, 30(19), pp.1983-1997. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.09.012>

- Simionato, C.G., Moreira, D., Piedra-Cueva, I., Fossati, M., Guerrero, R., De Los Campos, T. y Repecaud, M., 2011. Proyecto FREPLATA-FFEM modelado numérico y mediciones in situ y remotas de las transferencias de sedimentos finos a través del Río de la Plata Parte A: Adquisición de datos. En: *Frente Marítimo*, 22, pp.109-136.
- Soreide, N.N., Woody, C.E. y Holt, S.M., 2001. Overview of ocean based buoys and drifters: present applications and future needs. En: *MTS/IEEE Oceans 2001. An Ocean Odyssey. Conference Proceedings (IEEE Cat. No.01CH37295)*. Vol. 4. Nueva York: IEEE. pp.2470-2472. <https://doi.org/10.1109/OCEANS.2001.968388>
- Simpson, J.E., 1994. *Sea breeze and local winds*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Tomczak, M., 1998. *Shelf and coastal oceanography* [En línea]. Version 1.0. Adelaida: Flinders University of South Australia. [Consulta: 25 de marzo de 2020]. Disponible en: <http://www.mt-oceanography.info/ShelfCoast/>
- Trinchin, R., Ortega, L. y Barreiro, M., 2019. Spatiotemporal characterization of summer coastal upwelling events in Uruguay, South America. En: *Regional Studies in Marine Science*, 31, 100787. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100787>
- Uruguay. Administración Nacional de Puertos, s.d. *Mareógrafo* [En línea]. Montevideo: ANP. [Consulta: 8 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://mareografo.anp.com.uy/>
- Uruguay. Decreto 43/018, de 26 de febrero de 2018. Diario Oficial, 06 de marzo de 2018, No. 29.900, p. 15.

El aporte de la ciencia ciudadana para generar un monitoreo visual de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba, Argentina

The contribution of citizen science to generate a visual monitoring of cyanobacteria in Los Molinos reservoir, Córdoba, Argentina

A contribuição da ciência cidadã para gerar um monitoramento visual de cianobactérias no reservatório Los Molinos, Córdoba, Argentina

RECIBIDO: 21/4/2020 → APROBADO: 16/10/2020 ✉ raquel.bazan@unc.edu.ar

- ✉ BAZÁN, RAQUEL (1); COSSAVELLA, ANA (1); CALVIMONTE, HELENA (1) (2); DÍAZ LOZADA, JOSÉ (1)(5); GARCÍA, CARLOS MARCELO (1)(5); CARNICELLI, GABRIEL (2); CASAS, AGUSTINA (1); JOSE, GRETA (1); GERS CALAMUCHITA (3), ESCUELA ALFONSINA STORNI (4)
 (1) UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES. CÓRDOBA, ARGENTINA.
 (2) ADMINISTRACIÓN PROVINCIAL DE RECURSOS HÍDRICOS (APRHI), CÓRDOBA, ARGENTINA.
 (3) GRUPO ESPECIAL DE RESCATE Y SALVAMENTO (GERS), CALAMUCHITA. CÓRDOBA, ARGENTINA.
 (4) ESCUELA ALFONSINA STORNI, POTRERO DE GARAY. CÓRDOBA, ARGENTINA.
 (5) INSTITUTO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA (IDIT)-CONICET, RÍO CUARTO. CÓRDOBA, ARGENTINA.

RESUMEN

La ciencia ciudadana promueve la contribución activa de los ciudadanos en proyectos científicos a través de sus esfuerzos, conocimientos, herramientas y recursos. La comunidad que reside en cercanías de un embalse es quien sufre las principales consecuencias de las floraciones de cianobacterias, y suele poseer un conocimiento popular de la problemática y un gran entusiasmo en colaborar en tareas de investigación. En este trabajo se describe una iniciativa conjunta entre la comunidad, la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, el Grupo Especial de Rescate y Salvamento de Calamuchita y la Administración Provincial de Recursos Hídricos. Este trabajo incluye el monitoreo colaborativo de floraciones de cianobacterias en el embalse Los Molinos, una experiencia inédita en los embalses de la provincia de Córdoba (Argentina). Se describe la transparencia medida con disco de Secchi como un excelente indicador para uso recreativo. Se destaca la participación

de los alumnos de la escuela Alfonsina Storni, de Potrero de Garay, y el personal del Grupo Especial de Rescate y Salvamento, quienes reportan datos valiosos sobre el estado del embalse en relación con las floraciones de cianobacterias y transmiten a sus familias, compañeros de trabajo y comunidad los conocimientos co-construidos.

PALABRAS CLAVE: calidad de agua, uso recreativo, cianosemáforo.

ABSTRACT

Citizen science involves the participation of the entire community in scientific activities and promotes the active contribution of citizens in research projects through their efforts, knowledge, tools and resources. The community living nearby a reservoir suffers the main consequences of cyanobacteria blooms and usually has a popular knowledge of the problem and a great enthusiasm to collaborate in research tasks. This study describes a joint project between the community and the Faculty of Exact, Physical and Natural Sciences of the National University of Córdoba, the Special Rescue Group of Calamuchita and the Provincial Administration of Water Resources. This initiative includes the collaborative monitoring of cyanobacterial blooms in Los Molinos reservoir in an unprecedented experience in reservoirs in the province of Córdoba (Argentina). Secchi depth is described as an excellent indicator for recreational use. The participation of students of the Alfonsina Storni school in Potrero de Garay and of the Special Rescue Group of Calamuchita, who reported valuable data on the reservoir conditions in relation to cyanobacterial blooms and transmit the main results and conclusions to their families, coworkers and the whole community, is here underscored.

KEYWORDS: water quality, recreational use, cyanosemaphore.

RESUMO

A ciência cidadã promove a contribuição ativa dos cidadãos em projetos científicos através de seus esforços, conhecimentos, ferramentas e recursos. A comunidade que reside nas proximidades de um reservatório sofre as principais consequências das florações de cianobactérias e geralmente possui um conhecimento popular da problemática e um grande entusiasmo em colaborar nas tarefas de pesquisa. Este trabalho descreve uma iniciativa conjunta entre a comunidade e a Faculdade de Ciências Exatas, Físicas e Naturais da Universidade Nacional de Córdoba, o Grupo Especial de Resgate e Salvamento de Calamuchita e a Administração Estadual de Recursos Hídricos. A iniciativa inclui o monitoramento de florações de cianobactérias no reservatório Los Molinos, Córdoba-Argentina. A transparência medida do disco de Secchi é descrita como um excelente indicador para uso recreativo. Destaca-se a participação de alunos da escola Alfonsina Storni em Potrero de Garay e os funcionários do Grupo Especial de Resgate e Salvamento, os quais relatam dados valiosos respeito do estado do reservatório em relação às florações de cianobactérias e transmitem o conhecimento co-construído a suas famílias, colegas de trabalho e comunidade.

PALAVRAS-CHAVE: qualidade da água, fins recreativos, cianosemáforo.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos fotoautótrofos que crecen en aguas ricas en nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno), y representan un problema cuando se multiplican rápidamente, dando origen a una floración. Generalmente, esto ocurre en aguas cálidas, de escaso movimiento y como consecuencia del proceso de eutrofización. Cuando se forma una floración de cianobacterias, a menudo el agua cambia de color, observándose un verde intenso que muchas personas describen como similar a una “mancha de pintura”, y además se percibe un olor desagradable. El potencial impacto de las cianobacterias se encuentra relacionado a la salud pública, a la biodiversidad y a la problemática ambiental, y trae aparejado pérdidas económicas (UNESCO, 2009; Chorus y Bartram, 1999). Particularmente, en el embalse Los Molinos (ELM), Bazán y otros (2014) y Cossavella (2003) han mencionado que el aporte de líquidos residuales provenientes de complejos turísticos, clubes y asentamientos de la cuenca (sin adecuado tratamiento); el mal manejo de suelos; la quema de pastizales y del monte serrano; así como las escorrentías agrícolas y ganaderas provenientes del área de aporte, contribuyen al deterioro de la calidad del agua del embalse. Tal deterioro ha sido observado por parte de la población de Potrero de Garay, quien manifestó su preocupación a fines de 2017 tras recibir agua de coloración verdosa y desconocer si podía ser usada para fines domésticos y/o consumo. Esta situación local no es ajena a la problemática global de la eutrofización que diversos autores (Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, Dirección Nacional de Determinantes de la Salud, 2017; UNESCO, 2009; Codd, et al., 1999; Amé, et al., 2010; Galanti, et al., 2013) señalan como una amenaza para la salud pública debido a las actividades de recreación y consumo de agua humana, como una preocupación ambiental por el efecto de bioacumulación de cianotoxinas y como una pérdida económica por afectar el turismo, el valor paisajístico y la pesca. Dichas consecuencias del problema de eutrofización y el logro de una red de trabajo interinstitucional creada durante dos décadas de monitoreo ininterrumpido en el ELM fueron los principales motivos que originaron el presente trabajo.

Desde el año 1999, en el ELM se realiza un Programa de Monitoreo Permanente de Calidad de Agua, conducido por la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (FCEFYN), con el valioso apoyo de la Administración Provincial de Recursos Hídricos (APRHI), el Grupo Especial de Rescate y Salvamento (GERS), de Calamuchita y la empresa Aguas Cordobesas S.A., como actual concesionaria de la provisión de agua potable para la ciudad de Córdoba. A pesar de los grandes esfuerzos que llevan a cabo las instituciones intervinientes, la distribución espacial y temporal en que se manifiestan las floraciones, sumado a que las instituciones involucradas en el programa no pueden arribar rápidamente al área de estudio, resulta dificultoso el registro, la caracterización y el estudio de todas las floraciones que ocurren en el ELM. Una manera novedosa de resolver las dificultades mencionadas es involucrar a los lugareños en el monitoreo visual de floraciones de cianobacterias a través un proyecto de ciencia ciudadana.

La ciencia ciudadana permite a la sociedad avanzar en una mejor comprensión del entorno, o de los riesgos ambientales, y a menudo conlleva una mayor implicación en la conservación del ambiente y el empoderamiento de los ciudadanos. Por lo tanto, beneficia tanto al colectivo científico como a la ciudadanía (Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales, s.d.). Paul y otros (2018) definen como ciencia ciudadana a la participación del público en general en distintas etapas de los proyectos de investigación que involucran la recolección, la interpretación y el análisis de datos. Los proyectos de ciencia ciudadana se han implementado en distintas disciplinas como, por ejemplo, en ciencias de la salud (Swan, 2012), en ecología (Kobori, et al., 2016; Silvertown, 2009) y en otras ciencias ambientales como la geomorfología (Behrens, et al., 2009) y la hidrología (Le Coz, et al., 2016). Los proyectos que involucran a los ciudadanos como participantes están en auge en la actualidad, aunque las raíces de la ciencia ciudadana se remontan a los comienzos de la ciencia moderna (Silvertown, 2009). Este auge está beneficiado por los acelerados desarrollos tecnológicos de instrumental de bajo costo y de fácil uso que están a disposición de los ciudadanos, y por la utilización de las redes sociales que permiten reportar rápidamente las observaciones (Le Coz, et al., 2016). En particular, para el seguimiento y monitoreo de cianobacterias, en el año 2013, el Laboratorio de la Región de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Comisión Interestatal de Control de la Contaminación del Agua de Nueva Inglaterra invitaron a profesionales científicos, ciudadanos sin formación científica y profesionales del agua capacitados a llevar a cabo un Monitoreo de Cianobacterias Colaborativo denominado CMC, según NALMS (s.d.) y USEPA (2017).

El monitoreo visual de un cuerpo de agua es una herramienta útil ya que genera información valiosa en tiempo real para el seguimiento de la calidad del agua, brindando datos complementarios a los generados en los muestreos programados. Su fortaleza radica en que posibilita el involucramiento de la ciudadanía, la cual se convierte en una parte fundamental de la investigación, ayudando a la prevención y la comunicación de los riesgos de las floraciones de cianobacterias, ya que muchas veces están visibles en un periodo corto de tiempo y en lugares determinados, ampliando así la cobertura de la vigilancia (Matthews, et al., 2018). La propuesta inédita para los embalses de Córdoba surge en el contexto de dos proyectos de compromiso social estudiantil de FCEFyN, denominados CYANO (Control y Alerta de Niveles Observados de Cianobacterias) y MATTEO (Monitoreo Automático del Tiempo en Escuelas y Organismos). La misma se originó para dar respuesta a una preocupación de la población de la localidad de Potrero de Garay y de algunos representantes del Grupo Especial de Rescate y Salvamento (GERS) de Calamuchita, quienes presentaron irritación en la piel y/o problemas gastrointestinales luego de tener contacto directo con el agua durante su entrenamiento físico o de rescate acuático como parte de su labor profesional cotidiana. Ambos proyectos de compromiso social estudiantil trabajaron en conjunto con la escuela Alfonsina Storni de Potrero de Garay para llevar a cabo las tareas de recopilación y registro de datos, y de educación y concientización sobre la problemática ambiental de las cianobacterias. Los participantes ciudadanos realizaron diferentes actividades relacionadas a la recopilación, el diseño y el análisis preliminar de los datos, por

lo que se encuadra como un proyecto de ciencia ciudadana colaborativo (Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales, s.d.). El objetivo principal de este trabajo es presentar el desarrollo de un monitoreo visual de floraciones de cianobacterias mediante un proyecto educativo y de ciencia ciudadana con el fin de contribuir a una nueva cultura científica y a un escenario en red transdisciplinario y multisectorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El ELM, construido en el año 1953, se encuentra ubicado en el Valle de Los Reartes, en el límite de los departamentos Santa María y Calamuchita (31° 43' 30" S y 64° 32' 20" W); a 65 km al sudoeste de Córdoba capital, y su principal vía de acceso es la ruta provincial N°5. El ELM posee un volumen de 307 hm³ a cota de vertedero, localizado a 53 metros desde la base de la presa, con una profundidad media de 14 metros. En estas condiciones, la superficie inundada es de 24,5 km². La cuenca de aporte de dicho embalse es de 978 km² (Bazán, 2006). El ELM posee usos múltiples y es el segundo más grande de la provincia de Córdoba, Argentina. Es considerado uno de los atractivos turísticos más importantes de la provincia y en los últimos años se promueve como un lugar privilegiado para el desarrollo de diversas actividades náuticas (kitesurf, esquí, wakeboard, kayak, vela, pesca deportiva) y como oferta de diferentes productos inmobiliarios. Además, en sus costas se ofrecen diversos servicios tales como guardería de lanchas, escuelas de kitesurf, cabalgatas, restaurantes y confiterías con vistas al embalse. Se encuentra rodeado por cuatro comunas principales: Los Reartes, Ciudad Parque Los Reartes, Villa Ciudad de América y Potrero de Garay. Las mismas cuentan con una población de: 1.426, 1.165, 765 y 1.323 habitantes, respectivamente. En la última década, las cuatro comunas del perillago han mostrado un progresivo crecimiento y, particularmente Potrero de Garay ha alcanzado una población de 5.000 habitantes permanentes. Dicha población permanente llega a triplicarse durante el periodo estival debido a la intensa actividad turística. Este patrón de crecimiento de la población no permanente durante el verano es similar en todas las comunas de la cuenca del ELM. Se destaca que, de las cuatro comunas del perillago, Potrero de Garay distribuye agua directamente desde el ELM sin un previo tratamiento de potabilización. Las restantes comunas se proveen de agua subterránea. Por otro lado, el ELM representa la segunda fuente de abastecimiento para el 30% de la población de la zona centro y sur de la ciudad de Córdoba (500.000 habitantes). No obstante, se destaca que debido al sistema de conducción a canal abierto y por el recorrido que hace el agua desde el ELM, pasando de un sistema léntico a uno lóxico en el canal Los Molinos-Córdoba, las floraciones de cianobacterias no han representado hasta ahora un problema para la ciudad de Córdoba (Bazán, et al., 2018).

Uno de los actores sociales en territorio que participó en el proyecto es el GERS de Calamuchita, compuesto por agentes de la policía provincial altamente entrenados y capacitados en temas relacionados con búsqueda y rescate en áreas

de difícil acceso (terrestre, acuático, en alturas y espacios confinados), navegación en el mar, búsqueda de artefactos explosivos y negociaciones en situaciones críticas. La base del GERS de Calamuchita durante el monitoreo visual de cianobacterias se ubicó en el club APYCAC, situado en la comuna de Villa Ciudad de América. Actualmente, se ha trasladado a la localidad de Potrero de Garay. El otro actor social que participó del proyecto es la escuela primaria Alfonsina Storni, ubicada en el polo educativo de Potrero de Garay. Dicha institución educativa pertenece al sector público y responde a una alta demanda por parte de las familias de localidades cercanas, entre ellas: Los Espinillos (10 Km), Paso de La Pampa (8 Km) y Villa Ciudad de América (15 Km). Asiste un total 204 alumnos (entre 5 y 12 años de edad), distribuidos en 9 secciones: de 1° a 6° en el turno mañana y 1°, 2° y 4° grado en la tarde. Cuenta con jornada extendida en el campo de las ciencias, educación artística, literatura y TICs. La comunidad educativa incluye además de los estudiantes, 14 docentes, 7 no docentes, 1 administrativo y 1 directivo. Un actor social que surgió de manera indirecta y que participó del proyecto es el cuerpo de Bomberos Voluntarios de Potrero de Garay. La articulación con ellos fue llevada a cabo desde la escuela Alfonsina Storni, la cual provee los datos de la estación meteorológica instalada en la escuela por el proyecto MATTEO. Diariamente la escuela envía por mensaje de WhatsApp una foto del visor de la estación meteorológica donde se especifican los datos medidos de temperatura ambiente, velocidad del viento, lluvia acumulada, humedad y presión atmosférica. Con esos datos, los bomberos elaboran el riesgo de incendios para la localidad. El segundo actor indirecto que surgió durante el desarrollo del proyecto fue Seguridad Náutica, quien tiene como función regular y fiscalizar las normas y disposiciones que disciplinan a la actividad náutica en aquellas jurisdicciones en que la provincia ejerce el poder de policía, incluyendo las actividades comerciales, deportivas, turística, industriales y/o particulares (Gobierno de la Provincia de Córdoba, 2020a). La Figura 1 muestra un diagrama de los actores sociales en territorio, acciones y relaciones del Proyecto CYANO, como así también las variables medidas y registradas durante el monitoreo visual de floraciones de cianobacterias.

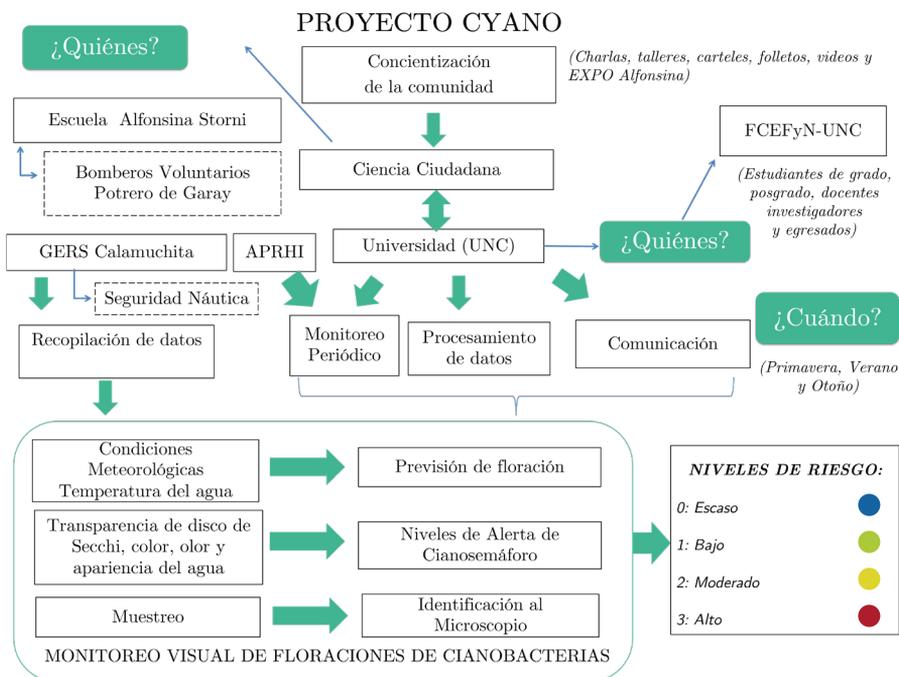


Figura 1. Diagrama de participantes, acciones y relaciones del Proyecto CYANO, especificando las variables medidas para el monitoreo visual de cianobacterias. En el recuadro de línea gruesa se destacan los actores directos y en líneas de puntos los indirectos.

Concientización y educación

En el presente trabajo, los estudiantes de 3°, 4° y 5° año de ingeniería química y ambiental, egresados y docentes de la FCEFYN brindaron dos charlas interactivas de concientización a los estudiantes y padres de la escuela Alfonsina Storni y al personal de GERS para presentar la problemática ambiental de eutrofización, cianobacterias y su influencia en la salud. Al final de las charlas se abrió un espacio de debate para plantear dudas y que los participantes cuenten sus experiencias sobre el embalse y las cianobacterias. Mediante este proceso, el grupo de investigación tomó conocimiento del saber popular con el que contaba la comunidad educativa y el personal del GERS.

Por otra parte, en la escuela Alfonsina Storni se brindaron dos talleres a estudiantes de 6° grado (de 11 y 12 años), orientados a desarrollar la habilidad de observación, medición y registro de datos con el fin de que comenzaran a registrar los datos de la estación meteorológica y la coloración del agua observada por ellos y/o sus padres. Durante uno de los talleres se abordó el concepto de cuenca y se motivó a los estudiantes a identificar las diferentes fuentes de aporte de nutrientes al embalse. Posteriormente, se realizó una mesa de debate donde los estudiantes del nivel primario plantearon su inquietud sobre el potencial riesgo en relación con el uso recreativo en las costas del embalse, y la necesidad de que la población tome conocimiento de la problemática de las cianobacterias. Al final de la mesa, se

acordó realizar un reconocimiento de las costas y divulgar los datos medidos en un pizarrón doble colocado en la puerta de la escuela, además de confeccionar folletos informativos sobre las cianobacterias y los cuidados a tener en el uso recreativo. Para la confección de los trípticos de divulgación, tanto los docentes de la escuela primaria como los estudiantes realizaron una búsqueda bibliográfica y revisión de antecedentes. Para el relevamiento de las costas se llevó a cabo un recorrido de unos 800 metros sobre la costa noroeste, entre las desembocaduras de los ríos San Pedro y Los Espinillos. Los estudiantes compartieron su saber popular sobre los eventos recreativos que organiza el municipio y los estudiantes de la FCEFyN les enseñaron cómo miden los parámetros de calidad de agua (temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto) con una sonda multiparamétrica Horiba U-10, durante los muestreos mensuales. Los niños tomaron notas de las mediciones efectuadas en sus cuadernos, y en un mapa del embalse (provido por los directores del proyecto CYANO) se identificaron los sitios donde se llevan a cabo actividades turísticas y de recreación. Se tomaron muestras de agua del embalse en frascos de vidrio de 350 mL para diferenciar el color y aspecto del agua con el fin de iniciar el entrenamiento en el reconocimiento macroscópico de las floraciones de cianobacterias. Durante el relevamiento, bajo la supervisión de los directores del proyecto, los escolares mantuvieron una comunicación mediante videollamada de WhatsApp con estudiantes de otra escuela primaria (Dr. Amadeo Sabattini), donde también se desarrolla el proyecto MATTEO. La escuela Sabattini es un establecimiento educativo rural al cual asisten 25 estudiantes, de entre 5 y 11 años. Dicha escuela se ubica alejada a la presa del embalse San Roque, la principal fuente de abastecimiento de la ciudad de Córdoba. Los estudiantes compartieron sus experiencias en los dos proyectos de ciencia ciudadana. Posteriormente, los alumnos de la escuela Alfonsina Storni visitaron el establecimiento educativo Dr. Amadeo Sabattini y entregaron los folletos de divulgación que habían realizado junto a las docentes de primaria. Las actividades realizadas entre los dos establecimientos educativos fueron pensadas como una forma de buscar y reconocer, en el encuentro entre pares, similitudes y diferencias respecto a cómo se abordó el estudio de una misma problemática en dos embalses diferentes. Al concluir el primer año del proyecto, se organizó una visita a la FCEFyN por parte de los estudiantes, docentes, personal administrativo y directivos de la escuela Alfonsina Storni. Durante el recorrido, se incluyó la visita al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Química Industrial y Aplicada para observar las cianobacterias en microscopio, y continuar con el entrenamiento visual macroscópico para distinguir los diferentes niveles del cianosemáforo con muestras preparadas *ad hoc* a partir de una floración. Los participantes del proyecto observaron en microscopio una muestra de agua proveniente de una floración de cianobacterias del embalse San Roque (debido a que en esa oportunidad Los Molinos se encontraba sin floración). Además, se prepararon diluciones seriadas de la muestra para simular el aspecto de las cianobacterias, según los cuatro niveles de riesgo del cianosemáforo. A partir de la muestra de agua del embalse, se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 para representar el nivel de riesgo moderado y bajo. La muestra sin diluir representó el nivel alto y el blanco se preparó con agua

destilada representando el nivel escaso. El procedimiento empleado fue idéntico al utilizado para la observación *in vivo* de la muestra tomada en el club APY-CAC durante el monitoreo mensual de febrero 2020; para lo cual se tomó una alícuota del sobrenadante con pipeta p-50, se agregó una gota en un portaobjeto y se colocó por encima un cubreobjeto. Se procedió a la observación del sobrenadante microscopio Leica DM 500 con un aumento de 40x.

