

EQUIPO EDITORIAL**Dirección****Dr. Jorge Silveira**

Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

CONSEJO EDITORIAL**Dra. Sofía 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 EgurenUniversidad 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 MéndezUniversidad 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 VolpeGerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio
Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay**EDICIÓN****Carla Rizzotto**Edición técnica 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

IMPLEMENTACIÓN, HOSTING Y SOPORTE DE OJS

Luis Ramírez Caldas

Bibliolatino

DISEÑO Y ARMADO

Manosanta desarrollo editorial

<https://manosanta.com.uy/>

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), bajo la modalidad de publicación continua, 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 indizada en las siguientes bases de datos: DOAJ, EBSCOhost Académica Premier, Latindex, Redalyc y REDIB.



Somos miembros de:

Asociación Uruguaya de Revistas Académicas AURA



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-NoComercial 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 27

Enero-junio de 2024

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>

SUMARIO

Artículos

- e654 **Assessing the efficiency of bamboo biochar in microcystin-LR removal from water**
Evaluación de la eficiencia del biochar de bambú en la eliminación de microcistina-LR del agua
Yanaína Castro, Camila Hernández, Ana Claudia Pina, Diana Míguez, Mirian Elizabeth Casco
- e647 **Monitoreo preliminar de glifosato y su principal metabolito en aguas superficiales de la cuenca del Río Santa Lucía y en agua potable**
Preliminary monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters of the Santa Lucía River basin and in drinking water
Paulo Frontera, Andrea Somma, Andrés Pérez Parada, Eduardo Manta
- e653 **Efecto de la bajante extrema 2020-2023 sobre la reproducción de peces migradores en el río Uruguay**
Effect of extreme low water levels 2020-2023 on the reproduction of migratory fish in the Uruguay River
Daniel Cataldo, Facundo Bordet, Lautaro Bruno
- e649 **Ensayo en laboratorio de depredación de larvas de anfibios exóticos por peces autóctonos: base para el control biológico de la rana toro en Uruguay**
Laboratory test of predation of exotic amphibian larvae by native fish: basis for the biological control of the bullfrog in Uruguay
Marcelo Iturburu Di Fiore, Gustavo Saona, Ernesto Brugnoli, José Carlos Guerrero
- e648 **Potencial probiótico de *Lactococcus lactis* GU967439 aislado de leche cruda: estudios *in vitro***
Probiotic potential of *Lactococcus lactis* GU967439 isolated from raw milk: an *in vitro* study
Camila Moreira, Silvana Carro Techera
- e645 **Propiedades ópticas, comportamiento de flujo y dureza de geles basados en nanoemulsión**
Optical properties, flow behavior and hardness of gels based on nanoemulsion
Cristóbal Rojas-Pizarro, Matías Meneses Garrido, Karen Vielma Domínguez, Natalia Riquelme Hinojosa, Carla Arancibia Aguilar
- e660 **Comparación interlaboratorio en medición de energía eléctrica en Panamá y República Dominicana: un ejercicio clave para mantener la confianza y el reconocimiento internacional**
Interlaboratory comparison for electric energy in Panama and the Dominican Republic: a key exercise to maintain confidence and international recognition
Julio González Vannucchi, Néstor Juan Rodríguez de la Cruz, Carlos Espinosa Bejarano, Juan Rafael Batista Donastorg, Jerry Irvam Mesa Nina, Jaime Estrella Engelmann, Saúl García Tovar

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 18 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 <https://ojs.latu.org.uy/inicio/> 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 del documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, 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 hallazgos en tablas, gráficos y/o 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 agradecimiento 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. Evitar las notas al pie en el desarrollo del artículo. Las denominaciones en latín deben ir en cursiva.

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).

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° de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; N°). ISBN (este último si se posee) DOI (siempre que el libro lo posea)

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

Newman, R. y 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.

Assessing the efficiency of bamboo biochar in microcystin-LR removal from water

Evaluación de la eficiencia del biochar de bambú en la eliminación de microcistina-LR del agua

Avaliação da eficiência do biochar de bambu na remoção de microcistina-LR da água

 YANAÍNA CASTRO (1)

 CAMILA HERNÁNDEZ (1)

 ANA CLAUDIA PINA (1)(2)

 DIANA MÍGUEZ (3)

 MIRIAN ELIZABETH CASCO (1)

(1) Departamento de Ingeniería, Universidad Católica del Uruguay, Montevideo, Uruguay.

(2) Área de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(3) Latitud - Fundación LATU, Montevideo, Uruguay.

RECIBIDO: 4/4/2024 → APROBADO: 30/5/2024 ✉ mirian.casco@ucu.edu.uy

ABSTRACT

Developing sustainable and cost-effective adsorbents for removing microcystin-LR (MCLR) is crucial. *Bambusa Tuldooides* was pyrolyzed at various temperatures (400, 500, and 600 °C) and residence times (0.5 and 2 h) to produce a series of biochars. The observed MCLR adsorption capacity (219 $\mu\text{g g}^{-1}$ for 600B0.5 sample) under pH conditions similar to those in a water treatment plant (pH = 7.6) is mainly attributed to hydrophobic interactions, π - π stacking, and the basic nature of the biochars (pH_{PZC} > 8). A comprehensive analysis, including FTIR, elemental and proximate analysis, TG, SEM, N₂ adsorption, Hg porosimetry and Raman spectroscopy support this finding. Additionally, to compare 600B0.5 with commercially available activated carbon, a dynamic study was conducted using actual contaminated water. 600B0.5 sample exhibits a removal efficiency of 99.5 %, resulting in a final concentration of 0.28 $\mu\text{g L}^{-1}$, well below the World Health Organization guideline of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords: biomass, pyrolysis, carbon, adsorption, cyanotoxin.

RESUMEN

Es fundamental desarrollar adsorbentes sostenibles y rentables para eliminar la microcistina-LR (MCLR). Se pirolizó *Bambusa Tuldooides* a varias temperaturas (400, 500 y 600 °C) y tiempos de residencia (0,5 y 2 h) para producir una serie de biochares. La

capacidad de adsorción de MCLR observada ($219 \mu\text{g g}^{-1}$ para una muestra de 600B0.5) en condiciones de pH similares a las de una planta de tratamiento de agua ($\text{pH} = 7.6$) se atribuye principalmente a las interacciones hidrofóbicas, al apilamiento π - π y a la naturaleza básica de los biochar ($\text{pH}_{\text{PZC}} > 8$). Un análisis exhaustivo, que incluye FTIR, análisis elemental y próximo, TG, SEM, adsorción de N_2 , porosimetría de Hg y espectroscopia Raman, respalda este hallazgo. Además, para comparar el 600B0.5 con un carbón activado disponible comercialmente, se realizó un estudio dinámico utilizando agua contaminada real. La muestra 600B0.5 exhibe una eficiencia de eliminación del 99,5 %, lo que da como resultado una concentración final de $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$, muy por debajo del valor de referencia de la Organización Mundial de la Salud de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Palabras clave: biomasa, pirólisis, carbón, adsorción, cianotoxina.

RESUMO

É essencial desenvolver adsorventes sustentáveis e econômicos para remover a microcistina-LR (MCLR). *Bambusa Tuldoidea* foi pirolizado em temperaturas variadas (400, 500 e 600 °C) e tempos de residência (0,5 e 2 h) para produzir uma série de biochar. A capacidade de adsorção de MCLR observada ($219 \mu\text{g g}^{-1}$ para uma amostra de 600B0.5) em condições de pH semelhantes às de uma planta de tratamento de água ($\text{pH} = 7,6$) é atribuída principalmente às interações hidrofóbicas, o apilamento π - π e a naturalidade básica do biochar ($\text{pH}_{\text{PZC}} > 8$). Uma análise exaustiva, que inclui FTIR, análise elemental e imediata, TG, SEM, adsorção de N_2 , porosimetria de Hg e espectroscopia Raman apoia esta descoberta. Além disso, para comparar o 600B0.5 com um carvão ativado disponível comercialmente, foi realizado um estudo dinâmico utilizando água contaminada real. A mostra 600B0.5 apresenta uma eficiência de remoção de 99,5 %, resultando em uma concentração final de $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$, bem abaixo do valor de referência da Organização Mundial da Saúde de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras-chave: biomassa, pirólise, carvão, adsorção, cianotoxina.

INTRODUCTION

Cyanobacterial blooms, caused by water eutrophication, have increased worldwide, posing risks to humans, animals, and plants due to the production of cyanotoxins. At a global scale, cyanotoxins have been found responsible for illness and death of wild and domestic animals (aquatic and terrestrial) and human health issues ranging from contact irritations and gastrointestinal distress to acute, chronic, and lethal poisonings (Carmichael y Boyer, 2016).

Microcystins (MCs) are potent toxins that *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria produce. They are one of the most prevalent and harmful cyanotoxins groups, and their presence in water bodies poses a significant risk to both humans and animals. In particular, microcystin-LR (MCLR) are hepatotoxic peptides that inhibit protein phosphatases, induce DNA damage and mutations in mammalian cells, disrupt the

mitotic spindle, and promote genetic instability, gene expression changes, and cell death, leading to potential carcinogenic activities (Zegura, 2016).

There is a growing concern about the presence of MCLR in freshwater sources, such as lakes, reservoirs, and rivers, as well as in drinking water supplies, posing threats to aquatic and terrestrial plants and agricultural soils used for crop production. Studies have indicated potential health risks associated with contaminated fruits and vegetables sourced from irrigated water containing MCs (Melaram et al., 2022). Furthermore, MCLR can accumulate in aquatic organisms like fish and shellfish, leading to its bioaccumulation in the food chain.

Cyanobacterial's toxins are highly stable and widely distributed hepatotoxins that can accumulate and transfer to higher trophic levels. The human health risks from MCs involve consistent low-level exposure through various channels like physical contact, drinking contaminated water, consuming tainted food, and hemodialysis. Drinking contaminated water and eating affected food are the primary exposure routes. Investigating the migration and transmission of MCs is crucial to reduce human exposure (Ren et al., 2023). The World Health Organization recommends a guideline level of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for microcystin-LR in drinking water to ensure the protection of human health (World Health Organization, 2020).

Ensuring complete removal of the toxin from water sources is a complex challenge. Traditional water treatment methods, such as conventional coagulation, sedimentation, filtration, and disinfection, are ineffective in eliminating MCLR (Verma et al., 2023). El Bouaidi et al. (2022) reviewed the use of various adsorbents used for MCs removal from water sources, considering that activated carbon constitutes the most widely used adsorbent for treating contaminated waters. In the case of Uruguay, the most recent tender resulted in the procurement of 600 tons of activated carbon for use in the drinking water treatment process (Uruguay. Agencia Reguladora de Compras Estatales, 2022). This purchase was imported at a cost of USD 762,348.00, approximately USD 1,270.58 per ton.

As current remediation methods require more environmentally friendly and cost-effective adsorbents, biochar has lately gained attention with its high porosity and sorption efficiency. Pyrolysis was evaluated as a method to produce efficient adsorbents for MCs removal, highlighting its cost-effectiveness, but its potential depends on feedstock and pyrolysis conditions (Frišták et al., 2020).

Bamboo as a raw material is a good choice as it has high biomass production and a rapid ripening period. Additionally, it is easy to manage in cultivation, renewable, non-toxic, and biodegradable. Bamboo-derived biochars provide an environmentally friendly, cost-effective, and technologically feasible solution removing pollutants to improve drinking water quality. Particularly, bamboo biochars exhibit unique structural and surface properties when compared to activated carbon (Li et al., 2018).

Pollutant removal mechanisms involved electrostatic attraction, pore-filling, hydrogen-bonding effect and π - π electron donor-acceptor interaction, but predominant mechanisms varied for different biochars (Li et al., 2018). The mechanism that influences the adsorption capacity of MCLR on biochars remains a subject of ongoing debate in the literature. The polarity, hydrophilicity/hydrophobicity, and the aromatization degree of the biochar affects the MCs adsorption performance.

For instance, Li et al. (2018) reported $\pi \pm \pi$ electron-donor-acceptor interactions dominate in the adsorption of MCLR on biochar (from plant- and animal-wastes) produced at 600 °C, in contrast to those produced at 300 °C. While Li et al. (2014) proposed that the adsorption mechanisms may be primarily associated with the Coulombic attractions and the hydrogen bond interactions between MCLR and the surface of biochars obtained at 300 °C. The statement that only one specific interaction between biochars and MCLR maximizes removal capabilities is inaccurate, as more than one mechanism can be involved, and the characteristics of the starting biomass material must also be considered.

Therefore, the central objective of this study is to assess the physical-chemical properties of bamboo biochar, elucidating possible mechanisms of adsorption that improve the removal of MCLR from aqueous solutions, thus advancing towards the adoption of bamboo biochar in water treatment processes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of bamboo biochars

Three-year-old wild *Bambusa Tuldoidea* were supplied by the company Bambú del Este to produce biochar. The bamboo culms were oven-dried at 105 °C for 24 h and then chipped and passed through to 120 mesh sieves (120 μm). Pyrolysis of prepared biomass was carried out in a tubular furnace (Sno1 LXC04) under a nitrogen atmosphere (purity > 99.9 % Air Liquid, N50) with a heating rate program 5 °C min^{-1} up to the predetermined temperatures of 400 °C, 500 °C, 600 °C and residence time of 0.5 and 2 h. The bamboo biochars produced at different combination temperature and time were named 400B0.5, 400B2.0, 500B0.5, 500B2.0, 600B0.5, and 600B2.0, where the prefix and suffix numbers stand for the pyrolysis temperature (°C) and the time (hour), respectively.

Bamboo and bamboo biochars characterization

The carbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N), and sulfur (S) contents were determined using an Elemental Analytical Instrument (Thermo Scientific Flash 2000 Organic Elemental Analyzer CHNSO). The oxygen (O) contents were calculated by difference according to mass balance.

The bamboo and bamboo biochars were analyzed for moisture, volatile matter (VM), fixed carbon (FC) and ash content (Ash). Moisture was calculated by weight difference between the sample before and after being exposed at 105 °C in an oven until constant weight. The VM and Ash were tested according to the protocol (American Society for Testing and Materials, 2021). The FC was calculated on dry basis by difference according to mass balance.

Thermogravimetric analysis (TG) was performed using a SDT Q600 thermal analyzer (TA instrument) at heating rates of 10 °C min^{-1} with temperatures ranging from room temperature to 900 °C. Compressed air and nitrogen was used for combustion experiments at 50 mL min^{-1} . About 5 ± 0.2 mg sample was weighed and placed in a platinum crucible.

Surface morphologies were observed by scanning electron microscopy (JEOL JSM- 5900LV equipment under 20 kV of the voltage) after sputtering with gold.

The point of zero charge (pH_{PZC}) of the bamboo biochars was measured by the drift method, where 0.5 g of the biochar powdered sample were added to the pH-adjusted solution (3, 4, 5, 6, 8, 10, 11) in a Erlenmeyer flask, capped and placed in the shaker. Then, the final pH of the solutions was measured after 48 hours at room temperature with a HANNA Instruments HI 2211 pH-meter and the ΔpH (difference between initial pH and final pH) against the initial pH was plotted, in which the value of pH_{PZC} was found where the $\Delta pH = 0$.

Surface functional groups were determined by Fourier transform infrared spectroscopy analysis (FTIR) via a FTIR spectrometer Shimadzu IRSpirit-T (KBr window), QATR-S (wide-band diamond crystal). The spectra were recorded at a resolution of 4 cm^{-1} through wavelength scanning range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$.

Confocal Raman imaging was applied to all the samples using a WITec equipment, Alpha 300RA model. Raman spectra were collected utilizing a 532 nm (2.33 eV) excitation wavelength. Representative spectra were collected using 100 accumulations of 0.5 seconds per spectrum.

The nitrogen adsorption/desorption isotherms were measured at $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ using an ASAP2000 equipment (Micromeritics). Before any physisorption measurements, the samples were degassed for 12 h at $150 \text{ }^\circ\text{C}$. The carbons' apparent specific surface area (S_{BET}) was calculated using Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation in the range that fits the consistency criteria proposed by Rouquerol et al. (2007). The total pore volume (V_t) was calculated at a relative pressure 0.95 according to the Gurvich rule. Micropore volume (V_{micro}) was calculated by applying Dubinin-Raduschewich equation. The difference between V_t and V_{micro} is considered as V_{meso} .

Mercury intrusion-extrusion porosimetry was measured from 0.002 up to 150 MPa on porosimeter analyzer AUTOPORE III 9410 (Micromeritics). The samples (bamboo and bamboo biochars in powder) were previously degassed to a residual pressure of $30 \text{ }\mu\text{mHg}$. Specific surface area (S_{Hg}), total pore volume (V_{TP-Hg}), porosity percentage, and pore size distribution were obtained from mercury intrusion data.

Microcystin-LR (MCLR) adsorption studies

The removal efficiency (E) of an adsorbent on MCLR is defined as:

$$E = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Where, C_0 ($\mu\text{g L}^{-1}$) is the initial concentration and C_e ($\mu\text{g L}^{-1}$) is the equilibrium concentration of MCLR.

Kinetic experiments were conducted with $500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of MCLR (Eurofins Abraxis, standar 0.5 mg) and 0.1 g L^{-1} of adsorbent 600B0.5 mixing in Erlenmeyer flasks using 30 mL of solution. Samples were taken out at different predetermined time (5, 15, 30, 60, 120, 300, 1440 min) to evaluate the residual MCLR concentrations. Similarly, equilibrium isotherm sorption

experiments were conducted using various initial concentrations of MCLR (20, 150, 350, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) mixed with a dose of 6.0 g L^{-1} of the bamboo biochar 600B0.5. All the experiments were conducted in Erlenmeyer flasks using 30 mL of solution. The equilibrium time was set as 24h. MCLR concentration was determined with a high-performance liquid chromatograph (HPLC) Separation Module 2695 (Water Alliance, detector Photodiode array 2998).

The adsorption amount (Q_e) was calculated according to equation:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} \cdot V \quad (2)$$

Where, C_0 ($\mu\text{g L}^{-1}$) is the initial concentration and C_e ($\mu\text{g L}^{-1}$) is the equilibrium concentration of MCLR; m is the weight of biochar (g), and V is the solution volume (L).

Lagmuir model were used to fit the adsorption isotherms according to the equation:

$$Q_e = \frac{Q_{max} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (3)$$

Where K_L ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$) is the Langmuir adsorption coefficient, and Q_{max} ($\mu\text{g g}^{-1}$) is the saturated adsorption capacity.

Freundlich model were used to fit the adsorption isotherms according to the equation:

$$Q_e = K_F \cdot C_e^n \quad (4)$$

Where K_F ($\mu\text{g}^{1-n} \text{L}^n \text{g}^{-1}$) is the adsorption coefficient, and n is the Freundlich constant describing the nonlinearity of isotherms, and is related to the surface site heterogeneity of the sorbent.

The pseudo-first order equation and pseudo-second order equation models were used to adjust the experimental data in this study. The kinetics equation models are the follow:

Pseudo-first order:

$$Q_t = Q_e \cdot (1 - e^{-K_1 t}) \quad (5)$$

Pseudo-second order:

$$Q_t = \frac{k_2 \cdot Q_e^2 \cdot t}{(1 + K_2 \cdot Q_e \cdot t)} \quad (6)$$

Where Q_e and Q_t ($\mu\text{g g}^{-1}$) are the amounts of MCLR adsorbed at equilibrium and at a time, t , respectively. K_1 and K_2 are the rate constants for pseudo-first-order and pseudo-second-order kinetics, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of bamboo biochars

A series of six bamboo biochars were produced by pyrolyzing three-year-old wild *Bambusa Tuldoidea* (referred to as 'bamboo' hereafter) at varying temperatures (400, 500, and 600 °C) and residence time (0.5 and 2 hours). A fibrous biomass like bamboo consists of cellulose, hemicelluloses, and lignin with smaller quantities of organic extractives and inorganic minerals (Chaturvedi et al., 2023). Notably, an inverse relationship is observed between the pyrolysis temperature and the yield of each biochar, attributed to the detachment of volatile matter. At the same time, carbon fixation occurs during carbonization (Table 1). This trend is less marked when keeping the temperature but varying the residence time.

Thermogravimetric analyses conducted in nitrogen atmospheres (refer to Figure A1) corroborate these tendencies. The weight loss pattern of bamboo in a nitrogen atmosphere exhibits a significant reduction in mass within the temperature range of 200–300 °C, corresponding to the release of volatile matter coming, first from the decomposition of extractive and, then from the decomposition of hemicellulose (Manals-Cutiño et al., 2011). Between 300 and 600 °C, the gradual decrease is consistent with the biochar yields related to various pyrolysis temperatures (Table 1), corresponding to cellulose decomposition (Manals-Cutiño et al., 2011).

TABLE 1. Yields, proximate analysis (on a dry basis), elemental compositions and atomic ratios on an ash-free basis for bamboo and the six bamboo biochars.

Sample	Yield ^a (%)	Ash (wt. %)	VM (wt. %)	FC ^b (wt. %)	C (at. %)	H (at. %)	N (at. %)	S (at. %)	O (at. %)	(N+O)/C ^c	H/C ^d	O/C ^e
Bamboo	-	8.1	79.2	12.7	35.6	44.1	0.3	0.0	20.0	0.57	1.24	0.56
400B0.5	37.9	6.1	30.0	63.9	59.6	30.7	0.5	0.1	9.1	0.16	0.51	0.15
400B2.0	37.4	6.2	27.8	66.0	62.4	30.5	0.5	0.1	6.6	0.11	0.49	0.11
500B0.5	33.0	6.2	26.7	67.1	67.8	26.7	0.6	0.1	4.8	0.08	0.39	0.07
500B2.0	32.4	6.4	16.1	77.5	71.5	24.3	0.6	0.1	3.5	0.06	0.34	0.05
600B0.5	30.7	5.2	10.2	89.6	76.2	18.3	0.6	0.1	4.7	0.07	0.24	0.06
600B2.0	30.8	5.8	9.9	84.3	79.7	16.5	0.5	0.2	3.2	0.05	0.21	0.04

^a Yield (%) = (weight of bamboo biochar) / (weight bamboo) x 100, ^b FC (%) = 100 - ash (%) - VM (%), ^c (N + O)/C: atomic ratio of the sum of nitrogen and oxygen to carbon, ^d H/C: atomic ratio of hydrogen to carbon, ^e O/C: atomic ratio of oxygen to carbon.