Para el personal del GERS se realizaron dos talleres participativos, el primero de ellos orientado a la concientización del riesgo sanitario al que se encuentra expuesto el personal de dicha institución por efectuar actividades laborales en el embalse. Al final del taller se abrió un espacio de debate para responder dudas y/o comentarios de los asistentes. El segundo taller se enfocó en el reconocimiento macroscópico de las floraciones de cianobacterias, el registro de datos y las mediciones *in situ* de temperatura y transparencia con disco de Secchi. Durante el taller se proyectó un video de 4 minutos de duración, elaborado por los estudiantes de ingeniería química y ambiental bajo la supervisión de los directores del proyecto CYANO, sobre el reconocimiento macroscópico de las cianobacterias y las variables a medir durante el monitoreo visual. Dicho video educativo se difundió como una herramienta digital asincrónica para capacitar al personal del GERS. Cabe destacar que el GERS participa activamente de los muestreos mensuales que se llevan a cabo en el ELM, y ha sido entrenado progresivamente en la toma de muestras, registro de datos y mediciones *in situ* desde hace 5 años.

Estación meteorológica y registro de datos

El proyecto MATTEO instaló en mayo de 2019 una estación meteorológica marca Link Made, modelo WH1081, en la escuela Alfonsina Storni. La estación cuenta con sensores para medir temperatura interna y externa, humedad interna y externa, velocidad del viento, lluvia acumulada y presión atmosférica. Al inicio de cada turno, los estudiantes de 4° y 6° grado llevaron a cabo la lectura de los datos de la estación y luego los registraron en un cuaderno destinado a tal fin. Se construyeron tablas en las hojas del mismo, cada variable se colocó en las columnas y el registro diario se escribió en las filas. Se agregó una columna adicional para registrar el color del agua. Este dato fue aportado diariamente por los estudiantes y padres que viven o transitan contiguo al embalse y se comparó con el color observado por el personal del GERS de Calamuchita durante el monitoreo visual.

Monitoreo visual

El monitoreo visual de floraciones de cianobacterias se llevó a cabo de octubre 2019 a marzo 2020, en 13 sitios de muestreo (Figura 2). Previamente, se seleccionaron las variables a medir y registrar por el personal del GERS de Calamuchita, para lo cual se creó un formulario digital mediante Google Forms.

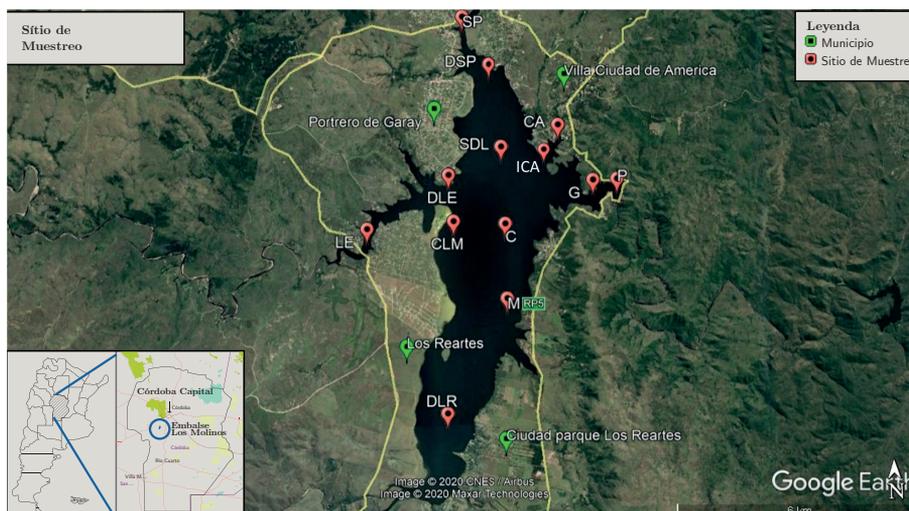


Figura 2. Ubicación relativa del embalse Los Molinos, Córdoba-Argentina y geoubicación de los sitios de muestreo (en rojo): Centro (C), Club Apycac (CA), Costa Los Molinos (CLM), Desembocadura Los Espinillos (DEL), Desembocadura Los Reartes (DLR), Desembocadura San Pedro (DSP), Garganta (G), Ingreso club Apycac (ICA), Los Espinillos (LE), Molvento (M), Presa (P), San Pedro (SP), Solar del Lago (SDL)y comunas del perilago (en verde).

Se incluyeron variables cuantitativas medidas *in situ*: temperatura del agua y transparencia de disco de Secchi. Además, se registraron variables cualitativas y sus diferentes estados para describir las condiciones del tiempo, entre ellas nubosidad (despejado, parcialmente nublado, nublado), viento (moderado, intenso, brisa suave). Además, se incluyó turbidez del agua (debido a cianobacterias o inorgánica causada por material en suspensión aportado por crecientes, cenizas u otros), aspectos de las cianobacterias (no visibles, en suspensión fina, “pinceladas”, natas y/o espumas espesas) y la presencia o ausencia de ejemplares de peces muertos (Figura 3). El aspecto de las cianobacterias y las coordenadas geográficas se registraron fotográficamente con el celular utilizando Angle Cam App o Google Maps. Estas fotos fueron adjuntadas al formulario de Google. Los datos recopilados por el personal del GERS de Calamuchita se registraron durante recorridos de rutina en el ELM con una frecuencia diaria, cada dos o tres días y/o semanal.

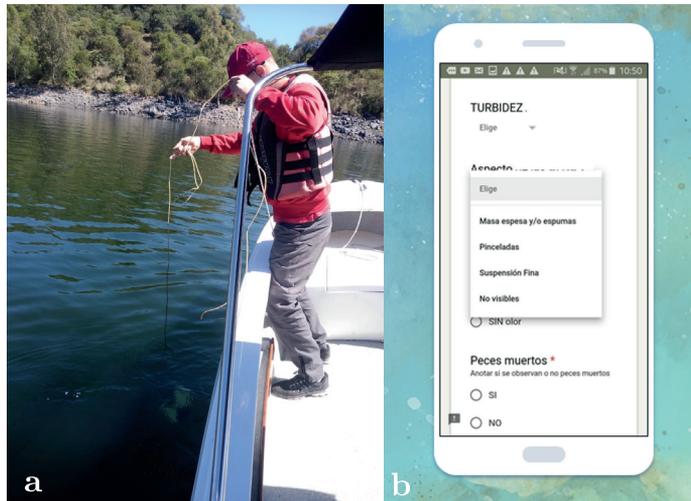


Figura 3. a) Medición de transparencia con disco de Secchi por personal del GERS de Calamuchita. b) Ilustración en el celular de una parte del formulario Google Forms del monitoreo visual de cianobacterias en el ELM.

Análisis e interpretación de los datos recopilados con Google Forms

El análisis de la calidad y la interpretación de los datos fueron realizados por los directivos del proyecto CYANO. Los datos recolectados se descargaron en formato de Microsoft Excel. A esta base se incorporaron los datos provistos por la estación meteorológica. Además, se incluyó el nivel del embalse publicado por el Gobierno de la Provincia de Córdoba (2020b). Se realizó un análisis de todas las variables y por comparación visual se asignó el nivel de riesgo según el cianosemáforo desarrollado por el Ministerio de la Salud de la Nación Argentina (Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, s.d.). Dicho cianosemáforo identifica los colores verde, amarillo y rojo a niveles de riesgo bajo, moderado y alto, respectivamente. En el presente trabajo se adaptó dicho cianosemáforo adicionando un nivel, al cual se le asignó el color azul, cuando hay ausencia de cianobacterias y en consecuencia el riesgo es considerado “escaso” (Tabla 1).

Tabla 1. Adaptación del cianosemáforo (Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, s.d.), color, nivel, aspecto del agua y recomendaciones sugeridas para cada nivel de riesgo.

| Color | Nivel de Riesgo | Aspecto del Agua | Recomendaciones |
|---|-----------------|--|--|
|  | Escaso | Limpio, sin floraciones. | Puede utilizarse el agua para fines recreativos. |
|  | Bajo | Sobre la superficie del agua aparecen pequeños cúmulos similares a “yerba dispersa”. | Si decide bañarse, enjuáguese después y lávese las manos. No consuma el agua. Mantenga alejados a niños y mascotas. |
|  | Moderado | Masa verde brillante de cianobacterias sobre la superficie, similar a una mancha de pintura. | Evite el contacto con las manchas de cianobacterias. Si lo tuvo lávese con agua limpia lo antes posible. Mantenga alejados a niños y mascotas. |
|  | Alto | Si en el agua o en la orilla se observa una masa verde oscura que aparenta una nata “espesa” | No entre al embalse ni consuma el agua. Aleje de la costa a los niños y mascotas. |

Comunicación

Los datos recopilados por los actores sociales en territorio (GERS Calamuchita y Escuela Alfonsina Storni) fueron comunicados a los proyectos de compromiso social estudiantil a través de un grupo de WhatsApp denominado Proyecto CYANO. Participan del mencionado grupo los jefes de guardia del GERS Calamuchita, técnicos del APRHI, el responsable de Seguridad Náutica, maestras de 4° y 6° grado y personal administrativo de la Escuela Alfonsina Storni, tutores docentes y estudiantes de la FCEfYn-UNC y directores de los proyectos CYANO y MATTEO. La Escuela Alfonsina Storni utiliza diferentes herramientas de comunicación interna y externa para difundir los datos recopilados. Diariamente, los estudiantes comunican los datos medidos por la estación meteorológica al iniciar la jornada educativa en cada turno (mañana y tarde). Entre las herramientas externas de comunicación empleadas se menciona que:

- El personal administrativo de la escuela comparte diariamente una fotografía del visor de la estación meteorológica con los Bomberos Voluntarios de Potrero de Garay.
- La misma fotografía y el dato del color del agua es enviado al grupo de WhatsApp del Proyecto CYANO.
- La temperatura ambiente y el porcentaje de humedad se indican en carteles con forma de termómetro y un gráfico de torta (construidos junto con la docente de Artes Plásticas). Los carteles fueron colocados al ingreso de la escuela para ser observados por padres y estudiantes.

- d) El riesgo de incendio proporcionado por los Bomberos Voluntarios de Potrero de Garay es indicado en un cartel de colores también al ingreso de la escuela.
- e) Los estudiantes escriben con tiza en un pizarrón doble faz los datos de temperatura ambiente, humedad, coloración del agua y nivel del riesgo de incendio, el cual es colocado en la vereda de la escuela para compartir la información con la comunidad de la localidad.
- f) Los estudiantes divulgan lo aprendido sobre qué son las cianobacterias y cómo su aparición afecta en los diferentes usos del agua durante su muestra anual denominada “Expo Alfonsina”.

Por último, el nivel de riesgo por floraciones de cianobacterias fue comunicado por los directores del proyecto CYANO al grupo de WhatsApp homónimo. Para los casos en que el nivel de riesgo fue moderado (amarillo) y/o alto (rojo), se comunicó vía llamada telefónica o mensaje de WhatsApp a los tomadores de decisión del gobierno provincial y comunal, y al responsable de la planta potabilizadora Los Molinos.

Un resumen de la metodología desarrollada se presenta en la Figura 4, donde se observa que el proceso diseñado es de retroalimentación positiva enfocado en la mejora continua.

Ciencia Ciudadana Paso a Paso

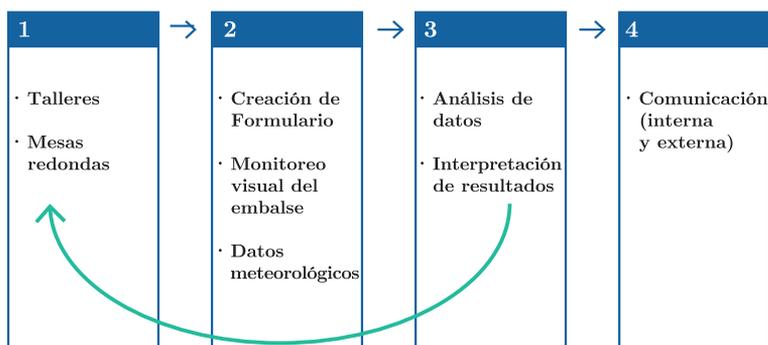


Figura 4. Proceso de creación y ejecución del monitoreo visual de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba-Argentina: Ciencia ciudadana en 4 Pasos.

Procesamiento de datos

Se realizó un análisis de la distribución espacial de las cianobacterias monitoreadas visualmente contabilizando la cantidad de muestreos en cada sitio. Además, se graficaron los porcentajes de ocurrencia de los diferentes niveles de riesgo en cada sitio monitoreado. Entre las variables medidas, se eligió la transparencia medida por la profundidad del disco de Secchi por ser un indicador de calidad del agua para uso recreativo, según lo descrito por Chorus y Bartram (1999). Se correlacionó la temperatura del agua con la transparencia y se estableció gráficamente una línea de corte a los 2 metros, el cual es coincidente con un estado trófico de eutrofia,

según Carlson (1977). En una primera instancia, los datos fueron ordenados en una planilla de Microsoft Excel 2010 y analizados utilizando el Software estadístico Infostat versión 2008 (Di Rienzo, et al., 2008). Se calcularon los valores medios y desvíos de las variables por nivel de riesgo y se aplicó análisis discriminante (AD). El criterio de agrupación fue el nivel de riesgo (escaso, bajo, moderado y alto). En el AD se suprimió el nivel de riesgo “alto”, dado que es una condición del software Infostat que exista más de un dato en cada grupo, y se contó con un único registro de nivel alto.

RESULTADOS

La herramienta de Google Forms resultó ser efectiva para recopilar los datos registrados por el personal del GERS. Utilizando dicho formulario durante el periodo monitoreado, se obtuvieron 44 registros en los 13 sitios de muestreo distribuidos en el embalse.

La distribución espacial de los diferentes niveles de riesgo se muestra en la Figura 5 como porcentaje de ocurrencia. Se observa que en la zona sur del embalse, los sitios correspondientes a la Desembocadura Los Reartes (DLR) y Molvento (M) presentaron la mayor frecuencia de floración. Otros sitios que registraron floraciones de cianobacterias fueron la Presa (P) y Centro (C) del embalse y la bahía del Club Apycac (CA). Este último fue el único que registró un nivel de riesgo alto (rojo) durante el mes de febrero 2020. Dicho registro coincidió con el monitoreo mensual programado para el ELM y los datos se complementaron con la identificación microscópica de *Dolichospermum* como género predominante. Durante el periodo estudiado, en el 77% de los casos el nivel de riesgo fue escaso, que en el presente trabajo se lo asocia a ausencia de floraciones de cianobacterias. El 11% de los sitios mostró un nivel de riesgo entre moderado (9%) y alto (2%). El 12% restante correspondió a un nivel de riesgo bajo.

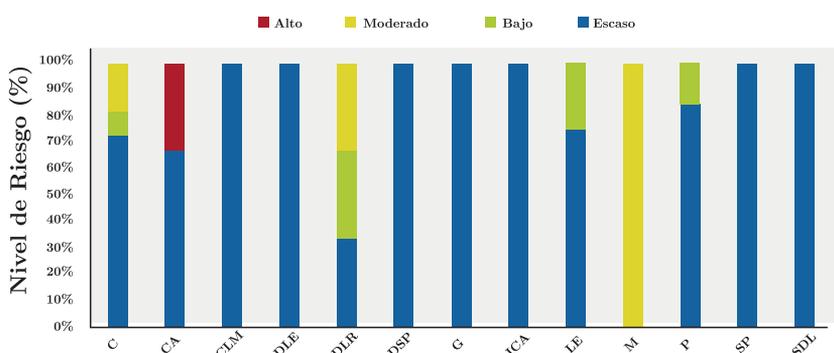


Figura 5. Porcentaje de ocurrencia de los niveles de riesgo según cianosemáforo (presentado en Tabla 1) en cada sitio de muestreo (ver códigos en la Figura).

En la Figura 6 se presenta la correlación de la temperatura del agua y la transparencia medida con disco de Secchi ($r = -0,4$). Se observa que a temperaturas mayores de 20 °C se registraron las menores transparencias.

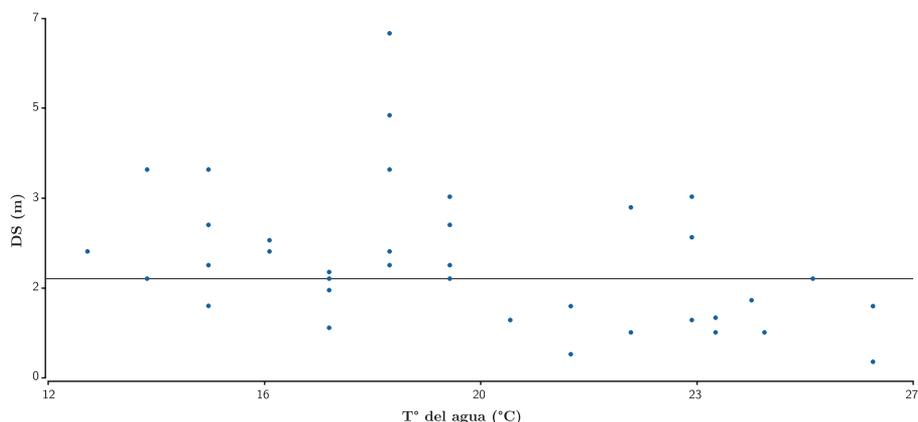


Figura 6. Relación entre temperatura del agua y transparencia. En los 2 m se ubica una línea de corte como límite recomendado de DS para uso recreativo seguro, según Chorus y Bartram (1999).

Además, aproximadamente el 50% de los registros estuvo por debajo de los 2 metros que se señala como límite para un uso seguro en aguas destinadas a recreación con contacto directo y para categorizar un cuerpo de agua eutrófico. La Tabla 2 muestra que la temperatura del agua durante los 10 eventos registrados con un nivel de riesgo (entre bajo, moderado y alto) fue de 24° C aproximadamente. Dicha temperatura es similar a la señalada por Bazán y otros (2005) como óptima para el desarrollo de las cianobacterias en el ELM. Se destaca que los niveles de riesgo bajo y moderado se produjeron cuando se registró la menor velocidad del viento (2,8 Km/h) y con dirección predominante N y NE. Debido a ello, las floraciones se observaron en el centro y zona sur del embalse. Mientras que para el único evento registrado con un nivel de riesgo alto, el viento predominante fue en dirección SO y la floración se acumuló en la bahía del club APYCAC (CA). El nivel de riesgo escaso se presentó cuando se registraron las menores cotas del embalse. El análisis AD mostró que las temperaturas de agua y aire, y el nivel del embalse fueron las variables que describieron de forma directa los niveles de riesgo bajo (color verde) y moderado (color amarillo), mientras que la profundidad de disco de Secchi se relacionó de forma inversa.

Tabla 2. Valores medios y desvíos por nivel de riesgo y para cada variable medida.

| Nivel de Riesgo | Nivel del Embalse (m) | Velocidad Viento (Km/h) | T° Ambiente (°C) | T° Agua (°C) | DS (m) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------|------------------|--------------|------------|
| Escaso | 49,70 ±0,78 | 4,95 ±4,98 | 19,65 ±4,77 | 17,86 ± 2,79 | 2,59 ±1,19 |
| Bajo | 51,30 ±1,20 | 3,14 ±2,63 | 24,60 ±6,30 | 24,40 ±1,13 | 1,27 ±0,58 |
| Moderado | 50,54 ± 1,53 | 2,45 ± 3,89 | 17,40 ±4,85 | 24,40±1,99 | 1,17 ±0,29 |
| Alto | 52,15 | 7,32 | 26,50 | 24,00 | 1,50 |

Según los autovalores del análisis discriminante, el eje canónico 1 explica el 93,7% de la variación entre los diferentes niveles de riesgos. Además, según la primera función discriminante estandarizada por las varianzas comunes, la temperatura del agua es la variable más importante para la discriminación sobre este eje (Figura 7).

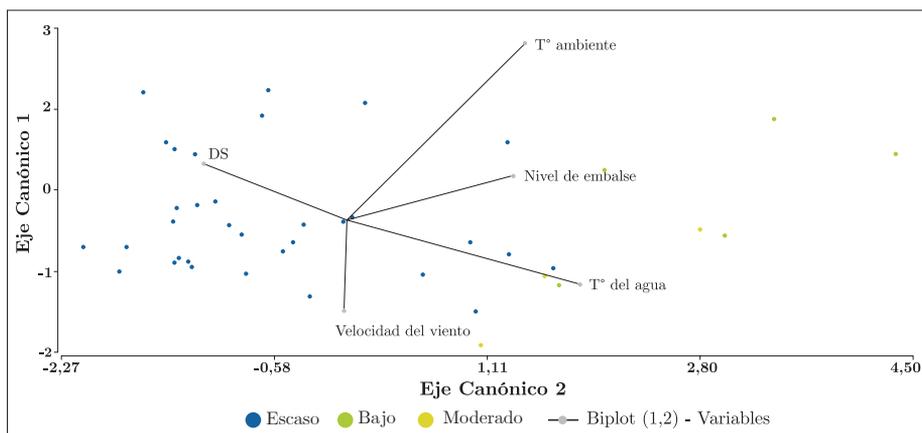


Figura 7. Biplot obtenido mediante análisis discriminante sobre 44 registros de las variables cuantitativas medidas. Los diferentes colores representan el nivel de riesgo en el que fueron clasificados los datos.

Mediante el proyecto MATTEO se tomaron registros meteorológicos con estaciones de bajo costo. A pesar de que no cumplen con los requisitos que poseen las estaciones oficiales, permiten densificar la cantidad de estaciones y así poseer información de eventos que no pudieron ser registrados por estaciones oficiales. Esto se debe a que las tormentas que ocurren en la región son del tipo convectivas y su corta extensión provoca que se originen eventos de precipitación intensa en un determinado sector. Los estudiantes registraron diariamente los datos de la estación y a partir de ellos se obtuvo el nivel de riesgo de incendios para la localidad de Potrero de Garay (Figura 8).

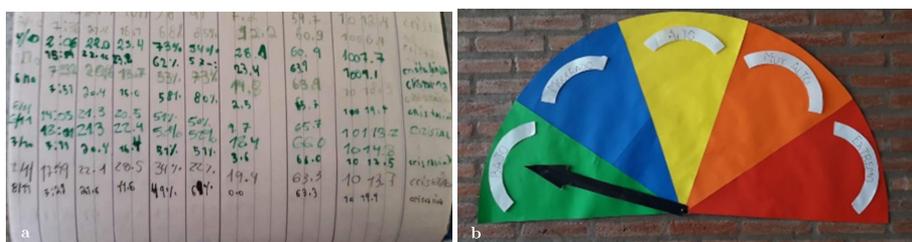


Figura 8. a) Registro de datos meteorológicos ordenados en columnas (en cuaderno de estudiantes), de izquierda a derecha: fecha, hora, temperatura interior, temperatura exterior, humedad interior, humedad exterior, velocidad del viento, lluvia acumulada, presión atmosférica, color del agua. b) Cartel ubicado al ingreso de la escuela con flecha que indica el nivel de riesgo de incendio que fue proporcionado por los Bomberos Voluntarios de Potrero de Garay a partir de los datos de la estación meteorológica.

En la Figura 9 se muestran algunas de las estrategias de comunicación externa que la escuela Alfonsina Storni llevó a cabo para contribuir en la concientización de la problemática de las cianobacterias. En consecuencia, motivaron a sus padres a involucrarse en ciencia ciudadana aportando datos de la coloración del agua y fotografías del aspecto del agua. Estos datos fueron compartidos por el personal administrativo de la escuela al grupo de WhatsApp del proyecto CYANO. Uno de los eventos más importantes de la escuela es la muestra anual denominada “Expo Alfonsina”. La misma se desarrolla durante un día del mes de noviembre en las instalaciones de la institución, para exhibir a la comunidad educativa y comunidad en general, los trabajos y proyectos desarrollados por los alumnos. Dicha exposición convoca más visitantes en cada edición, llegando a más de 300 visitas en su última realización en el año 2019. En esa oportunidad, los estudiantes de 6° grado, junto a sus docentes y con las sugerencias de los directores del proyecto CYANO, presentaron un stand con folletos de divulgación, cartelería y fotografías de los diferentes niveles de riesgos de cianobacterias.



Figura 9. Diferentes estrategias de comunicación en Escuela Alfonsina Storni. a) Pizarrón doble faz de vereda ubicado en la escuela, b) Stand en la muestra anual “EXPO Alfonsina”, noviembre 2019.

DISCUSIÓN

Los proyectos de ciencia ciudadana en el mundo son escasos (Paul, et al., 2018) y en nuestro continente aún novedosos, por lo tanto, esta experiencia inédita en el embalse Los Molinos podría ser de utilidad para transferirse a otros cuerpos de agua eutrofizados.

Según Kobori y otros (2016), los proyectos de ciencia ciudadana pueden contribuir a un cambio de paradigma en la ciencia, desarrollando un trabajo colaborativo entre investigadores científicos, directores de proyectos, organismos gubernamentales y público en general para abordar problemáticas ambientales emergentes. Tal es el caso del presente trabajo, en el cual se logró una recopilación e interpretación de datos que no se podría haber alcanzado si no se hubiera llevado a cabo de manera colaborativa.

En la escuela, las ciencias se construyen desde los conocimientos cotidianos que poseen los estudiantes, es decir desde los modelos iniciales o de sentido común,

debido a que estos proporcionan el anclaje necesario para la apropiación de los modelos científico-escolares (Argentina. Ministerio de Educación de la Provincia de Córdoba, 2019). En este marco, la actividad científica en las aulas mediante las charlas y los talleres que se brindaron en el primer paso de la ejecución del proyecto estuvo conformada por la progresiva construcción de aquellos modelos que pudieran proporcionar una posible representación y explicación válida de las problemáticas ambientales locales. Esto originó que los estudiantes y los ciudadanos en general se formulen interrogantes y elaboren ideas sobre los distintos componentes de la realidad, como así también se cuestionen el cómo y el por qué. En este contexto, los proyectos de ciencia ciudadana constituyeron una oportunidad para enseñar a los niños y al resto de la población a “mirar el mundo con ojos de científicos”. Uno de los logros más importantes alcanzados fue que al finalizar el primer año del proyecto CYANO, los estudiantes de la escuela primaria, los estudiantes universitarios y el personal del GERS aprendieron a reconocer las floraciones de cianobacterias y sus diferentes niveles de riesgos. A su vez, se observó que el compromiso con el proyecto de ciencia ciudadana fue progresivo a medida que transcurría el tiempo y la comprensión del poder de la información recopilada en la toma de decisiones y gestión. Actualmente, el monitoreo visual es parte del patrullaje diario que realiza el GERS en el ELM. Por otra parte, en la escuela Alfonsina Storni se observó que el proyecto fue útil para que alumnos que no encontraban motivación por los estudios hallaran una inspiración para llegar más temprano y ser ellos quienes registraran primero los datos, o bien practicar la lectura y escritura al comunicarlos. A lo largo del proyecto, las niñas y los niños fueron apropiándose del conocimiento adquirido y empoderándose personalmente, convirtiéndose en multiplicadores de los saberes aprendidos.

La actividad de observación microscópica de las cianobacterias fue diseñada como parte de la enseñanza de las ciencias, la cual permitió incrementar la motivación de los estudiantes a través de adquirir el conocimiento de una manera vivencial, y representó una ayuda para la comprensión de los conceptos abordados en el proyecto. Además, contribuyó a desarrollar el razonamiento científico de los estudiantes, adquirir habilidad y destreza en el manejo de instrumentos y actitudes relacionadas con el conocimiento científico como es la curiosidad, el trabajo en equipo y la planificación de tareas.

El acercamiento de la universidad a la escuela contribuyó al despertar de las vocaciones científicas de niñas y niños, quienes se proyectaron como futuros estudiantes de la facultad, un escenario impensado por ellos debido al entorno cultural donde se desarrollan. Por último, al analizar todos los canales de comunicación utilizados (4to paso) se observó el rol central que tiene la escuela Alfonsina Storni como institución educativa, siendo el nexo fundamental entre la sociedad, el gobierno de la localidad y el ámbito académico. La ciencia ciudadana permitió a los estudiantes redescubrir el embalse Los Molinos y reconocerse como ciudadanos participativos y responsables. Se observó que la profundidad del disco de Secchi es un excelente y económico indicador de calidad de agua para uso recreativo. Valores de disco de Secchi mayores a 2 metros fueron asociados a ausencia de floraciones, es decir, que permiten el baño o tener contacto directo con el agua. Por el contrario, valores menores a 2 metros corresponden a presencia de floraciones en cualquiera de los tres niveles de riesgo (bajo, moderado, alto),

por lo que la recomendación es evitar el contacto con el agua, no consumirla y mantener a los niños y mascotas alejados del agua y de las costas. La transparencia ha sido señalada como un indicador que puede ser medido por ciudadanos científicos voluntarios de la zona y pescadores (Kloiber, et al., 2002, USEPA, 2017). La aparición de cianobacterias, como en todo cuerpo eutrófico, estuvo sujeta a variables del tiempo como temperatura, precipitación y viento, las cuales variaron en el lapso de horas o días influyendo en la permanencia o desaparición del florecimiento (UNESCO, 2009; Bazán, et al., 2005). Por lo tanto, contar con el monitoreo visual en forma periódica es imprescindible para poder realizar el seguimiento y la vigilancia de cianobacterias. Se concluye que el monitoreo visual es una herramienta útil, de baja complejidad, económica, y de gran valor para la gestión y el manejo de floraciones. A su vez, es primordial la participación multi-sectorial debido al impacto que tienen las floraciones de cianobacterias como una:

- a) Amenaza para la salud pública: sus potenciales toxinas pueden causar problemas de salud en humanos que van desde irritaciones de la piel hasta daños en el hígado y el sistema nervioso. Dichas toxinas también pueden ser dañinas para los animales, incluidos el ganado y las mascotas caninas que beben o nadan en aguas contaminadas. Durante las diferentes actividades de concientización, los vecinos de Potrero de Garay, así como deportistas que practican kitesurf y parte del personal del GERS, manifestaron haber tenido irritación en la piel o problemas gastrointestinales luego de tener contacto directo con el agua o haberla utilizado para beber, cocinar y/o ducharse debido que la misma carece de proceso de potabilización.
- b) Preocupación ambiental: debido a que los nutrientes, la temperatura y la calma han sido reportados por Bazán (2006) como las condiciones que promueven el predominio de cianobacterias, y que dichas floraciones -según Bazán y otros (2017)- se desarrollan con mayor frecuencia e intensidad desde el 2010; y debido a que la pesca es uno de los deportes y atractivos que tiene el embalse Los Molinos, se desprende como de vital importancia realizar estudios de bioacumulación de toxinas en la cadena trófica. Este estudio pone de relieve el efecto de los vientos preponderantes en la formación y el desplazamiento de los cúmulos de *Dolichospermum* y sugiere que, en los periodos más cálidos, el aumento del nivel hídrico beneficiaría el desarrollo de floraciones por aporte de materia orgánica y nutrientes.
- c) Pérdida económica y del valor paisajístico: además de ser estéticamente desagradable por su apariencia y olor, las floraciones de cianobacterias afectan las actividades recreativas y el turismo; incluso podrían desencadenar una reducción del valor de las propiedades. Se destaca que este monitoreo visual, acompañado del análisis bacteriológico de las zonas de playas, aportó la información necesaria para que la APRHI tomara la decisión de no autorizar una competencia de nado abierto que estaba prevista realizarse en el embalse Los Molinos en marzo pasado, sentando el primer precedente al respecto. Se reconoce tal actuación como consecuencia de un valioso trabajo en equipo y comunicación entre gestores, investigadores científicos y ciudadanos.

A futuro está previsto continuar con el entrenamiento de monitoreo visual en otras comunas del peligro, y realizar un entrenamiento en el análisis de datos a través

de planillas de cálculo e identificación de cianobacterias en microscopio a docentes y estudiantes de la escuela Alfonsina Storni, lo que permitirá analizar las variables medidas a lo largo del tiempo y diferenciar las floraciones de cianobacterias de aquellas producidas por algas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba y a la Secretaría de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba por el apoyo financiero. Al personal del GERS (Franco Toccoli, Ezequiel Nuñez, Franco Britos, Hernán Castro, Guillermo Brandalise, José Freytes, Franco Marbian, Guillermo Videla Laureano Moyano y Hernán Vivas) y a la comunidad educativa de la Escuela Alfonsina Storni, en especial a las maestras de 6° grado Carolina Monsalvo y Blanca Vega, al personal de apoyo administrativo Alejandro Paez y su directora Marta Pons por su participación activa y su valiosa colaboración. Al Dr. Ing. Horacio Herrero y la Ing. Mariana Roqué de la APRHi por el apoyo logístico y de personal en las diferentes actividades realizadas. Se agradece a los revisores y a la editora por sus pertinentes comentarios que ayudaron a mejorar este documento.

REFERENCIAS

- Amé, M.V., Galanti, L.N., Menone, M.L., Gerpe, M.S., Moreno, V.J. y Wunderlin, D.A., 2010. Microcystin–LR,–RR,–YR and–LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. En: *HarmfulAlgae*, 9(1), pp.66-73.
doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.hal.2009.08.001>
- Argentina. Gobierno de la Provincia de Córdoba, 2020a. *Seguridad náutica* [En línea]. Córdoba: Gobierno de la Provincia de Córdoba. [Consulta: 1 de Junio de 2020]. Disponible en: <https://www.cba.gov.ar/reparticion/seguridadnautica/>
- Argentina. Gobierno de la Provincia de Córdoba, 2020b. *Nivel de presas* [En línea]. Córdoba: Gobierno de la Provincia de Córdoba. [Consulta: 4 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.cba.gov.ar/niveles-de-presas-y-embalses-nuevo/>
- Argentina. Ministerio de Educación de la Provincia de Córdoba, 2019. *Diseño curricular de la educación primaria 2011-2020: Ciencias Naturales y Tecnología/Ciencias Naturales*. Córdoba: Ministerio de Educación de la Provincia de Córdoba. pp.150-188. [Consulta: 15 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.igualdadycalidadcba.gov.ar/SIPEC-CBA/publicaciones/DPCurriculares-v2.php#gsc.tab=0>
- Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, s.d. *Ciano semáforo* [En línea]. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación Argentina. [Consulta: 12 de Abril de 2020]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/ryc/graficos/0000000769cnt-cianosemaforo.pdf>

- Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, Dirección Nacional de Determinantes de la Salud, 2017. *Directrices sanitarias para el uso seguro de aguas recreativas. Resolución 125/2016. Módulo II: directrices sanitarias para enteropatógenos y microorganismos oportunistas en agua potable* [En línea]. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación Argentina. [Consulta: 12 de enero de 2020]. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000001149cnt-directrices_sanitarias_para_enteropatogenos.pdf
- Bazán, R., 2006. *Evaluación de la calidad del agua, nivel de eutrofización y sus consecuencias en el embalse Los Molinos (Córdoba)*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. (Tesis de Maestría)
- Bazán, R., Larrosa, N., Bonansea, M., López, A., Busso, F. y Cosavella, A., 2014. Programa de monitoreo de calidad de agua del embalse Los Molinos, Córdoba-Argentina. En: *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC*, 1(2), pp.28-34.
- Bazán, R., Larrosa, N., Bonfanti, E. y Cossavella, A. 2018. Compromiso ambiental: articulación Universidad-Estado-Empresa. En: Universidad Pinar del Río. *XI Taller Universidad, Medio Ambiente, Energía y Desarrollo Sostenible*. La Habana, Cuba (12-16 de febrero de 2018). La Habana: UPR.
- Bazán, R., Larrosa, N., Busso, F., Bonfanti, E., Bonansea, M. y Cossavella, A., 2017. Florecimientos de cianobacterias en el embalse Los Molinos, Córdoba-Argentina. En: FIBA. *VI Taller de Cianobacterias Toxígenas en Argentina*. Mar del Plata y Buenos Aires, Argentina (23-24 de noviembre de 2017). Mar del Plata: FIBA.
- Bazán, R., del Olmo, S., Corral, M., Rodríguez, M., Grisolia, G., Cossavella, A., Rodríguez, A., Wunderlin, D., Avena, M., Busso, F. y Bonfanti, E., 2005. Factores ambientales y su incidencia en la estructura de la comunidad del fitoplancton del embalse Los Molinos. En: *XX Congreso Nacional del Agua*. Mendoza, Argentina (9-13 de mayo de 2005). Mendoza: s.n. pp.27-34.
- Behrens, D.K., Bombardelli, F.A., Largier, J.L. y Twohy, E., 2009. Characterization of time and spatial scales of a migrating rivermouth. En: *Geophysical Research Letters*, 36(9). <https://www.doi.org/10.1029/2008GL037025>
- Carlson, R.E., 1977. A trophic state index for lakes. En: *Limnol. Oceanog*, 22, pp.361-369.
- Cossavella, A., 2003. *Influencia de efectos antrópicos y naturales en el proceso de eutrofización de las aguas del embalse Los Molinos*. Córdoba: Universidad Tecnológica. (Tesis de Maestría).

- Chorus, I. y Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Londres: WHO, E&FN Spon. ISBN: 0419239308.
- Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales (CREAF), s.d. *Ciencia ciudadana* [En línea]. Cataluña: CREAF. [Consulta: 1 de Junio de 2020]. Disponible en: <http://www.creaf.cat/es/investigacion/ciencia-ciudadana>
- Codd, G. A., Bell, S. G., Kaya, K., Ward, C. J., Beattie, K. A. y Metcalf, J. S., 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. En: *European Journal of Phycology*, 34(4), pp.405-415.
- Di Rienzo, J.A., Balzarini, Mónica, González, Laura, Casanoves, Fernando, Tablada, Margot y Robledo, Carlos, 2008. *InfoStat versión 2008* [En línea]. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. [Consulta: 20 de abril de 2020]. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Galanti, L.N., Amé, M.V. y Wunderlin, D.A., 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. En: *Harmful Algae*, 27, pp.88-97. doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.hal.2013.05.007>
- Kloiber, S., Brezonik, P. y Bauer, M., 2002. Application of LandSat imagery to regional-scale assessments of lake clarity. En: *Water Research*, 36(17), pp.4330-4340. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00146-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00146-X)
- Kobori, H., Dickinson, J.L., Washitani, I., Sakurai, R., Amano, T., Komatsu, N. y Miller-Rushing, A.J., 2016. Citizen science: a new approach to advance ecology, education, and conservation. En: *Ecological Research*, 31(1), pp.1-19.
- Le Coz, J., Patalano, A., Collins, D., Guillen, N.F., García, C.M., Smart, G.M., Bind, J., Chiaverini, A. y Le Boursicaud, R., 2016. Crowdsourced data for flood hydrology: feedback from recent citizen science projects in Argentina, France and New Zealand. En: *J. Hydrol.*, 541(B), pp.766-777.
- Matthews, E.A., Matthews, R.A., Sheets, Z. y Gilbert, J.E., 2018. CyanoHABIT: a novel game to identify harmful freshwater algae. En: *Stephanidis, Constantine, ed. HCI International 2018 – Posters' extended abstracts*. Berlín: Springer. pp.78-84. eBook ISBN 978-3-319-92270-6
- NALMS, s.d. *The Secchi Dip-In* [En línea]. Madison: NALMS. [Consulta: 1 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.nalms.org/secchidipin/>
- Paul, J.D., Buytaert, W., Allen, S., Ballesteros-Cánovas, J.A., Bhusal, J., Cieslik, K. y Dewulf, A., 2018. Citizen science for hydrological risk reduction and resilience building. En: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 5(1), pp.e1262. <https://www.doi.org/10.1002/wat2.1262>

- Silvertown, J., 2009. A new dawn for citizen science. En: *Trends in Ecology & Evolution*, 24(9), pp.467-471. <https://www.doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.017>
- Swan, M., 2012. Crowdsourced health research studies: an important emerging component to clinical trials in the public health research ecosystem. En: *J Med Internet Res.*, 14(2), pp.e46. doi: <https://www.doi.org/10.2196/jmir.1988>
- UNESCO, 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay. En: Bonilla, Sylvia, ed. *Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO. (Documento Técnico PHI-LAC, no.16)
- USEPA, 2017. *Quality Assurance Program Plan (QAPP) for the Cyanobacteria monitoring collaborative* [En línea]. Massachusetts: USEPA. [Consulta: 01 Abril de 2020]. Disponible en: <https://blog.cyanos.org/2017/04/27/cyanobacteria-montoring-collaborative-qapp-released/>

Dinámica larval del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes, río Santa Lucía, Uruguay

Larval development of golden mussel *Limnoperna fortunei* in Aguas Corrientes reservoir, Santa Lucía river, Uruguay

Dinâmica larval do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* no reservatório de Aguas Corrientes, rio Santa Lucía, Uruguai

RECIBIDO: 29/8/2020 → APROBADO: 4/11/2020 ✉ asomma@ose.com.uy

✉ SOMMA, ANDREA (1); NOGUEIRA, LUCÍA (1); GONZÁLEZ-MADINA, LUCÍA (1); LANGONE, JOSÉ A. (1)
(1) LABORATORIO DE HIDROBIOLOGÍA, USINA DE AGUAS CORRIENTES, ADMINISTRACIÓN DE LAS OBRAS SANITARIAS DEL ESTADO. CANELONES, URUGUAY.

RESUMEN

El mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) es una especie exótica invasora que causa grandes perjuicios en América del Sur. El río Santa Lucía es la principal fuente de agua potable que abastece al 60% de la población de Uruguay. *L. fortunei* ha sido reportado desde 1996 en esta cuenca y actualmente se encuentra en los tres embalses que abastecen a la usina potabilizadora. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la dinámica temporal de las larvas de *L. fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes (río Santa Lucía). Para esto se realizaron análisis diarios del embalse, donde se midieron parámetros fisicoquímicos, y se cuantificaron larvas y la comunidad fitoplanctónica. Las larvas de *L. fortunei* presentaron una dinámica estacional y su desarrollo fue favorable a temperaturas mayores a los 17°C. La temperatura fue la principal variable moduladora de la presencia de larvas. Una vez que la temperatura fue adecuada para su reproducción, la cota del embalse resultó ser la variable clave para determinar la presencia de larvas. Esto evidencia la importancia del manejo del caudal del embalse durante la época reproductiva del mejillón para disminuir sus impactos. Se plantean dos mecanismos de regulación de las larvas que actúan a diferentes escalas: fisiológico y ambiental.

PALABRAS CLAVE: temperatura, caudal, usina potabilizadora de agua, invasión biológica.

ABSTRACT

The golden mussel (*Limnoperna fortunei*) is an invasive exotic species that has several negative impacts in South America. Santa Lucía River is the main drinking water source, supplying 60% of the total population of Uruguay. *L. fortunei* has been reported since 1996 in this basin, and nowadays is present in the three reservoirs that supply the water treatment plant. The aim of this study was to analyze the temporal dynamics of *L. fortunei* larvae in Aguas Corrientes reservoir (Santa Lucía River). We quantify diary *L. fortunei* larvae and phytoplankton, we also measure physicochemical parameters of water. *L. fortunei* larvae showed a seasonal dynamic and its development was promoted by temperatures up to 17°C. Temperature was the main variable controlling the presence of larvae. Once temperature was optimal for its reproduction, the reservoir level was the key variable to determine the presence of larvae. This shows the importance of flow managing in the reservoir in order to reduce golden mussel impacts during the reproductive season. We also propose two alternative regulation mechanisms of larvae, acting at two different scales: physiological and environmental.

KEYWORDS: temperature, flow, water treatment plant, biological invasion.

RESUMO

O mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) é uma espécie exótica invasora que causa grandes danos em America do Sul. O rio Santa Lucía é a principal fonte de água potável que abastece 60% da população do Uruguai. *L. fortunei* é registrada desde 1996 na bacia e atualmente é encontrada nos três reservatórios principais que abastecem a estação de tratamento de água. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a dinâmica temporal de larvas de *L. fortunei* no reservatório de Aguas Corrientes (rio Santa Lucía). Para isso, foram realizadas análises diárias do reservatório, onde foram medidos parâmetros físico-químicos e quantificadas as larvas e a comunidade fitoplanctônica. As larvas de *L. fortunei* apresentaram dinâmica sazonal e seu desenvolvimento foi favorável em temperaturas superiores a 17°C. A temperatura foi a principal variável moduladora da presença de larvas. Uma vez que a temperatura foi adequada para sua reprodução, a elevação do reservatório passou a ser a variável chave para determinar a presença de larvas. Isso mostra a importância do gerenciamento da vazão do reservatório para reduzir os impactos do mexilhão dourado. Ao mesmo tempo, dois mecanismos de regulação das larvas são propostos atuando em diferentes escalas: fisiológica e ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: temperatura, fluxo, planta de purificação de água, invasão biológica.

INTRODUCCIÓN

Las invasiones biológicas son una de las principales pérdidas de biodiversidad a nivel mundial (Gallardo, et al., 2015; Sala, et al., 2000). El mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) es una especie exótica invasora en América del Sur (Oliveira, et al., 2015). *Limnoperna fortunei* ingresó al continente por el Río de la Plata, en el

año 1990 (Pastorino, et al., 1993), y rápidamente se expandió por toda la cuenca, a contracorriente, afectando a los ríos Paraná y Uruguay, entre otros, y abarcando Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay y Bolivia, en su nueva área de distribución (Oliveira, et al., 2015). Esta especie presenta características morfofuncionales que favorecen la rápida colonización y su éxito en diferentes ambientes (Morton, 2015). Entre estas características, el estadio larval planctónico de *L. fortunei* puede alcanzar altas densidades (>20.000 ind/m³), lo que le permite una alta dispersión por deriva en el ambiente natural (Cataldo, 2015). A su vez, los organismos adultos adheridos a sustratos como artes de pesca y cascos de embarcaciones resisten la desecación (entre 7 y 11 días fuera del agua) (Darrigran, et al., 2004; Montalto y Ezcurra de Drago, 2003), lo que permite otro mecanismo de dispersión.

El asentamiento de *L. fortunei* en los ecosistemas ha presentado un alto impacto tanto en el ambiente natural (Darrigran y Damborenea, 2011) como en las infraestructuras humanas (Darrigran, et al., 2020). Se han documentado cambios en la comunidad bentónica (Linares, et al., 2017; Silva, et al., 2020), fitoplanctónica (Boltovskoy, et al., 2015a, 2013) y zooplanctónica (Rojas Molina, et al., 2015), así como su capacidad de incorporarse a las tramas tróficas de los peces (García y Protogino, 2005; González-Bergonzoni, et al., 2020; Penchaszadeh, et al., 2000). Las principales interferencias a nivel humano hasta ahora detectadas son: macrofouling (obstrucción por altas densidades de organismos vivos adheridos) en tomas y tuberías de aguas para potabilización, uso industrial y centrales energéticas, e interferencias en la navegación, y en la pesca comercial y deportiva, entre otras; produciendo elevados perjuicios económicos (Darrigran, et al., 2007; Boltovskoy, et al., 2015c; Xu, et al., 2015). Hay numerosos ejemplos de instalaciones industriales que han tenido problemas en su funcionamiento debido a la colonización del mejillón dorado (Boltovskoy, et al., 2015c). En China y Japón ha afectado diferentes plantas potabilizadoras y sistemas de distribución de agua desde hace décadas (Morton, 1975; Nakanishi y Mukai, 1997). A principios de 1994, *Limnoperna fortunei* provocó el primer caso de macrofouling de agua dulce en América. Este hecho ocurrió en la planta potabilizadora de agua de la Ciudad de La Plata, Argentina (Darrigran, 1995). Otros casos ocurrieron en las tomas de agua para consumo humano de Bernal (34°40' S - 58°14' O) y de la Ciudad de Buenos Aires (34°35' S - 58°22' O) (Darrigran, 1995; Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000). Aunque no han sido formalmente publicados otros registros, se estima que otras plantas potabilizadoras experimenten similares problemas dada la extendida distribución que posee esta especie en la región (Oliveira, et al., 2006).

La cuenca del río Santa Lucía se ubica al sur de Uruguay (entre 33°42'18" - 34°50'24" S y 54°59'24" - 57°07'11" O) y tiene un área de 13.480 km². Esta cuenca está constituida por cinco grandes tributarios: río Santa Lucía, río Santa Lucía Chico, arroyo Canelón Grande, arroyo Canelón Chico y río San José, y cuenta con tres embalses principales (Aguas Corrientes, Canelón Grande y Paso Severino), que actúan como reservas para garantizar el suministro de agua bruta a la planta potabilizadora de Aguas Corrientes (Figura 1). Esta planta pertenece a la Administración de las Obras Sanitarias del Estado (O.S.E.) y abastece al 60% de la población del país (Figura 1).

En esta cuenca, el primer reporte de *Limnoperna fortunei* data de 1996 (Brugnoli, et al., 2005). Entre 2000 y 2003 se registró en varias localidades de la cuenca, incluyendo el embalse de Paso Severino (Langone, 2005) y el de Aguas Corrientes (Brugnoli, et al., 2005). En la actualidad también ha colonizado el embalse Canelón Grande (observación personal). Langone (2005) plantea que en el río Santa Lucía, *L. fortunei* presenta dos mecanismos de colonización: a través de adultos adheridos a pequeñas embarcaciones y por dispersión de sus larvas (en dirección aguas abajo).