From the scanning electron microscopy images obtained (refer to Figure A2), it can be observed that the bamboo, before carbonization, exhibited organized and well-oriented fibers, forming a structural unit. On the other hand, in the images of the biochar 500B2.0, small independent domains of carbon fibers are randomly distributed. This can be

associated with the bamboo decomposition mechanism during the pyrolysis process. In the thermogravimetric study conducted on bamboo, characteristic temperatures of the thermal decomposition process of biomass were identified, and the regions where different mass losses are experienced were established. At 500 °C, hemicellulose and cellulose had already decomposed. As the micro-fibrils of cellulose, which form the matrix where lignin and hemicellulose intertwine, degrade, the bamboo loses its structure, a result that can be observed in the images of the biochar obtained after carbonization at 500 °C.

Elemental analysis results indicate that increasing the pyrolysis temperature leads to an increment in the carbon (C) content while diminished the levels of oxygen (O) and hydrogen (H). The decreasing atomic ratios of H/C and O/C suggest the aromatization of biomass, a phenomenon later confirmed by Raman analysis. The diminishing polarity index ((O+N)/C) indicates a decrease in surface polar functional groups. According to the literature, these ratios indicate biochar's hydrophobic/hydrophilic nature (Chen y Chen, 2009). Consequently, for the bamboo biochars in this study, a concurrent reduction in hydrophilicity accompanies the rise in pyrolysis temperature. In other words, the gradual elimination of oxygen (and nitrogen)-containing groups from the biomass results in a more hydrophobic biochar framework. As anticipated in previous research in the literature (Teng et al., 2013a), this property promotes hydrophobic interactions between the surface of biochars and the hydrophobic moieties of MCLR (leucine).

Confocal Raman microscopy was utilized to assess the amorphization/aromatization process of bamboo biochar under varying temperature and time treatments. Raman spectra in Figure 1a, indicate an excellent homogeneity in the carbonaceous signals, corresponding to G and D bands along all the analyzed samples (refer to Table A1). All the signals plotted correspond to that of amorphous materials (Fries y Steele, 2010). However, recorded data show a graphitic increment, especially with temperature treatment (I_G increment), leading to an increment in the structure's order according to the I_D/I_G contribution results.

In line with elemental analysis, this indicates that as the temperature increases the aromatic carbon frameworks gradually develop, offering additional binding sites via π - π stacking interaction between the aromatic units and the benzene ring of MCLR (Teng et al., 2013b).

Figure 1b portrays the FTIR spectra for all the bamboo biochars. Biochars are complex materials with several distinctive functional groups, and the FTIR results concord with those previously reported (Odoemelam et al., 2015). The characteristic signal recorded at 750 cm^{-1} is assigned to =C-H bending out of plane vibration, while 800 and 880 cm^{-1} are assigned to =C-H ring torsion and C-H bending and ring puckering, respectively. The presence of alcohols and, or phenols is confirmed by the 1110 and 1373 cm^{-1} vibrating bands, corresponding to C-O stretching and O-H bending. The signal at 1574 cm^{-1} assigned to C=C stretching is recorded for all the samples. The signal that showed a more extensive signal modification depending on the treatment (not only the temperature but also the time of treatment as can be seen for 500 samples series) is assigned to C=O (bonded with H) stretching associated with carboxylic acids and derivatives groups located at 1700 cm^{-1} .

The point of zero charge (pH_{PZC}) was measured to further analyze the physical-chemical properties of the bamboo biochar's surface (Figure A3). The pH_{PZC} value gradually

improved with pyrolysis temperature. It ranges from 7.92 to 8.66 from 400B0.5 to 600B2.0, respectively (Table 2). Since $\text{pH}_{\text{PZC}} > 7$, all obtained bamboo biochars are basic in nature. This behavior is in line with the FTIR functional group analysis, which confirms the reduction of carboxylic acid content with increasing temperature. The pH_{PZC} represents the solution pH at which the surface charge of biochar becomes neutral, which means biochar may exhibit a negative charge at $\text{pH} > \text{pH}_{\text{PZC}}$ and a positive charge at $\text{pH} < \text{pH}_{\text{PZC}}$.

TABLE 2. Textural properties and zero-point charge (pH_{PZC}) of the six bamboo biochars.

Sample	S_{BET} (m^2/g)	V_{micro} (cm^3/g)	V_{t} (cm^3/g)	V_{meso} (cm^3/g)	S_{Hg} (m^2/g)	$V_{\text{t,Hg}}$ (cm^3/g)	Porosity (%)	ρ_{bulk} (g/cm^3)	ρ_{skeletal} (g/cm^3)	pH_{PZC} (%)
400B0.5	2	0.001	0.001	0.000	23.8	1.47	60.1	0.41	1,02	7.92
400B2.0	2	0.001	0.002	0.001	23.7	1.54	60.1	0.39	0,98	7.97
500B0.5	3	0.001	0.002	0.001	24.6	1.05	49.5	0.47	0,93	8.42
500B2.0	8	0.003	0.005	0.002	22.9	1.18	51.2	0.43	0,89	8.52
600B0.5	64	0.027	0.027	0.000	20.7	1.33	55.8	0.42	0,95	8.66
600B2.0	67	0.029	0.029	0.000	16.3	1.53	58.4	0.38	0,91	8.66

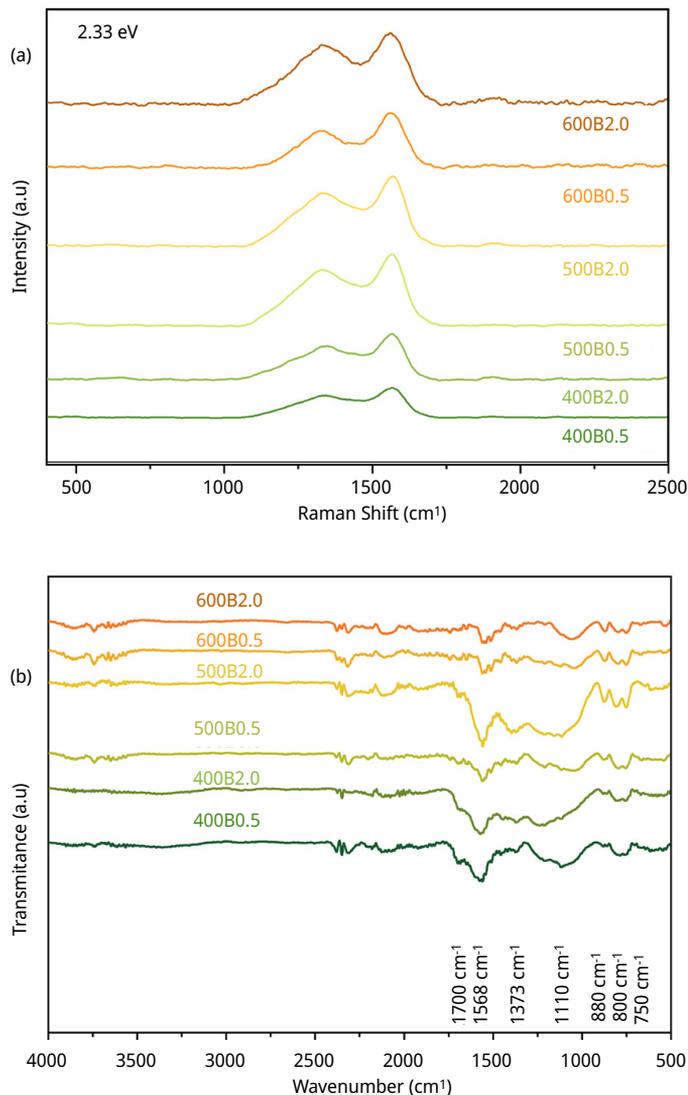
When MCs are present in the water before entering the purification plant, the pH typically ranges between 7 and 7.9 (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020), which means that the biochar surface will be positively charged under this condition. At this point, it is crucial to consider the MCLR molecule's nature and its features. The ionizable entities in MCLR, which consist of two carboxyl groups and one guanidino group, can undergo deprotonation or protonation, resulting in a positively or negatively charged MCLR at varying pH. As indicated by the pKa values of MCLR (pKa1, 2.09; pKa2, 2.19; pKa3, 12.48), when the solution pH is neutral (or slightly basic), MCLR predominantly exists in the form of anion MCLR⁻ (Li et al., 2014).

Therefore, at the pH typically found in water treatment plants, the adsorption of MCLR onto bamboo biochars is likely to be enhanced by electrostatic attraction between the positively charged biochar surfaces and the negatively charged MCLR.

The textural properties of adsorbent materials significantly influence the adsorption process. Figure 1c displays the nitrogen adsorption/desorption isotherms of the six biochars. According to the IUPAC classification, all samples exhibit a Type I isotherm (Thommes et al., 2015), indicating their character as microporous adsorbent materials. The specific surface area (S_{BET}), the total pore volume (V_{t}), and the micropore volume (V_{micro}), were determined to further analyze the adsorption performance of bamboo biochars. Even though increasing pyrolysis temperatures enhances these values (Table 2), the most significant increase observed at 500 °C for 2.0 hours and 600 °C for 0.5 hours, where the specific surface area (S_{BET}) increases from 8 to 64 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respectively. According to the isotherm shape (type I), all the bamboo biochars still exhibit micropores (pore diameters less than 2 nm). The three-dimensional size of the MCLR molecule was documented as 1.9 nm x 1.5 nm x 1.1 nm, with the maximum length and second-widest dimension of 2.94 nm and 2.55 nm, respectively (Teng et al., 2013b), falling in the lower

limit of mesopore size range (2-50 nm), it is expected that steric hindrances hinder the diffusion of the microcystin molecule into those micropores, potentially making it less effective in the removal process.

Hence, the presence of substantial mesopores or macropores within the bamboo biochars was characterized through Hg porosimetry. The corresponding mercury intrusion-extrusion curves can be found in Figure A4. Notably, all bamboo biochars display a considerable increase in accumulated volume at low pressures, specifically at 0.2 MPa, signifying the presence of large macropores exceeding 1 μm in diameter. Figure 1d presents the pore size distribution (PSD) data obtained from Hg porosimetry, revealing an average pore diameter of 11 μm . This pore size does not obstruct water flow, potentially leading to improved MCLR diffusion into the interior of the particle, thus enhancing the adsorption kinetics (as we will discuss later). A summary of the textural properties obtained from the mercury porosimetry data is provided in Table 2.



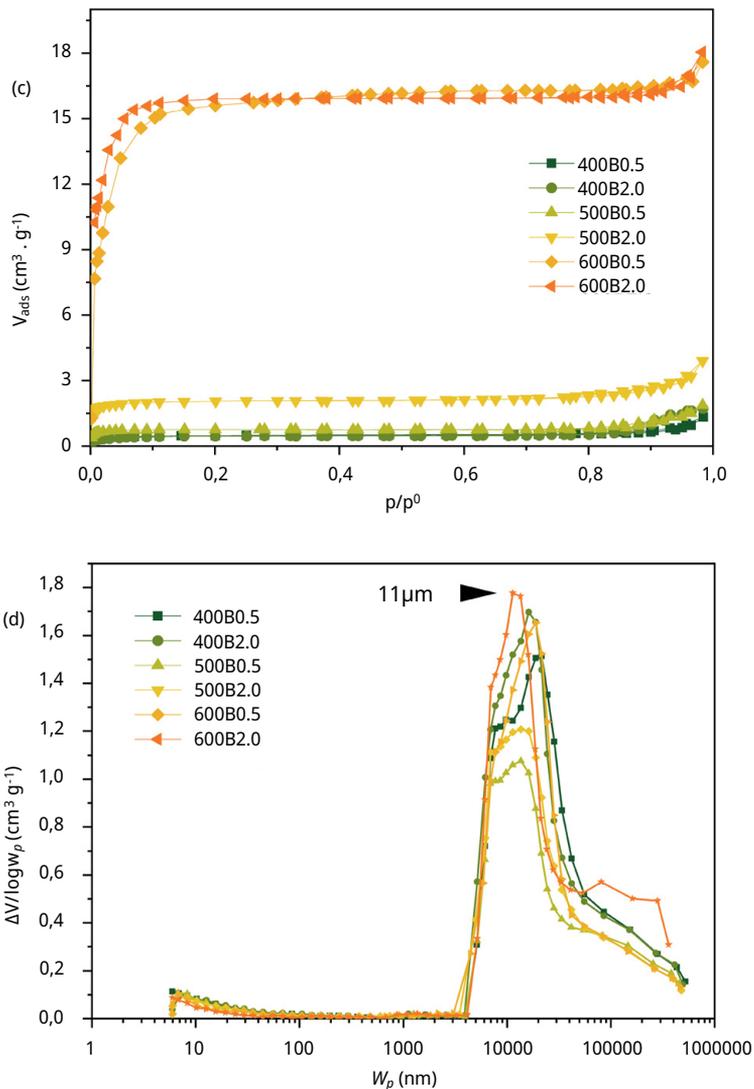


FIGURE 1. Surface and textural characterization of the six bamboo biochars. (a) Raman spectra of the six bamboo biochars, (b) FT-IR spectra, (c) N_2 adsorption/desorption isotherms and (d) pore size distribution obtained from Hg intrusion data.

MCLR adsorption performance

Initially, we calculated the MCLR removal efficiency (%) of all biochars at different initial concentrations ($C_0 = 20$ (18.1), 150 (153), 350 (370), 500 (525) $\mu g L^{-1}$). All samples showed excellent removal efficiency percentage ($> 86.7\%$) when the initial concentration was relatively low (Figure 2). The main differences can be observed at the maximal concentration of MCLR 500 (525) $\mu g/L$. In this case, the removal efficiency was 53.9% and 61.3% for 400B0.5 and 400B2.0, respectively. Conversely, the remaining bamboo biochars demonstrated a significantly higher removal efficiency, exceeding 91%. The removal

efficiency, the adsorption isotherms (Figure A5), and the Langmuir and Freundlich fitting parameters are listed in Table 3.

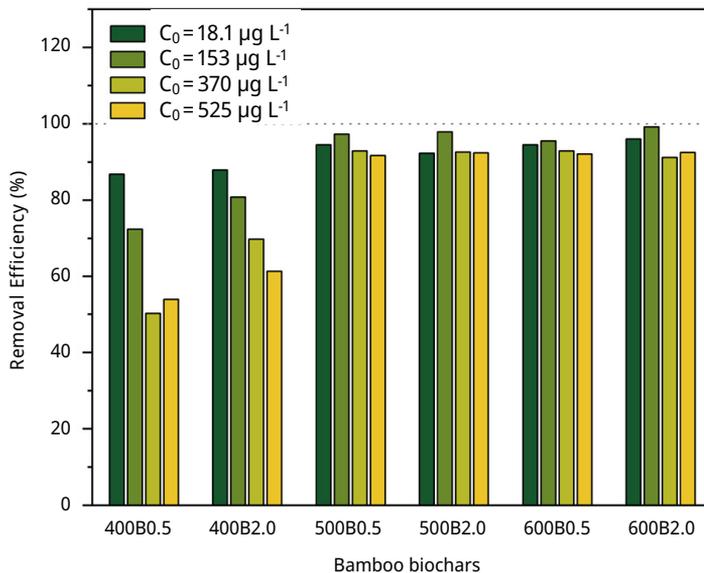


FIGURE 2. MCLR adsorption performance. Removal efficiency (%) of the six bamboo biochars in batch.

The superior performance of bamboo biochars obtained at pyrolysis temperatures of 500 and 600 °C can be attributed to their pH_{pZC} . The pH of the initial solution was 7.63, aligning with the typical pH conditions encountered in water treatment plants. Then, the significance of a pH_{pZC} exceeding 8 becomes evident in enhancing the MCLR removal capacity of bamboo biochars via electrostatic attraction between the positively charged bamboo biochar surfaces and the negatively charged MCLR. These findings present a significant advantage for applying bamboo biochars as adsorbents, as there is no need to adjust the pH to ensure their optimal performance.

TABLE 3. Langmuir and Freundlich fitting parameters of MCLR adsorption isotherm, and removal efficiency (%) calculated in for a concentration of MCLR of 525 µg/L (adsorbent dose 6 g/L).

Sample	Langmuir model			Freundlich model			Removal Efficiency (%)
	K_L (L g ⁻¹)	Q_{max} (µg g ⁻¹)	R_{adj}^2	K_F (µg ¹⁻ⁿ L ⁿ g ⁻¹)	n	R_{adj}^2	
400B0.5	0.007	46.605	0.9514	1.284	0.575	0.9765	53.9
400B2.0	0.0127	61.685	0.9816	2.856	0.523	0.9363	61.3
500B0.5	0.033	106.29	0.9825	5.551	0.523	0.9872	81.2
500B2.0	0.0843	73.170	0.9083	7.433	0.523	0.9185	92.4
600B0.5	0.0113	218.95	0.9640	4.569	0.733	0.9958	92.1
600B2.0	0.2393	69.600	0.8342	12.088	0.459	0.8513	92.5

Considering the characterization of bamboo biochars and removal efficiency results, we have identified sample 600B0.5 as a potential candidate to replace activated carbon in a hypothetical water treatment plant. Among the bamboo biochars exhibiting a removal efficiency exceeding 91 %, sample 600B0.5 ($pH_{PZC} = 8.66$) stands out due to its relatively elevated specific surface area ($S_{BET} = 64 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) and high graphitization degree (indicated by the lowest I_D/I_G ratio, 2.08), combined with a shorter residence time (0.5 h). The maximum adsorption capacity (Q_{max}) obtained through Langmuir fitting was $219 \mu\text{g g}^{-1}$ for this sample.

The adsorption kinetics of MCLR on the selected bamboo biochar (600B0.5) reveals a rapid increase in the adsorption capacity of MCLR within the initial 20 min, signifying a fast adsorption process. In contrast, the adsorption equilibrium is reached at approximately 2-3 h (refer to Figure A6). The exceptional kinetic properties can be attributed to the macroporous structure of the bamboo biochar, as evidenced by Hg porosimetry, allowing an easy path to reach the adsorption sites. Furthermore, the saturation adsorption amount obtained by fitting the pseudo-second-order kinetic model is $262 \mu\text{g g}^{-1}$, which closely aligns with the experimental equilibrium adsorption capacity of 600B0.5 ($200 \mu\text{g g}^{-1}$) and the Langmuir equation fitting. This model is usually applied when chemisorption controls the adsorption kinetic.

Powdered activated carbon (PAC) and granular activated carbon (GAC) are frequently employed in water treatment plants to eliminate undesirable taste, odor, and various organic compounds, including MCs, through the adsorption process. In this context, we conducted a column experiment to evaluate the dynamic adsorption behavior of the selected bamboo biochar (600B0.5) compared to a commercially available activated carbon (AC) toward removing MCLR in a complex matrix.

A photograph of the experimental set-up is provided in Figure A7. The contaminated water from a real water source, supplied by the National Administration of State Sanitary Works (OSE), a state-owned Uruguayan Water Utilities company, was introduced into the column at a flow rate of 8 mL min^{-1} . The supplied source water underwent standard water treatment processes, including coagulation, flocculation and sedimentation in the plant. No filtration process was applied. The conventional treatments proved ineffective in removing extracellular/dissolved cyanotoxins (Verma et al., 2023). Therefore, we deliberately introduced $58 \mu\text{g L}^{-1}$ of MCLR into this sample to simulate an extreme scenario of cyanobacteria blooms.

After passing through the column, the resulting solution contains less than $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of MCLR for both adsorbents ($0.28 \mu\text{g L}^{-1}$ for 600B0.5 and $0.52 \mu\text{g L}^{-1}$ for the AC), falling below the recommended guideline level for drinking water (World Health Organization, 2020). This is a removal efficiency of 99.5 % for 600B0.5 and 99.1 % for the AC. Results are promising for two reasons: firstly, other organic compounds or minerals in the water could interfere with the adsorption process. However, both adsorbents demonstrate resilience to such interferences, maintaining their effectiveness. Secondly, in comparing activated carbon with bamboo biochar, the latter possesses a significantly lower surface area ($64 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ vs. $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), as it does not undergo an activation process, rendering the bamboo biochar a comparatively more cost-effective adsorbent.

Discussion of the adsorption mechanism on bamboo biochars

The adsorption mechanisms of MCLR on carbonaceous materials, such as porous carbon and biochars, are determined by their surface chemistry and textural characteristics. MCLR is a large and complex molecule that interacts with sorbents through hydrophobic forces, electrostatic attraction, pore-filling, hydrogen bond, and π - π interaction (Frišták et al., 2020; Pendleton et al., 2001).

Under the pH condition comparable to the incoming water at the water treatment plant, the bamboo biochar pyrolyzed at 600 °C for 0.5 hours (600B0.5) achieved the highest MCLR removal efficiency. This pyrolysis temperature renders a biochar with 1) a hydrophobic surface promoting hydrophobic interaction with the leucine moieties of MCLR, 2) a high aromatization degree of the carbonaceous structure, promoting a π - π stacking with the benzene group of MCLR, and 3) a basic nature ($\text{pH}_{\text{PZC}} > 8$), promoting electrostatic attractions with the anion MCLR. The chemical structure of MCLR is presented in Figure A8 and the proposed mechanisms are schematized in Figure 3. Although the pores are essentially small to adsorb MCLR, bamboo biochars exhibit a highly developed macroporosity that accelerates the diffusion of pollutants toward the surface of the biochars.

In summary, bamboo biochars emerge as a promising candidate for effectively removing MCLR from real water sources. The adsorption capacity rivals and even surpasses other adsorbents such as wood-based activated carbon (Pendleton et al., 2001) and rice straw-derived biochar (Wei and Lu, 2021). Upon comparison with diverse carbonaceous materials outlined in Table 4, bamboo biochars exhibit several advantageous qualities. Using bamboo biomass as a sustainable starting material, free from chemicals associated with an activation process, suggests potential benefits for sustainability and reduced environmental impact. The effective performance of bamboo biochars at the studied pH eliminates the necessity for pH adjustment when utilized in a water treatment plant. When comparing different carbonaceous materials, it is crucial to consider production costs, giving special attention to biomass residues that have the potential to compete with bamboo.

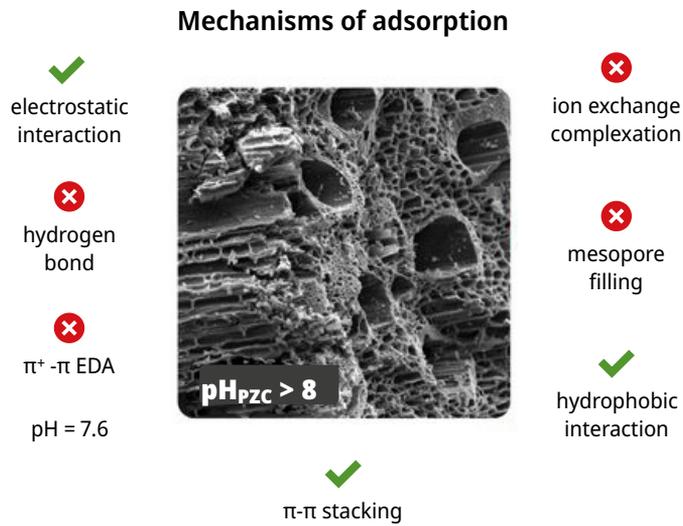


FIGURE 3. List of potential MCLR adsorption mechanisms on carbonaceous materials, with the green ticks outlining those elucidated for bamboo biochar 600B0.5.

TABLE 4. MCLR adsorption capacity of various carbonaceous materials and the mainly proposed mechanism.

Materials	Adsorption capacity	Mechanism	Reference
Wood-based AC	189 $\mu\text{g mg}^{-1}$	Pore -filling (secondary micropores and mesopores)	(Pendleton et al., 2001)
Rice straw-derived biochar	10.96 $\mu\text{g g}^{-1}$	Electrostatic interactions and Hydrogen bonds	(Wei and Lu, 2021)
Chicken manure-derived biochar	>1050 $\mu\text{g g}^{-1}$	Electrostatic interaction related to higher ash content at low pH	(Li et al., 2018)
Bamboo/chitosan-derived biochar	1 mg g^{-1}	Ion pairing effect at low pH	(Zhang et al., 2011)
Mesoporous carbon	37.87 mg g^{-1}	(meso-)pore diffusion and $\pi - \pi$ (and hydrophobic) interactions	(Park et al., 2020)
Graphene oxide	1700 $\mu\text{g g}^{-1}$	Ion-pairing effect at low pH	(Pavagadhi et al., 2013)
Giant reed-derived biochar	42.4 mg g^{-1}	Hydrophobic interaction and $\pi^+ - \pi$ or $\pi - \pi$ interaction	(Liu et al., 2018)
Nanotubes	14.8 mg g^{-1}	Nanotubes 10nm filling	(Yan et al., 2006)
Bamboo biochar	200 $\mu\text{g g}^{-1}$	Electrostatic interaction, hydrophobic interaction and $\pi - \pi$ interaction	This work

CONCLUSIONS

Bamboo biochars were systematically synthesized, varying the pyrolysis temperatures and residence times. The influence of time on the surface chemistry and textural characteristics of the biochars is minimal compared to the impact of temperature. Among bamboo biochars, sample 600B0.5 exhibits a remarkable combination of well-developed macroporous structures, an optimal aromatization degree, and a basic nature, resulting in efficient and effective removal of MCLR: 91 % in batch ($Q_{\max} = 219 \mu\text{g g}^{-1}$) at a pH of 7.63 comparable to that in water treatment plants and, 99.5 % in column, resulting in a final concentration of $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$, well below the World Health Organization guideline of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (World Health Organization, 2020). The MCLR uptake mechanism under this condition was mainly determined by electrostatic, π - π stacking, and hydrophobic interactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Bambú del Este for the biomass supply, Laboratorio de Sólidos Porosos, Universidad Nacional de San Luis (Argentina) for the nitrogen isotherms, thermogravimetric analysis and mercury porosimetry, Ricardo Faccio for Raman measurements. This work was supported by the Centro Tecnológico del Agua [CGA2020-06].

REFERENCES

- American Society for Testing and Materials, 2021. D3172-13, reapproved 2021: *Proximate analysis of coal and coke*. West Conshohocken: ASTM.
- Carmichael, W. W. and Boyer, G. L., 2016. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: implications for the North American great lakes. In: *Harmful Algae*, 54, pp. 194–212. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.HAL.2016.02.002>
- Chaturvedi, K.; Singhwane, A.; Dhangar, M.; Mili, M.; Gorhae, N.; Naik, A.; Prashant, N.; Srivastava, A. K. and Verma, S., 2023. Bamboo for producing charcoal and biochar for versatile applications. En: *Biomass Conv. Bioref.*
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03715-3>
- Chen, B. and Chen, Z., 2009. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. In: *Chemosphere*, 76(1), pp. 127–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.004>
- El Bouaidi, W.; Enaime, G.; Loudiki, M.; Yaacoubi, A.; Douma, M.; Ounas, A. and Lübken, M., 2022. Adsorbents used for microcystin removal from water sources: current knowledge and future prospects. In: *Processes*, 10(7), pp. 1–23.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pr10071235>
- Fries, M. and Steele, A., 2010. Raman spectroscopy and confocal Raman imaging in mineralogy and petrography. In: *Springer Series in Optical Sciences*, 158, pp. 111–135.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-12522-5_6/

- Frišták, V.; Laughinghouse, H. D. and Bell, S. M., 2020. The use of biochar and pyrolysed materials to improve water quality through microcystin sorption separation. In: *Water (Switzerland)*, 12(10), pp. 1–19. DOI: <https://doi.org/10.3390/w12102871>
- Li, J.; Cao, L.; Yuan, Y.; Wang, R.; Wen, Y. and Man, J., 2018. Comparative study for microcystin-LR sorption onto biochars produced from various plant- and animal-wastes at different pyrolysis temperatures: Influencing mechanisms of biochar properties. In: *Bioresource Technology*, 247(July 2017), pp. 794–803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.120>
- Li, L.; Qiu, Y.; Huang, J.; Li, F. and Sheng, G. D., 2014. Mechanisms and factors influencing adsorption of Microcystin-LR on biochars. In: *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(12). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2220-6>
- Liu, G.; Zheng, H.; Zhai, X. and Wang, Z., 2018. Characteristics and mechanisms of microcystin-LR adsorption by giant reed-derived biochars: Role of minerals, pores, and functional groups. In: *Journal of Cleaner Production*, 176, pp. 463–473. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.156>
- Manals-Cutiño, E.; Penedo-Medina, M. and Giralte-Ortega, G., 2011. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales [Online]. In: *Tecnología Química*, XXXI(2), pp. 36–43. [Accessed: 12 april 2024]. Retrieved from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543773005>
- Melaram, R.; Newton, A. R. and Chafin, J., 2022. Microcystin contamination and toxicity: implications for agriculture and public health. In: *Toxins*, 14(5). DOI: <https://doi.org/10.3390/TOXINS14050350>
- Odoemelam, S.; Onwu, F.; Uchechukwu, S. and Chinedu, M., 2015. Adsorption Isotherm Studies of Cd(II) and Pb(II) Ions from Aqueous Solutions by Bamboo-Based Activated Charcoal and Bamboo Dust. In: *American Chemical Science Journal*, 5(3), pp. 253–269. DOI: <https://doi.org/10.9734/acsj/2015/14425>
- Park, J. A.; Kang, J. K.; Jung, S. M.; Choi, J. W.; Lee, S. H.; Yargeau, V. and Kim, S. B., 2020. Investigating Microcystin-LR adsorption mechanisms on mesoporous carbon, mesoporous silica, and their amino-functionalized form: Surface chemistry, pore structures, and molecular characteristics. In: *Chemosphere*, 247, 125811. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125811>
- Pavagadhi, S.; Tang, A. L. L.; Sathishkumar, M.; Loh, K. P. and Balasubramanian, R., 2013. Removal of microcystin-LR and microcystin-RR by graphene oxide: Adsorption and kinetic experiments. In: *Water Research*, 47(13), pp. 4621–4629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.033>
- Pendleton, P.; Schumann, R. and Wong, S. H., 2001. Microcystin-LR Adsorption by activated carbon. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, 240(1), pp. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1006/JCIS.2001.7616>
- Ren, X.; Wang, Y.; Zhang, K.; Ding, Y.; Zhang, W.; Wu, M.; Xiao, B. and Gu, P., 2023. Transmission of microcystins in natural systems and resource processes: a review of potential risks to humans health. In: *Toxins*, 15(7). DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins15070448>
- Rouquerol, J.; Llewellyn, P. and Rouquerol, F., 2007. Is the bet equation applicable to microporous adsorbents? In: *Studies in Surface Science and Catalysis*, 160, pp. 49–56. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(07\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(07)80008-5)

- Teng, W.; Wu, Z.; Fan, J.; Chen, H.; Feng, D.; Lv, Y.; Wang, J.; Asiri, A. M. and Zhao, D., 2013a. Ordered mesoporous carbons and their corresponding column for highly efficient removal of microcystin-LR. In: *Energy and Environmental Science*, 6(9), pp. 2765–2776. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3ee41775a>
- Teng, W.; Wu, Z.; Feng, D.; Fan, J.; Wang, J.; Wei, H.; Song, M. and Zhao, D., 2013b. Rapid and efficient removal of microcystins by ordered mesoporous silica. In: *Environmental Science and Technology*, 47(15), pp. 8633–8641. DOI: <https://doi.org/10.1021/es400659b>
- Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A. V.; Olivier, J. P.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J. and Sing, K. S. W., 2015. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). In: *Pure and Applied Chemistry*, 87(9–10), pp. 1051–1069. DOI: <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>
- Uruguay. Agencia Reguladora de Compras Estatales, 2022. *Licitación abreviada 23041/2022* [Online]. Montevideo: Administración de las Obras Sanitarias del Estado. [Accessed: 24 april 2024]. Available at: <https://www.comprasestatales.gub.uy/consultas/detalle/id/i366680>
- Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medioambiente, 2020. *Informe, evolución de la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía* [Online]. Montevideo: DINAMA. [Accessed: 12 april 2024]. Available at: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/Informe-Santa-Lucia-2015-2019.pdf>
- Verma, S.; Kumar, P.; and Lavrenčič Štangar, U., 2023. A Perspective on removal of cyanotoxins from water through advanced oxidation processes. In: *Global Challenges*, 2300125, pp. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1002/gch2.202300125>
- Wei, L. and Lu, J., 2021. Adsorption of microcystin-LR by rice straw biochars with different pyrolysis temperatures. In: *Environmental Technology and Innovation*, 23, 101609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101609>
- World Health Organization, 2020. *Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments* [Online]. Ginebra: WHO. [Accessed: 24 april 2024]. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338066>
- Yan, H.; Gong, A.; He, H.; Zhou, J.; Wei, Y. and Lv, L., 2006. Adsorption of microcystins by carbon nanotubes. In: *Chemosphere*, 62(1), pp. 142–148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.075>
- Zegura, B., 2016. An overview of the mechanisms of Microcystin-LR genotoxicity and potential carcinogenicity. In: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13), pp. 1042–1062. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160308141549>
- Zhang, H.; Zhu, G.; Jia, X.; Ding, Y.; Zhang, M.; Gao, Q.; Ciming, H. and Xu, S., 2011. Removal of microcystin-LR from drinking water using a bamboo-based charcoal adsorbent modified with chitosan. In: *Journal of Environmental Sciences*, 23(12), pp. 1983–1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60676-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60676-6)

ANNEXES

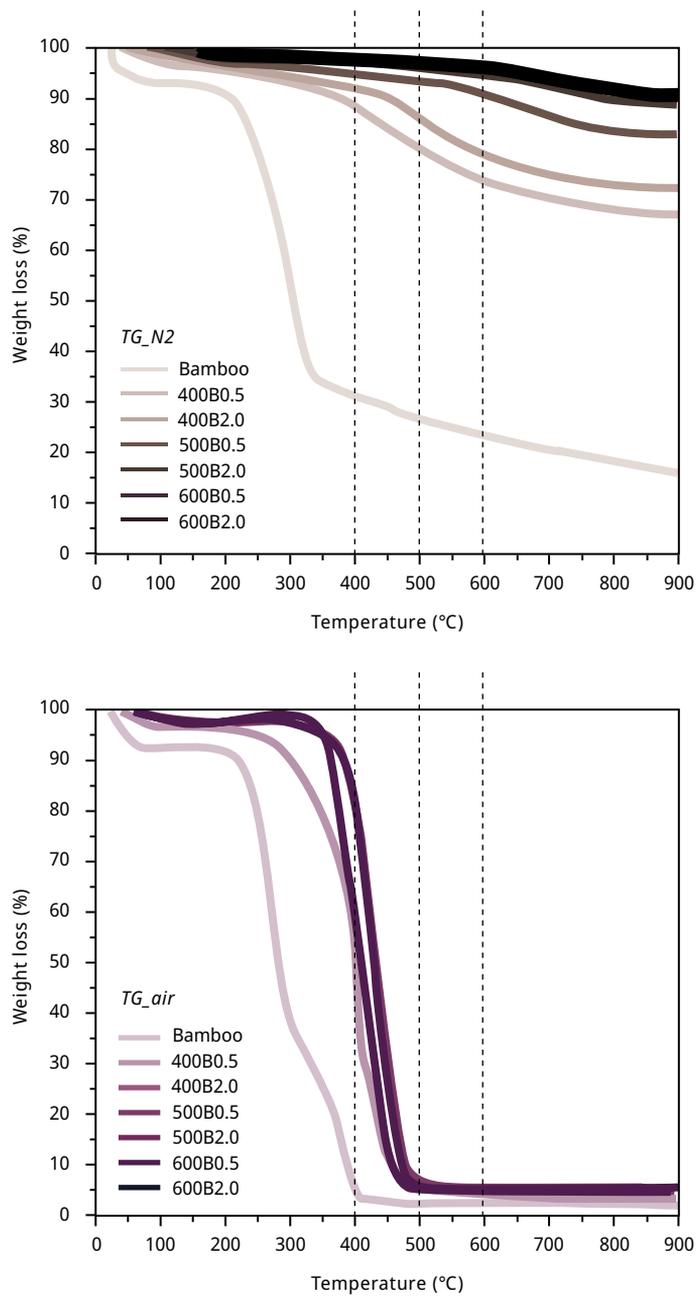


FIGURE A1. Thermogravimetric analysis (TG) for bamboo and bamboo biochars performed at heating rates of 10 °C min⁻¹ with temperatures ranging from room temperature to 900 °C. Compressed air (left) and nitrogen (right) was used for combustion experiments at 50 mL min⁻¹.

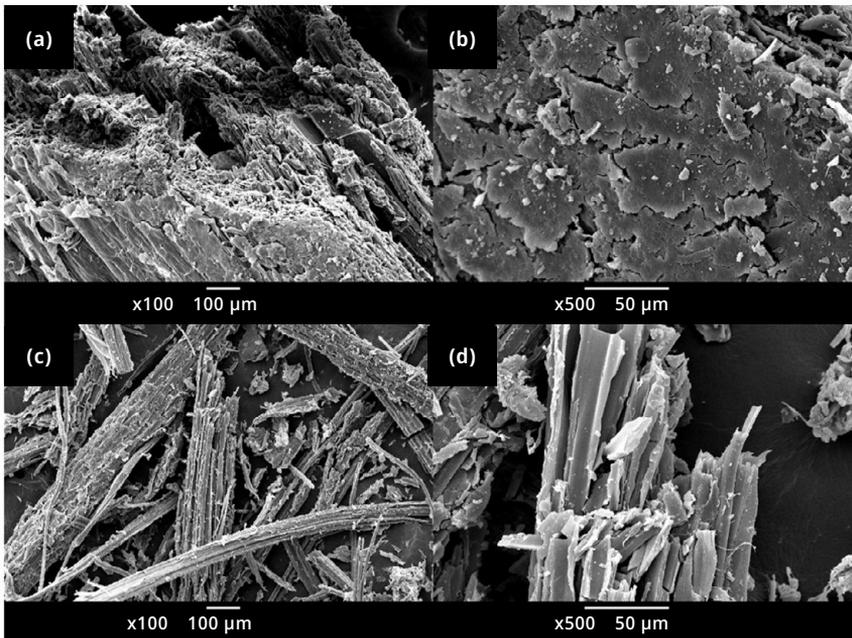


FIGURE A2. Scanning electron microscopic images of (a) bamboo biomass x100, and (b) bamboo biomass x500, and (c) 500B2.0 x100 and (d) 500B2.0 x500.

TABLE A1. Raman shifts of the D and G bands observed in the six bamboo biochars, along with the intensity ratio I_D/I_G .

Sample	D band	G band	Ra, I_D/I_G
	Raman Shift	Raman Shift	
400B0.5	1352.5	1568.3	2.37
400B2.0	1354.1	1568.2	2.46
500B0.5	1343.7	1566.9	2.24
500B2.0	1346.4	1568.7	2.18
600B0.5	1340.0	1568.3	2.08
600B2.0	1340.1	1568.2	2.05

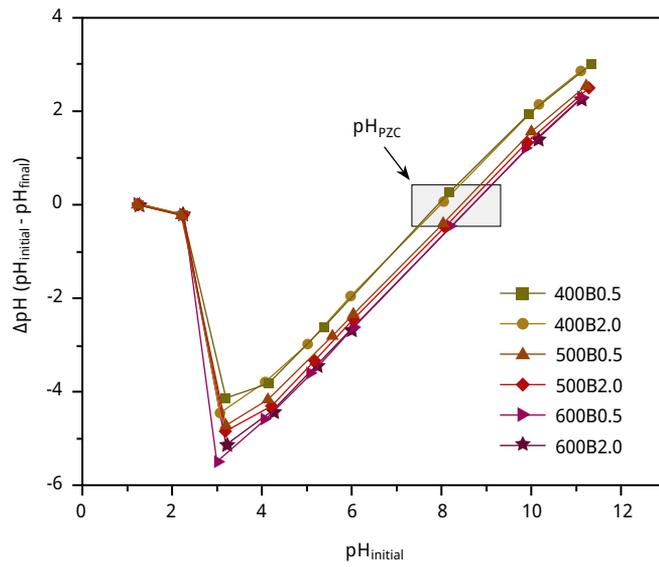


FIGURE A3. Plot of ΔpH vs. initial pH for pH_{PZC} s determination of the six bamboo biochars.

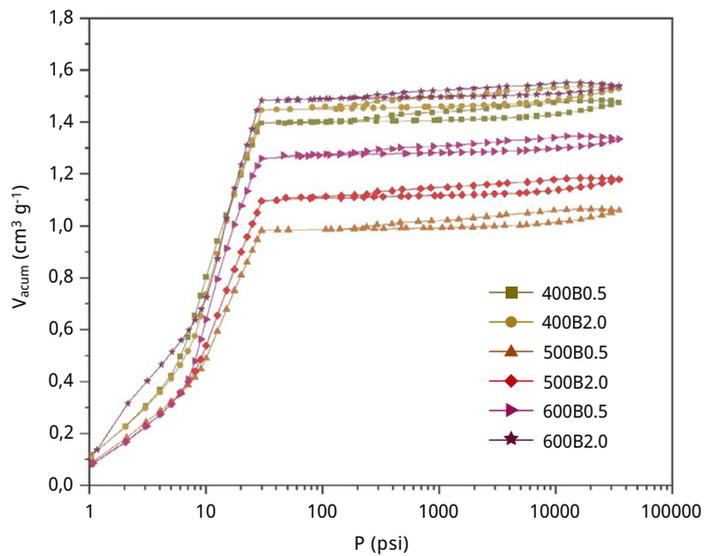


FIGURE A4. Hg intrusion-extrusion curves for the six bamboo biochars.

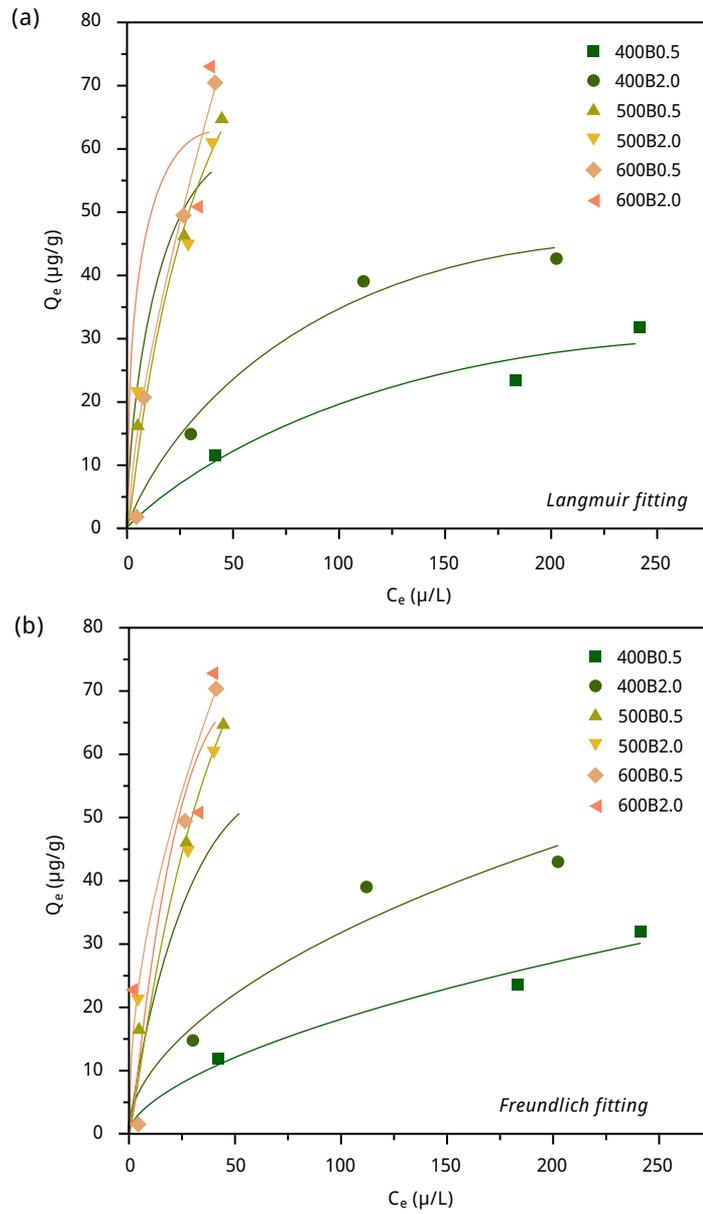


FIGURE A5. Adsorption isotherm of MCLR (scatters) on the six bamboo biochars with (a) Langmuir model fitting (lines), (b) Freundlich model fitting (lines).