En la usina potabilizadora de agua de Aguas Corrientes, *Limnoperna fortunei* ha causado interferencias en la operativa de la planta desde el año 2000. Entre ellas se destacan: taponamiento de rejillas y cribas de las tomas, disminución del caudal de captación debido a la colonización de los túneles, tuberías y parshalls, mayor gasto de energía y baja en el servicio de bombas aductoras. Hasta el momento, la principal medida reactiva ha sido la remoción mecánica de los adultos de las superficies colonizadas. Esta medida fue elegida debido a su bajo costo e inocuidad ambiental. Las sustancias químicas utilizadas para el control del mejillón dorado suelen ser costosas, pueden tener efectos tóxicos, generar subproductos indeseados (Claudi y de Oliveira, 2015) y su aplicación no está regulada por la norma.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la dinámica de las larvas de *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes (río Santa Lucía) con la finalidad de brindar pautas para la mejora del manejo y gestión de la usina potabilizadora de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La represa de Aguas Corrientes, inicialmente construida en 1933, asegura la altura de agua del río necesaria para la succión de las bombas hacia la usina de potabilización. En la actualidad retiene un volumen embalsado aproximado de 1.800.000 m³. Cuando las condiciones de caudal del río no son suficientes para garantizar el nivel operativo, se realizan bombeos desde aguas abajo del embalse hacia aguas arriba de la presa a través de dos bombas. Por otro lado, la represa cuenta con dos compuertas que permiten regular la altura del embalse. La cota de rebase de esta represa es de 2,90 metros en su parte central y 3,10 metros en los laterales (sobre el cero Aguas Corrientes).

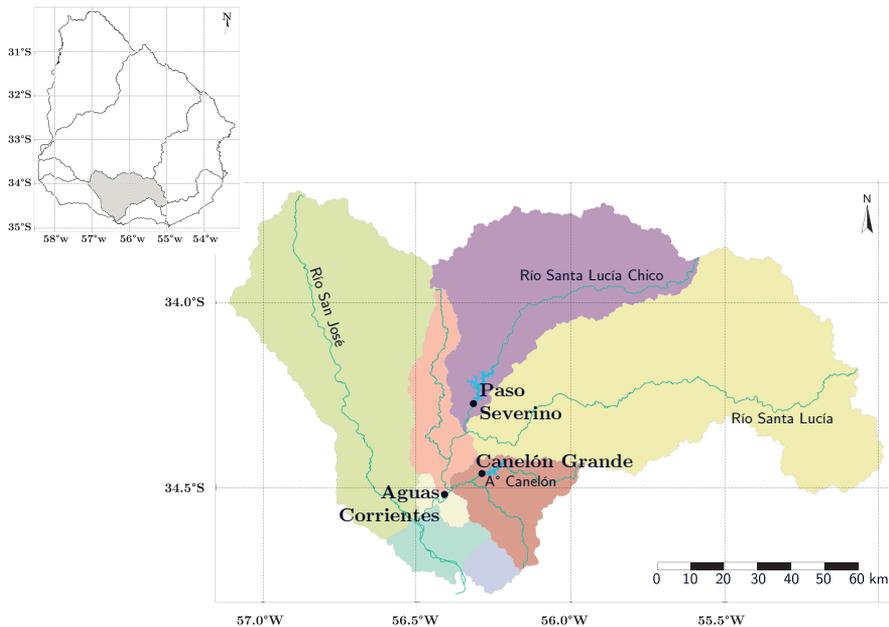


Figura 1. Mapa de la cuenca del río Santa Lucía. Se muestran los principales tributarios y grandes embalses (puntos): Paso Severino, Canelón Grande y Aguas Corrientes. Los colores representan la clasificación de Cuencas Nivel 2 según la DINAMA (Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2020).

Trabajo de campo y laboratorio

Se realizaron muestreos diarios subsuperficiales del agua del río Santa Lucía en el margen izquierdo del embalse de Aguas Corrientes, entre el 02/11/2016 y el 20/07/2020. Estos muestreos son el resultado de la rutina del programa de monitoreo fisicoquímico e hidrobiológico de usina y cuenca de los respectivos Laboratorios de la Unidad Usinas de O.S.E. En cada muestreo se midió la cota del embalse (m) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y se tomaron muestras para la cuantificación de las variables fisicoquímicas, la comunidad de fitoplancton y las larvas de *Limnoperna fortunei*. Las variables fisicoquímicas de turbidez (NTU), color (mg/l Pt), alcalinidad (mg/l CaCO_3), pH, oxígeno disuelto (mg/l) y conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C) fueron determinadas según los procedimientos del Laboratorio Unidad Usinas de Montevideo (American Public Health Association, et al., 2017a, 2017b, 2017c, 2017d, 2017e y 2017f, respectivamente). La cuantificación de la comunidad de fitoplancton se realizó siguiendo el método de Utermöhl (Sournia, 1978), en cámaras de sedimentación de 2 ml en microscopio óptico invertido a 400 aumentos. Se cuantificaron todos los organismos presentes en media cámara o hasta cuantificar 100 organismos de la especie más abundante (Lund, 1958). La abundancia de fitoplancton y cianobacterias fue expresada en células por mililitro (cel/ml). La cuantificación de las larvas de *L. fortunei* se realizó dentro del programa de monitoreo rutinario de invertebrados. Para esto, se filtraron entre 500 y 1000 ml de muestra (dependiendo de la turbidez) por un copo de 25 μm de poro, y se contabilizaron las larvas

bajo microscopio óptico a un aumento de 100x. Solamente se cuantificaron las larvas en estadio “forma de D” o de “charnela recta” (115-180 μm de largo), según Santos y otros (2005) y Cataldo (2015), y se expresó en ind/ m^3 . Esta metodología de conteo permite determinar los períodos en los que las instalaciones industriales son más vulnerables a la colonización de esta especie y es útil para controlar las incrustaciones (Cataldo, et al., 2005).

Análisis de datos

La base de datos obtenida cuenta con 1.356 observaciones diarias. Debido a la distribución de las variables, se realizaron correlaciones no paramétricas de Kruskal-Wallis y pruebas pareadas a posterior de Wilcoxon entre las medianas de las variables ambientales y de los estimadores de la comunidad de fitoplancton, con la finalidad de determinar diferencias significativas entre años, meses y estaciones del año. Las relaciones entre las variables ambientales y fitoplanctónicas fueron evaluadas a través de un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), con la función base “princomp” del Software R (R Core Team, 2018), y de correlaciones no paramétricas de Spearman. Para el PCA, las variables fueron centradas por la media y estandarizadas por el desvío estándar. En función del resultado de estos análisis, se seleccionó un conjunto de variables que mejor explicaran la variabilidad ambiental y que no fueran redundantes.

Con la finalidad de estudiar el comportamiento intrínseco de las larvas, se analizó la abundancia de larvas en función del tiempo y se determinó si existían diferencias significativas entre la abundancia y los meses, estaciones del año y años a través de pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis; y en caso de que hubiera diferencias, se realizaron pruebas a posterior de Wilcoxon. La abundancia de larvas de *L. fortunei* fue contrastada con las variables ambientales seleccionadas por el PCA. A su vez, a través de árboles de clasificación y regresión (CART por sus siglas en inglés) se determinaron las principales variables ambientales y fitoplanctónicas, y sus umbrales para la clasificación de la presencia/ausencia de larvas. El árbol de complejidad óptima fue determinado en base a la “regla 1-SE” (error estándar estimado, Breiman, et al., 1984). Los CART fueron realizados con el paquete “rpart” (Therneau y Atkinson, 2019).

Los gráficos fueron realizados con “ggplot2” (Wickham, 2016) y “ggpubr” (Kassambara, 2020) y todos los análisis estadísticos se realizaron con el Software R, versión 3.5.2 (R Core Team, 2018).

RESULTADOS

Características ambientales y fitoplanctónicas del embalse

Todas las variables ambientales (menos la lluvia y el cambio de nivel del embalse) presentaron diferencias significativas entre las estaciones del año (Figura 2). El cambio de nivel del embalse y las lluvias presentaron valores promedios similares entre estaciones del año y valores extremos (fuera del 1,5 x rango intercuartil) en todas las estaciones (Figura 2). La temperatura y el oxígeno disuelto (OD) presentaron un patrón estacional (Figura 2) con valores máximos de temperatura y mínimos de OD en el verano.

El fitoplancton total y las cianobacterias también presentaron un patrón estacional (Figura 2). Las mayores abundancias de fitoplancton total se registraron en primavera, mientras que las cianobacterias fueron más abundantes durante el otoño y menos abundantes en primavera (Figura 2).

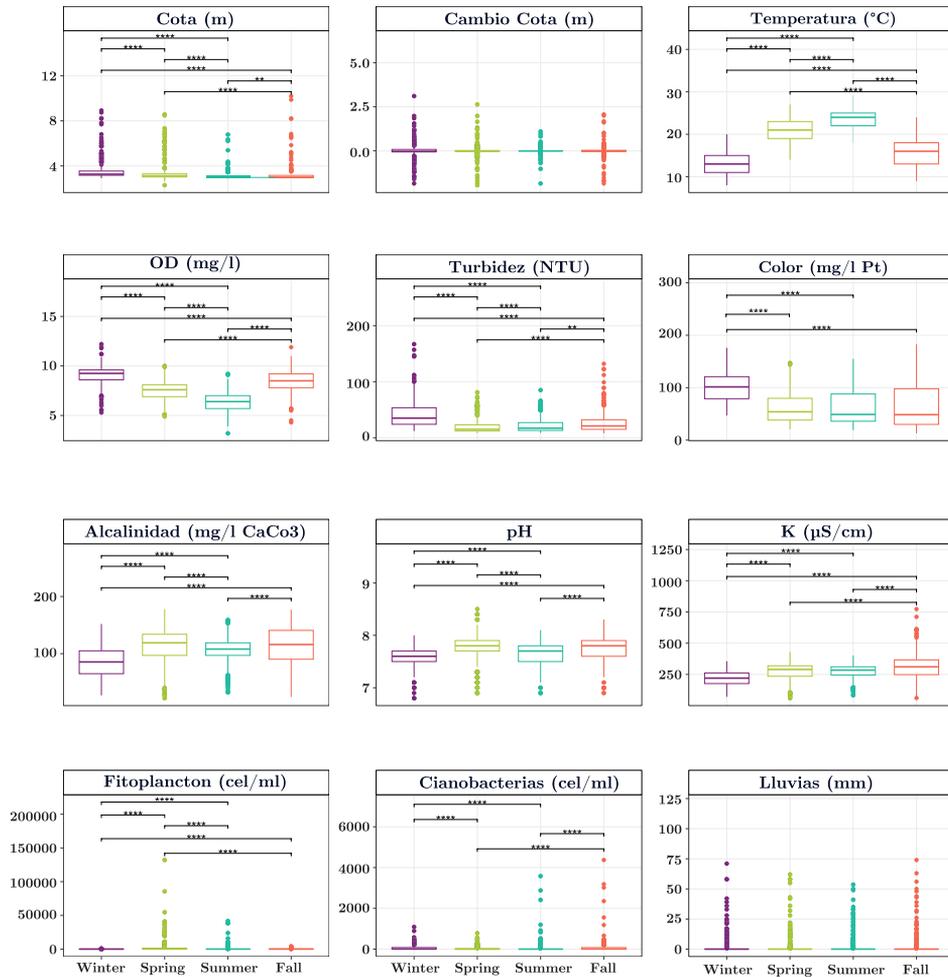


Figura 2. Boxplots de las variables ambientales y fitoplanctónicas en función de las estaciones del año para el embalse de Aguas Corrientes. Se indica la mediana (línea gruesa), los percentiles 25 y 75% (caja) y los valores 1,5 x rango intercuartil (bigotes). Los círculos son valores que se encuentran por fuera del 1,5 x rango intercuartil. Las líneas horizontales indican las comparaciones pareadas significativas y los asteriscos el valor de dicha significancia (*: p-valor $\leq 0,05$; **: p-valor $\leq 0,01$; ***: p-valor $\leq 0,001$; ****: p-valor $\leq 0,0001$).

El análisis de componentes principales (PCA) determinó las variables más importantes que influyeron en la varianza de los datos. Los primeros dos componentes del PCA explicaron el 71,8% de la varianza de los datos (Figura 3). El primer componente estuvo determinado principalmente por la cota (0,34), el color (0,41) y la turbidez (0,35) de forma positiva, y la alcalinidad (-0,44), el pH (-0,42) y la conductividad (-0,41) que influyeron negativamente. Según este componente, se puede establecer

un gradiente desde condiciones con mayor cota y aguas turbias y menores valores de pH, conductividad y alcalinidad en un extremo, y condiciones de baja cota y aguas más claras asociadas a mayores valores de pH, conductividad y alcalinidad en el otro extremo. Las variables con mayor importancia para el segundo componente principal fueron la temperatura de forma positiva (0,64) y el oxígeno disuelto de forma negativa (-0,70), generando un gradiente con casos con temperaturas cálidas y bajos valores de OD, mientras que en el otro extremo se presentaron observaciones asociadas a menores temperaturas y mayores niveles de OD (Figura 3).

El pH, la alcalinidad y la conductividad estuvieron correlacionados positivamente entre sí, de la misma manera que la cota, la turbidez y el color. A su vez, estos dos grupos de variables se correlacionaron negativamente (Figura 3, Anexo 1). Cabe destacar que, debido al comportamiento particular del embalse de Aguas Corrientes, en general la cota no presentó una relación lineal con las variables mencionadas, sino que se observó un comportamiento diferencial dependiendo de si el embalse se encontraba rebasando (cota > 3,1m) o no (cota < 3,1m) (Anexo 1).

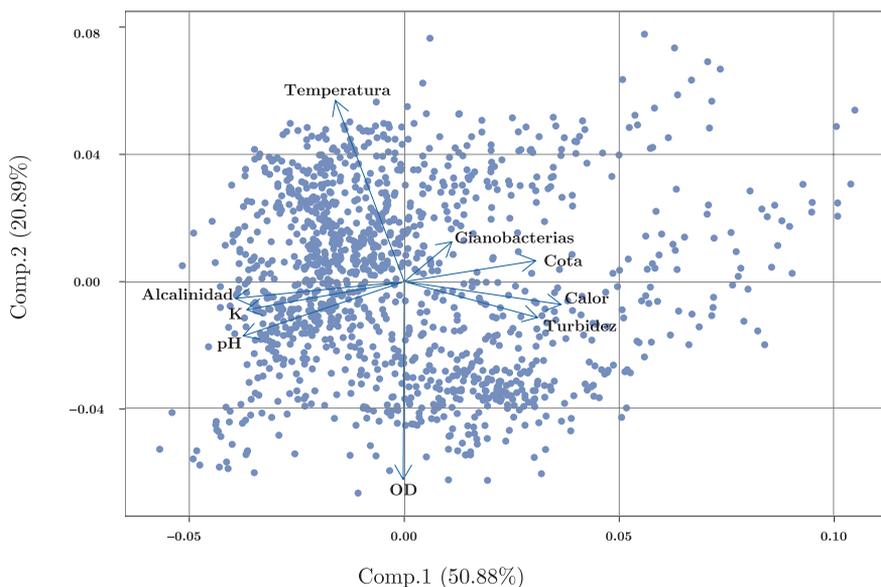


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) de las principales variables ambientales y fitoplanctónicas del embalse de Aguas Corrientes. Las variables están centradas por la media y estandarizadas por el desvío estándar.

Dinámica de las larvas de *Limnoperna fortunei*

En la mayoría de los muestreos (76%) no se registraron larvas de *Limnoperna fortunei*. Las larvas presentaron un comportamiento estacional con mayores abundancias durante los meses más cálidos (noviembre-abril) y abundancias nulas durante el invierno (Figura 4a y b). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis y la prueba a posterior de Wilcoxon para la abundancia de larvas en función de la estación del año y los meses evidenciaron dos “bloques” de datos: el primero de ausencia o bajas abundancias de larvas en la época más fría (mayo a octubre), y el segundo de altas abundancias en los meses más cálidos (noviembre a marzo). No se establecieron diferencias significativas a nivel intragrupo (primavera-verano y otoño-invierno), pero sí las hubo entre grupos.

Abril se comportó como un mes de transición entre los dos bloques de datos. En particular, diciembre fue el mes que presentó mayores abundancias de larvas (promedio = 8.600 ind/m³, Figura 4b, Wilcoxon: p-valor < 0,001 con todos los meses); y agosto el único mes que nunca registró larvas. Cabe destacar que la abundancia de larvas también presentó diferencias significativas ($\chi^2 = 123,9$, p-valor < 0,0001) entre años. En particular, el verano 2016-2017 fue el que registró la abundancia de larvas más alta (max = 88.000 ind/ m³) y la temporada 2018-2019, la que presentó la abundancia más baja (< 6.000 ind/ m³) (Figura 4a).

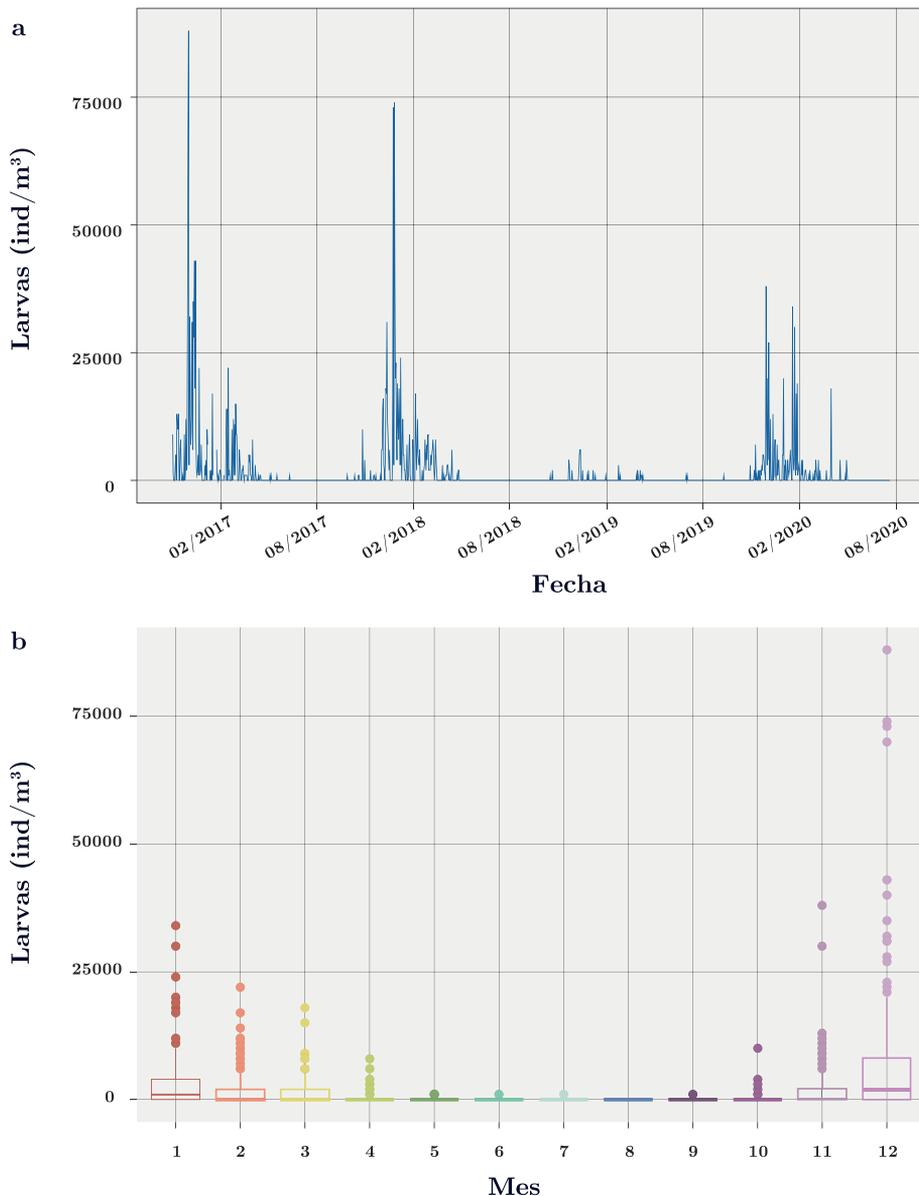


Figura 4. a) Dinámica de larvas de *Limnoperna fortunei* (ind/m³) en el tiempo en el embalse de Aguas Corrientes. b) Diagrama de cajas para la abundancia de larvas de *L. fortunei* (ind/m³) para cada mes (1: enero – 12: diciembre). Se indica la mediana (línea gruesa), los percentiles 25 y 75% (caja) y los valores 1,5 x rango intercuartil (bigotes). Los círculos son valores que se encuentran por fuera del 1,5 x rango intercuartil.

La temperatura fue la variable clave que determinó la presencia de larvas de *L. fortunei* (Figuras 4, 5 y 6). El umbral de temperatura para la presencia de larvas fue 17°C, encontrándose únicamente 6 casos de presencias de larvas con temperaturas menores a 17°C (0,4% de los datos, Figura 5).

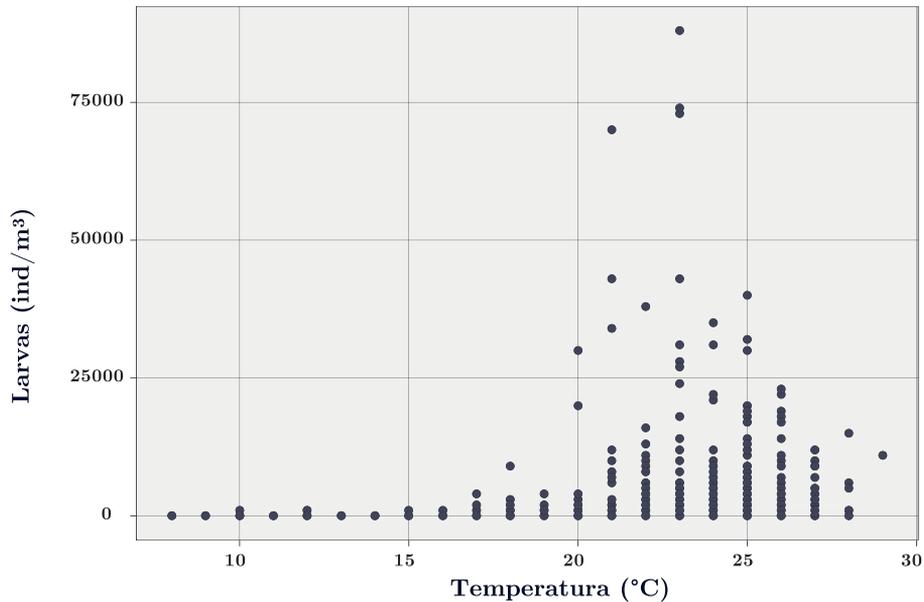


Figura 5. Abundancia de larvas de *Limnoperna fortunei* en función de la temperatura.

A partir de las variables más relevantes seleccionadas en el PCA como representativas de la variación ambiental (temperatura, cota, turbidez, abundancia de cianobacterias y oxígeno disuelto), se construyó un árbol de clasificación (CART) para la presencia y ausencia de larvas. A partir del CART de clasificación fue posible identificar a la temperatura como la principal variable seleccionada para explicar la presencia de las larvas (Figura 6: nodo 1). En este sentido, temperaturas menores a 21,5°C registraron sólo un 7% de presencia de larvas (Figura 6: nodo 2). Para temperaturas mayores a 21,5°C, la siguiente variable en determinar la presencia de larvas fue la cota (Figura 6: nodo 3): con valores mayores a 3,155 m, hubo solamente un 20% de presencias de larvas (Figura 6: nodo 4). Cuando las condiciones del río presentaron cotas menores a 3,155 m y temperaturas mayores a 24,5°C, el 81% de los datos fueron presencias (Figura 6: nodo 11). Para temperaturas entre 21,5°C y 24,5°C y cotas menores a 3,155 m, la turbidez fue la variable que clasificó a las larvas (Figura 6: nodo 6). Bajo estas condiciones, con valores de turbidez mayores a 18,5 NTU, la mayoría de los datos fueron ausencias de larvas (65%; Figura 6: nodo 7). En los casos en que la turbidez fue menor a 18,5 NTU, las cianobacterias fueron la siguiente variable en explicar el comportamiento de las larvas (Figura 6: nodo 8): a valores de cianobacterias mayores a 8 cel/ml, la mayoría de los datos fueron ausencias de larvas (59%; Figura 6: nodo 9), mientras que ante valores de cianobacterias menores a 8 cel/ml, la mayoría de los datos (68%) correspondieron a

presencia de larvas (Figura 6: nodo 10). Por último, cabe destacar que el 78% de las ausencias de larvas registradas se dieron con temperaturas menores a 21,5°C, mientras que el 80% de las presencias se registraron con temperaturas mayores a 21,5°C y el 73% de las presencias con temperaturas mayores a 21,5°C y cotas menores a 3,155 m.