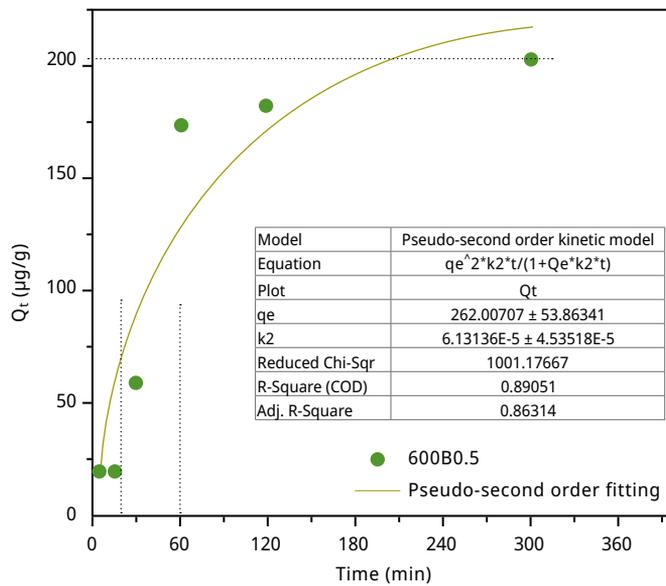


FIGURE A6. Adsorption capacity at the time t (Q_t) versus contact time on the sample 600B0.5 with an initial concentration of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ in water.

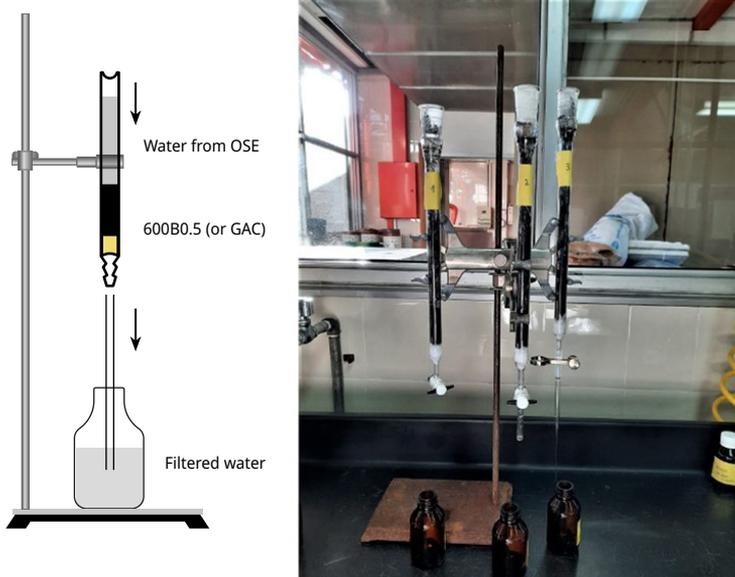


FIGURE A7. Scheme of the setup (left). Photograph of the column built in the (right). OSE refers to National Administration of State Sanitary Works.

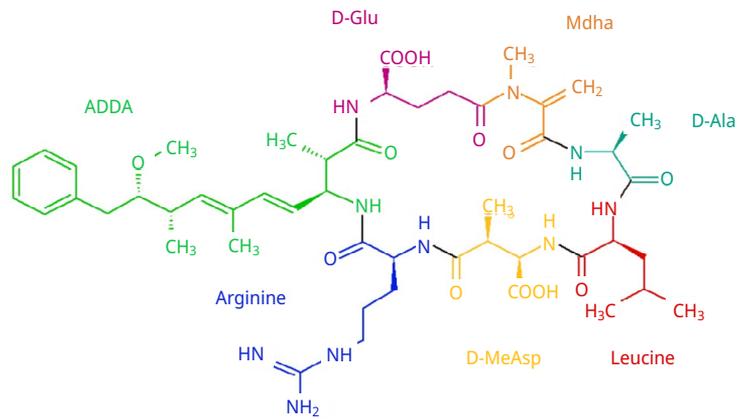


FIGURE A8. MCLR chemical structure.

Monitoreo preliminar de glifosato y su principal metabolito en aguas superficiales de la cuenca del Río Santa Lucía y en agua potable

Preliminary monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters of the Santa Lucía River basin and in drinking water

Monitoramento preliminar do glifosato e seu principal metabólito nas águas superficiais da bacia do Rio Santa Lucía e na água potável

 **PAULO FRONTERA** (1)(2)(4)

 **ANDREA SOMMA** (3)

 **ANDRÉS PÉREZ PARADA** (4)

 **EDUARDO MANTA** (5)(6)

(1) Programa de Posgrado de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

(2) Obras Sanitarias del Estado (OSE), Uruguay.

(3) Laboratorio de Ecología Fluvial, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay.

(4) Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Uruguay.

(5) Laboratorio de Química Fina, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

(6) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

RECIBIDO: 13/11/2023 → APROBADO: 15/1/2024 ✉ paulofrontera1982@gmail.com

RESUMEN

La cuenca del Río Santa Lucía (CRSL) es la principal fuente de abastecimiento de agua potable para la población de Uruguay y en ella existe un importante uso del herbicida glifosato (GLY). El objetivo de este trabajo fue realizar un monitoreo preliminar de GLY y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) en aguas superficiales (AS) de la cuenca, en agua bruta (AB) y en agua potable (AP) de la planta potabilizadora de Aguas Corrientes (PPAC). Se analizó GLY y AMPA en 121 muestras tomadas en el período de agosto a diciembre del 2020, 33 fueron de AB de la PPAC, 33 de AP y 55 de AS de la CRSL.

Se encontró que, en AB y AP, GLY y AMPA dieron resultados no cuantificables y cumplen con las recomendaciones y regulaciones nacionales respectivamente. En AS se detectaron y cuantificaron GLY y AMPA en la subcuenca del arroyo Canelón Chico con valores inferiores a 1 µg/L. Estos valores cumplen con las recomendaciones nacionales para aguas naturales, no así con las regulaciones de la Unión Europea. Por otra parte, este hallazgo indica que la subcuenca del arroyo Canelón Chico es uno de los afluentes de menor calidad de la CRSL.

Palabras clave: herbicidas, proceso de potabilización, contaminación difusa.

ABSTRACT

The Santa Lucía River basin (CRSL) is the main source of drinking water supply for the population of Uruguay, and there is a significant use of the herbicide glyphosate (GLY) within it. The aim of this study was to carry out a preliminary monitoring of GLY and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in surface waters (AS) of the CRSL as well as at raw water (AB) and in the drinking water (AP) of the Aguas Corrientes potable water treatment plant (PPAC). GLY and AMPA were analyzed in 121 samples taken from August to December of 2020, 33 of which were AB from the PPAC, 33 were AP, and 55 were AS from the CRSL. It was found that in AB and AP the results for GLY and AMPA could not be quantified, which complies with national recommendations and regulations respectively. GLY and AMPA were detected and quantified in AS in the Canelón Chico creek sub-basin, with values below 1 µg/L. Even though these values comply with national recommendations for natural waters, they exceed European Union regulations. Furthermore, this finding indicates that the Canelón Chico creek sub-basin is one of the worst quality tributaries of the CRSL.

Keywords: herbicides, water treatment process, diffuse pollution.

RESUMO

A bacia do Rio Santa Lúcia (CRSL) é a principal fonte de abastecimento de água potável para a população do Uruguai, e há um uso significativo do herbicida glifosato (GLY) dentro dela. O objetivo deste estudo foi realizar um monitoramento preliminar de GLY e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) em águas superficiais (AS) da CRSL, na captação (Água Bruta, AB) e na água potável (AP) da estação de tratamento de água potável de Aguas Corrientes (PPAC). GLY e AMPA foram analisados em 121 amostras coletadas de agosto a dezembro de 2020, das quais 33 eram AB da PPAC, 33 eram AP e 55 eram AS da CRSL. Verificou-se que em AB e AP os resultados para GLY e AMPA não puderam ser quantificados, cumprindo as recomendações e regulamentos nacionais, respectivamente. No entanto, em AS, GLY e AMPA foram detectados e quantificados na sub-bacia do riacho Canelón Chico, com valores abaixo de 1 µg/L. Esses valores estão em conformidade com as regulamentações nacionais para águas naturais, mas não com as regulamentações da União Europeia. Além disso, essa descoberta indica que a sub-bacia do riacho Canelón Chico é um dos afluentes menos preservados da CRSL.

Palavras-chave: herbicidas, processo de tratamento de água, poluição difusa.

INTRODUCCIÓN

El glifosato (GLY) es un herbicida de amplio uso a nivel mundial tanto en agricultura como en áreas urbanas. Es el herbicida de mayor uso en Uruguay, con volúmenes anuales de importación superiores a 7000 toneladas de ingrediente activo (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2020). Por esta razón es considerado prioritario en la lista de plaguicidas prioritarios para la gestión ambiental, realizada por la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental (Uruguay. Ministerio de Ambiente. Observatorio Ambiental Nacional, 2021).

Es empleado como herbicida sistémico de amplio espectro y rápida acción, particularmente asociado a la expansión de cultivos genéticamente modificados tolerantes al mismo (de Castilhos Ghisi et al., 2020). El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima 3-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa, lo cual interfiere en la biosíntesis de aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas (Roberts et al., 1998). Esta enzima forma parte de la vía metabólica del ácido shikímico, presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Roberts et al., 1998). Sin embargo, existen controversias en relación con su clasificación como posible carcinógeno desde el año 2015 (International Agency for Research on Cancer, 2015) y posteriores reevaluaciones de su toxicología (United States Environmental Protection Agency, 2016). El uso sostenido de este compuesto en la agricultura convencional ha aumentado el interés sobre los potenciales riesgos a la salud humana y al ambiente (de Castilhos Ghisi et al., 2020; Zhang et al., 2022; Bo Liu et al., 2022; Maggi et al., 2020; World Health Organization, 2017).

A nivel nacional, la Norma UNIT 833:2008 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008) establece para agua potable (AP) el valor máximo permitido de GLY + ácido aminometilfosfónico (AMPA) en 700 µg/L. Para aguas naturales, las recomendaciones nacionales proponen 65 µg/L de GLY (Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014).

En tanto, las reglamentaciones internacionales, como la guía para la protección de la vida acuática canadiense, proponen valores de GLY máximos en agua superficial (AS) de 800 µg/L en una exposición a corto plazo y de 27.000 µg/L en una exposición a largo plazo (Canadá. Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012). La reglamentación brasilera establece 280 µg/L como valor máximo permitido para AS de clase III (Brasil, 2005).

Si bien el GLY no es listado como un plaguicida prioritario en la Unión Europea y no dispone de un valor máximo permisible explícito, la normativa europea vigente establece un criterio general para plaguicidas individuales y sus metabolitos de 0,1 µg/L y una sumatoria de plaguicidas totales presentes en la muestra inferior a 0,5 µg/L (Unión Europea, 2020).

Por otra parte, los valores máximos permitidos según las reglamentaciones nacionales no necesariamente aseguran que no exista un riesgo para los organismos acuáticos. Algunos estudios muestran que concentraciones de GLY por debajo de 0,1 µg/L implican un riesgo bajo para los organismos acuáticos, mientras que por encima de 1 µg/L representan un riesgo alto (Brovini et al., 2021). Estudios en la región han reportado riesgos significativos a concentraciones máximas de 70 µg/L y 125 µg/L de GLY en el agua (Bonansea et al., 2017). A nivel nacional, el estudio realizado por Corrales (2018) muestra que el GLY puede generar cambios en la composición de la comunidad de diatomeas.

Guilherme et al. (2010) demostró que concentraciones de 18 µg/L y 36 µg/L de GLY suponen un riesgo para la salud de las poblaciones de los peces.

La movilidad de los plaguicidas hacia el ambiente acuático ocurre fundamentalmente por deriva, procesos erosivos y de escorrentía superficial que favorecen la llegada de estos compuestos a los cursos de agua (Gelós et al., 2020). La persistencia del GLY en suelos depende de las condiciones climáticas y del tipo de suelo. Su movilización y descomposición dependen de la estructura del suelo, cantidad y calidad de la materia orgánica, temperatura, pH, y tipo de arcilla, entre otros (González y Fuentes, 2022., Muskus et al., 2020).

La transformación microbiológica aeróbica del GLY ha sido identificada como la principal vía de degradación, generando el metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Guijarro et al., 2018). AMPA presenta tiempos de vida media en suelo y agua mayores al GLY, por lo que también interesa conocer su ecotoxicidad y sus niveles en el ambiente (Sun et al., 2019; Ivantsova et al., 2022; Bonansea et al., 2017).

La cuenca del Río Santa Lucía (Uruguay, CRSL) se caracteriza por ser la fuente de agua de la principal planta potabilizadora del país, la Planta Potabilizadora de Aguas Corrientes (PPAC). La PPAC está ubicada en el departamento de Canelones (34° 31'07" S, 56° 23'39" W), potabiliza el agua que abastece a Montevideo y su zona metropolitana, con aproximadamente 1.700.000 de habitantes (Uruguay. Obras Sanitarias del Estado, 2021).

La CRSL abarca una superficie de 13.681 km² y se ubica al sur de Uruguay, en los departamentos de Lavalleja, Canelones, San José, Montevideo, Flores y Florida. El Río Santa Lucía nace en la Cuchilla Grande, al noreste de Minas-Lavalleja, y desemboca en el Río de la Plata. Se alimenta de numerosos ríos, arroyos y cañadas, presentando un sistema hidrográfico denso (Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023b). La región de influencia de esta cuenca significa una importante zona agropecuaria de Uruguay, que combina la existencia de agricultura intensiva y extensiva, ganadería y lechería, entre otras actividades (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2015). El estado ambiental de la cuenca hidrográfica del Río Santa Lucía ha sido reconocido como uno de los más críticos del país desde hace varios años, y por ello diversas instituciones han establecido numerosos programas de monitoreo (por ejemplo: Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023b).

Dentro del programa de monitoreo de la calidad de agua del Río Santa Lucía (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020), la CRSL se divide en 9 subcuencas y los monitoreos se realizan con una frecuencia bimestral en 25 estaciones de muestreo, a fin de obtener seis datos al año por punto de muestreo. Existen algunos antecedentes recientes de monitoreo de GLY y AMPA en estas subcuencas, los cuales han identificado al GLY y AMPA dentro de los contaminantes orgánicos con mayor frecuencia de detección (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020).

El objetivo de este trabajo fue realizar un monitoreo preliminar intensivo de GLY y AMPA en aguas naturales de la CRSL que impactan directamente en la toma de la PPAC y en AP en un periodo de tiempo acotado. Con esto se pretendió identificar potenciales riesgos en el suministro de AP debido al GLY y AMPA en los afluentes inmediatos a la PPAC, lo cual es relevante desde el punto de vista del aseguramiento de la calidad

del AP. Por otra parte, se buscó evaluar la eventual remoción de GLY y AMPA en el proceso de potabilización, la cual no se pudo realizar en función de los resultados obtenidos.

Con el fin de lograr la sostenibilidad del servicio de AP, es prioritario gestionar de manera integral la CRSL y en particular las fuentes de contaminación del AS para reducir los riesgos en la salud humana y la vida acuática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Los puntos de muestreo fueron seleccionados para que representen las contribuciones de los diferentes afluentes de la cuenca del Río Santa Lucía (Figura 1). El punto EPS representa al Embalse Paso Severino ubicado en el Río Santa Lucía Chico, los puntos PP y SL al tramo alto y medio del Río Santa Lucía, mientras que BCC, MCC, ECG, PE y PC a la subcuenca del Arroyo Canelón Grande y Canelón Chico. Además, se muestra el mapa de usos y coberturas del suelo del año 2019 para la cuenca del Río Santa Lucía (Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023a). En la Figura 2 se observan las precipitaciones (medidas en la PPAC), la temperatura de muestreo (medida en agua bruta) y el nivel del río (medido en la PPAC) en el periodo de estudio (Uruguay. Obras Sanitarias del Estado, 2023).

De esta manera se realiza una descripción parcial del comportamiento del sistema en el periodo evaluado, definiendo así el escenario base de estudio.

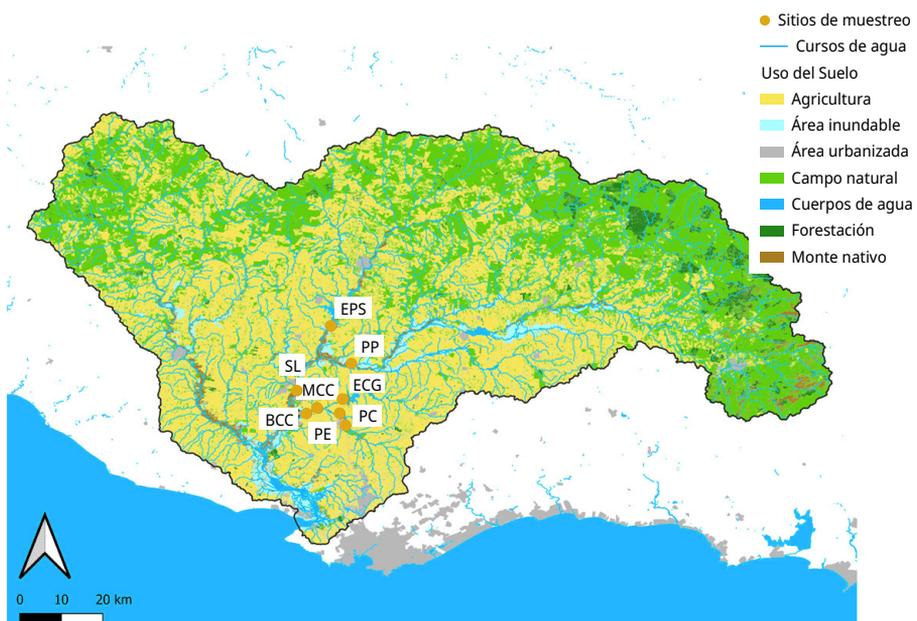


FIGURA 1. Mapa de usos y coberturas del suelo del año 2019 para la cuenca del Río Santa Lucía indicado con colores (Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023a). Los puntos anaranjados muestran los sitios de muestreo de la cuenca (AS). BCC: Arroyo Canelón

Grande en Puente Belinzon (34°29'49.6"S 56°22'13.4"W); MCC: Arroyo Canelón Grande a la altura de Margat (34°29'05.2"S 56°20'27.9"W); ECG: Embalse Canelón Grande sobre Arroyo Canelón Grande (34°27'30.5"S 56°16'16.2"W); PC: Arroyo Canelón Chico en Paso Calleros (34°31'48.2"S 56°16'07.0"W); PE: Arroyo Canelón Chico en Paso Espinosa (34°29'56.0"S 56°16'55"W); SL: Río Santa Lucía en ciudad Santa Lucía (34°26'20.3"S 56°23'56.8"W); PP: Río Santa Lucía en Paso Pache (34°21'48.0"S 56°15'17.5"W); EPS: Embalse Paso Severino en Río Santa Lucía Chico (34°15'56.7"S 56°18'24.0"W).

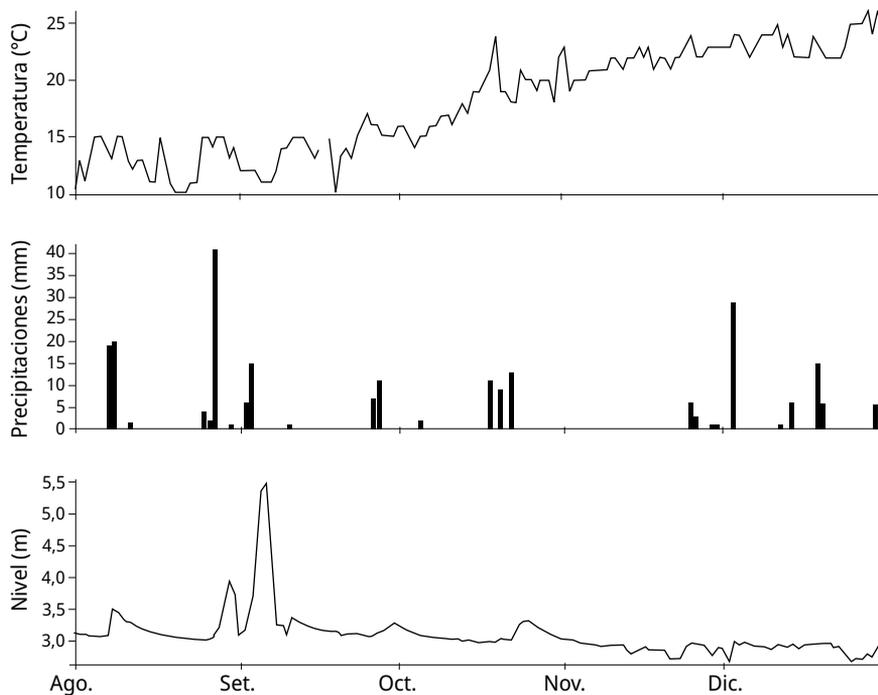


FIGURA 2. Temperatura (°C) del agua bruta (AB, panel superior), precipitaciones (mm en 24 horas) (panel medio) y nivel del río (m) (panel inferior) en la PPAC en función del tiempo (del 01/08/2020 al 31/12/2020).