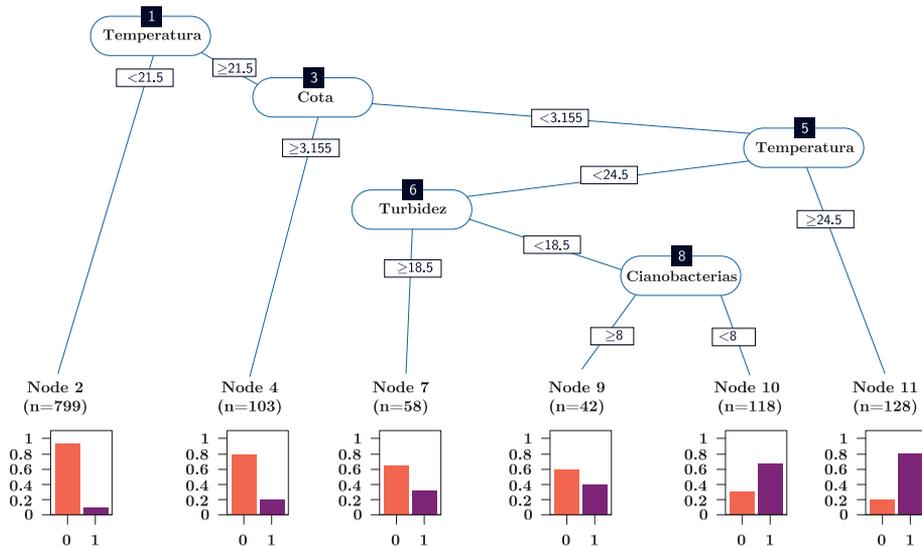


Figura 6. Árbol de clasificación (CART) para la presencia de larvas de *L. fortunei*. Las gráficas de barras en los nodos terminales representan la proporción de ausencias (0) y presencias (1) de larvas dentro de cada nodo.

Debido al efecto fisiológico que tiene la temperatura en la reproducción de *L. fortunei* (valor umbral = 17°C), se analizó de forma univariada la abundancia de larvas en función del resto de las variables ambientales para temperaturas mayores a 17°C.

Las mayores abundancias de larvas se registraron entre los 20 y 25°C (Figura 5). Cuando la temperatura fue favorable para la reproducción de la especie ($> 17^\circ\text{C}$), las larvas presentaron mayores abundancias en condiciones de cota por debajo del nivel de rebase de toda la presa (3,1 m; Figura 7) y/o cuando el cambio de nivel del río fue nulo, es decir, cuando el tiempo de residencia fue alto (Figura 7). Por su lado, la abundancia de larvas en función del color y la turbidez también presentaron un patrón similar: a mayor turbidez y color, menor abundancia de larvas (Figura 7). La alcalinidad, el pH y la conductividad influyeron de forma similar sobre la abundancia de larvas (solo se muestra K): mayor abundancia de larvas a mayores valores de estas variables (Figura 7). Las larvas y el fitoplancton total no evidenciaron un patrón marcado (Figura 7). Sin embargo, se observa que las mayores abundancias de larvas se dieron a bajas concentraciones de cianobacterias (Figura 7). Las menores abundancias de larvas se dieron frente a eventos extremos de precipitación estando sujetos a dinámicas similares a las del caudal y cota (Figura 7).

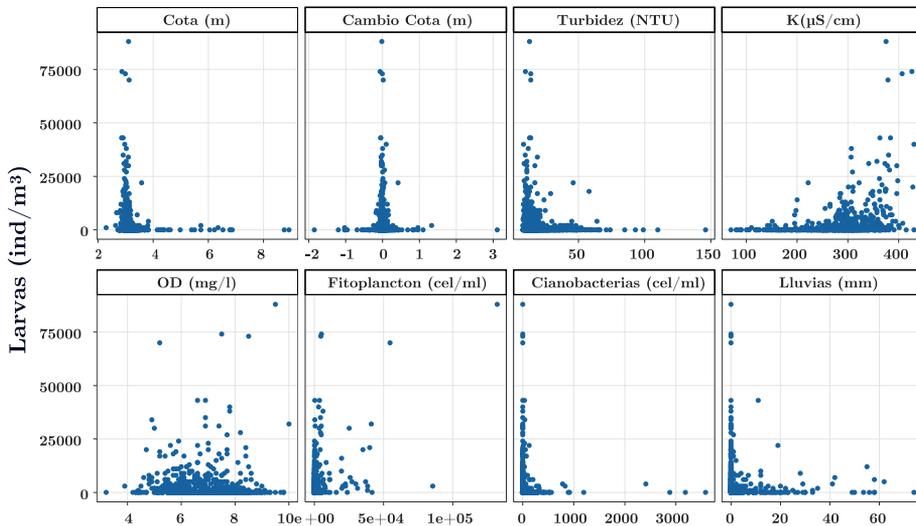


Figura 7. Abundancia de larvas de *Limnoperna fortunei* en función de las principales variables ambientales y fitoplanctónicas para temperaturas mayores a 17°C.

DISCUSIÓN

En este trabajo se determinaron por primera vez las principales variables ambientales y biológicas que modularon la dinámica de larvas de *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes. La alta abundancia de larvas encontradas refleja el grado de colonización del mejillón dorado en la cuenca en contraste con otros ecosistemas de la región (Boltovskoy, et al., 2009; Boltovskoy, et al., 2015b; Cataldo y Boltovskoy, 2000). En este estudio se observó que la dinámica larval estuvo determinada por características fisiológicas propias de la especie y por factores ambientales. En este sentido, y en concordancia con la literatura existente para la especie, se estableció un umbral de temperatura de 17°C para la aparición de las larvas (Boltovskoy, et al., 2015b, 2009; Cataldo y Boltovskoy, 2000). Una vez que las condiciones de temperatura fueron adecuadas para su reproducción, la cota fue la segunda variable determinante de la presencia de larvas.

El éxito de una especie exótica invasora depende de las características fisiológicas de la especie y de su desempeño ante los filtros ambientales. El proceso de invasión puede definirse en cuatro etapas: transporte, establecimiento de la nueva población, crecimiento y expansión (Lockwood, et al., 2007). En general, el transporte está relacionado a la acción humana (accidental o intencionalmente) (Lockwood et al., 2007), como es el caso de *L. fortunei*, que llegó al Río de la Plata en el agua de lastre de barcos provenientes de Asia (Pastorino, et al., 1993) y fue transportado aguas arriba (Darrigran, et al., 2012; Oliveira, et al., 2015, 2006). Las características fisiológicas de la especie, como presentar un rápido crecimiento y maduración sexual y tener la capacidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales (Morton, 1987), incluso limitantes para otras especies bentónicas, le permitió dispersarse no solo en la Cuenca del Plata sino en otras cuencas de América del Sur, como la del Guaiba, Patos-Mirím, Mar Chiquita y la del Río San

Francisco, lo cual señala la agresividad de la invasión del mejillón dorado (Barbosa, et al., 2016; Giglio, et al., 2016; Oliveira, et al., 2015).

En localidades de la región donde *L. fortunei* es invasora, el rango normal de densidad de larvas es 6.000-7.000 ind/m³ y excepcionalmente puede alcanzar los 100.000 ind/m³, mostrando grandes fluctuaciones en cortos períodos de tiempo, dependiendo del tiempo post colonización y la disponibilidad de sustratos para el asentamiento de los adultos (Boltovskoy, et al., 2015b). Si bien las densidades larvales promedio observadas en el embalse de Aguas Corrientes se encuentran dentro del rango propuesto por Boltovskoy y otros (2015b), los valores máximos (88.000 ind/m³) se encuentran entre los más altos reportados. Esto refleja una avanzada colonización de individuos adultos tanto en el mismo embalse de Aguas Corrientes como aguas arriba. Grandes densidades de organismos adultos del mejillón dorado también pueden observarse en dos de los embalses más grandes de la cuenca: Paso Severino (Brugnoli, et al., 2005; Langone, 2005) y Canelón Grande (observación personal), que se encuentran a 37 y 20 km de distancia de Aguas Corrientes, respectivamente. Considerando que las larvas pueden demorar hasta 20 días en asentarse (Cataldo, et al., 2005) y que el agua demora unas 24 horas entre que sale de dichos embalses y llega al de Aguas Corrientes, las larvas encontradas podrían estar generándose en estos cuerpos de agua que presentan condiciones hidrológicas más favorables, como un mayor tiempo de residencia. A su vez, cabe destacar que a lo largo del río Santa Lucía existen varios sustratos aptos para la colonización del mejillón dorado (piedras, puentes, muelles, troncos, etc.) que también podrían oficiar de fuentes de larvas para el embalse de Aguas Corrientes.

En este trabajo se observaron larvas de *L. fortunei* durante una única estación reproductiva (6 meses: noviembre-abril). Este comportamiento ha sido encontrado por Boltovskoy y otros (2009) y por Cataldo y Boltovskoy (2000) en varios sistemas de la región (ej. Río Uruguay, Paraná y Río de la Plata). Por su lado, otros autores realizaron estudios histológicos de las gónadas de organismos adultos de *L. fortunei* y concluyeron que la especie presenta picos de reproducción (Giglio, et al., 2016; Darrigran, et al., 1999; Morton, 1977). En particular, Giglio y otros (2016) plantean que las especies invasoras requieren de un período de tiempo para el desarrollo de un patrón reproductivo una vez asentado en un nuevo entorno. Si se tiene en cuenta el grado de colonización de la cuenca y los múltiples posibles orígenes de las larvas en el embalse de Aguas Corrientes, es posible que estos picos de reproducción se encuentren solapados.

Este estudio demostró que en la cuenca del río Santa Lucía, la dinámica de larvas de *L. fortunei* dependió fuertemente de la temperatura. En concordancia con otros trabajos para la región (Boltovskoy, et al., 2015b, 2009; Cataldo y Boltovskoy, 2000), se determinó un umbral de 17°C para la aparición de larvas, donde por debajo de esta temperatura la producción de larvas es cercana a cero. Según Boltovskoy y otros (2015b), temperaturas entre 15 y 18°C han sido citadas por varios autores como el umbral para el desarrollo larval. Estas limitaciones se relacionan con la regulación de la maduración de las gónadas de la especie que está ligada a la temperatura (Morton, 1982; Darrigran, et al., 1999, 2003; Boltovskoy, et al., 2009; Giglio, et al., 2016). Si bien esto no es aplicable para cuerpos de agua tro-

picales (Giglio, et al., 2016), en muchas localidades templadas donde está presente *L. fortunei* es usual un período definido de “relajación reproductiva”, el cual invariablemente ocurre en los meses más fríos (Boltovskoy, et al., 2009). La variación térmica de las regiones templadas determina que el desencadenante reproductivo principal de la especie sea la temperatura (Boltovskoy, et al., 2015b). Sin embargo, otros factores asociados al tiempo y a la intensidad de la reproducción como pH, caudal, sólidos suspendidos, oxígeno disuelto y disponibilidad de fitoplancton son menos claros y parecerían estar basados en evidencia circunstancial (Boltovskoy, et al., 2009; Ernandes-Silva, et al., 2017, 2016; Oliveira, et al., 2011).

En el embalse de Aguas Corrientes, las mayores abundancias de larvas asociadas a cotas menores al nivel de rebase de todo el embalse (3,1m) y a los cambios de nivel nulos (estabilidad de la columna de agua) reflejan el efecto de la hidrología sobre las larvas planctónicas. En este sentido, durante cotas menores al nivel de rebase y con las compuertas cerradas, el sistema aumentaría su tiempo de residencia y se comportaría como un sistema “léntico”, lo que favorecería la abundancia de larvas planctónicas al disminuir el “lavado” o arrastre de larvas aguas abajo. Por su lado, el flujo continuo del embalse (tanto por rebase como por manejo de compuertas), que disminuiría el tiempo de residencia, favorecería el lavado de larvas aguas abajo y disminuiría la probabilidad de asentamiento en las rejillas, túneles, tuberías y parshalls de la usina potabilizadora.

La construcción de embalses para acopiar agua es un fenómeno en aumento a nivel mundial (Maberly y Wang, 2018; Zarfl, et al., 2015). El manejo de los caudales de los embalses es esencial en el proceso de potabilización del agua, no solo por asegurar la cantidad de agua y el nivel adecuado para el funcionamiento de las bombas, sino porque el tiempo de residencia de los mismos puede determinar el desarrollo de organismos nocivos. Algunos autores plantean que en los protocolos de manejo de los embalses deben tenerse en cuenta los parámetros de calidad de agua y no solamente la disponibilidad de agua (Bowling, et al., 2013; Mitrovic, et al., 2011). En este sentido, un manejo integral de los embalses de la cuenca es fundamental para el mantenimiento de la calidad del agua y la disminución de impactos indeseados, como floraciones algales nocivas y colonización de especies exóticas invasoras.

AGRADECIMIENTOS

A Magno V. Segalla por traducir el resumen al portugués. Agradecemos a las personas que revisaron este manuscrito, quienes nos permitieron mejorar y aclarar buena parte del mismo.

REFERENCIAS

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017a. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 2130 B, Approved 2001-Rev. 2011.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017b. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 2120 C, Approved 2001-Rev. 2011.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017c. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 2320 B, Approved 1997-Rev. 2011.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017d. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 4500-H+B, Approved 2000-Rev. 2011, 2017.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017e. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 4500-O G, Approved 2016.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2017f. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23va ed. Washington: APHA. Standard Methods. 2510 B, Approved 1997-Rev. 2011.

Barbosa, N.P., Silva, F.A., de Oliveira, M.D., dos Santos Neto, M.A., de Carvalho, M.D. y Cardoso, A.V., 2016. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco river basin, Brazil. En: *Check List*, 12(1). <http://dx.doi.org/10.15560/12.1.1846>

Boltovskoy, D., Correa, N., Bordet, F., Leites, V. y Cataldo, D., 2013. Toxic *Microcystis* (Cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloom-enhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Freshwater Biology*, 58(9), pp.1968–1981. <https://doi.org/10.1111/fwb.12184>

Boltovskoy, D., Correa, N., Sylvester, F. y Cataldo, D., 2015a. Nutrient recycling, phytoplankton grazing, and associated impacts of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy, D. ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.153–176. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_9

Boltovskoy, D., Morton, B., Correa, N., Cataldo, D., Damborenea, C., Penchaszadeh, P.E. y Sylvester, F., 2015b. Reproductive output and seasonality of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy, D., ed., *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.77–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_5

- Boltovskoy, D., Sylvester, F., Otaegui, A., Leites, V. y Cataldo, D.H., 2009. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. En: *Austral Ecology*, 34(7), pp.719–730. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.01974.x>
- Boltovskoy, D., Xu, M., Nakano, D., 2015c. Impacts of *Limnoperna fortunei* on man-made structures and control strategies: general overview. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.375–393. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_21
- Bowling, L.C., Merrick, C., Swann, J., Green, D., Smith, G. y Neilan, B.A., 2013. Effects of hydrology and river management on the distribution, abundance and persistence of cyanobacterial blooms in the Murray River, Australia. En: *Harmful Algae*, 30, pp.27–36. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.08.002>
- Breiman, L., Friedman, J., Stone, C.J. y Olshen, R.A., 1984. *Classification and regression trees*. Boca Ratón: CRC press.
- Brugnoli, E., Clemente, J., Boccardi, L., Borthagaray, A. y Scarabino, F., 2005. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, 77(2), pp.235–244.
- Cataldo, D. y Boltovskoy, D., 2000. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred' from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Paraná river and the Rio de la Plata estuary (Argentina). En: *Aquatic Ecology*, 34, pp.307–317.
- Cataldo, D., Boltovskoy, D., Hermosa, J.L. y Canzi, C., 2005. Temperature-dependent rates of larval development In *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). En: *Journal of Molluscan Study*, 71(1), pp.41–46. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi005>
- Cataldo, D.H., 2015. Larval Development of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.43–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_2
- Claudi, R. y de Oliveira, M.D., 2015. Chemical strategies for the control of the Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) in industrial facilities. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.417–441. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_23
- Darrigran, G., 1995. *Limnoperna fortunei*: ¿un problema para los sistemas naturales de agua dulce del MERCOSUR? En: *Museo*, 5, pp.85–87.

- Darrigran, G., Agudo-Padrón, I., Baez, P., Belz, C., Cardoso, F., Carranza, A., Collado, G., Correoso, M., Cuzzo, M. G., Fabres, A., Gutiérrez Gregoric, D.E., Letelier, S., Ludwig, S., Mansur, M.C., Pastorino, G., Penchaszadeh, P., Peralta, C., Rebolledo, A., Rumi, A., Santos, S., Thiengo, S., Vidigal, T. y Damborenea, C., 2020. Non-native mollusks throughout South America: emergent patterns in an understudied continent. En: *Biological Invasions*, 22(3), pp.853-871. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02178-4>
- Darrigran, G. y Damborenea, C., 2011. Ecosystem engineering impacts of *Limnoperna fortunei* in South America. En: *Zoological Science*, 28(1), pp.1-77.
- Darrigran, G., Damborenea, C., Drago, E., Ezcurra de Drago, I., Paira, A. y Archuby, F., 2012. Invasion process of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae): The case of Uruguay River and emissaries of the Esteros del Iberá Wetland (Argentina). En: *Zoologia*, 29(6), pp.531-539.
- Darrigran, G., Damborenea, C. y Greco, N., 2007. An evaluation pattern for antimacrofouling procedures: *Limnoperna fortunei* larvae study in a hydroelectric power plant in South America. En: *AMBIO*, 36(7), pp.575-579.
- Darrigran, G. y Ezcurra de Drago, I., 2000. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. En: *The Nautilus*, 114(2), pp.69-73.
- Darrigran, G.A., Maroñas, M.E. y Colautti, D.C., 2004. Air exposure as a control mechanism for the golden Mussel, *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). En: *Journal of Freshwater Ecology*, 19(3), pp.461-464. <https://doi.org/10.1080/02705060.2004.9664920>
- Darrigran, G., Penchaszadeh, P. y Damborenea, M.C., 1999. The reproductive cycle of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) from a neotropical temperate locality. En: *Journal of Shellfish Research*, 18(2), pp.361-365.
- Ernandes-Silva, J., Pinha, G.D. y Mormul, R.P., 2017. Environmental variables driving the larval distribution of *Limnoperna fortunei* in the upper Paraná River floodplain, Brazil. En: *Acta Limnologica Brasiliensis*, 29. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x7716>
- Ernandes-Silva, J., Ragonha, F.H., Jati, S. y Takeda, A.M., 2016. *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 larvae in different environments of a Neotropical floodplain: relationships of abiotic variables and phytoplankton with different stages of development. En: *Brazilian Journal of Biology*, 76(1), pp.154-161. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15514>
- Gallardo, B., Clavero, M., Sánchez, M.I. y Vilà, M., 2015. Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. En: *Global Change Biology*, 22, pp.151-163. <https://doi.org/10.1111/gcb.13004>

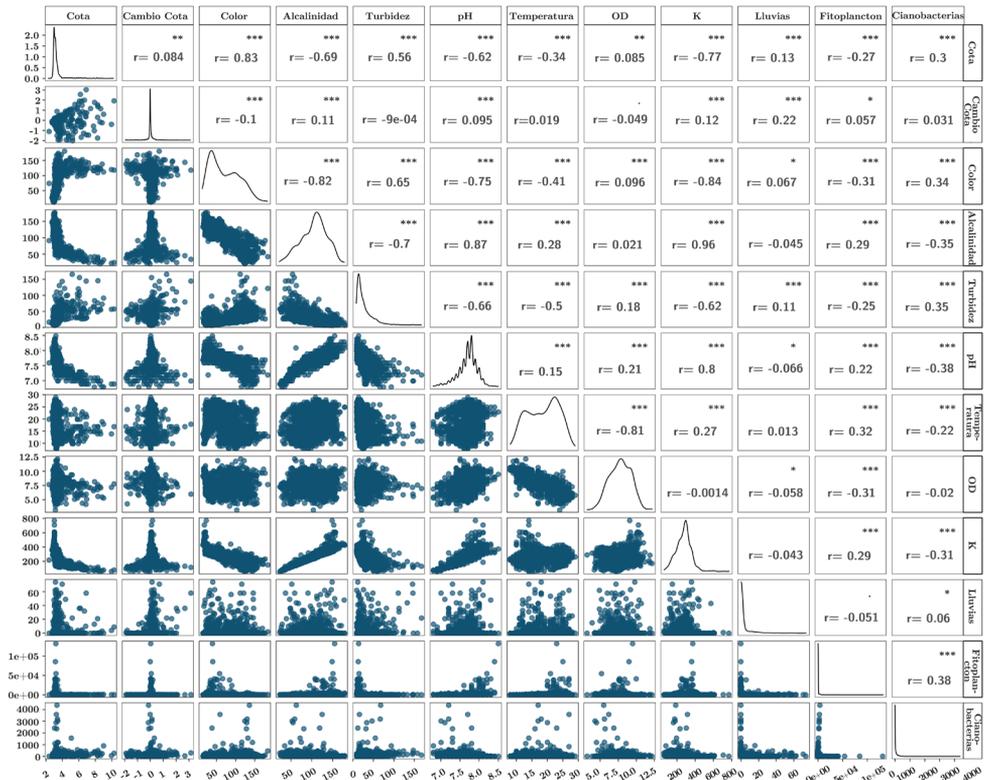
- García, M.L. y Protogino, L.C., 2005. Invasive freshwater molluscs are consumed by native fishes in South America. En: *Journal of Applied Ichthyology*, 21(1), pp.34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00570.x>
- Giglio, M., Dreher Mansur, M.C., Damborenea, C., Penchaszadeh, P. y Darrigran, G., 2016. Reproductive pattern of the aggressive invader *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in South America. En: *Invertebrate Reproduction & Development*, 60(3), pp.175–184.
- González-Bergonzoni, I., Silva, I., Teixeira de Mello, F., D’Anatro, A., Boccardi, L., Stebniki, S., Brugnoli, E., Tesitore, G., Vidal, N. y Naya, D.E., 2020. Evaluating the role of predatory fish controlling the invasion of the Asian golden mussel *Limnoperna fortunei* in a subtropical river. En: *Journal of Applied Ecology*, 57, pp.717–728. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13573>
- Kassambara, A., 2020. *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 10 de julio de 2020]. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Langone, J., 2005. Notas sobre el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) en Uruguay. En: *Publicación Extra Museo Nacional de Historia Natural y Antropología*, 1, pp.1–17.
- Linares, M.S., Callisto, M. y Marques, J.C., 2017. Invasive bivalves increase benthic communities complexity in neotropical reservoirs. En: *Ecological Indicators*, 75, pp.279–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.046>
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. y Marchetti, M.P., 2007. *Invasion ecology*. Malden: Blackwell.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. y Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. En: *Hydrobiologia*, 11(2), pp.143–170. <https://doi.org/10.1007/BF00007865>
- Maberly, S. y Wang, B., 2018. Preface to effects of dams on river biogeochemistry and ecology. En: *Inland Waters*, 8(2). <https://doi.org/10.1080/20442041.2018.1469335>
- Mitrovic, S.M., Hardwick, L. y Dorani, F., 2011. Use of flow management to mitigate cyanobacterial blooms in the Lower Darling River, Australia. En: *Journal of Plankton Research*, 33(2), pp.229–241. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq094>
- Montalto, L. y Ezcurra de Drago, I., 2003. Tolerance to desiccation of an invasive mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae), under experimental conditions. En: *Hydrobiologia*, 498(1), pp.161–167. <https://doi.org/10.1023/A:1026222414881>

- Morton, B., 2015. The biology and anatomy of *Limnoperna fortunei*, a significant freshwater bioinvader: blueprints for success. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.3–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_1
- Morton, B., 1987. Comparative life history tactics and sexual strategies of the fresh and brackish water bivalve fauna of Hong Kong and southern China. En: *American Malacology Bulletin*, 5, pp.91-99
- Morton, B., 1977. The population dynamics of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia: Mytilacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. En: *Malacologia*, 16, pp.165-182
- Morton, B., 1975. The colonization of Hong Kong's raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalva: Mytilacea) from China. En: *Malacological Review*, 8, pp.91–105.
- Nakanishi, M. y Mukai, S., 1997. Growth and extermination of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) at water purification facilities. En: *Journal Water Waste*, 39(11), pp.15–18.
- Oliveira, M.D., Calheiros, D.F., Jacobi, C.M. y Hamilton, S.K., 2011. Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. En: *Biological Invasions*, 13, pp.717–729. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9862-0>
- Oliveira, M.D., Campos, M.C.S., Paolucci, E.M., Mansur, M.C.D. y Hamilton, S.K., 2015. Colonization and Spread of *Limnoperna fortunei* in South America. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.333–355. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_19
- Oliveira, M.D., Takeda, A.M., de Barros, L.F., Barbosa, D.S. y de Resende, E.K., 2006. Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) of the Pantanal Wetland, Brazil. En: *Biological Invasions*, 8, pp.97–104. <https://doi.org/10.1007/s10530-005-0331-0>
- Pastorino, G., Darrigran, G.A., Lunaschi, L. y Martín, S.M., 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. En: *Neotropical*, 39.
- Penchaszadeh, P., Darrigran, G., Angulo, C., Averbuj, A., Brignoccoli, N., Brögger, M., Dogliotti A. y Pérez, Y.N., 2000. Predation on the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846 (Anostomidae) in the Río de la Plata, Argentina. En: *Journal Shellfish Research*, 19(1), pp.229-231.

- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing [En línea]. Vienna: *R Foundation for Statistical Computing*. [Consulta: 10 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
- Rojas Molina, F.R., José de Paggi, S.B. y César Paggi, J., 2015. Impacts of *Limnoperna fortunei* on Zooplankton. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna Fortunei*. Cham: Springer. pp.177–190.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_10
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B. y Kinzig, A., 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. En: *Science*, 287(5459), pp.1770–1774.
- Santos, C.P. dos, Würdig, N.L. y Mansur, M.C.D., 2005. Fases larvais do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. En: *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), pp.702–708. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000300029>
- Silva, I., Naya, D., de Mello, F. T., D’Anatro, A., Tesitore, G., Clavijo, C. y González-Bergonzoni, I., 2020. Fish vs. Aliens: predatory fish regulate populations of *Limnoperna fortunei* mitigating impacts on native macroinvertebrate communities. En: *Hydrobiologia*, pp.1-21. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04421-9>
- Sournia, A., ed., 1978. *Phytoplankton manual, monographs on oceanographic methodology*. Paris: Unesco.
- Therneau, T. y Atkinson, B., 2019. *rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-15* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 10 de julio de 2020]. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>
- Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, 2020. *Observatorio ambiental nacional* [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 30 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.dinama.gub.uy/oan/geoportal/>
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Nueva York: Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Xu, M.; Darrigran, G.; Wang, Z.; Zhao, N.; Lin, Ch and Pan, B., 2015. Experimental study on control of *Limnoperna fortunei* biofouling in water transfer tunnels. En: *Journal of Hydro-environment Research*, 9(2), pp.248-258. doi:10.1016/j.jher.2014.06.006.
- Zarfl, C., Lumsdon, A.E., Berlekamp, J., Tydecks, L. y Tockner, K., 2015. A global boom in hydropower dam construction. En: *Aquatic Science*, 77, pp.161–170. <https://doi.org/10.1007/s00027-014-0377-0>

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de correlación entre las variables ambientales y fitoplanctónicas. Panel superior: coeficientes de correlación de Spearman y diferencias significativas marcadas con * (p-valores: ***, 0; **, 0.001; *, 0.05) entre las variables. Panel inferior: biplots entre las variables. Diagonal: gráfico de distribución de cada variable



Ventajas y límites de la variabilidad morfofisiológica para el establecimiento, la colonización y la expansión del bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* en Sudamérica

Benefits and limits of morphophysiological variability for the establishment, colonization, and expansion of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* in South America

Benefícios e limites da variabilidade morfofisiológica para o estabelecimento, colonização e expansão do bivalve invasor *Limnoperna fortunei* na América do Sul

RECIBIDO: 4/9/2020 → APROBADO: 2/12/2020 ✉ estebanmpaolucci@gmail.com

PAOLUCCI, ESTEBAN MARCELO
(1) MUSEO ARGENTINO DE CIENCIAS NATURALES “BERNARDINO RIVADAVIA” - CONICET,
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES, UBA. BUENOS AIRES, ARGENTINA.

RESUMEN

La variabilidad fenotípica, tanto basada en plasticidad fenotípica como en diversidad genética, puede tener una gran importancia durante el proceso de invasión de las especies exóticas. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) fue introducido en Sudamérica alrededor de 1990, en el estuario del Río de la Plata, Argentina, desde donde se expandió rápidamente hasta abarcar prácticamente toda esta cuenca y otras aledañas. Sin embargo, algunos ambientes no han sido colonizados y, presumiblemente, la supervivencia de esta especie se vio afectada por distintos factores ambientales como los sólidos en suspensión, la salinidad, y la contaminación. *L. fortunei* evidenció una alta variabilidad genética y morfológica, mostrando una distribución fuertemente afectada por las actividades humanas y por sus vectores de dispersión. El grado de variabilidad fenotípica estaría jugando un papel fundamental en su establecimiento, o no, en los diferentes ambientes. Las variaciones morfológicas y metabólicas, incluyendo cambios en la tasa de crecimiento, desarrollo de órganos internos o cambios en la tasa de filtrado y respiración en áreas límite de su distribución o bajo condiciones ambientales extremas, permitirían explicar, junto con otras variables como la presencia de vectores de dispersión, el patrón de distribución actual.

PALABRAS CLAVE: ecofisiología, especies exóticas, distribución, mejillón dorado, morfología.

ABSTRACT

Phenotypic variability, both based on phenotypic plasticity and genetic diversity, can be a main factor affecting the invasion process of alien species. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) was introduced in South America around 1990, in the Río de la Plata estuary, Argentina, from where it spread swiftly to cover most of the basin and other smaller watersheds. However, some environments have not been colonized and, presumably, the survival of this species was affected by different environmental factors such as suspended solids, salinity, and pollution. *L. fortunei* showed high genetic and morphological variability, showing a distribution strongly affected by human activities and its dispersal vectors. The degree of phenotypic variability would be playing a main role in its establishment, or not, in the different environments. Morphological and metabolic variations, including changes in the growth rate, development of internal organs or changes in the rate of filtration and respiration in border areas of its distribution or under extreme environmental conditions, would allow to explain, together with other variables such as the presence of dispersal vectors, the current distribution pattern.

KEYWORDS: ecophysiology, exotic species, distribution, golden mussel, morphology.

RESUMO

A variabilidade fenotípica, tanto baseada na plasticidade fenotípica quanto na diversidade genética, pode ser um dos principais fatores que afetam o processo de invasão de espécies exóticas. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) foi introduzido na América do Sul por volta de 1990, no estuário do Río de la Plata, Argentina, de onde se espalhou rapidamente para cobrir a maior parte da bacia e outras bacias hidrográficas menores. No entanto, alguns ambientes não foram colonizados e, presumivelmente, a sobrevivência desta espécie foi afetada por diferentes fatores ambientais, como sólidos em suspensão, salinidade e poluição. *L. fortunei* apresentou alta variabilidade genética e morfológica, apresentando uma distribuição fortemente afetada pelas atividades humanas e seus vetores de dispersão. O grau de variabilidade fenotípica estaria desempenhando um papel fundamental no seu estabelecimento, ou não, nos diferentes ambientes. Variações morfológicas e metabólicas, incluindo alterações na taxa de crescimento, desenvolvimento dos órgãos internos ou alterações na taxa de filtração e respiração em áreas fronteiriças de sua distribuição ou sob condições ambientais extremas, permitiriam explicar, em conjunto com outras variáveis como a presença de vetores de dispersão, o padrão de distribuição atual.

PALAVRAS-CHAVE: ecofisiologia, espécie exótica, distribuição, mexilhãodourado, morfologia.

INTRODUCCIÓN

Una vez introducida y establecida una especie exótica, el proceso de colonización de un nuevo ambiente es un fenómeno complejo que depende de múltiples factores antrópicos y ambientales, así como de características intrínsecas de la

especie introducida (Blackburn, et al., 2011). Aunque realizar generalizaciones acerca de estas características resulta difícil pues su valor parece relativo al contexto ambiental (Boltovskoy, et al., 2020), la variabilidad genética y fenotípica puede determinar la extensión y diversidad de ambientes a colonizar (Sax, et al., 2007; Kelley, 2014). Sin embargo, también se ha cuestionado el valor mismo de la diversidad genética y plasticidad fenotípica para las especies invasoras (Drown, et al., 2011; Davidson, et al., 2011), dada la existencia de exitosos invasores resistentes a ambientes extremos (Paolucci y Thuesen, 2020; Rabushko, et al., 2020), pero con muy baja variabilidad genética y plasticidad fenotípica, aparentemente similar a la de especies nativas coexistentes (Levri, et al., 2014). En paralelo, la presión de propágulos, es decir la magnitud y el número de eventos de introducción, puede ser determinante no solo en la introducción inicial sino también en la dispersión a nuevos ambientes, ya que abarca tanto las características biológicas como la presencia de vectores de dispersión (Lockwood, et al., 2009). Este proceso no es irreversible; aunque los ejemplos son escasos, Blackburn y otros (2011) describen detalladamente el retroceso y la desaparición de especies exóticas, incluyendo explícitamente la posibilidad de fallas en cualquier etapa de la colonización.

En este contexto, el estudio del grado de variabilidad genética, morfológica y metabólica de una especie invasora ayuda a comparar la importancia relativa de estos factores frente a otros como la presión de propágulos, y así comprender cuáles son los determinantes de ese proceso de invasión en particular. El presente trabajo expone los últimos reportes sobre la distribución del bivalvo exótico *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en Sudamérica, recopilando las evidencias sobre variabilidad morfológica y metabólica que podrían facilitar o condicionar la colonización de diversos ambientes. Frente a la expansión de la distribución de esta especie exótica, ya reiteradamente predicha (Oliveira, et al., 2015), se estudian las variables que puedan sustentar o limitar la expansión y mitigar el impacto de esta especie. Se analizan datos publicados e inéditos acerca de variaciones morfológicas y metabólicas de relevancia en la supervivencia en los ecosistemas colonizados, y se discute la potencial plasticidad fenotípica de esta especie en el marco de la variabilidad genética reportada.

Bivalvos exóticos y plasticidad fenotípica

Las variaciones morfológicas y metabólicas observadas en bivalvos en general demuestran la gran capacidad de estos organismos para establecerse en nuevos ambientes (McLachlan, et al., 1995; Soares, et al., 1998); incluyendo numerosos ejemplos de especies invasoras como las almejas asiáticas *Corbicula fluminea* y *C. larguillerti*, el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*, el mejillón quagga *D. rostriformis bugensis*, y la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, entre otros (Alexander, et al., 1994; Marsden, et al., 1996; Sousa, et al., 2007; Dutertre, et al., 2009; Peyer, et al., 2010). En varios de estos estudios se probó que la plasticidad fenotípica fue uno de los mecanismos más importantes que permitió una rápida respuesta a las diferentes y cambiantes condiciones ambientales.

La plasticidad fenotípica en bivalvos se ve reflejada en cambios en la morfología de las valvas, en órganos paliars como el área branquial o en los palpos labiales

como respuesta a las distintas condiciones ambientales (Payne, et al., 1995; Lei, et al., 1996; Peyer, et al., 2010). Particularmente, en los moluscos lamelibranquios se observan cambios morfológicos en respuesta a variaciones en la cantidad y el tipo de alimento, los sedimentos en suspensión y otras variables ambientales que pueden afectar su capacidad de filtración. Por ejemplo, una disminución en el área branquial y un incremento en el área de los palpos labiales se ha asociado a ambientes de alta turbidez (Drent, et al., 2004; Dutertre, et al., 2009). Según dichos autores, estos cambios representarían una ventaja al evitar el daño de las branquias por el material en suspensión, e incrementarían la capacidad de seleccionar el alimento, función atribuida a los palpos labiales en moluscos. Una mayor área branquial ha sido observada en bivalvos establecidos en ambientes de baja concentración de oxígeno (Scott, 2005), siendo frecuente asumir que una mayor superficie de filtración incrementa la capacidad respiratoria y de alimentación, lo que podría considerarse como una respuesta adaptativa a las condiciones ambientales (Alexander, et al., 1994; Lei, et al., 1996).

Por otro lado, también se han observado en moluscos en general, y particularmente en bivalvos exóticos, respuestas metabólicas y fisiológicas frente a cambios ambientales tales como cambios en la temperatura, salinidad, disponibilidad de alimentos y otros (Fanslow, et al., 2001; Hamdoun, et al., 2003; Barrento, et al., 2013; Tyner, et al., 2015). Se ha estudiado la relación entre la tolerancia a cambios térmicos y la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas de shock térmico (HSP70) en distintas especies exóticas, demostrando la base genética para la plasticidad metabólica como respuesta a condiciones de estrés (Hamdoun, et al., 2003; Kelley, 2014).

***Limnoperna fortunei*: llegada, dispersión y distribución de un molusco exótico en Sudamérica**

La invasión del bivalvo exótico *Limnoperna fortunei* en Sudamérica comenzó alrededor de 1990, cuando se detectó por primera vez en el estuario del Río de la Plata, Argentina, probablemente introducido por agua de lastre de barcos comerciales provenientes del sudeste de Asia (Darrigran y Pastorino, 1995). En 2015, Oliveira y otros publicaron una actualización de la distribución de *L. fortunei* en Sudamérica, la cual incluía casi todos los principales cuerpos de agua de la Cuenca del Río de la Plata, al igual que otras cuencas vecinas como Guaíba, Tramandai, Patos-Mirim, y Mar Chiquita (Figura 1). Durante los primeros años del proceso de invasión, la dispersión fue rápida -alcanzando valores de hasta 250 km por año-, en gran medida determinada por el transporte río arriba a través de embarcaciones en la Hidrovía Paraná-Paraguay (Darrigran y Pastorino, 2004; Boltovskoy, et al., 2006; Oliveira, et al., 2011).



Figura 1. Mapa de distribución de *Limnoperna fortunei* en Sudamérica (Modificado de Oliveira, et al., 2015, puntos negros), con nuevos registros de la especie en Brasil, puntos rojos y verdes, reportados por Barbosa y otros (2016) y Senskey otros (2019) respectivamente, y nuevos reportes en Argentina (punto amarillo, Anónimo, 2019).

Ya en 1998, *L. fortunei* había sido registrada a más de 3.400 kilómetros aguas arriba del lugar de introducción, en el río Paraguay Superior, uno de los principales cursos de la Cuenca del Río de la Plata (Oliveira, et al., 2015). Dada esta velocidad de dispersión, se sugirió que la especie podría avanzar río arriba colonizando ambientes conectados a los afluentes y lagunas asociadas al río Paraguay, pudiendo alcanzar incluso afluentes y cursos de agua de la cuenca del Amazonas (Uliano-Silva, et al., 2013). Sin embargo, una menor intensidad del tránsito naviero (solo embarcaciones menores de tránsito local) y condiciones ambientales adversas (ambientes anóxicos; Oliveira, et al., 2010) podrían disminuir considerablemente tanto la presión de propágulo como su supervivencia fuera de los cursos principales, y consecuentemente la expansión de *L. fortunei*. Aunque se ha reportado una tolerancia a la anoxia relativamente mayor a otras especies de bivalvos invasores (Karatayev, et al., 2015), los eventos de anoxia extrema detectados en las lagunas conectadas al canal principal del río Paraguay parecen producir grandes mortandades en

larvas y adultos de *L. fortunei* y, aparentemente, limitar su distribución (Oliveira, et al., 2010; Pessotto y Nogueira, 2018).

L. fortunei continuó expandiendo su distribución hacia el norte y fue reportada en cuencas vecinas, incluyendo las del río San Francisco (Barbosa, et al., 2016), del Complejo Bahía-Estuario de Santos, São Vicente y del Canal de Bertioga (Senske, et al., 2019), estas dos últimas en Brasil (Figura 1). Su presencia en estas cuencas parece más relacionada a una introducción secundaria, producto de la actividad de algún vector de introducción más que a una expansión natural de la distribución; por ejemplo, el agua de lastre para el caso del Complejo Bahía-Estuario de Santos, São Vicente y del Canal de Bertioga (Senske, et al., 2019). Esta expansión hacia el norte en zonas tropicales contrasta con la falta de nuevos registros hacia el límite sur de su distribución en Sudamérica, donde hasta al momento no se han registrado ríos ni otros cuerpos de agua colonizados por *L. fortunei*.

Elevados valores de salinidad marcan un límite de distribución para esta especie dulceacuícola, y el efecto de esta variable sobre la mortalidad de *L. fortunei* fue estudiado reproduciendo las fluctuaciones de salinidad típicas del estuario del Río de la Plata, tolerando hasta un 23% de salinidad (Sylvester, et al., 2013). Dicha tolerancia cae a 2% en condiciones de exposición constante (Angonesi, et al., 2008). Este factor estaría limitando su distribución, es decir, permitiendo colonizar solo parcialmente distintos ambientes costeros como la Laguna Los Patos (Barbosa y Melo, 2009), el complejo estuarino São Vicente y el Canal de Bertioga (Senske, et al., 2019), o el propio Río de la Plata (Sylvester, et al., 2013). Sin embargo, parece interesante destacar la diferencia en la tolerancia a valores altos de salinidad observada al comparar los trabajos de Sylvester y otros (2013) y Angonesi y otros (2008). En el primer estudio, la mayor supervivencia reportada por exposición discontinua a valores altos de salinidad se basaría, según los autores, en la capacidad de esta especie de modificar su comportamiento cerrando las valvas como respuesta a las condiciones adversas (Cataldo, et al., 2003). Este comportamiento flexible, así como quizás otros mecanismos de compensación osmótica no suficientemente estudiados (Deaton, et al., 1989), permitirían a esta especie sobrevivir en ambientes de salinidad intermedia, los cuales suelen poseer gran actividad naviera y portuaria con la consecuente importancia en la dispersión de esta especie hacia otros ambientes, como fue analizado por Sylvester y otros (2013).

Otros saltos menores en la distribución se observaron en Argentina, donde a fines de 2019 personal del Instituto de Biodiversidad Tropical y de la Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Tucumán reportaron a los medios locales la presencia de esta especie en el Dique Celestino Gelsi (El Cadillal, Tucumán), ubicado sobre el río Salí, y en un tributario de éste, el río Loro (Figura 1) (Anónimo, 2019). Estos ríos forman parte de una cuenca endorreica que desemboca en la Laguna de Mar Chiquita, junto con otros ríos como el Primero y Segundo, donde ya se había reportado previamente la presencia de *L. fortunei* en el año 2006 (Oliveira, et al., 2015). Sin embargo, aunque todos estos cuerpos de agua son afluentes de la mencionada laguna, la intermitencia de los mismos y la elevada salinidad de la Laguna de Mar Chiquita, que varía entre 24.8 y 360.3 g/L (Reati, et al., 1996), probablemente estén limitado la expansión dentro de la cuenca, tal como fue observado en

otras cuencas vecinas (Darrigran, et al., 2011). De hecho, es altamente probable que este salto en la distribución se haya producido por la actividad de vectores locales como botes de pescadores y de recreación, que le permitieron a *Limnoperna* saltar las barreras ambientales existentes. Estas mismas barreras naturales para la dispersión de *L. fortunei*, sumadas a la gran cantidad de sedimentos en suspensión, fueron propuestas para diversos tributarios andinos de la Cuenca del Plata, como los ríos Salado del Norte, Bermejo y Pilcomayo (Darrigran, et al., 2011), que no han sido colonizados a pesar de tener conexión directa con otros cuerpos de agua de la cuenca donde se reportan poblaciones permanentes del bivalvo.

Por el contrario, se han registrado algunos casos de fracaso en la colonización o retroceso significativo de las poblaciones de *Limnoperna* en ambientes donde se había reportado esta especie, como es el caso de los embalses Piraquara I y Guaricana, en la Alta Cuenca del río Iguazú, Brasil (Frehse, et al., 2018), y el Embalse Río Tercero en Córdoba, Argentina (Mariñelarena, et al., 2016). En el primer caso, se trató de solo cinco individuos adultos reportados por Takeday y otros (2003), de los cuales desafortunadamente no se proveen más datos que permitan chequear el estado de los individuos ni confirmar su identidad. Es más, sucesivos estudios en los mismos cuerpos de agua no lo pudieron confirmar -incluso analizando el ADN mitocondrial extraído del total de las muestras de plancton colectadas-, quedando esta especie limitada al tramo inferior del río Iguazú (Pestana, et al., 2010; Borges, et al., 2017; Frehse, et al., 2018). A pesar de haberse reportado como un caso fallido de invasión, la escasa cantidad de organismos reportados inicialmente y la escasa información sobre los mismos impiden realizar un análisis más profundo de la dinámica de dispersión y posible colonización en estos cuerpos de agua. Probablemente más estudios sean necesarios para conocer si *L. fortunei* está presente en la zona, tal vez como poblaciones reducidas aun en periodo de latencia. Por otro lado, el Embalse Río Tercero, uno de los ambientes donde más detalladamente se estudiaron las densidades de *L. fortunei* mediante muestreos intensivos realizados por buzos, mostró una gran abundancia 10 años después de la colonización de este ambiente (Boltovskoy, et al., 2009a). La distribución reportada no fue uniforme, los sustratos rocosos alcanzaron densidades promedio de hasta 4.867 ind.m⁻², entre 0 y 10 metros de profundidad, mientras que en otros sustratos o a mayores profundidades las densidades fueron mucho menores o incluso nulas. Según este estudio, llevó entre cuatro y ocho años, desde el momento de su introducción en 1998, alcanzar las densidades observadas (en promedio 959 ind.m⁻²) para este embalse de 0.48 km³, con amplia disponibilidad de sustratos duros para ser colonizados y escasa presencia de peces u otros depredadores. Más recientemente se comenzó a registrar una disminución sustancial de las colonias de *L. fortunei* (Mariñelarena, et al., 2016; Correa, et al., 2015). Aunque no se realizó un nuevo estudio reportando las densidades de las poblaciones en este ambiente, las colonias parecen haber desaparecido de las zonas donde solían ser abundantes en comparación con lo observado durante los primeros años de la invasión (Miguel Hechem com. pers.; Mongi, 2019; Correa, et al., 2015). Sin embargo, es necesario confirmar esta tendencia e investigar más profundamente sus causas, entre las cuales se ha mencionado la disminución del nivel del agua (Correa, et al., 2015). Con solo dos bajantes pronunciadas

del nivel del embalse confirmadas durante el periodo analizado no es posible realizar una cuantificación objetiva del impacto en las poblaciones del bivalvo invasor (Correa, et al., 2015). En caso de confirmarse esta disminución poblacional, podría tratarse también de una fase normal en la dinámica de colonización conocida como boom-bust y definida por Strayer y otros (2017) como un crecimiento exponencial seguido de una rápida disminución para alcanzar una densidad poblacional más estable o incluso desaparecer.

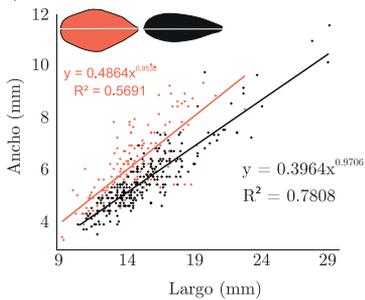
Un factor biológico mencionado como potencialmente capaz de limitar la abundancia y/o distribución de esta especie es la presencia de depredadores, en particular peces (Paolucci, et al., 2007; Sylvester, et al., 2007; Nakano, et al., 2010; González-Bergonzoni, et al., 2020). Se han registrado alrededor de 50 especies de peces, tanto larvas como juveniles y adultos (Cataldo, 2015; Paolucci y Thuesen, 2015; González-Bergonzoni, et al., 2020), incluso en algunos casos consumiendo de manera preferencial (Paolucci, et al., 2010; Paolucci, et al., 2015; Paolucci, et al., 2017). Sin embargo, el efecto en los casos más extremos parece ser una disminución de la abundancia de *L. fortunei* que no resulta suficiente para impedir su avance o, más aún, producir su erradicación.

Respuestas morfológicas a los cambios ambientales

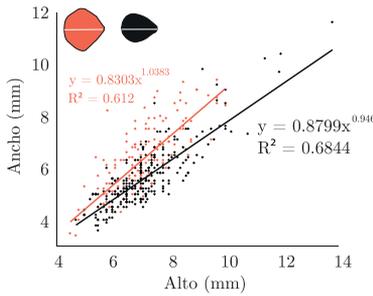
Limnoperna fortunei ha colonizado una gran diversidad de ambientes y, al menos con los estudios realizados hasta la fecha, ha fallado en colonizar otros. Sin embargo, a diferencia de lo que se ha descrito para otros bivalvos invasores, poco se conoce acerca de la respuesta fenotípica a condiciones ambientales adversas y cómo esta respuesta -junto a otros elementos clave como la capacidad de dispersión y la presencia de vectores- podría afectar su distribución. Un primer estudio a nivel regional en Sudamérica (Paolucci, et al., 2014b) permitió detectar variaciones morfológicas en esta especie basadas mayormente en cambios en las proporciones ancho-largo y ancho-alto de sus valvas (Figura 2a). Más aún, mostró que esas variaciones parecen tener un efecto importante a nivel del desarrollo interno, afectando mayormente al área branquial relativa (definida en función del área total del organismo para incluir la variación por tamaño: Figura 2b). Algunas poblaciones mostraron alta proporción de mejillones de mayor relación ancho/largo, resultando en mejillones menos alargados que las proporciones normales (Figura 2c) descritas originalmente para esta especie (Morton, 1973). Aunque las poblaciones analizadas por los autores resultaron de gran heterogeneidad, abarcando diversidad de ambientes y características, tres factores fueron destacados por los análisis como aparentemente relevantes para describir estas variaciones: los sólidos totales en suspensión, probablemente la baja concentración de oxígeno disuelto o la elevada contaminación registrada en algunas de las poblaciones estudiadas en el Río de la Plata (QU, BU, y PL en la figura 2b y 2c correspondientes a las poblaciones de Quilmes, Buenos Aires y Punta Lara). Desde el punto de vista de la morfología de las valvas, las poblaciones parecen agruparse en dos morfologías distintivas, con mejillones más alargados (poblaciones marcadas en negro en la Figura 2) y mejillones más anchos y cortos (poblaciones marcadas en rojo, Figura 2) con un diferente desarrollo branquial. Al comparar la variación morfológica con la estruc-

tura genética poblacional de estas mismas poblaciones, utilizando indicadores de diversidad nucleotídica y haplotípica de datos publicados por Zhan y otros (2012), y Ghabooli y otros (2013), y que por cierto mostraron una gran heterogeneidad espacial y diversidad genotípica, no se pudieron atribuir las distintas morfologías a los genotipos hallados. En base a este análisis, los autores de los tres trabajos citados sugieren en Paolucci y otros (2014b) que estas variaciones podrían originarse en un proceso de plasticidad fenotípica. Sin embargo, es razonable pensar que más trabajos deberían ser realizados para confirmar o descartar estos hallazgos.

a) Vista longitudinal



Vista Antero-posterior



b) Vista lateral

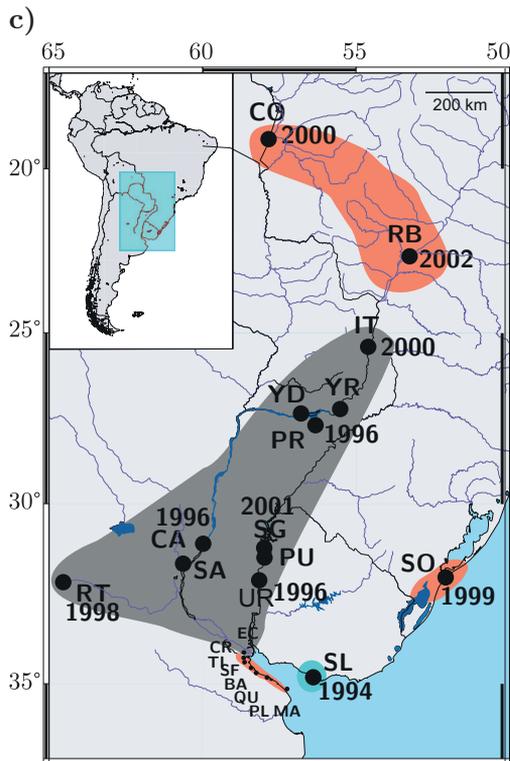
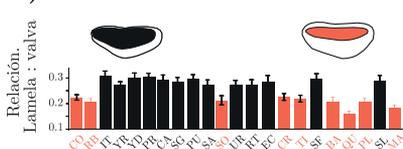


Figura 2. Relaciones ancho-largo, ancho-alto de las valvas (a) y del área branquial relativa (b, modificado de Paolucci et al., 2014b) para ejemplares de *Limnoperna fortunei* colectados en su área de distribución en Sudamérica (c, modificado de Zhan, et al., 2012).