Se colectaron 121 muestras, de las cuales 33 corresponden a agua superficial en la toma de la PPAC (Agua Bruta, AB), 33 a agua potabilizada de la PPAC (AP) y 55 a agua superficial (AS) de los afluentes inmediatos a la PPAC. La Figura 1 muestra la ubicación de estos puntos de muestreo. El muestreo fue realizado entre agosto y diciembre del 2020. Para AB y AP la frecuencia de muestreo fue: 1 muestra en agosto, 14 muestras en setiembre, y 6 muestras en octubre, noviembre y diciembre respectivamente. Para AS la frecuencia de muestreo fue: 16 muestras en octubre, 24 en noviembre y 15 en diciembre.

Cada muestra de AB se obtuvo en la entrada al sistema de la PPAC y cada muestra de AP fue colectada a la salida del sistema (punto de control rutinario del agua potable de la PPAC). Estas muestras fueron obtenidas de forma directa en tubo Falcon de polipropileno de 15 mL, y trasladadas en frío (2 - 8 °C) al Departamento de Desarrollo Tecnológico

del CURE (Centro Regional del Este, Rocha, Uruguay), donde inmediatamente fueron congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Las muestras de AS de la cuenca se obtuvieron de la capa subsuperficial, las cuales fueron colectadas por el Laboratorio de la Unidad de Usinas Montevideo de Obras Sanitarias del Estado (OSE), Uruguay. Las muestras fueron tomadas con muestreadores de plástico y trasvasadas a botellas de polietileno marrones de 2 L. Previo a la colecta de las muestras, todas las botellas fueron enjuagadas dos veces con agua desionizada y tres veces con agua del punto de muestreo. En cada muestreo se tomó al menos 1 L de muestra y posteriormente se trasvasó a un tubo Falcon de polipropileno de 15 mL y se trasladó en frío ($2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) al Departamento de Desarrollo Tecnológico del CURE (Centro Regional del Este, Rocha, Uruguay), donde fue inmediatamente congelada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Método de análisis y preparación de muestra

La determinación de GLY y AMPA se realizó en el Laboratorio del Departamento de Desarrollo Tecnológico del CURE (Centro Regional del Este, Rocha, Uruguay) por derivatización con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC-Cl) y cromatografía líquida con detección de fluorescencia. La metodología empleada en este trabajo fue previamente reportada por Alonso et al. (2022).

Se tomó una alícuota de 3 mL de muestra de agua en un tubo Falcon de polipropileno de 50 mL. A cada muestra se le adicionó una alícuota de 15 μL de L-ácido aspártico (ASP) 10 mg/L. El tubo fue colocado en un baño de ultrasonido durante 3 minutos. Para la derivatización se agregaron 0,5 mL de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 25 mM, 0,5 mL de FMOC-Cl 6,0 g/L y 0,5 mL de acetonitrilo (ACN) y se agitó en vortex durante 30 segundos. Se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente ($22 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Una vez transcurrido este tiempo, se purificó el extracto mediante una extracción líquido-líquido con diclorometano (DCM). Para ello, se agregaron 4,5 mL de DCM y se agitó con vortex durante 30 segundos. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la fase acuosa (fase superior). Esta alícuota se cargó en jeringa descartable y se filtró mediante un filtro de PVDF de 0,45 μm (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) colectando en un vial de vidrio de 2 mL de automuestreador para su análisis instrumental (Alonso et al., 2022).

Reactivos y materiales

Los solventes utilizados fueron acetonitrilo (ACN), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) grado HPLC. En los tres casos, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Se empleó agua ultrapura de un purificador de agua Smart2Pure 3 UV (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Los estándares analíticos de GLY (99,4 %), AMPA (99 %), el reactivo derivatizante cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC-Cl, 99 %) y GLY-FMOC (98 %) fueron suministrados por HPC Standards (Cunnersdorf, Alemania). El L-ácido aspártico (ASP, 99 %) fue suministrado por J.T. Baker (Phillipsburg, EE. UU.) y empleado como estándar subrogado. La solución stock de GLY, AMPA, ASP y GLY-FMOC fue preparada en agua ultrapura a una concentración de 2000 mg/L. Cada solución de trabajo se preparó en agua ultrapura diluyendo la solución stock.

Se preparó una solución de FMOC-Cl en ACN a una concentración de 6 g/L. Cada solución fue conservada en oscuridad a 4 ± 2 °C. Los reactivos tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) e hidróxido de amonio (NH_4OH) en grado analítico fueron suministrados por Carlo Erba (Cornaredo, Italia).

Instrumental

Para realizar el ajuste de pH de la fase móvil se utilizó un medidor de pH Thermo Scientific modelo Orion Versa Star. Se utilizó un baño sonicador Branson 2800. Se empleó un cromatógrafo líquido Thermo Scientific Ultimate 3000 acoplado a un detector de fluorescencia Thermo Scientific FLD 3400RS. La tabla 1 muestra las condiciones de la separación cromatográfica (Alonso et al., 2022).

TABLA 1. Condiciones cromatográficas.

Columna	Thermo Scientific Hypersil Gold C18 (250 mM x 4,6 mM id x 5 µm)
Temperatura de la columna	30 °C
Fase móvil	A-Buffer amonio/amoníaco 5 mM, pH = 9.5 B-ACN
Gradiente	Inicio 5 % de B, aumentando hasta el 19 % a los 6 minutos y manteniéndose isocrático durante 4 minutos. Posteriormente, en 2 minutos se incrementó el porcentaje de B hasta el 95 %, sosteniéndose durante 7 minutos para eliminar excesos de FMOC y subproductos de reacción. El programa finaliza disminuyendo el porcentaje de ACN hasta el 5 %
Flujo	1 mL/min
Volumen inyectado	10 µL
Solvente limpieza jeringa	MeOH
Detector	FLD
Longitud de onda FLD	Fija - λ excitación 270 nm; λ emisión: 315 nm para GLY-FMOC y AMPA-FMOC
Adquisición de medida en FLD	Entre 5 y 10 minutos empleando un factor de sensibilidad = 2 y entre 10 y 13 minutos empleando un factor de sensibilidad = 3

Aseguramiento de la calidad

Las curvas de calibración fueron preparadas adicionando soluciones de GLY y AMPA al agua superficial. Este blanco fue previamente verificado de estar libre de estos analitos. Se fortificó cada muestra utilizando alícuotas apropiadas de soluciones intermedias de ambos compuestos preparadas en agua ultrapura. Posteriormente las curvas de calibración fueron sometidas al proceso analítico completo, por lo que estuvieron afectadas por recuperación. La técnica fue validada previamente llegando a límites de cuantificación (LOQ) de 0,25 µg/L para GLY y 0,67 para AMPA (Alonso et al., 2022). Los valores inferiores al LOQ no fueron reportados. Entre las operaciones de aseguramiento habituales se realizaron blancos

de reactivos, blancos analíticos y curvas de calibración diarias en el rango 0,25-10 µg/L para GLY y 0,67-50 µg/L para AMPA. Asimismo, se realizó un gráfico de control del estándar subrogado ASP para determinar la conformidad del proceso analítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitoreo preliminar

Los resultados de GLY y AMPA para AB y AP acotados al período de este trabajo se encontraron por debajo del LOQ (0,25 µg/L para GLY y 0,67 µg/L para AMPA). Esto supone una baja incidencia de GLY y AMPA en la PPAC durante el período relevado bajo las condiciones ambientales del estudio. Los hallazgos de GLY y AMPA presentados en este trabajo podrían verse afectados en diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, la cantidad de lluvia y el tiempo transcurrido entre lluvias y muestreo puede afectar por escorrentía la concentración de GLY y AMPA en agua. El nivel del río representa una medida indirecta de la dilución generada: a mayor nivel del río, mayor cantidad de agua, y por lo tanto mayor dilución del o de los contaminantes de interés. Las condiciones ambientales implicaron un máximo de precipitaciones de 41 mm en 24 horas, un mínimo de < 1 mm en 24 horas y un promedio de 1,6 mm en 24 horas. El nivel máximo del río en la PPAC fue de 5,48 m, con un mínimo de 2,65 m y un promedio de 3,09 m. La temperatura del AB tuvo un máximo de 26 °C, un mínimo de 10 °C y un promedio de 18 °C.

La Tabla 2 muestra un resumen de los resultados encontrados para GLY y AMPA en AB y AP tomados en la PPAC, mientras que la Tabla 3 resume los resultados de GLY y AMPA en los afluentes. Dado los LOQ de las metodologías empleadas, no fue posible evaluar la eventual remoción de GLY y AMPA en el proceso de potabilización.

TABLA 2. Resumen de resultados de muestras analizadas en la PPAC y agua superficial. Se emplea el valor guía nacional en agua natural de 65 µg/L (Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014) para AS y AB y el Valor Máximo Permitido (VMP) de 700 µg/L para GLY + AMPA en AP (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008).

Compuesto	Tipo de muestra	Cantidad de muestras analizadas	% Frecuencia de detección	Rango de valores (µg/L)	% Cumplimiento valor guía GESTA o VMP Norma UNIT 833:2008
GLY	Agua superficial (AS)	55	3,6	LOQ - 0,5	100
AMPA			3,6	LOQ - 0,7	NC
GLY	Agua bruta (AB)	33	0	< LOQ	100
AMPA			0	< LOQ	NC
GLY	Agua potable (AP)	33	0	< LOQ	100
AMPA			0	< LOQ	NC

En lo que refiere al monitoreo en afluentes de la cuenca del Río Santa Lucía, los resultados de GLY y AMPA para todos los puntos estuvieron por debajo del LOQ, a excepción de los puntos PE y PC. En estos casos, fue posible cuantificar GLY en PE en dos oportunidades consecutivas en concentraciones $< 1 \mu\text{g/L}$ (19/11/2020 y 26/11/2020). Por otro lado, se cuantificó AMPA una vez en PE (08/10/2020) y otra en PC (19/11/2020), también en concentraciones $< 1 \mu\text{g/L}$ (Tabla 2 y 3).

En base a lo anterior, todas las muestras analizadas de AB y AP cumplieron con los valores máximos de referencia nacionales propuestos como $65 \mu\text{g/L}$ GLY en aguas naturales (Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014) y $700 \mu\text{g/L}$ de la suma de GLY y AMPA en AP (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008) (Tabla 2).

Es destacable que estos resultados comparativos entre AB y AP de la PPAC en un periodo de tiempo acotado, con una alta frecuencia de muestreo, son los primeros realizados a nivel nacional y evidencian la necesidad de aumentar el monitoreo de estos compuestos en distintos escenarios ambientales y de forma sostenida en el tiempo.

Respecto a los afluentes de la cuenca del Río Santa Lucía, se concluye que en las muestras analizadas se cumple con los valores máximos propuestos en la reglamentación nacional (Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014).

Las concentraciones de GLY encontradas también se ubican por debajo de los valores de la guía para la protección de la vida acuática canadiense (Canadá. Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012) y la reglamentación brasilera (Brasil, 2005). Sin embargo, para reglamentaciones más estrictas como la normativa europea vigente (Unión Europea, 2020), se evidencia la necesidad de aplicar metodologías analíticas con menores LOQ. La aplicación de técnicas de preconcentración, como extracción en fase sólida (SPE) o liofilización, la cromatografía líquida asociada a detección MS/MS, y alternativas como ELISA mejoran los LOQ (Rodríguez et al., 2020, Brovini et al., 2021).

TABLA 3. Distribución de resultados de muestras de agua superficial en afluentes. Se emplea el valor guía nacional en agua natural de 65 µg/L (Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014) para AS.

Compuesto	Tipo de muestra	Cantidad de muestras analizadas	% Frecuencia de detección	Rango de valores (µg/L)	% Cumplimiento valor guía GESTA
GLY	Puente Belinzon (BCC)	8	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Arroyo Canelón Grande (MCC)	8	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Río Santa Lucía (SL)	8	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Embalse Paso Severino (EPS)	7	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Paso Pache (PP)	7	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Embalse Canelón Grande (ECG)	7	0	<LOQ	100
AMPA			0	<LOQ	NC
GLY	Paso Espinosa (PE)	7	28.6	LOQ - 0,5	100
AMPA			14.3	LOQ - 0,7	NC
GLY	Paso Calleros (PC)	5	0	<LOQ	100
AMPA			20.0	LOQ - 0,7	NC

Recientemente, Rodríguez-Bolaña et al. (2023) han cuantificado GLY en la cuenca de la Laguna del Cisne-Uruguay en el rango de 227,5 ng/L a 1045 ng/L y AMPA en el rango de 580 ng/L a 890 ng/L. Estos resultados son superiores a los reportados en este trabajo en la CRSL. Por lo anterior, es fundamental expandir el monitoreo de GLY y AMPA en aguas superficiales y evaluar los riesgos asociados a los organismos acuáticos.

En términos generales, los resultados obtenidos en AS son afines al programa de monitoreo de calidad de agua de la cuenca del Río Santa Lucía desarrollado entre los años 2015-2019 (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020), donde se registró el cumplimiento de los estándares de calidad en general de casi todas las subcuencas, a excepción del afluente del Arroyo Canelón Chico (donde se ubican los puntos PE y PC). En este afluente se evidencia comparativamente un mayor deterioro, producto de la fuerte presión urbana y agrícola de la zona. En este mencionado antecedente, se encontró para los arroyos Canelón Grande y Canelón Chico un 60 % de muestras cuantificables para el GLY (Rango

0.1-10 $\mu\text{g/L}$) y un 83 % de muestras cuantificables para AMPA (Rango 0.5-10 $\mu\text{g/L}$) (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020).

Algunos autores plantean que la cuenca de Canelón Grande registró el mayor aumento promedio del área terrestre cultivada y manejada en el periodo 2008-2011 (cultivos regados, de secano y frutales), con un 80 % de aumento en el cambio del uso del suelo y cursos de agua clasificados en estado eutrófico a hipereutrófico (Aubriot et al., 2017). Además, los afluentes Canelón Grande/Canelón Chico han sido los cursos de agua de la cuenca con las mayores concentraciones de nutrientes registradas desde 2005. Las concentraciones promedio de nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT) en el último periodo reportado, según el informe de evolución de la calidad de agua en la cuenca del Río Santa Lucía 2015-2019, fueron de NT: 2,3 mg/L y PT: 0,876 mg/L para el afluente Canelón Grande, y NT: 7,5 mg/L y PT: 1,292 mg/L para el afluente Canelón Chico (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020).

Ha sido señalado que los nutrientes, en particular el fósforo, podrían ser transportados a los cursos de agua en forma particulada como consecuencia de la erosión del suelo o en forma soluble por escorrentía superficial (Aubriot et al., 2017). Asimismo, estudios recientes muestran que la fracción disuelta de fósforo predomina sobre la fracción particulada (Goyenola et al., 2015, Goyenola et al., 2021). En analogía a los nutrientes, se sugiere el transporte de GLY hacia los cursos de agua asociado a fenómenos de erosión y/o de escorrentía de la zona. Se propone para próximos estudios correlacionar resultados de GLY y AMPA con resultados de nutrientes.

Por otra parte, en este trabajo no se obtuvieron resultados cuantificables en muestras del Embalse de Paso Severino y del Río Santa Lucía, lo que difiere del monitoreo de calidad de agua de la cuenca del Río Santa Lucía desarrollado entre los años 2015-2019 (Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020), donde se observa en muestras del Embalse de Paso Severino 39 % de datos cuantificables para GLY (Rango 0.1-10 $\mu\text{g/L}$) y 64 % para AMPA (Rango 0.5-10 $\mu\text{g/L}$) y en muestras del Río Santa Lucía 15 % de GLY (Rango 0.1-10 $\mu\text{g/L}$) y 51 % de AMPA (Rango 0.5-10 $\mu\text{g/L}$).

La presencia de GLY en agua depende de varios factores que podrían explicar las diferencias encontradas. Además del momento del muestreo, las condiciones del clima, la dosis aplicada, la frecuencia de aplicación y la formulación utilizada están directamente relacionadas con la persistencia del GLY en el suelo y por lo tanto su presencia en el agua (Maggi et al., 2020). La cantidad y frecuencia de lluvias, la ventana entre que se aplica y un evento de precipitación impactan en la escorrentía, en el lixiviado, y consecuentemente en la concentración en los cursos de agua (Maggi et al., 2020).

Los resultados del estudio realizado sobre los niveles de GLY y AMPA tampoco garantizan la inexistencia de riesgos al suministro de agua potable. Se recomienda realizar un monitoreo continuo y detallado de la cuenca durante un año completo que incluya puntos de muestreo adicionales. También se sugiere analizar la información recopilada en relación con el uso del suelo y los momentos en que se aplican los herbicidas, así como otros factores ambientales como las precipitaciones. De esta manera se podrá determinar si existe algún riesgo potencial para la salud pública y tomar medidas para mitigar cualquier impacto negativo.

Considerando que el GLY también se puede encontrar en otras matrices ambientales, por ejemplo, en suelos o sedimentos, se sugiere ampliar el monitoreo a estas matrices para una mayor comprensión del comportamiento de este plaguicida.

CONCLUSIONES

Los niveles de GLY y AMPA encontrados en las aguas naturales y potables cumplen con las normativas nacionales. Sin embargo, en la subcuenca del Arroyo Canelón Chico se han detectado valores de GLY y AMPA que incumplen con la normativa de calidad de aguas de la Unión Europea. Esta subcuenca ha sido identificada como la zona de mayor exportación de GLY y AMPA a nivel de la cuenca del Río Santa Lucía, significando un potencial riesgo para la protección de la calidad del agua potable en la Planta Potabilizadora de Aguas Corrientes. La remoción de GLY durante la potabilización no pudo ser determinada debido a que se obtuvieron resultados no cuantificables en el periodo de estudio para el agua potable. De todos modos, se sugiere desarrollar experimentos a escala laboratorio para evaluar la remoción de GLY y AMPA en tratamientos convencionales y no convencionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen el apoyo de PEDECIBA Química. A Obras Sanitarias del Estado (OSE) por facilitar el acceso a las muestras, el muestreo de cuencas analizadas en este estudio y los datos de precipitaciones, nivel del río y temperatura de muestreo. Se agradece a Luciana Griffero y a Beatriz Alonso por la colaboración brindada en las determinaciones de glifosato.

REFERENCIAS

- Aubriot, L.; Delbene, L.; Haakonsson, S.; Somma, A.; Hirsch, F. y Bonilla, S., 2017. Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: Influencia de la intensificación productiva y perspectivas. En: *INNOTECH*, 14, pp. 7-16. DOI: <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Alonso, B.; Griffero, L.; Bentos, H.; Pareja, L. y Pérez, P., 2022. Determination of glyphosate and AMPA in freshwater and soil from agroecosystems by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization and liquid chromatography-fluorescence detection and tandem mass spectrometry. En: *MethodsX*, 9, pp. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101730>
- Bo Liu, J.; Fa Li, Z.; Lu, L.; Yong Wang, Z. y Wang, L., 2022. Glyphosate damages blood-testis barrier via NOX1-triggered oxidative stress in rats: Long-term exposure as a potential risk for male reproductive health. En: *Environment International* (159), pp. 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107038>
- Bonanseal, R.; Filipi, I.; Wunderlin, D.; Marino, D. y Ame, M., 2017. The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment. En: *Toxics*, 6(1), pp. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>

- Brasil. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*. [En línea], 18 de marzo de 2005. [Consulta: 05 de diciembre de 2023].
Disponible en: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>
- Brovini, M.; Cardoso, S.; Quadra, G.; Vilas-Boas, J.; Paranaíba, J.; Pereira, R. y Fernandes, R., 2021. Glyphosate concentrations in global freshwaters: ¿are aquatic organisms at risk? En: *Environmental Science and Pollution Research*, (28), pp. 60635–60648.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8>.
- Canadá. Canadian Council of Ministers of the Environment, 2012. *Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Glyphosate* [En línea]. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment. [Consulta: 05 de diciembre de 2023].
Disponible en: <https://ccme.ca/en/res/glyphosate-en-canadian-water-quality-guidelines-for-the-protection-of-aquatic-life.pdf>
- Corrales Martín, N., 2018. *Efectos del glifosato en ecosistemas acuáticos: análisis experimental de las respuestas de la comunidad de diatomeas perifíticas (Laguna del Cisne, Canelones)*. Montevideo: UdelaR, Facultad de Ciencias. (Tesis de maestría).
- de Castilhos Ghisi, N; Zuanazzi, N; Fabrin, T y Olivera, E, 2020. Glyphosate and its toxicology: A scientometric review. En: *Science of the Total Environment*, (733), pp. 1-15.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139359>
- Gelós, M, 2020. *Modelación SWAT. Evaluación del destino ambiental de plaguicidas. Cuenca Piloto del Santa Lucía. Proyecto GCP/URU/031/GFF* [En línea]. Montevideo: MSP, MGAP, MA, FAO, Gef. [Consulta: 19 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/evaluacion-del-destino-ambiental-plaguicidas>
- Goyenola, G.; Meerhoff, M.; Teixeira-De Mello, F.; González-Bergonzoni, I.; Graeber, D.; Fosalba, C.; Vidal, N.; Mazzeo, N.; Ovesen, N. B.; Jeppesen, E. y Kronvang, B., 2015. Monitoring strategies of stream phosphorus undercontrasting climate-driven flow regimes. En: *Hydrology and Earth System Sciences*, 19, pp. 4099-4111.
DOI: <https://doi.org/10.5194/hess-19-4099-2015>
- Goyenola, G.; Kruk, C.; Mazzeo, N.; Nario, A.; Perdomo, C.; Piccini, C. y Meerhoff, M., 2021. Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay: armando el rompecabezas. En: *INNOTEC*, 22, pp. 1-33. DOI: <https://doi.org/10.26461/22.02>
- Guilherme, S.; Gaivao, I.; Santos, M. A. y Pacheco M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - a glyphosate-based herbicide. En: *Mutagenesis*, 25, pp. 523–530.
DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>
- González, E. y Fuentes, M., 2022. *Dinámica del glifosato en el suelo y sus efectos en la microbiota*. En: *Rev. Int. Contam. Ambie.*, (38), pp. 127-144.
DOI: <https://doi.org/10.20937/RICA.54197>
- Guijarro, K.; Aparicio, V.; de Geronimo, E.; Castellote, M.; Figuerola, E.; Costa, J. y Erijman, L., 2018. Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. En: *Science of the Total Environment*, (634), pp. 974–982.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.393>
- International Agency for Research on Cancer, 2015. *Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides* [En línea]. Lyon: IARC. [Consulta: 16 de abril de 2023].
Disponible en: <https://www.iarc.fr/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>

- Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008. UNIT-ISO 833: Agua potable Requisitos. Montevideo: UNIT.
- Ivantsova, E.; Wengrovitz, A.; Souders, C. y Martyniuk, C., 2022. Developmental and behavioral toxicity assessment of glyphosate and its main metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in zebrafish embryos/larvae. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 93, pp. 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103873>
- Maggi, F.; la Cecilia, D.; Tang, F. y McBratney, A., 2020. The global environmental Hazard of glyphosate use. En: *Sci Total Environ*, (717), pp. 1-12 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>
- Muskus, A. M.; Krauss, M.; Miltner, A.; Hamer, U. y Nowak K. M., 2020. Degradation of glyphosate in a Colombian soil is influenced by temperature, total organic carbon content and pH. En: *Environ. Pollut.*, 259, 113767. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113767>
- Roberts, T.; Hutson, D.; Lee, P.; Nicholls, P. y Plimmer, J., 1998. *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN: 978-0-85404-494-8.
- Rodríguez, C.; Boroskib, M.; Aparecido, G. y Theodoro, A., 2020. Glyphosate and AMPA occurrence in agricultural watershed: the case of Parana Basin 3, Brazil. En: *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(10), pp. 909–920. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1794703>
- Rodríguez-Bolaña, C.; Pérez-Parada, A.; Tesitore, G.; Goyenola, G.; Kröger, A.; Pacheco, M.; Gérez, N.; Berton, A.; Zinola, G.; Gil, G.; Mangarelli, A.; Pequeño, F.; Besil, N.; Niell, S.; Heinzen, H. y Teixeira de Mello, F., 2023. Multicompartmental monitoring of legacy and currently used pesticides in a subtropical lake used as a drinkingwater source (Laguna del Cisne, Uruguay). En: *Science of the Total Environment*, 874, 162310. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162310>
- Sun, M.; Li, H. y Jaisi, D., 2019. Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system. En: *Water Research*, (163), pp. 1-10, 114840. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.007>
- United States Environmental Protection Agency, 2016. *Glyphosate issue paper: evaluation of carcinogenic potential* [En línea]. Washington: USEPA. [Consulta: 16 de abril de 2023]. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100ZNU6.PDF?Dockey=P100ZNU6.PDF>
- Unión Europea. Directiva (UE) 2020/2184, de 16 de diciembre de 2020. *Diario Oficial de la Unión Europea* [En línea], 23 de diciembre de 2020. [Consulta: 05 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32020L2184>
- Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023a. *Cuenca Santa Lucía (2019) clasificación de usos/ coberturas del suelo* [En línea]. Montevideo: Ministerio de Ambiente. [Consulta: 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.ambiente.gub.uy/geoservicios/>
- Uruguay. Ministerio de Ambiente, 2023b. *Plan de cuenca del río Santa Lucía* [En línea]. Montevideo: Ministerio de Ambiente. [Consulta: 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/plan-cuenca-del-rio-santa-lucia#:~:text=Se%20trata%20de%20un%20documento,la%20gesti%C3%B3n%20integrada%20del%20agua.>

- Uruguay. Ministerio de Ambiente. GESTA. Grupo de Estándares Ambientales - Agua, 2014. *Propuesta de modificación del Decreto 253/79. Normas reglamentarias para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas*. Montevideo: Ministerio de Ambiente.
- Uruguay. Ministerio de Ambiente. Observatorio Ambiental Nacional, 2021. *Plaguicidas prioritarios para la gestión ambiental* [En línea]. Montevideo: Ministerio de Ambiente. [Consulta: 16 de abril de 2023]. Disponible en: [https:// ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/](https://ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/)
- Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2020. *Importaciones de fitosanitarios* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 25 de noviembre de 2022] Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/importaciones-productos-fitosanitarios>
- Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2015. *Atlas de la cuenca del río Santa Lucía* [En línea]. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 19 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-vivienda-ordenamiento-territorial/comunicacion/publicaciones/atlas-cuenca-del-rio-santa-lucia>
- Uruguay. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2020. *Informe evolución de la calidad de agua en la cuenca del río Santa Lucía 2015-2019* [En línea]. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 01 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/Informe-Santa-Lucia-2015-2019.pdf>
- Uruguay. Obras Sanitarias del Estado, 2021. *Agua potable* [En línea]. Montevideo: OSE. [Consulta: 16 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.ose.com.uy/agua/agua-potable>
- Uruguay. Obras Sanitarias del Estado, 2023. *Datos de precipitación, temperatura y nivel del río suministrados por OSE de informes del Laboratorio de la Unidad Usinas de Montevideo*. Montevideo: OSE.
- World Health Organization, 2017. *Guidelines for drinking-water quality* [En línea]. Fourth edition incorporating the first Addendum. Ginebra: WHO. [Consulta: 16-de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
- Zhang, Q.; Liub, .X; Gao, M.; Li, X.; Wang, Y.; Chang, Y.; Zhang, X.; Huo, Z.; Zhang, L.; Shan, J.; Zhang, F.; Zhu, B. y Yao, W., 2022. The study of human serum metabolome on the health effects of glyphosate and early warning of potential damage. En: *Chemosphere*, (298), pp. 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134308>

Efecto de la bajante extrema 2020-2023 sobre la reproducción de peces migradores en el río Uruguay

Effect of extreme low water levels 2020-2023 on the reproduction of migratory fish in the Uruguay River

Efeito dos níveis extremos de água 2020-2023 na reprodução de peixes migratórios no rio Uruguay

 **DANIEL CATALDO** (1)(2)

 **FACUNDO BORDET** (3)

 **LAUTARO BRUNO** (1)

- (1) Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- (2) Instituto de Ecología Genética y Evolución (IEGBA-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- (3) Área de Gestión Ambiental, Comisión Técnica Mixta de Salto Grande, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

RECIBIDO: 9/3/2024 → APROBADO: 24/5/2024  daniel@ege.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la bajante extrema del agua sobre la reproducción de peces migradores del río Uruguay. Las bajantes extremas del agua producen un efecto negativo en el ictioplancton, y proporcionan nuevos conocimientos sobre la intensidad de este efecto durante periodos consecutivos de sequías. El estudio compara la abundancia y composición del ictioplancton de tres periodos reproductivos consecutivos (octubre-marzo), durante las bajantes extremas del río durante 2020-2023, respecto a información de los 10 años previos (2010-2020) mediante muestreos semanales en cuatro sitios dentro del embalse de Salto Grande. En relación con la década anterior, se observaron disminuciones en las abundancias de *P. lineatus* (60-85 %), *Pseudoplatystoma spp.* (52-79 %), *L. patí* (39-82 %), *Pimelodus spp.* (24-61 %) y *Anostomidae* (26-56 %), así como también cambios temporales en la densidad del ictioplancton. A diferencia del periodo previo (2010-2020), cuando se desarrollaban *blooms* de cianobacterias perjudiciales para los peces durante las sequías estivales, en 2020-2023 no se registraron eventos de floraciones de cianobacterias debido a un fenómeno hidrológico. La ausencia de este efecto perjudicial, sumado a la capacidad de resiliencia de los peces observada durante el

periodo previo, genera expectativas razonables para considerar que al finalizar el periodo extremo los peces lentamente recuperan la actividad reproductiva anterior.

Palabras clave: efecto climático, peces potamodromos, ictioplancton.

ABSTRACT

The effect of extreme water level decreases on the reproduction of migratory fish in the Uruguay River was evaluated. Extreme water decreases have a negative effect on ichthyoplankton and provide new insights into the intensity of this effect during consecutive drought periods. The study compares the abundance and composition of ichthyoplankton during three consecutive reproductive periods (October-March) during extreme water level decreases in the river from 2020-2023, with data from the previous 10 years (2010-2020) through weekly samplings at four sites within the Salto Grande reservoir. Compared to the previous decade, decreases in the abundances of *P. lineatus* (60-85 %), *Pseudoplatystoma spp.* (52-79 %), *L. patí* (39-82 %), *Pimelodus spp.* (24-61 %), and *Anostomidae* (26-56 %) were observed, as well as temporal changes in ichthyoplankton density. Unlike the previous period (2010-2020), where harmful cyanobacteria blooms developed during summer droughts, during the extraordinary period caused by a hydrological phenomenon, no cyanobacteria bloom events were recorded. The absence of this harmful effect, combined with the resilience of fish observed during the previous period, generates reasonable expectations that at the end of the extraordinary period, fish will slowly recover their previous reproductive activity.

Keywords: climatic effect, potamodromos fish, ichthyoplankton.

RESUMO

Avaliou-se o efeito da queda extrema do nível da água sobre a reprodução de peixes migratórios do rio Uruguai. As quedas extremas do nível da água produzem um efeito negativo no ictioplâncton e fornecem novos conhecimentos sobre a intensidade desse efeito durante periodos consecutivos de secas. O estudo compara a abundância e composição do ictioplâncton de três periodos reprodutivos consecutivos (outubro-março), durante as quedas extremas do rio entre 2020-2023, em relação a informações dos 10 anos anteriores (2010-2020) por meio de amostragens semanais em quatro locais dentro do reservatório de Salto Grande. Em comparação com a década anterior, foram observadas diminuições nas abundâncias de *P. lineatus* (60-85 %), *Pseudoplatystoma spp.* (52-79 %), *L. patí* (39-82 %), *Pimelodus spp.* (24-61 %) e *Anostomidae* (26-56 %), bem como mudanças temporais na densidade do ictioplâncton. Diferente do periodo anterior (2010-2020), em que durante as secas de verão ocorriam florações de cianobactérias prejudiciais aos peixes, durante o periodo extraordinário devido a um fenômeno hidrológico, não foram registrados eventos de florações de cianobactérias. A ausência desse efeito prejudicial, somada à capacidade de resiliência dos peixes observada durante o periodo anterior, gera expectativas razoáveis de que, ao final do periodo extraordinário, os peixes lentamente recuperam sua atividade reprodutiva anterior.

Palavras-chave: eventos climáticos, peixes migratórios, ictioplâncton.

INTRODUCCIÓN

La Cuenca del Plata (CP) es la quinta cuenca más importante del mundo y la segunda más grande de Sudamérica, detrás de la del Amazonas. Abarca un área de más de 3 millones de kilómetros cuadrados y está integrada por los ríos Paraná, Uruguay y Paraguay. Los caudales de los ríos de la CP son de origen pluvial, donde los mayores aportes provienen de los tramos superiores de la cuenca, con precipitaciones asociadas a los vientos húmedos del Océano Atlántico que pueden alcanzar los 2.500 mm anuales (Comisión Argentina-Paraguaya del río Paraná, 1994; Carolsfeld et al., 2004). El régimen hidrológico de estos ríos alterna periodos de crecidas que desencadenan inundaciones con periodos de estiaje debido a precipitaciones deficitarias que dan lugar a sequías (Camilloni y Barros, 2000; Zaniboni y Schulz, 2004; Penalba y Vargas, 2008). Las variaciones de la altura del agua en los ríos de la CP ejercen un fuerte efecto sobre las características físicas y químicas del agua, tales como la concentración de nutrientes, la transparencia del agua, el pH, el oxígeno disuelto y el carbono orgánico particulado (Villa y Bonetto, 2000). También influyen sobre las comunidades biológicas como, por ejemplo, la abundancia y composición del fitoplancton (O'Farrell et al., 2012), el zooplancton (Boltovskoy et al., 2021) y la ictofauna (Cataldo et al., 2020); o sobre la ocurrencia de floraciones de cianobacterias (O'Farrell et al., 2012; Kruk et al., 2023; Ferrari, 2020). Durante épocas de sequía han sido reportados efectos negativos en la reproducción de peces en general y migradores en particular en los ríos Pilcomayo (Smolders et al., 2000), Paraná superior (Alves et al., 2021), Amazonas (Camacho Guerreiro et al., 2021; Fabré et al., 2017) y Uruguay (Cataldo et al., 2020). Las características de la CP también son afectadas por otros factores no atmosféricos, como el uso del suelo (Saurral et al., 2008) y aportes de residuos domiciliarios de las poblaciones humanas localizadas en sus márgenes sin un adecuado tratamiento.

El río Uruguay alberga más de 150 especies de peces (Menni, 2004; Sverlij et al., 1993), entre las que se encuentran muchas migratorias (potamodromas) de gran importancia ecológica, comercial, pesquera y deportiva. Las especies potamodromas son migradoras obligadas que deben recorrer grandes distancias para reproducirse y así completar su ciclo de vida (de Resende, 2004; Cataldo et al., 2020). Entre las especies de mayor porte se destacan el dorado *Salminus brasiliensis*, la boga *Megaleporinus obtusidens*, el sábalo *Prochilodus lineatus*, el patí *Luciopimelodus pati*, y los surubíes *Pseudoplatystoma corruscans* y *P. reticulatum* (Menni, 2004; Carolsfeld et al., 2004). Con el comienzo de las crecientes anuales de los ríos, los peces migradores forman cardúmenes y se desplazan masivamente en contra de la corriente (migración reproductiva) hasta alcanzar lugares favorables para el desove aguas arriba, considerados áreas reproductivas (Bonetto et al., 1981; de Resende, 2004). En estas áreas los reproductores liberan una gran cantidad de huevos que derivan, con la corriente río abajo, hacia las áreas de cría donde se alimentan y crecen durante uno o dos años (Zaniboni y Schulz, 2004). En este sentido, la altura de los ríos asociados con el caudal del agua es un factor clave en la reproducción de peces migradores.

Los efectos de los cambios del nivel del río sobre las poblaciones de peces migratorios se han evaluado utilizando diferentes aproximaciones. Entre ellas se destacan el estudio de la dinámica poblacional, con marcado y recaptura (Delfino y Baigún, 1985), el análisis

del desarrollo gonadal, y el estudio de la abundancia y composición del ictioplancton. Este último es uno de los más recomendados debido a que permite una determinación más precisa de las áreas de reproducción y de cría (Cataldo et al., 2020; Humphries y Lake, 2000; Fuentes y Espinach Ros, 1998; Fuentes et al., 2003). Si bien las especies migratorias están adaptadas a las fluctuaciones del ciclo hidrológico y sincronizan sus migraciones y desoves con los pulsos de inundación (Welcomme, 1985), los periodos de sequías prolongados disminuyen la intensidad y duración de estos pulsos, y afectan negativamente la reproducción de peces y consecuentemente la productividad de las pesquerías (Sverlij et al., 1993; Reynalte-Tataje et al., 2012; Cataldo et al., 2022; Fuentes et al., 2016). De acuerdo con los datos suministrados por el Instituto Nacional del Agua (INA-Argentina), desde comienzos del año 2020 se viene desarrollando una bajante prolongada y extrema en la CP que podría superar la marca histórica de 1.39 m por debajo de cero registrada en 1944 (Borús, 2021). En este sentido, resulta de suma importancia la evaluación de esta tendencia sobre la calidad del agua y las comunidades biológicas afectadas, con énfasis en los peces.

El embalse de Salto Grande es un cuerpo de agua eutrófico que presenta eventos de floraciones de cianobacterias estivales recurrentes (Beron, 1990; Quirós y Luchini, 1983; De León y Chalar, 2003; Chalar, 2006). Los veranos secos están asociados a mayores tiempos de retención del agua que, combinados con el aporte de nutrientes provenientes del río Uruguay y las altas temperaturas que conducen al desarrollo de fuertes estratificaciones verticales del agua, favorecen el desarrollo de *blooms* de cianobacterias de complejo *Microcystis spp.* (O'Farrell et al., 2012; Rangel et al., 2012). Estudios del ictioplancton del río Uruguay señalan que la instalación de la represa de Salto Grande, al impedir los desplazamientos de los peces potamodromos, provocó la fragmentación de sus poblaciones a ambos lados de la presa. Y estableció dos áreas reproductivas diferentes e independientes entre sí, ubicadas en la cabecera del embalse y aguas abajo de la presa (Cataldo et al., 2020). Durante los veranos secos, entre los años 2010-2020, las menores densidades de huevos y larvas de peces en la cabecera del embalse de Salto Grande fueron asociadas a los eventos de floraciones de cianobacterias estivales (Paolucci et al., 2017; Cataldo et al., 2020). Las anomalías climáticas asociadas con El Niño-Oscilación del Sur (ENOS) impactan en varios aspectos poblacionales de los peces (Smolders et al., 2000; Alves et al., 2021). En el embalse de Salto Grande, la fase La Niña del fenómeno ENOS fue asociada con las reducciones del caudal de agua y la densidad del ictioplancton, concomitantemente con el desarrollo de *blooms* de cianobacterias; mientras que la fase húmeda del ENOS (El Niño) promovió el efecto inverso sobre estas variables (Cataldo et al., 2022).

El objetivo general del trabajo fue analizar el efecto de la bajante extrema del agua del río Uruguay durante el periodo 2020-2023 sobre la actividad reproductiva de las especies de peces migradores mediante el análisis espacio temporal del ictioplancton, e identificar posibles zonas de reproducción y cría de estas especies durante el periodo reproductivo en el embalse de Salto Grande. Por último, con el propósito de analizar la magnitud del efecto de la bajante sobre la reproducción de peces durante este periodo extremo, se comparó dicho análisis con una base de datos existente para la misma región (Cataldo et al., 2022). Complementariamente, se exploró el efecto del fenómeno climático El Niño-Oscilación del Sur (ENOS) sobre la abundancia y composición del ictioplancton.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El río Uruguay (31,2 S, 57,9 W) es el segundo afluente más importante de la cuenca del Río de la Plata, después del río Paraná. La cuenca del río Uruguay incluye sectores de Brasil, Uruguay y Argentina, cubre un área de 297.199 km² y recibe precipitaciones anuales que oscilan entre 1.000 y 2.000 mm (Chalar et al., 2002). Salto Grande es un gran embalse subtropical ubicado en el curso medio del río Uruguay, cogestionado por Uruguay (URU) y Argentina (ARG), construido en 1979 (superficie: 750 km², longitud media: 120 km, profundidad máxima: 35 m, profundidad media: 6,4 m). Se utiliza principalmente para la generación de energía (capacidad total de 1.890 MW), para el suministro de agua y para actividades recreativas, incluidos los deportes acuáticos y la pesca. Es un cuerpo de agua eutrófico (fósforo total medio: 40 µg l⁻¹, clorofila *a*: 14,8 µg l⁻¹) y polimíctico, con breves periodos de estratificación durante el verano (O'Farrell et al., 2012). La temperatura del agua superficial oscila estacionalmente entre unos 12 y 30 °C.

El caudal medio anual de entrada de agua es de unos 5.000 m³ s⁻¹, con registros mínimos y máximos de 434 y 29730 m³ s⁻¹, respectivamente (O'Farrell et al., 2012). La estación del año con menor caudal es la estival, entre enero y marzo (3186 m³ s⁻¹), mientras que los periodos de mayores descargas de agua ocurren entre junio y noviembre (6176 m³ s⁻¹). El tiempo promedio de retención de agua dentro del embalse es de alrededor de 2 semanas (Chalar, 2006), pero durante periodos secos puede aumentar a 9 semanas o más (O'Farrell et al., 2012). En los periodos secos son recurrentes las floraciones estivales de cianobacterias (Chalar et al., 2002). Las cianobacterias de complejo *Microcystis* son potenciales productoras de cianotoxinas, cuya presencia en el agua es perjudicial para las comunidades acuáticas (Benayache et al., 2019; Osswald et al., 2007). Las concentraciones de microcistinas en el embalse, durante las floraciones de cianobacterias, se han evaluado aunque de forma irregular desde 1999, con concentraciones puntuales durante los periodos estivales de sequías extremas de 200 µg l⁻¹ (Chalar et al., 2002; Bordet et al., 2017).

Muestreos

Los muestreos abarcan tres periodos consecutivos de bajantes extremas durante los años 2020, 2021 y 2023. Los datos de descarga de agua (m³ s⁻¹) para el embalse de Salto Grande fueron proporcionados por el Área de Gestión Ambiental de la Comisión Técnica Mixta de Salto Grande (CTMSG). Las muestras de ictioplancton se recolectaron semanalmente durante el periodo reproductivo de los peces (octubre-marzo) (Cataldo et al., 2020). Se utilizó una red de plancton de malla de 300 µm de poro (apertura de la boca: 50 cm, longitud: 100 cm) equipada con un flujómetro (volumen medio filtrado: 21,2 ± 2,5 m³). Los muestreos se realizaron arrastrando la red contra corriente desde una embarcación en el centro del cauce, durante 10 minutos, a una profundidad de entre 0,5-1,5 m durante el día (entre las 8-12 AM). Las muestras de ictioplancton se preservaron en formaldehído al 5 % inmediatamente después de la recolección y se transportaron al laboratorio para posterior análisis en el microscopio estereoscópico (x12).