Las branquias en *L. fortunei*, así como en bivalvos en general, están típicamente formadas por dos ctenidios de aspecto laminar (Figura 3a), formados a su vez por dos hemibranquias cada uno (Morton, 1973; Jørgensen, 1990). En el caso de *L. fortunei*, las hemibranquias son desiguales, siendo la hemibranquia externa (la más cercana al manto) más grande dorsoventralmente que la interna (Morton, 2015). Cada hemibranquia está formada por dos lamelas, una ascendente y otra descendente. Las dos lamelas descendentes de cada hemibranquia se juntan dorsalmente,

mientras que la unión ventral de las mismas con las respectivas lamelas ascendentes de cada hemibranchia forma los surcos alimentarios marginales (Figura 3a). Estos canales tienen una importancia fundamental en el transporte de partículas y alimento, ya que desembocan en la cavidad oral y en otras estructuras llamadas palpos labiales. Estos últimos son los órganos encargados de seleccionar y separar aquellas partículas sin valor alimenticio y descartarlas en forma de pseudoheces (Jørgensen, 1990). Las poblaciones estudiadas por Paolucci y otros (2014b) mostraron diferencias importantes en el área branquial como respuesta a cambios ambientales, y se presume que estas diferencias podrían también observarse en el área de los palpos labiales (Paolucci, et al., 2014a).

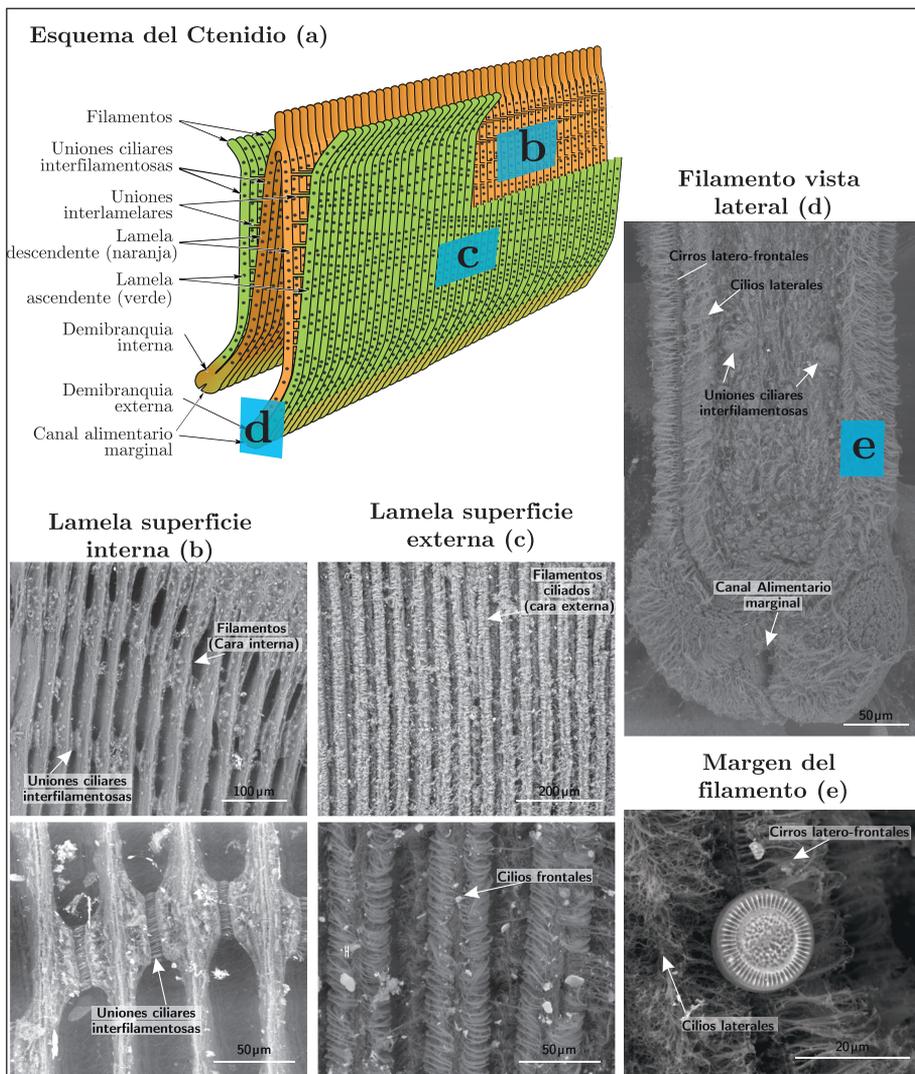


Figura 3. Esquema del ctenidio en *Limnoperna fortunei* (a, modificado de Morton, 2015), y micrografías electrónicas de la superficie lamelar interna (b), externa (c), vista lateral del filamento (d), y detalle de cilios laterales, cirros latero-frontales con partícula de alimento (e). Fotografías: Esteban M. Paolucci.

Así como en otros lamelibranquios filibranquiados, los ctenidios de *L. fortunei* están formados por filamentos alineados de manera paralela, con orientación dorso-ventral, y conectados por medio de discos ciliares o uniones ciliares interfilamentosos (Figura 3b-e). Según se comprobó en *Dreissena polymorpha*, estas uniones entre filamentos son discos ciliares con la capacidad de contraerse o separarse en base a estímulos iónicos ambientales y movimientos musculares, variando hasta en un 25% la superficie de las branquias (Medler y Silverman, 1997; Medler, et al., 1999). En el caso de *Limnoperna*, la distancia entre las uniones interfilamentosas no presentó diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas (Paolucci, et al., 2014b), lo cual probó que las diferencias en el área branquial halladas no corresponden a una reacción espontánea al medio iónico como fue mencionado previamente para *D. polymorpha* (Medler y Silverman, 1997; Medler, et al., 1999), sino a un proceso ontológico afectado probablemente por las condiciones ambientales.

Las branquias en *L. fortunei* están formadas por un solo tipo de filamento (branquias homorabdicas), pero cada filamento está cubierto por distintos tipos de cilios, cuyo movimiento conjunto es determinante en las funciones de respiración, alimentación y transporte de partículas. Los filamentos no presentan cilios adfrontales en la superficie interna de la lamela (Figura 3b), pero sí abundantes cilios frontales en la cara externa (lamela superficie externa, Figura 3c), y cilios laterales orientados hacia el espacio entre filamentos adyacentes (Figura 3e). Los cilios laterales (Figura 3e) son responsables de crear las corrientes que desplazan los fluidos a través de los filamentos entre las cámaras infra y supra branquial (definidas por las lamelas), y por consiguiente las corrientes inhalantes y exhalantes (Morton, 2015). *Limnoperna* también posee un tipo adicional de cilios, presentes también en otros mitílidos, llamados cirros latero-frontales, pues están constituidos por la unión de varios cilios y ubicados entre los cilios laterales y frontales (Figura 3d). Los cirros latero-frontales cumplen la función de filtrado, prolongándose lateralmente desde los filamentos hacia el espacio entre estos y captando las partículas que pasan (Figura 3d-e) para dirigir las hacia los cilios frontales (Dillon, 2000). Estos últimos transportan dichas partículas hacia los canales orales marginales. A pesar de su importancia funcional, no se observaron diferencias morfológicas tanto para el ancho promedio de los filamentos como para la longitud y densidad promedio de los cilios entre las poblaciones estudiadas en Sudamérica (Paolucci, et al., 2014b).

Los sólidos totales en suspensión y la contaminación fueron reportados previamente, afectando no solo la macroestructura sino también la ultraestructura de las branquias de bivalvos (Gregory, et al., 1999; Beninger, et al., 2008). Una particularidad de los bivalvos filtradores es la secreción de moco, que está aparentemente relacionado a la captación y al transporte de partículas que quedan impregnadas en dicha mucosidad (Jørgensen, 1990), pero también fue observado en gran cantidad en ambientes con mayor contaminación (David y Fontanetti, 2005). En ninguna de las poblaciones de *L. fortunei* analizadas por Paolucci y otros (2014b) se observaron daños en la estructura branquial, tal como fue reportado previamente para otros organismos filtradores. Sí se observó la presencia

de moco en las branquias, y aunque no pudo asociarse inequívocamente a condiciones de alta contaminación o de carga de sedimentos (Figura 4a-b), trabajos experimentales recientes muestran esta reacción característica en *L. fortunei* ante la presencia de metales pesados (Manske Nunes, et al., 2018).

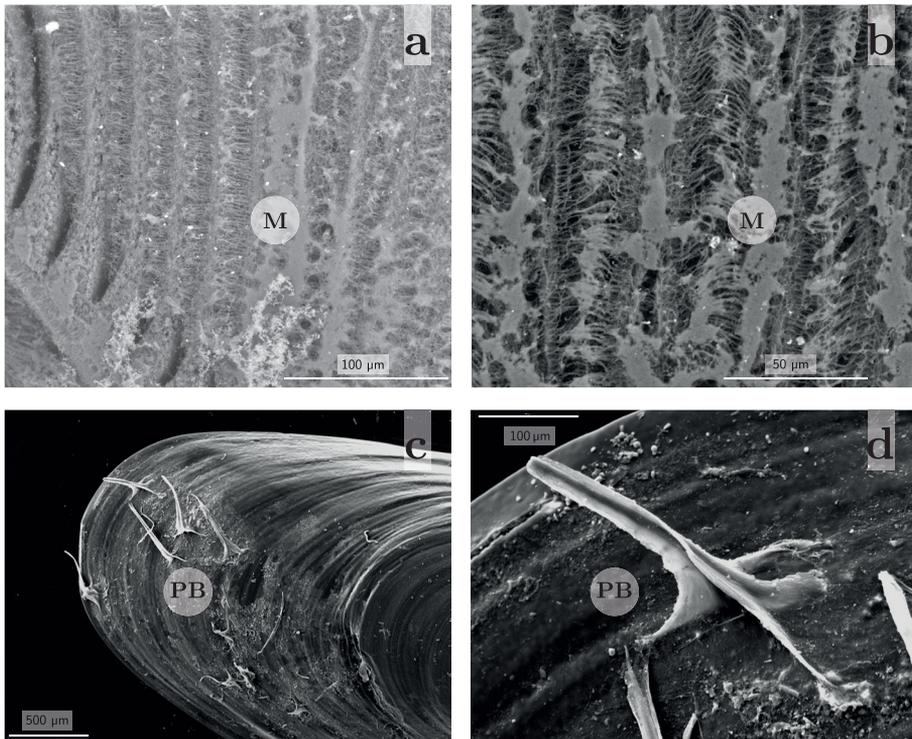


Figura 4. Detalle de la superficie branquial (a-b) secretando moco (M) y presencia de pelos bisales (PB) en el periostraco de *Limnoperna fortunei* (c-d). Fotografías: Esteban M. Paolucci.

Así como fue observado en otros bivalvos (Ockelmann, 1983; Ockelmann y Dinesen, 2009; Dinesen y Morton, 2014), en *L. fortunei* se registró otra interesante variación en la morfología externa, que es la presencia de pelos bisales en el periostraco de ejemplares juveniles y adultos (Montalto y Rojas Molina, 2014). Dichos pelos bisales fueron reportados en organismos colectados mayormente en ambientes lénticos del río Paraná, y adheridos a las raíces de macrófitas flotantes. Dado que no se los registró en organismos colectados en ambientes lóticos, se concluyó que las condiciones físicas más rigurosas podrían estar impidiendo el desarrollo de estas estructuras, cuya presencia estuvo inversamente correlacionada con la velocidad de la corriente (Montalto y Rojas Molina, 2014). Estos pelos bisales también fueron observados por el autor de esta revisión en ambientes lóticos, en particular en organismos colectados entre las raíces de árboles a orillas del Canal Arias, en el Delta del Paraná (Figura 4c-d), donde la velocidad de la corriente suele ser más baja que en el curso principal. La mayoría de los autores que investigaron estas estructuras sugiere que su presencia estaría relacionada con una reacción a los depredadores por la aparente utilidad como camuflaje de las mismas (Ockelmann, 1983; Ockelmann y Dinesen, 2009; Dinesen y Morton, 2014).

Variabilidad metabólica en *Limnoperna fortunei*

Existe una escasa cantidad de trabajos que abordan el estudio de variables fisiológicas y metabólicas de *L. fortunei*; y la mayoría está enfocada en estudiar la mortalidad y los indicadores metabólicos bajo condiciones extremas. Estos trabajos han medido la capacidad de osmorregulación bajo distintas salinidades (Deaton, et al., 1989); y el nivel de glucógeno en condiciones de inanición, tanto en laboratorio como durante el transporte (Cordeiro, et al., 2016; Cordeiro, et al., 2017) o bajo distintas temperaturas (Andrade, et al., 2018). Si bien todos estos estudios aportan evidencia acerca de un metabolismo flexible capaz de variar en función de variables como la temperatura, la disponibilidad de alimento y las condiciones ambientales en general, pocos aportan evidencia sobre la tasa metabólica en sí misma para esta especie. De hecho, aunque indirectamente, los menores valores de glucógeno observados por Andrade y otros (2018) a 30 °C en comparación con temperaturas menores indicarían un aumento del metabolismo en general.

En el primer estudio, donde se registraron los valores de consumo de oxígeno y tasa metabólica basal en *L. fortunei* para una población colectada en el Río de la Plata, Paolucci y otros (2019) reportaron valores promedio que variaron entre 0.89 ± 0.13 y 2.59 ± 0.28 mg O₂ gPSLC⁻¹h⁻¹ (PSLC= peso seco libre de cenizas), para temperaturas de entre 17 y 26 °C. Estos valores fueron muy similares, aunque levemente mayores, a los registrados en poblaciones de su área de distribución natural en China, en la cual la tasa metabólica varió entre $0,84 \pm 0,04$ y $2,01 \pm 0,24$ mg O₂ gPSLC⁻¹h⁻¹ para temperaturas de entre 15 y 30 °C (Fang y Xi-hui, 2005). En ambos casos se encontró una relación positiva con la temperatura (efecto Arrhenius) sin caída de la tasa metabólica, demostrando la capacidad de adaptar el metabolismo dentro de este rango de temperaturas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aun cuando no se han profundizado los estudios en este campo, resulta evidente que *L. fortunei* muestra una importante variabilidad morfológica y metabólica en respuesta a las variables ambientales registradas en su área de distribución actual en Sudamérica. Tal como fue observado en otros bivalvos exóticos (Payne, et al., 1995; Drent, et al., 2004; Dutertre, et al., 2009), dichas variaciones pueden verse como una ventaja que permitiría a esta especie sobrevivir y establecerse en los distintos ambientes. Por otro lado, la incapacidad de responder morfológica y metabólicamente ante las variaciones ambientales también nos puede brindar evidencia acerca de los límites en la capacidad de establecerse, explicando la ausencia de esta especie en algunos ambientes. Por supuesto que otros factores también pueden explicar su ausencia en diversos ambientes, como la falta de vectores que permitan la introducción de esta especie; o una vez introducida, distintos factores bióticos o abióticos incompatibles con la supervivencia y reproducción de *L. fortunei* podrían hacer fracasar el proceso de colonización. Un análisis más profundo de la diversidad de causas y factores que pueden limitar el proceso de invasión para especies exóticas en general puede hallarse en Blackburn y otros (2011).

Los cambios en las proporciones externas observados en *L. fortunei* (Paolucci, et al., 2014b), con predominio de organismos menos alargados que lo descripto normalmente

para la especie (Morton, 1973), podrían responder no solo a altas concentraciones de sólidos totales en suspensión y contaminación sino también a otras condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento de esta especie. De manera similar, en otros bivalvos se observaron alteraciones en las proporciones y el crecimiento como respuesta no solo a los sólidos totales en suspensión y la contaminación (Alexander, et al., 1994; Beninger, et al., 2008) sino también a cambios en la densidad poblacional, presión de depredación, tipo de sustrato, disponibilidad de comida y temperatura, entre otros (Marsden, et al., 1996; Sousa, et al., 2007; Peyer, et al., 2010). De hecho, varios de estos autores coinciden al reportar que el impacto de estas variables ambientales en la tasa de crecimiento daría como resultado alteraciones en las proporciones observadas.

Con respecto al efecto de los sólidos totales en suspensión, se ha demostrado experimentalmente el efecto de la carga de sedimentos sobre la capacidad filtradora de *L. fortunei* (Tokumon, et al., 2015), así como en otros bivalvos (Robinson, et al., 1984; Alexander, et al., 1994; Rosewarne, et al., 2014). En *L. fortunei*, la actividad filtradora cae un 50% cuando la concentración de sedimentos inorgánicos alcanza 1.0 g l⁻¹, y una caída más importante se produce a concentraciones mayores a 2 g l⁻¹, en comparación con lo observado a 0.1 g l⁻¹ (Tokumon, et al., 2015). Es probable que estas caídas afecten significativamente la capacidad de obtener alimento y oxígeno, con las esperables consecuencias sobre el metabolismo y funcionamiento en general, y expliquen, junto a la presencia de otros posibles efectos, la ausencia de la especie en ambientes con alta carga de sedimentos. En concentraciones menores de sólidos en suspensión, como las observadas en las poblaciones estudiadas en Paolucci y otros (2014b), el mismo mecanismo podría impactar sobre la alimentación y afectar el crecimiento, pero no limitar la posibilidad de supervivencia. De forma similar, altas concentraciones de metales pesados (Cd, Cr, Ni, Cu, Pb, Zn, entre otros), anoxia extrema y otras condiciones propias de cuerpos altamente contaminados resultan letales para *L. fortunei* (Bálsamo Crespo, et al., 2020; Contardo-Jara, et al., 2009), mientras que niveles aparentemente menores de metales pesados y otros contaminantes producirían un efecto negativo sobre el crecimiento, con cambios en la morfometría (Bonel, et al., 2013) similares a los reportados por Paolucci y otros (2014b).

La disminución del área branquial relativa observada por Paolucci y otros (2014b) en ambientes con mayor carga de sedimentos, podría ser solo una consecuencia indirecta de las distintas tasas de crecimiento y la correspondiente alteración en las proporciones. Sin embargo, podría tener un impacto positivo en la supervivencia si esta menor superficie branquial minimiza la exposición al material en suspensión potencialmente dañino para las estructuras branquiales, como fue observado en otros bivalvos (Payne, et al., 1995; Drent, et al., 2004). De lo contrario, solo disminuiría la superficie de filtración, pudiendo afectar las funciones de alimentación y respiración, sin representar ventaja alguna. Por otro lado, es más probable que el aumento de la superficie de los palpos labiales observado en *L. fortunei* (Paolucci, et al., 2014a) represente una ventaja en determinados ambientes, dada la importancia de los palpos en la selección de alimento y descarte de material particulado también observado en otros organismos filtradores (Barillé, et al., 2000; Drent, et al., 2004; Dutertre, et al., 2009). Sin embargo, más

estudios son necesarios para confirmar si estas variaciones representan una ventaja adaptativa para *L. fortunei*, tal como fue reportado en otros bivalvos (Drent, et al., 2004); y si en definitiva contribuyen al éxito en el proceso de invasión, como fue sugerido para otras especies de bivalvos invasores (Payne, et al., 1995).

La relación positiva entre tasa metabólica y temperatura ambiental observada en *L. fortunei* (Paolucci, et al., 2019) evidencia una capacidad metabólica que permite incrementar la tasa metabólica (efecto Arrhenius), aumentando la obtención de energía, utilizada a su vez en otros procesos que también escalan con la temperatura. Estos procesos incluyen tasa de filtración (Sylvester, et al., 2005), desarrollo embrionario (Cataldo, et al., 2005), actividad reproductiva (Boltovskoy, et al., 2009b), crecimiento (Nakano, et al., 2015), y excreción (Fang y Xi-hui, 2005). Consecuentemente, las tasas de respiración y metabólicas variables en función de la temperatura permiten a estos organismos ajustar su metabolismo a fin de obtener la energía requerida para sobrevivir y llevar a cabo los distintos procesos en nuevos ambientes, mientras estén dentro de los límites térmicos de tolerancia. Esta capacidad resulta fundamental para expandir su rango de distribución hacia nuevos hábitats, incluyendo distintos ambientes tropicales y subtropicales de Sudamérica, alcanzando también Centroamérica y Norteamérica, tal como los distintos modelos han predicho (Oliveira, et al., 2015). Sin embargo, estos resultados también evidencian la cercanía del límite de tolerancia térmica de esta especie; especialmente al analizar los datos a 26 °C y en su comparación con datos obtenidos a 30 °C, donde los valores de tasa metabólica no aumentan sino que parecen disminuir levemente -cerca de un 25%- para una temperatura mayor (30 °C). Esto podría ser indicio de una falta de respuesta metabólica a los cambios térmicos dentro de este rango de temperaturas, lo cual fue señalado como un indicio que marca el umbral térmico superior de una especie (Schulte, 2015), o que las poblaciones poseen nichos térmicos diferenciados (Deutsch, et al., 2015).

Es interesante destacar que, aunque se ha estudiado la estructura genética poblacional de esta especie en Sudamérica (Zhan, et al., 2012), y que en comparación con aquellas poblaciones de Asia mostró una relativamente alta diversidad (Ghabooli, et al., 2013), no se halló hasta el momento -como se mencionó previamente- correlación alguna con las variables morfológicas estudiadas como las proporciones ancho-largo o ancho-alto o el área branquial (Paolucci, et al., 2014b). Aunque esto podría depender del tipo de marcador molecular usado, las evidencias sugieren que la variabilidad morfológica observada en estas variables podría ser producto de la plasticidad fenotípica de esta especie. Más estudios son necesarios para confirmar que dicha variabilidad es expresada independientemente del genotipo de los organismos para estas variables (proporciones ancho-largo o ancho-alto y área branquial relativa), y para otras variables morfológicas sobre las que no se ha realizado ningún análisis. Estudios sobre el genoma para esta especie también han dado evidencias de una significativa plasticidad metabólica en respuesta a condiciones extremas (Uliano-Silva, et al., 2015). En particular, se ha reportado una expansión en la cantidad de genes de la familia enzimática HSP70 (Uliano-Silva, et al., 2015), los cuales se han asociado a plasticidad en los límites térmicos para otro bivalvo invasor como *Crassostrea gigas* (Hamdoun, et al., 2003).

AGRADECIMIENTOS

A Ernesto Brugnoli Oliveira e Iván González-Bergonzoni por la invitación a participar en esta publicación. A Demetrio Boltovskoy por su asistencia en la realización de las figuras. A Leila Ron, Sharon Lackie y Fabian Tricarico por la asistencia en la toma de microfotografías electrónicas.