Se recolectó un total de 260 muestras de ictioplancton en cuatro sitios de muestreo. El primer punto de muestreo, Bella Unión (BU), se encuentra ubicado en la cabecera del embalse de Salto Grande (a 120 km de la presa), próximo a la ciudad de Bella Unión (URU). Su localización es estratégica ya que el material biológico colectado en este punto proporciona información sobre la actividad reproductiva de los peces aguas arriba del embalse. El segundo sitio, Constitución (CONS), se encuentra localizado a unos 109 km aguas abajo de BU, próximo a la ciudad homónima (URU). Esta estación permite recabar información en un punto relativamente intermedio entre la cabecera del embalse y los sitios más próximos a la presa. El tercer sitio, Itapebí (ITA), se ubica en un brazo del embalse (a 13 km de la presa); y el cuarto sitio se sitúa en el centro del embalse (E1), a 1000 m de la presa (Figura 1).

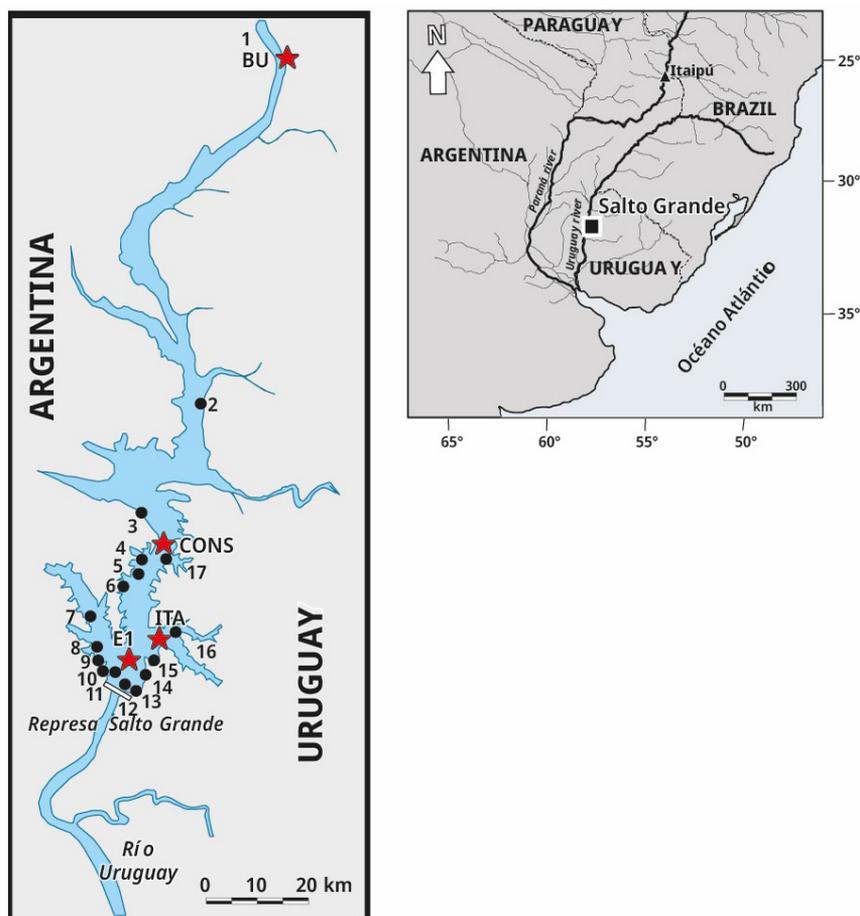


FIGURA 1. Mapa del embalse Salto Grande y ubicación de los sitios de muestreo del ictioplancton (estrellas rojas) y de cianobacterias (círculos negros).

El estudio analizó la composición de huevos y larvas de peces. Las larvas de peces se identificaron al nivel taxonómico, lo más detalladamente posible (Sverlij et al., 1993; Muñiz Saavedra y Piacentino, 1991; Nakatani et al., 2001). Los estadios larvales de los peces fueron clasificados en dos categorías sobre la base de la presencia o ausencia de vitelo, como larvas viteladas y no viteladas.

Las especies de peces de agua dulce se clasificaron como migratorias o no migratorias, de acuerdo con Carolsfeld et al. (2004) y Menni (2004). Los ejemplares en etapas muy tempranas de desarrollo (como larvas recién eclosionadas) con los caracteres sistemáticos indistinguibles para su identificación se denominaron larvas no identificadas (NI) (Tabla 1), y no se clasificaron como migratorias o no migratorias. Además, dada la falta de caracteres taxonómicos confiables observados en los huevos de peces, las identificaciones de estos fueron muy limitadas. Estudios de ADN en base al ictioplancton colectado de los mismos sitios de muestreo indicaron que la mayoría de los huevos de peces pertenecen a especies de peces migratorias como *P. lineatus* y *S. brasiliensis* y especies de la familia *Anostomidae* (Cataldo y Paolucci, 2022; y datos inéditos de los autores de este estudio). Las densidades de huevos y larvas de peces se expresan en individuos por metro cúbico de agua (ind. m⁻³).

TABLA 1. Porcentajes de los grupos taxonómicos encontrados en cada estación de muestreo. PM: peces migratorios (peces potamodromos); N-PM: especie no migratoria y NI: larvas no identificadas (debido a su etapa muy temprana de desarrollo no se distinguen las características sistemáticas). Aclaración: los porcentajes de *S. Lima* (*) en todos los sitios de muestreo fueron inferiores al 0.02 %.

Taxones de ictioplancton		Sitios de muestreo			
		BU	CONS	ITA	E1
<i>Prochilodus lineatus</i>	PM	25.5	11.3	0.0	0.0
<i>Anostomidae</i>	PM	9.9	25.0	0.0	0.0
<i>Pseudoplatystoma spp.</i>	PM	20.1	3.6	0.0	0.0
<i>Doradidae</i>	PM	5.6	0.6	0.0	0.0
<i>Luciopimelodus pati</i>	PM	5.3	5.4	0.0	0.0
<i>Pimelodus spp.</i>	PM	12.3	3.6	1.3	4.7
<i>Raphiodon vulpinus</i>	PM	0.1	0.0	0.0	0.0
<i>Sorubim lima</i> (*)	N-PM	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Iheringichthys labrosus</i>	N-PM	3.3	0.0	0.0	0.0
<i>Lycengraulis grossidens</i>	N-PM	0.0	11.3	89.6	76.7
<i>Pachyrurus bonariensis</i>	N-PM	0.0	3.0	6.5	8.1
<i>Catathyridium jenisii</i>	N-PM	0.3	6.5	1.3	1.2
<i>Apareiodon affinis</i>	N-PM	3.9	29.7	1.3	9.3
<i>Characiformes</i>	NI	13.4	0.0	0.0	0.0
<i>Siluriformes</i>	NI	0.3	0.0	0.0	0.0

Las densidades del complejo de cianobacterias dominante (*Microcystis spp.* y *Dolichospermum spp.*) se determinaron a partir de muestras colectadas semanalmente, a 20 cm de profundidad, en 17 sitios durante el mismo periodo de muestreo que el ictioplancton (Figura 1). Las muestras se conservaron en frascos de PVC con solución de lugol-yodo al 1 % (O'Farrell et al., 2012; Bordet et al., 2017). Los conteos se realizaron en cámaras según Utermöhl (1958) luego de sedimentar al menos 24 h. Los errores de conteo se estimaron según Venrick (1978), aceptando un máximo de 20 %. Cuando se presentaron espumas densas de fitoplancton los conteos se realizaron con un hemocitómetro Neubauer (0,1 mm de profundidad) bajo microscopio óptico, previa digestión en caliente con hidróxido de sodio para desintegrar las colonias unidas al mucílago (Reynolds y Jaworski, 1978).

Para evaluar la magnitud del efecto de la bajante extrema del agua durante el periodo 2020-2023 sobre el ictioplancton, la densidad y composición de huevos y larvas de peces reportados en este estudio fueron comparadas con la serie de datos previos de ictioplancton provenientes de muestreos multianuales de alta frecuencia colectados del 2010 al 2020, empleando la misma metodología descrita anteriormente (Cataldo et al., 2022).

Los datos mensuales de ENOS, representados por el Índice Oceánico El Niño (ION), se obtuvieron de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, 2021). El ION es calculado como la media móvil de 3 meses de anomalías de SST (temperatura de la superficie del mar reconstruida extendida) en la región de El Niño 3.4, es decir, 5°N–5°S, 120°–170°W (Huang et al., 2017). Valores iguales o superiores a 0,5 °C indican eventos de El Niño; valores iguales o inferiores a -0,5 °C representan eventos de La Niña, mientras que valores que oscilan entre -0,5 y 0,5 °C indican periodos neutrales.

Análisis estadísticos

Las diferencias en las abundancias de ictioplancton (huevos y larvas) y cianobacterias fueron evaluadas utilizando modelos lineales generalizados (GLM), modelando la matriz de covarianza y la heterocedasticidad (Di Rienzo et al., 2020). Se utilizó el análisis residual para probar la normalidad y la homocedasticidad. El criterio de Akaike se empleó como indicador de los modelos más parsimoniosos. Para comparar estas variables entre los sitios de muestreo y los periodos de tiempo se aplicó la prueba de comparación múltiple de LSD de Fisher (Di Rienzo et al., 2020). Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) para ordenar los sitios de muestreo según la abundancia estandarizada de especies y grupos taxonómicos de larvas a fin de evitar resultados sesgados. Con el propósito de caracterizar la composición de grupos taxonómicos de cada sitio de muestreo, en este análisis se excluyeron los individuos cuyos caracteres sistemáticos eran indistinguibles para su identificación debido a sus etapas muy tempranas de desarrollo larvario (ver NI, en Tabla 1).

Este análisis descriptivo caracterizó los sitios de muestreo por diferencias en la abundancia y composición de larvas de especies migratorias y no migratorias. En tanto, el nivel de significancia de los agrupamientos de peces se analizó mediante la prueba de perfil de similitud de SIMPROF. Las relaciones del ION y la abundancia de cianobacterias con las densidades de ictioplancton, huevos y larvas de peces fueron calculadas mediante el análisis de correlaciones de Pearson o Spearman (dependiendo de la normalidad

de alguna de las variables). Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete InfoStat® (Di Rienzo et al., 2020) y el paquete estadístico "r" (R4.2.1).

RESULTADOS

Caudal de agua aportado al embalse

La media general del caudal de agua aportado al embalse durante los últimos tres periodos reproductivos consecutivos de los peces entre los años 2020-2023 ($\bar{X} \pm DS$; 2020-2021: $2021 \pm 1283 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; 2021-2022: $1906 \pm 1519 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; y 2022-2023: $1893 \pm 1578 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) fue la más baja registrada desde el año 2010. Los valores obtenidos representan una disminución del 64.8 %, 66.8 %, y 67 % respectivamente comparados con el caudal medio entre 2010 y 2020 ($5734 \pm 2561 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) (Figura 2A). La variación mensual de los caudales de agua aportados al embalse señala que, a excepción de los meses de febrero (2021), octubre (2021 y 2022) y marzo (2021), los caudales aportados fueron inferiores al promedio mensual registrado durante los diez años previos (2010-2020) (Figura 2B-C).

Ictioplancton

Se recolectó un total de 4679 huevos y larvas de peces (huevos 24.2 %, $n = 1134$; larvas 75.8 %, $n = 3545$). La captura fue mayor durante 2020-2021 (huevos $n = 610$; larvas $n = 1484$) que durante el periodo reproductivo posterior 2021-2022 (huevos $n = 175$; larvas $n = 1162$) y 2022-2023 (huevos $n = 347$; larvas = 899). Sin embargo, en todos los periodos (2020-2021, 2021-2022, y 2022-2023) las mayores frecuencias de ocurrencia fueron registradas en la estación BU (94.4 %, 92.4 %, y 91.8 % respectivamente), mientras que los demás sitios presentaron los siguientes porcentajes: CONS: 3.2 %, 3.5 %, y 3.8 %; ITA: 1.3 %, 1.5 %, y 1.6 %; y E1: 1.1 %, 2.6 %, y 2.8 % respectivamente.

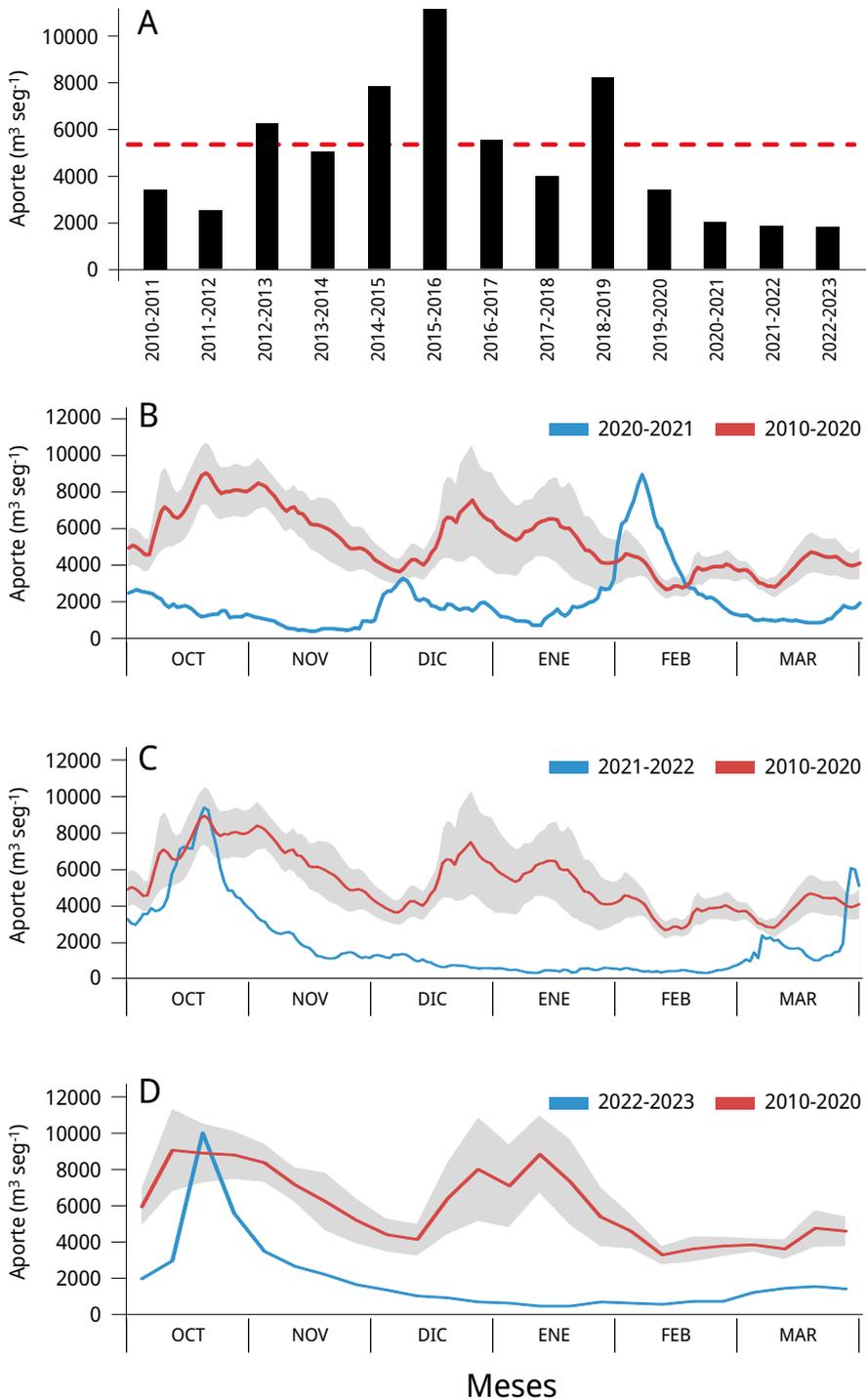


FIGURA 2. Caudal del río Uruguay en la zona del embalse de Salto Grande (m^3s^{-1}). A: medias anuales entre los años 2010 y 2023 (periodo octubre -marzo), la línea punteada roja corresponde a la media anual total desde 2010. Medias mensuales entre, B: 2020-2021, C: 2021-2022 y D: 2022-2023 (línea azul). Las líneas rojas corresponden a las medias mensuales entre 2010-2020 y en gris al desvío estándar de los datos (gráficos B, C y D).

La densidad media anual del ictioplancton difirió significativamente entre periodos reproductivos y sitios de muestreo, siendo más alta en el periodo reproductivo 2020-2021 (4.48 ind. m⁻³) que en los periodos posteriores 2021-2022 (3.23 ind. m⁻³) y 2022-2023 (2.73 ind. m⁻³) (GLM, $p < 0,05$). En tanto, en cada uno de los periodos reproductivos la densidad media anual del ictioplancton más alta se registró en la estación BU (GLM, $p < 0,01$; 2020-2021: 4.24 ind. m⁻³; 2021-2022: 3.07 ind. m⁻³; y 2022-2023: 2.57 ind. m⁻³). A su vez, estos valores fueron superiores a los del resto de los sitios de muestreo (CONS: 0.15 ind. m⁻³; 0.1 ind. m⁻³, y 0.1 ind. m⁻³; ITA: 0.05 ind. m⁻³, 0.04 ind. m⁻³, y 0.04 ind. m⁻³; E1: 0.03 ind. m⁻³, 0.02 ind. m⁻³, y 0.02 ind. m⁻³ respectivamente) (LSD de Fisher $p < 0,05$) (Figura 3).

En todos los periodos reproductivos la densidad de huevos en BU fue significativamente mayor que en el resto de los sitios de muestreo (GLM $p < 0,001$, pruebas LSD de Fisher; $p < 0,05$). La densidad media de huevos en BU fue de 1.31 huevos m⁻³ en 2020-2021, 0.43 huevos m⁻³ en 2021-2022 y 0.78 huevos m⁻³ en 2022-2023. De manera semejante a lo señalado anteriormente, la abundancia de larvas viteladas (LV) y no viteladas (LNV) en BU fue significativamente mayor (LSD de Fisher; $p < 0,05$) (2020-2021: LV 1.38 ind. m⁻³, LNV 1.56 ind. m⁻³; 2021-2022: LV 1.72 ind. m⁻³, LNV 0.92 ind. m⁻³ y 2022-2023: LV 0.99 ind. m⁻³, LNV 0.80 ind. m⁻³) que en el resto de los sitios de muestreo. Entre estos últimos tres sitios solo se colectaron LV en CONS (densidades menores a 0.005 ind. m⁻³), mientras que las densidades de LNV variaron entre 0.02 y 0.14 ind. m⁻³ en los tres periodos de muestreo.

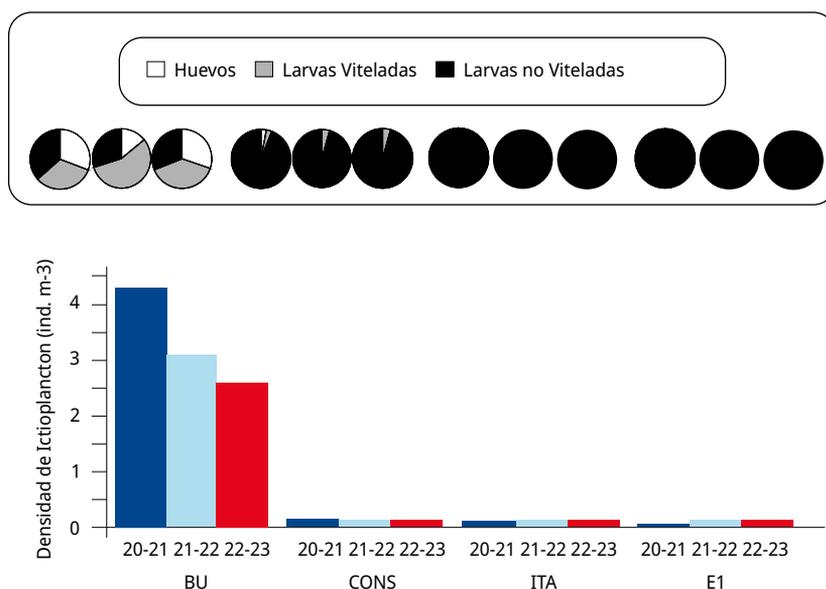
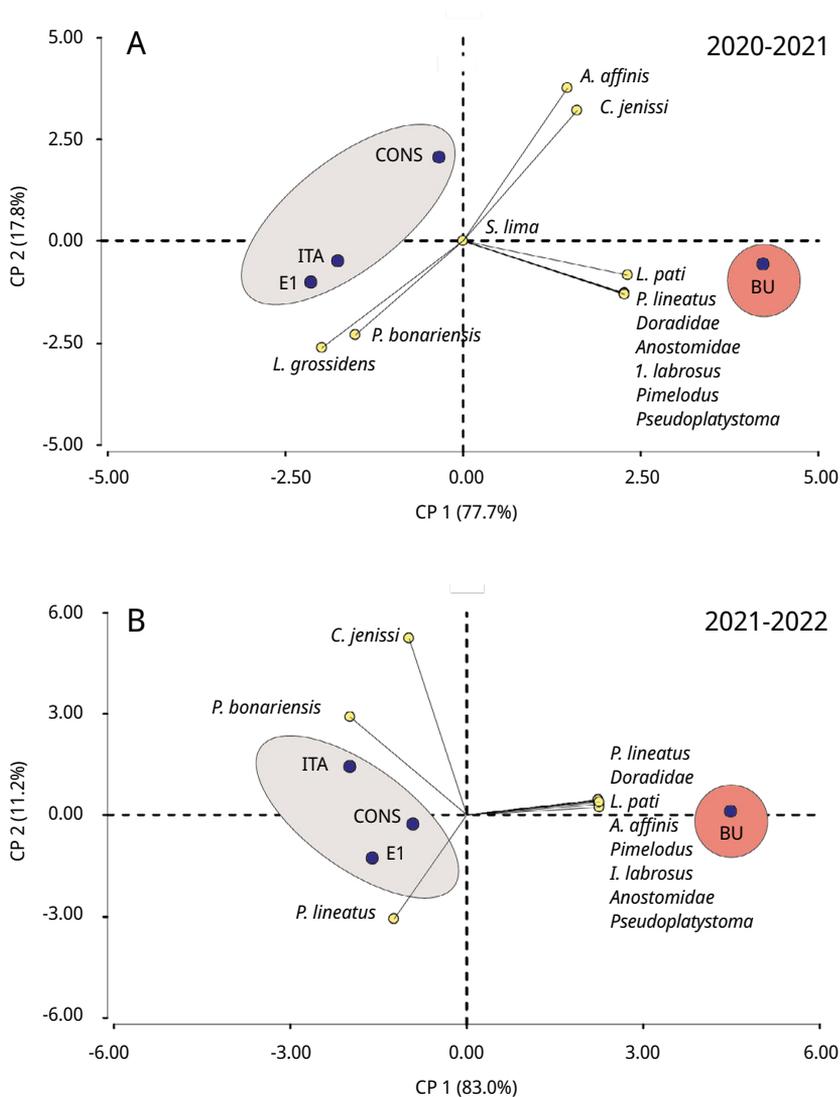


FIGURA 3. Densidad media del ictioplancton en los sitios de muestreo BU, CONS, ITA y E1, entre octubre y marzo de 2020-2021 (en azul), 2021-2022 (en celeste) y 2022-2023 (en rojo). Los gráficos circulares en la parte superior indican la proporción en porcentaje de huevos de peces (blancos), larvas con saco vitelino (gris) y larvas sin saco vitelino (negras) para cada sitio y año de muestreo.