REFERENCIAS

- Alexander, J.E., Thorp, J.H. y Fell, R.D., 1994. Turbidity and temperature effects on oxygen consumption in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(1), pp.179-184.
- Andrade, J.T.M., Cordeiro, N.I.S., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Luz, R.C.R., Martinez, C.B., Pinheiro, J., Paglia, A.P. y Vidigal, T.H.D.A., 2018. Effect of temperature on behavior, glycogen content, and mortality in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). En: *Journal of Limnology*, 77(2), pp.189-198. doi: <https://www.doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1658>
- Angonesi, L.G., Da Rosa, N.G. y Bemvenuti, C.E., 2008. Tolerance to salinities shocks of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* under experimental conditions. En: *Iheringia (Série Zoologia)*, 98, pp.66-69.
- Anónimo, 2019. El Cadillal, en alerta por la invasión y expansión de mejillones dorados [En línea]. En: *Revista Contexto de Tucumán*. [Consulta: 1 de setiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.contextotucuman.com/nota/174455/el-cadillal-en-alerta-por-la-invasion-y-expansion-de-mejillones-dorados.html>
- Bálsamo Crespo, E., Pereyra, P.J., Silvestro, A., Hidalgo, K. y Bulus Rossini, G., 2020. Acute Toxicity of Cd²⁺, Cr⁶⁺, and Ni²⁺ to the Golden Mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857). En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s00128-020-02854-5>
- Barbosa, F.G. y Melo, A.S., 2009. Modelo preditivo de sobrevivência do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) em relação a variações de salinidade na Laguna dos Patos, RS, Brasil. En: *Biota Neotrop*, 9(3), pp.407-412.
- Barbosa, N.P.U., Silva, F.A., De Oliveira, M.D., Neto, M.a.D.S., De Carvalho, M.D. y Cardoso, A.V., 2016. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil. En: *Check List*, 12(1), pp.1846. doi: <https://www.doi.org/10.15560/12.1.1846>
- Barillé, L., Haure, J., Cognie, B. y Leroy, A., 2000. Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(4), pp.837-843. doi: <https://www.doi.org/10.1139/f00-012>

- Barrento, S., Lupatsch, I., Keay, A. y Christophersen, G., 2013. Metabolic rate of blue mussels (*Mytilus edulis*) under varying post-harvest holding conditions. En: *Aquatic Living Resources*, 26(3), pp.241-247. doi: <https://www.doi.org/10.1051/alr/2013050>
- Beninger, P.G., Valdizan, A., Decottignies, P. y Cognie, B., 2008. Impact of seston characteristics on qualitative particle selection sites and efficiencies in the pseudolamellibranch bivalve *Crassostrea gigas*. En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360(1), pp.9-14. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2008.03.003>
- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., Wilson, J.R.U. y Richardson, D.M., 2011. A proposed unified framework for biological invasions. En: *Trends in Ecology & Evolution*, 26(7), pp.333-339. doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>.
- Boltovskoy, D., Correa, N., Cataldo, D. y Sylvester, F., 2006. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. En: *Biological Invasions*, 8(4), pp.947-963. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10530-005-5107-z>.
- Boltovskoy, D., Correa, N.M., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Thuesen, E.V., Sylvester, F. y Paolucci, E.M., 2020. Traits and impacts of introduced species: a quantitative review of meta-analyses. En: *Hydrobiologia*. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-020-04378-9>.
- Boltovskoy, D., Karatayev, A., Burlakova, L., Cataldo, D., Karatayev, V., Sylvester, F. y Mariñelarena, A., 2009a. Significant ecosystem-wide effects of the swiftly spreading invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Hydrobiologia*, 636(1), pp.271-284. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-009-9956-9>.
- Boltovskoy, D., Sylvester, F., Otaegui, A., Leites, V. y Cataldo, D.H., 2009b. Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*: implications for antifouling strategies. En: *Austral Ecology*, 34(7), pp.719-730. doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.01974.x>.
- Bonel, N., Solari, L.C. y Lorda, J., 2013. Differences in density, shell allometry and growth between two populations of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) from the Río De La Plata Basin, Argentina. En: *Malacologia*, 56(1-2), pp.43-58. doi: <https://www.doi.org/10.4002/040.056.0203>
- Borges, P.D., Ludwig, S. y Boeger, W.A., 2017. Testing hypotheses on the origin and dispersion of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) in the Iguassu River (Paraná, Brazil): molecular markers in larvae and adults. En: *Limnology*, pp.31-39. doi:<https://www.doi.org/10.1007/s10201-016-0485-8>

- Cataldo, D., Boltovskoy, D. y Pose, M., 2003. Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. En: Journal of the American Water Works Association, 95, pp.66-78.
- Cataldo, D., 2015. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with adult fishes. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.231-248.
- Cataldo, D., Boltovskoy, D., Hermosa, J.L. y Canzi, C., 2005. Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei* (bivalvia: mytilidae). En: *Journal of Molluscan Studies*, 71(1), pp.41-46.
doi: <https://www.doi.org/10.1093/mollus/eyi005>.
- Contardo-Jara, V., Galanti, L.N., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A. y Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in watercourses of Córdoba, Argentina. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), pp.1871-1880.
doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.001>.
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Araújo, J.M., Martinez, C.B., Pinheiro, J. y Vidigal, T.H.D.A., 2017. Physiological response of invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) submitted to transport and experimental conditions. En: *Brazilian Journal of Biology*, 77(1), pp.191-198.
- Cordeiro, N.I.S., Andrade, J.T.M., Montresor, L.C., Luz, D.M.R., Martinez, C.B., Darrigran, G., Pinheiro, J. y Vidigal, T.H.D.A., 2016. Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). En: *Journal of Limnology*. doi: <https://www.doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1465>
- Correa, N., Sardiña, P., Perepelizin, P.V. y Boltovskoy, D., 2015. *Limnoperna fortunei* colonies: structure, distribution and dynamics. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.119-143.
- Darrigran, G., Damborenea, C., Drago, E.C., Ezcurra De Drago, I. y Paira, A., 2011. Environmental factors restrict the invasion process of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in the Neotropical region: a case study from the Andean tributaries. En: *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 47(3), pp.221-229. doi: <https://www.doi.org/10.1051/limn/2011025>
- Darrigran, G.A. y Pastorino, G., 1995. The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. En: *The Veliger*, 38, pp.171-175.

- Darrigran, G.A. y Pastorino, G., 2004. Distribution of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), (Bivalvia: Mytilidae [Mytilidae]) after 10 years invading America. En: *Journal of Conchology, Special Publication*, 3, pp.95-101.
- David, J.a.D.O. y Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. En: *Braz J Morphol Sci*, 22(4), pp.203-210.
- Davidson, A.M., Jennions, M. y Nicotra, A.B., 2011. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. En: *Ecology Letters*, 14(4), pp.419-431.
doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01596.x>.
- Deaton, L.E., Derby, J.G.S., Subhedar, N. y Greenberg, M.J., 1989. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 133(1-2), pp.67-79.
doi: [https://www.doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90158-5](https://www.doi.org/10.1016/0022-0981(89)90158-5)
- Deutsch, C., Ferrel, A., Seibel, B., Pörtner, H.-O. y Huey, R.B., 2015. Climate change tightens a metabolic constraint on marine habitats. En: *Science*, 348(6239), pp.1132-1135. doi: <https://www.doi.org/10.1126/science.aaa1605>.
- Dillon, R.T., 2000. *The ecology of freshwater molluscs*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dinesen, G.E. y Morton, B., 2014. Review of the functional morphology, biology and perturbation impacts on the boreal, habitat-forming horse mussel *Modiolus modiolus* (Bivalvia: Mytilidae: Modiolinae). En: *Marine Biology Research*, 10(9), pp.845-870. doi: <https://www.doi.org/10.1080/17451000.2013.866250>
- Drent, J., Luttikhuisen, P.C. y Piersma, T., 2004. Morphological dynamics in the foraging apparatus of a deposit feeding marine bivalve: phenotypic plasticity and heritable effects. En: *Functional Ecology*, 18, pp.349-356.
- Drown, D.M., Levri, E.P. y Dybdahl, M.F., 2011. Invasive genotypes are opportunistic specialists not general purpose genotypes. En: *Evolutionary Applications*, 4(1), pp.132-143. doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00149.x>.
- Dutertre, M., Barillé, L., Beninger, P.G., Rosa, P. y Gruet, Y., 2009. Variations in the pallial organ sizes of the invasive oyster, *Crassostrea gigas*, along an extreme turbidity gradient. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85(3), pp.431-436.
doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.ecss.2009.09.007>

- Fang, G. y Xi-Hui, Z., 2005. Research on the oxygen consumption and ammonia excretion of invasive mussel *Limnoperna fortunei* in raw water transport pipeline. En: *Water & Wastewater Engineering*, 31(11), pp.23-26.
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F. y Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. En: *Hydrobiologia*, 448, pp.61-70. doi: <https://www.doi.org/10.1023/a:1017582119098>
- Frehse, F.A., De Andrade, P.D.B. y Vitule, J.R.S., 2018. Absence of the invasive golden mussel in a reservoir near Curitiba, Brazil: A possible case of invasion failure. En: *Neotropical Biology and Conservation*, 13(1), pp.86-89. doi: <https://www.doi.org/10.4013/nbc.2018.131.10>
- Ghabooli, S., Zhan, A., Sardiña, P., Paolucci, E., Sylvester, F., Perepelizin, P.V., Briski, E., Cristescu, M.E. y Macisaac, H.J., 2013. Genetic diversity in introduced golden mussel populations corresponds to vector activity. En: *PLoS ONE*, 8(3), pp.e59328. doi: <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0059328>
- González-Bergonzoni, I., Silva, I., Teixeira De Mello, F., D'anatro, A., Boccardi, L., Stebniki, S., Brugnoli, E., Tesitore, G., Vidal, N., Naya, D.E. y Britton, R., 2020. Evaluating the role of predatory fish controlling the invasion of the Asian golden mussel *Limnoperna fortunei* in a subtropical river. En: *Journal of Applied Ecology*, 57(4), pp.717-728. doi: <https://www.doi.org/10.1111/1365-2664.13573>
- Gregory, M.A., George, R.C., Marshall, D.J., Anandraj, A. y McClurg, T.P., 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). En: *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), pp.116-121. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00119-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00119-8)
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P. y Cherr, G.N., 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. En: *The Biological Bulletin*, 205(2), pp.160-169. doi: <https://www.doi.org/10.2307/1543236>
- Jørgensen, C.B., 1990. *Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology*. Fredensborg: Olsen & Olsen.
- Karatayev, A.Y., Boltovskoy, D., Burlakova, L.E. y Padilla, D.K., 2015. Parallels and contrasts between *Limnoperna fortunei* and species of *Dreissena*. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.261-297.
- Kelley, A.L., 2014. The role thermal physiology plays in species invasion. En: *Conservation physiology*, 2(1), pp.cou045. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou045>

- Lei, J., Payne, B.S. y Wang, S.Y., 1996. Filtration dynamics of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(1), pp.29-37.
- Levri, E.P., Krist, A.C., Bilka, R. y Dybdahl, M.F., 2014. Phenotypic plasticity of the introduced New Zealand Mud Snail, *Potamopyrgus antipodarum*, compared to sympatric native snails. En: *PLoS ONE*, 9(4), pp.e93985.
doi: <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0093985>.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. y Blackburn, T.M., 2009. The more you introduce the more you get: the role of colonization pressure and propagule pressure in invasion ecology. En: *Diversity and Distributions*, 15(5), pp.904-910.
doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1472-4642.2009.00594.x>
- Manske Nunes, S., Josende, M.E., González-Durruthy, M., Pires Ruas, C., Gelesky, M.A., Romano, L.A., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M. y Ventura-Lima, J., 2018. Different crystalline forms of titanium dioxide nanomaterial (rutile and anatase) can influence the toxicity of copper in golden mussel *Limnoperna fortunei*? En: *Aquatic Toxicology*, 205, pp.182-192.
doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.009>
- Mariñelarena, A., Mac Donagh, M.E., Donadelli, J. y Casco, M.A., 2016. Un caso inusual de eutrofización en el Embalse Río Tercero: el posible rol de dos bioinvasores. En: *Biología Acuática*, 31, pp.10-18.
- Marsden, E.J., Spidle, A.P. y May, B., 1996. Review of genetic studies of dreissena spp. En: *American Zoologist*, 36(3), pp.259-270.
- Mclachlan, A., Jaramillo, E., Defeo, O., Dugan, J., De Ruyck, A. y Coetzee, P., 1995. Adaptations of bivalves to different beach types. En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187(2), pp.147-160.
doi: [https://www.doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00176-E](https://www.doi.org/10.1016/0022-0981(94)00176-E)
- Medler, S. y Silverman, H., 1997. Functional organization of intrinsic gill muscles in zebra mussels, *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia), and response to transmitters in vitro. En: *Invertebrate Biology*, 116(3), pp.200-212.
- Medler, S., Thompson, C.C., Dietz, T.H. y Silverman, H., 1999. Ionic effects on intrinsic gill muscles in the freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular and Integrative Physiology*, 122(2), pp.163-172.
doi: [https://www.doi.org/10.1016/s1095-6433\(98\)10161-7](https://www.doi.org/10.1016/s1095-6433(98)10161-7)
- Mongi, C., 2019. *Mejillón dorado: ¿una plaga en retirada en los lagos cordobeses?* [En línea]. Córdoba: La Voz. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.lavoz.com.ar/ciudadanos/mejillon-dorado-una-plaga-en-retirada-en-lagos-cordobeses>

- Montalto, L. y Rojas Molina, F., 2014. Byssal hairs in the invasive Asian freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in the Paraná River system with comments on this species in South America. En: *Molluscan Research*, 34(2), pp.127-138. doi: <https://www.doi.org/10.1080/13235818.2014.888981>
- Morton, B., 1973. Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia: Mytilacea). En: *Malacologia*, 12(2), pp.265-281.
- Morton, B., 2015. The biology and anatomy of *Limnoperna fortunei*, a significant freshwater bioinvader: blueprints for success. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.3-41.
- Nakano, D., Kobayashi, T. y Sakaguchi, I., 2010. Predation and depth effects on abundance and size distribution of an invasive bivalve, the golden mussel *Limnoperna fortunei*, in a dam reservoir. En: *Limnology*, 11(3), pp.259-266. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10201-010-0314-4>
- Nakano, D., Kobayashi, T. y Sakaguchi, I., 2015. Population dynamics and growth of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.105-118.
- Ockelmann, K.W., 1983. Descriptions of mytilid species and definition of the Dacrydiinae n. subfam. (Mytilacea-Bivalvia). En: *Ophelia*, 22(1), pp.81-123. doi: <https://www.doi.org/10.1080/00785326.1983.10427225>
- Ockelmann, K.W. y Dinesen, Grete, 2009. Systematic relationship of the genus *Adula* and its descent from a Mytilus-like ancestor (Bivalvia, Mytilidae, Mytilinae). En: *Steenstrupia*, 30, pp.141-152.
- Oliveira, M.D., Calheiros, D.F., Jacobi, C.M. y Hamilton, S.K., 2011. Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. En: *Biological Invasions*, 13(3), pp.717-729. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10530-010-9862-0>
- Oliveira, M.D., Campos, M.C., Paolucci, E.M., Mansur, M.C. y Hamilton, S.K., 2015. Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Nueva York: Springer International Publishing. pp.333-355.
- Oliveira, M.D., Hamilton, S.K., Calheiros, D.F. y Jacobi, C.M., 2010. Oxygen depletion events control the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in a tropical floodplain. En: *Wetlands*, 30, pp.705-716.

- Paolucci, E.M., Almada, P., Cataldo, D.H. y Boltovskoy, D., 2015. Native fish larvae take advantage of introduced mussel larvae: field evidence of feeding preferences on veligers of the introduced freshwater bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Hydrobiologia*, 745(1), pp.211-224.
doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-014-2108-x>.
- Paolucci, E.M., Cataldo, D.H. y Boltovskoy, D., 2010. Prey selection by larvae of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Curimatidae): Indigenous zooplankton versus veligers of the introduced bivalve *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mitilidae). En: *Aquatic Ecology*, 44(1), pp.255-267. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10452-009-9263-6>.
- Paolucci, E.M., Cataldo, D.H., Fuentes, C.M. y Boltovskoy, D., 2007. Larvae of the invasive species *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) in the diet of fish larvae in the Paraná River, Argentina. En: *Hydrobiologia*, 589(1), pp.219-233.
doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-007-0734-2>.
- Paolucci, E.M., Leites, V., Cataldo, D.H. y Boltovskoy, D., 2017. Veligers of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* in the diet of indigenous fish larvae in a eutrophic subtropical reservoir. En: *Austral Ecology*, 42(7), pp.759-771.
doi: <https://www.doi.org/10.1111/aec.12493>.
- Paolucci, E.M., Oliveira, M.D., Sardiña, P., Sylvester, F., Ron, L., Mutti, L. y Macisaac, H.J., 2014a. Phenotypic plasticity in an alien invasive mussel across a gradient of their limiting factors in South America. En: *Biología Acuática*, 29, pp.285.
- Paolucci, E.M., Ron, L. y Thuesen, E., 2019. Respuesta metabólica a cambios de temperatura en el molusco invasor *Limnoperna fortunei* [En línea]. En: Asociación Argentina de Malacología. *3er Congreso Argentino de Malacología*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina (4-6 de diciembre de 2019). Buenos Aires: Asociación Argentina de Malacología.[Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=42607&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=8424218
- Paolucci, E.M., Sardiña, P., Sylvester, F., Perepelizin, P.V., Zhan, A., Ghabooli, S., Cristescu, M.E., Oliveira, M.D. y Macisaac, H.J., 2014b. Morphological and genetic variability in an alien invasive mussel across an environmental gradient in South America. En: *Limnology and Oceanography*, 59(2), pp.400-412.
doi: <https://www.doi.org/10.4319/lo.2014.59.2.0400>.
- Paolucci, E.M. y Thuesen, E.V., 2015. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with larval fishes. En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Berlín: Springer International Publishing, pp.211-229.

- Paolucci, E.M. y Thuesen, E.V., 2020. Effects of osmotic and thermal shock on the invasive aquatic mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*: mortality and physiology under stressful conditions. En: *NeoBiota*, 54, pp.1-22.
doi: <https://www.doi.org/10.3897/neobiota.54.39465>.
- Payne, B.S., Lei, J., Miller, A.C. y Hubertz, E.D., 1995. Adaptative variation in palp and gill size in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, pp.1130-1134.
- Pessotto, M.A. y Nogueira, M.G., 2018. More than two decades after the introduction of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) in La Plata Basin. En: *Brazilian Journal of Biology*, 78(4), pp.773-784. doi: <https://www.doi.org/10.1590/1519-6984.180789>
- Pestana, D., Ostrensky, A., Tschá, M.K. y Boeger, W.A., 2010. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. En: *Papeis Avulsos de Zoologia*, 50, pp.553-559.
- Peyer, S.M., Hermanson, J.C. y Lee, C.E., 2010. Developmental plasticity of shell morphology of quagga mussels from shallow and deep-water habitats of the Great Lakes. En: *Journal of Experimental Biology*, 213(15), pp.2602-2609.
doi: <https://www.doi.org/10.1242/jeb.042549>
- Rabushko, V.I., Slynko, Y.V. y Slynko, E.E., 2020. Adaptive strategy of *Rapana venosa* (Gastropoda, Muricidae) in the invasive population of the Black Sea. En: *Biosystems Diversity*, 28(1), pp.48-52. doi: <https://www.doi.org/10.15421/012008>.
- Reati, G.J., Florín, M., Fernández, G.J. y Montes, C., 1996. The Laguna de Mar Chiquita (Córdoba, Argentina): A little known, secularly fluctuating, saline lake. En: *International Journal of Salt Lake Research*, 5(3), pp.187-219.
doi: <https://www.doi.org/10.1007/bf01997137>.
- Robinson, W.E., Wehling, W.E. y Morse, M.P., 1984. The effect of suspended clay on feeding and digestive efficiency of the surf clam, *Spisula solidissima* (Dillwyn). En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 74(1), pp.1-12. doi: [https://www.doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90034-0](https://www.doi.org/10.1016/0022-0981(84)90034-0)
- Rosewarne, P.J., Svendsen, J.C., Mortimer, R.J.G. y Dunn, A.M., 2014. Muddied waters: suspended sediment impacts on gill structure and aerobic scope in an endangered native and an invasive freshwater crayfish. En: *Hydrobiologia*, 722(1), pp.61-74. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-013-1675-6>
- Sax, D., Stachowicz, J., Brown, J., Bruno, J., Dawson, M., Gaines, S., Grosberg, R., Hastings, A., Holt, R. y Mayfield, M., 2007. Ecological and evolutionary insights from species invasions. En: *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9), pp.465-471. doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.tree.2007.06.009>.

- Schulte, P.M., 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. En: *The Journal of Experimental Biology*, 218(12), pp.1856. doi: <https://www.doi.org/10.1242/jeb.118851>.
- Scott, K.M., 2005. Allometry of gill weights, gill surface areas, and foot biomass $\delta^{13}\text{C}$ values of the chemoautotroph–bivalve symbiosis *Solemya velum*. En: *Marine Biology*, 147(4), pp.935-941. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s00227-005-1630-9>
- Senske, W.F.K., Reigada, Á.L.D., Paes De Carli, B., Milena Ramires y Rotundo, M.M., 2019. Registro de invertebrados bioinvasores no Complexo baía-estuário de Santos, São Vicente e Canal de Bertioga, SP, Brasil [En línea]. En: *Anais do Encontro Nacional de Pós-Graduação*, VIII ENPG, 3, pp.99-103. [Consulta: 01 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://periodicos.unisanta.br/index.php/ENPG/article/view/2101>
- Soares, A.G., Callahan, R.K. y Ruyck, A.M.C.D., 1998. Microevolution and phenotypic plasticity in *Donax serra* Roding (Bivalvia: Donacidae) on high energy sandy beaches. En: *Journal of Molluscan Studies*, 64(4), pp.407-421. doi: <https://www.doi.org/10.1093/mollus/64.4.407>
- Sousa, R., Freire, R., Rufino, M., Méndez, J., Gaspar, M., Antunes, C. y Guilhermino, L., 2007. Genetic and shell morphological variability of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in two Portuguese estuaries. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 74(1-2), pp.166-174. doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.ecss.2007.04.011>
- Strayer D.L., D'antonio, C.M., Essl, F., Fowler, M.S., Geist, J., Hilt, S., Jarić, I., Jöhnk, K., Jones, C.G., Lambin, X., Latzka, A.W., Pergl, J., Pyšek, P., Robertson, P., Von Schmalensee, M., Stefansson, R.A., Wright, J., Jeschke, J.M. y Early, R., 2017. Boom-bust dynamics in biological invasions: towards an improved application of the concept. En: *Ecology Letters*, 20(10), pp.1337-1350. <https://doi.org/10.1111/ele.12822>
- Sylvester, F., Boltovskoy, D. y Cataldo, D.H., 2007. Fast response of freshwater consumers to a new trophic resource: Predation on the recently introduced Asian bivalve *Limnoperna fortunei* in the lower Paraná River, South America. En: *Austral Ecology*, 32(4), pp.403-415. doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1442-9993.2007.01707.x>
- Sylvester, F., Cataldo, D., Notaro, C. y Boltovskoy, D., 2013. Fluctuating salinity improves survival of the invasive freshwater golden mussel at high salinity: implications for the introduction of aquatic species through estuarine ports. En: *Biological Invasions*, 15, pp.1355–1366. doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10530-012-0373-z>

- Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juárez, Á. y Cataldo, D., 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of Size and Temperature. En: *Hydrobiologia*, 534(1-3), pp.71-80.
doi: <https://www.doi.org/10.1007/s10750-004-1322-3>
- Takeda, A.M., Mansur, M.C.D., Fujita, D.S. y Bibian, J.P.M., 2003. Occurrence of an invasive species, the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), in two small reservoirs near Curitiba, PR. En: *Acta Biologica Leopoldensia*, 25, pp.251-254.
- Tokumon, R., Cataldo, D. y Boltovskoy, D., 2015. Effects of suspended inorganic matter on filtration and grazing rates of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytiloidea). En: *Journal of Molluscan Studies*, (82)1.
doi: <https://www.doi.org/10.1093/mollus/eyv024>
- Tyner, E.H., Bootsma, H.A. y Lafrancois, B.M., 2015. Dreissenid metabolism and ecosystem-scale effects as revealed by oxygen consumption. En: *Journal of Great Lakes Research*, 41, pp.27-37. doi: <https://www.doi.org/10.1016/j.jglr.2015.05.009>
- Uliano-Silva, M., Américo, J.A., Brindeiro, R., Dondero, F., Prosdocimi, F. y Rebelo, M.F., 2015. The genetics of the Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*): are genes related to invasiveness? En: Boltovskoy, D., ed., 2015. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer. pp.67-75.
- Uliano-Silva, M., Fernandes, F.F.C.F., De Holanda, I.B.B. y Rebelo, M.F., 2013. Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin. En: Allodi, S., ed., 2013. *Exploring themes on aquatic toxicology*. Kerala: Research Signpost.
- Zhan, A., Perepelizin, P.V., Ghabooli, S., Paolucci, E., Sylvester, F., Sardina, P., Cristescu, M.E. y Macisaac, H.J., 2012. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. En: *Diversity and Distributions*, 18(10), pp.1042-1055. doi: <https://www.doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00894.x>