La composición taxonómica del ictioplancton mostró diferencias significativas durante los tres periodos reproductivos consecutivos entre la estación ubicada en la cabecera del

embalse (BU) y los restantes sitios (Test de Simprof $P < 0.05$). El análisis de ordenamiento de componentes principales indicó que las especies migratorias predominaron en BU, entre las que se destacaron principalmente *P. lineatus*, *Anostomidae*, *Pseudoplatystoma spp.*, *L. pati*, *Pimelodus spp.*, y *Doradidae* (excepto en 2022-2023); mientras que en los restantes sitios de muestreo las especies no migratorias como *Lycengraulis grossidens*, *Pachyurus bonariensis* y *Catathyrnidium jenynsii* fueron las más abundantes (Figura 4). *S. Lima* solo se detectó, con muy escasa presencia, durante el periodo 2020-2021 en BU, CONS y E1.



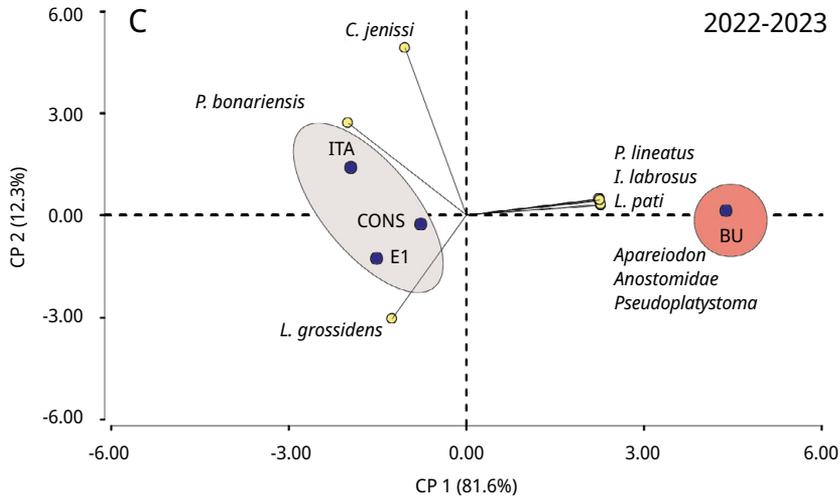
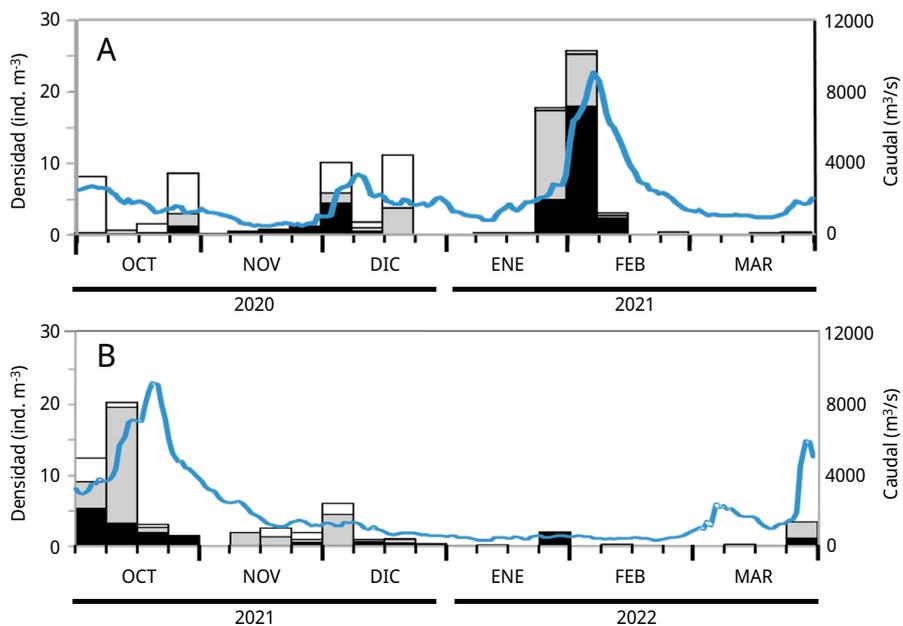


FIGURA 4. Biplot y análisis de componentes principales de la ordenación de los sitios de muestreo (círculos negros) según la abundancia de taxones de peces (círculos amarillos) de los periodos reproductivos A: 2020-2021, B: 2021-2022 y C: 2022-2023. Las áreas sombreadas de diferentes colores representan diferencias significativas en la composición taxonómica entre BU y los restantes sitios de muestreo (prueba SIMPROF $P < 0.05$).

Debido a que la mayoría de los huevos y estadios tempranos de desarrollo de las especies potamodromas fueron capturados en la estación de BU, el análisis temporal de la densidad del ictioplancton se realizó en base a la información obtenida a partir de dicho sitio. La variación temporal de la densidad del ictioplancton estuvo asociada al caudal de agua aportado al embalse, pero con diferencias entre años: en los dos últimos periodos reproductivos las mayores densidades de ictioplancton se registraron entre los meses de octubre y noviembre, mientras que durante el primer periodo se observaron entre fines de enero y febrero de 2021 (Figura 5).



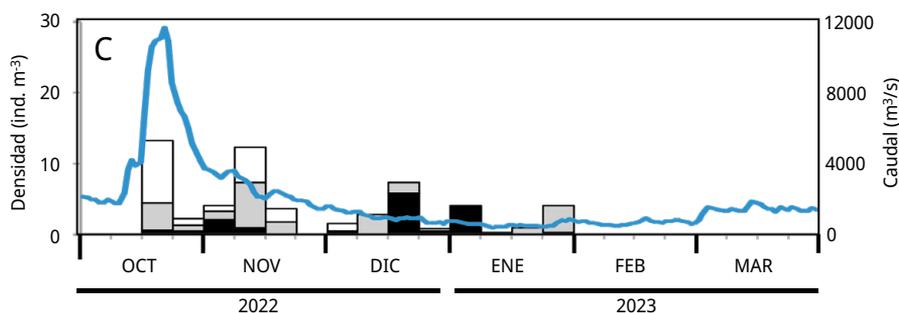


FIGURA 5. Variación temporal en la densidad semanal de ictioplancton y el caudal de agua aportado al embalse en el sitio Bella Unión durante los periodos reproductivos. A: 2020-2021; B: 2021-2022 y C: 2022-2023. En blanco: la proporción de huevos de peces; en gris las larvas viteladas; en negro las larvas no viteladas. La línea azul: el caudal de agua $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$.

Cianobacterias

Las densidades del complejo de cianobacterias (*Microcystis spp.* y *Dolichospermum spp.*) presentaron diferencias entre los periodos estivales analizados (GLM $P < 0.01$), evidenciando una fuerte disminución con el tiempo (pruebas LSD de Fisher; $p < 0,05$). Las mayores densidades semanales medias se observaron en 2020-2021 (93153 ± 164789 células ml^{-1}) con un pico máximo de 426860 células ml^{-1} durante enero de 2021, luego en 2021-2022 con densidades de 869 ± 805 células ml^{-1} (máximo en marzo de 2022 de 2178 células ml^{-1}). Los niveles medios más bajos de cianobacterias se desarrollaron durante el último periodo (2022-2023) con niveles medios de 110 células ml^{-1} y máximos durante noviembre de 2022 con densidades de 258 células ml^{-1} .

Periodo de bajantes extremas 2020-2023 vs. periodo previo 2010-2020

El ION se correlacionó positivamente con las densidades de ictioplancton, huevos y larvas de peces entre 2010-2023 ($r = 0.34$, $p = 0.0027$; $r = 0.32$, $p = 0.0046$; $r = 0.54$, $p = 0.0001$ respectivamente). Durante los periodos reproductivos 2010-2020, los valores de ION variaron alternativamente sin mostrar una tendencia definida, mientras que durante 2020-2023 se observaron tres periodos reproductivos consecutivos en fase La Niña ($\text{ION} < -0.5$), en concordancia con la disminución del caudal del agua entre el 65 y 67 %. Un comportamiento análogo al señalado anteriormente se verificó entre la abundancia de cianobacterias y el ictioplancton. Las densidades de cianobacterias se correlacionaron negativamente con el ictioplancton, huevos y larvas de peces durante 2010-2020 ($r = -0.41$, $p = 0.0012$; $r = -0.40$, $p = 0.0014$; $r = -0.41$, $p = 0.011$ respectivamente), mientras que durante 2020-2023 las relaciones funcionales entre ambas variables no fueron significativas en ninguno de los casos. Durante el periodo 2010-2020, la concentración promedio del complejo de *Microcystis* fue de 86301 ± 246601 células ml^{-1} (máximo de 1724107 células ml^{-1}), seguida por una reducción significativa durante los tres periodos posteriores (2020-2021: 29124 ± 28347 células ml^{-1} ; 2021-2022: 869 ± 805 células ml^{-1} ; y 2022-2023: 95 ± 110 células ml^{-1} ; GLM $p < 0,05$, pruebas LSD de Fisher; $p < 0,05$).

La densidad media del ictioplancton durante 2010-2020 fue de 8.1 ± 9.8 ind. m^{-3} , disminuyendo significativamente durante los últimos tres periodos (2020-2021: 4.3 ± 3.5 ind. m^{-3} ; 2021-2022: 2.6 ± 3.4 ind. m^{-3} ; y 2022-2023: 3.0 ± 2.7 ind. m^{-3} ; GLM $p < 0,05$, pruebas LSD de Fisher; $p < 0,05$). Un comportamiento semejante se produjo con los huevos (H) y larvas de peces: hubo mayores densidades durante 2010-2020 (H: 1.4 ± 2.0 ind. m^{-3} ; LV y LNV: 6.6 ± 6.3 ind. m^{-3}) y disminuciones significativas durante los tres periodos posteriores (2020-2021: H: 0.8 ± 1.0 ind. m^{-3} , LV y LNV 4.8 ± 6.6 ind. m^{-3} ; 2021-2022: H: 0.4 ± 0.5 ind. m^{-3} , LV y LNV: 2.2 ± 3.0 ind. m^{-3} ; 2022-2023: H: 0.8 ± 0.7 ind. m^{-3} , LV y LNV 2.8 ± 0.9 ind. m^{-3} ; pruebas LSD de Fisher; $p < 0,05$; Figura 6).

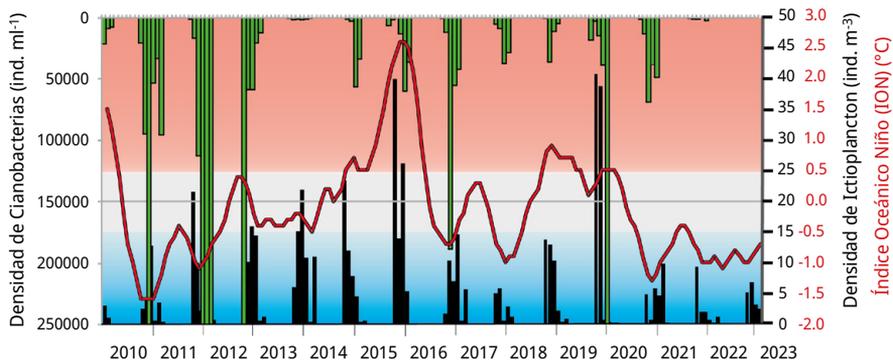


FIGURA 6. Distribución temporal de la densidad de cianobacterias (ind. ml^{-1} : barras verdes), de la densidad de ictioplancton en el sitio BU (ind. m^{-3} : barras negras) y del Índice Oceánico El Niño (ION, línea roja) durante el periodo de estudio. Valores de ION > 0.5 °C corresponden a la fase El Niño (sombreado rojo), valores < -0.5 °C corresponden a la fase La Niña (sombreado azul) y valores entre $-0.5 \leq ION \leq 0.5$ corresponden a la fase neutra (sombreado gris) del ENOS.

Respecto al ictioplancton de las especies migradoras afectadas, se observó una fuerte disminución durante el periodo de bajantes extremas (PBE: 2020-2021; 2021-2022; 2022-2023) respecto del periodo previo (PP: 2010-2020). *P. lineatus* (PBE: 0.8, 0.6 y 0.3 ind. m^{-3} respectivamente; PP: 2.1 ind. m^{-3}), *Pseudoplatystoma spp.* (PBE: 0.5, 0.6 y 0.3 ind. m^{-3} respectivamente; PP: 1.3 ind. m^{-3}), *L. pati* (PBE: 0.2, 0.1 y 0.1 ind. m^{-3} respectivamente; PP: 0.4 ind. m^{-3}), *Pimelodus spp.* (PBE: 0.4, 0.2 y 0.2 ind. m^{-3} respectivamente; PP: 0.5 ind. m^{-3}), *Anostomidae* a excepción de 2020-2021 (PBE: 0.4, 0.1 y 0.1 ind. m^{-3} respectivamente; PP: 0.3 ind. m^{-3}). Otras especies migradoras como *S. brasiliensis* y *R. vulpinus*, presentes en el embalse durante el periodo previo (2010-2020), no fueron encontradas durante el periodo de bajantes extremas (Figura 7).

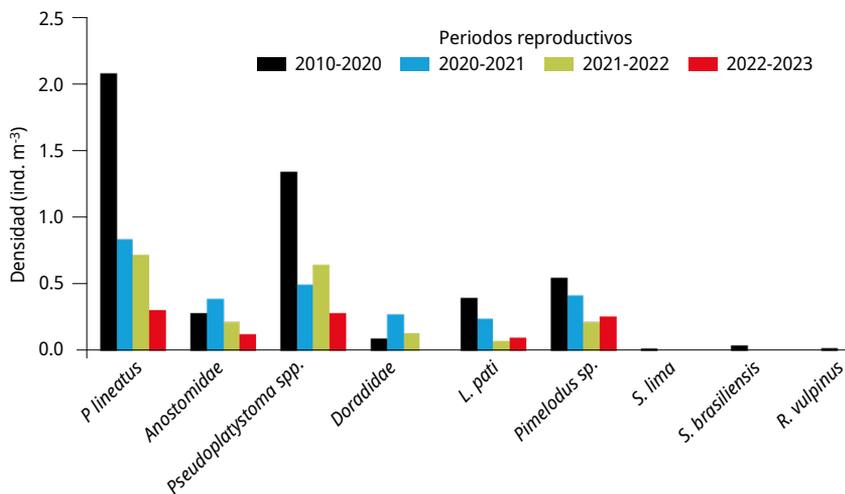


FIGURA 7. Densidad media anual de larvas de especies potamodromas en la estación BU durante el periodo 2010-2020 (barras negras), y los periodos 2020-2021 (barras azules), 2021-2022 (barras verdes) y 2022-2023 (barras rojas).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que las bajantes extremas del cauce de los ríos en zonas de embalses producen un efecto negativo sobre la densidad del ictioplancton de especies potamodromas, y proporcionan nuevos conocimientos acerca de la intensidad de ese efecto durante periodos consecutivos de sequías. Efectos adversos de las sequías sobre la reproducción de peces en general y migradores en particular han sido reportados en diferentes ambientes de aguas continentales. Smolders et al. (2000) atribuyeron el colapso de la pesquería de sábalo (*P. lineatus*) en el río Pilcomayo (Bolivia) a la disminución de las descargas fluviales debido a una reducción de áreas de cría en estadios juveniles (Welcomme, 1979). Mientras que en la llanura aluvial del río Paraná superior (Brasil) se reportaron asociaciones positivas del nivel del agua con la abundancia, la riqueza de especies y la estructura de la ictiofauna de los ríos Paraná (represado) e Ivinhema (sin represas) (Alves et al., 2021).

De manera semejante a lo señalado para la Cuenca del Plata, los eventos de sequía provocaron la disminución del crecimiento de *Semaprochilodus insignis*, una importante especie comercial del Amazonas central (Brasil) (Camacho Guerreiro et al., 2021). Fabré et al. (2017) reportaron que los niveles mínimos de agua que indican las condiciones de sequía influyen en la estructura de tamaño de las comunidades de peces de agua dulce del Amazonas. En tanto, en la selva tropical en Surinam (América del Sur) se observó el secado de lagunas de agua salobre, pantanos de agua dulce y arroyos, provocando la muerte de especies como *Ariusherz bergii*, *A. passany*, *Centropomus undecimalis*, *Oreochromis mossambicus*, *Mugil curema*, *M. liza*, y *Megalops atlanticus*. También se registraron fallas en la reproducción de tres especies de bagres acorazados de la familia *Callichthyidae* tanto en pantanos costeros de agua dulce como en un arroyo de selva tropical (Mol et al., 2000).

Los resultados de este estudio corroboran que el área de reproducción de peces migradores se localiza en la cabecera del embalse (BU), tal como fue señalado en estudios previos (Cataldo et al., 2020 y 2022). El efecto de la disminución del caudal de agua durante la bajante extrema afectó de manera heterogénea a las especies o los grupos taxonómicos presentes en el embalse. El análisis de las principales especies migradoras indicó una fuerte disminución de las abundancias de *P. lineatus* (entre 60-85 %), *Pseudoplatystoma spp.* (52-79 %), *L. patí* (39-82 %), *Pimelodus spp.* (24-61 %), *Anostomidae* (a excepción del 2021-2022; 26-56 %).

Otras especies migradoras que fueron detectadas durante 2010-2020 en densidades relativamente más bajas, como *S. brasiliensis* y *R. vulpinus* (Cataldo et al., 2020), estuvieron ausentes durante el periodo de bajantes extremas 2020-2023. Sin embargo, a pesar de estos bajos niveles de densidades de huevos y larvas de peces presentes en el área de reproducción, la mayor parte de las especies potamodromas lograron reproducirse durante este periodo extremo de sequías.

Diversos factores pueden ser atribuibles al efecto negativo de la disminución del caudal de agua sobre la reproducción de la ictiofauna. En primer término, teniendo en cuenta que el incremento del nivel del agua actúa como un gatillo para la reproducción de peces (King et al., 2003; Agostinho et al., 2004; Cataldo et al., 2020), la ausencia de este factor podría ser la causa de una pobre o nula migración reproductiva. Por otro lado, los periodos de sequía podrían facilitar las actividades depredadoras de los peces piscívoros debido al confinamiento y aumento de la densidad de otras especies ícticas. Una disminución del nivel del agua también podría reducir el intercambio y la conectividad entre las zonas de reproducción, cría de juveniles y alimentación (Rodríguez y Lewis, 1997; Turesson y Bronmark, 2007; Alves et al., 2021; Welcomme, 1979).

La mayor intensidad de la actividad reproductiva de las especies potamodromas durante los diez años previos al presente estudio invariablemente se desarrolló en el periodo octubre-noviembre, concomitantemente al incremento del aporte de agua al embalse durante la primavera (Cataldo et al., 2020). El periodo de sequías, además de afectar la densidad del ictioplancton, produjo cambios temporales en la actividad reproductiva. Por ejemplo, en este trabajo, durante el periodo reproductivo 2020-2021, las mayores densidades de ictioplancton ocurrieron entre fines de enero y mediados de febrero de 2021 asociados al incremento del caudal de agua. Los resultados corroboran la hipótesis de que estas especies de peces dependen temporalmente del nivel hidrométrico para reproducirse (Carolsfeld et al., 2004).

En los veranos secos, durante el periodo 2010-2020, la densidad media de *Microcystis spp.* en el embalse de Salto Grande fue de 166469 ± 76443 células ml^{-1} , superando el nivel guía de salud pública para las actividades recreativas (100.000 células ml^{-1}) recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bartram, 1999; Chorus y Bartram, 1999; Chorus y Welker, 2021). Las densidades semanales más altas en este ambiente coincidieron con fuertes periodos de sequías, con valores de hasta 16627500 células ml^{-1} en febrero de 2012 (Cataldo et al., 2020). En el embalse de Salto Grande, la concentración de microcistinas totales se correlacionaron con las abundancias de *Microcystis spp.* y *Dolichospermum spp.* (Bordet et al., 2017). Las concentraciones de microcistinas suelen ser superiores a $10 \mu\text{g l}^{-1}$ durante la mayoría de los periodos secos, registrándose el valor más alto de $621 \mu\text{g l}^{-1}$ en octubre de 2012 (Bordet et al., 2017). Estos niveles de microcistinas

exceden los valores orientativos de la OMS para el agua potable ($1 \mu\text{g l}^{-1}$) y las actividades recreativas ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) (Chorus y Bartram, 1999).

Los peces expuestos a microcistinas muestran lesiones hepáticas que resultan en la inhibición de la síntesis de vitelogenina, esencial para producir gametos (Mitsoura et al., 2013). García y Martínez (2012) concluyeron que los juveniles de *P. lineatus* expuestos, durante 24 y 96 h, a concentraciones de microcistinas entre 1 y 2 mg l^{-1} muestran afectación en sus defensas antioxidantes, con daños en hígado, branquias y el ADN de las células sanguíneas de los peces. Mediante el análisis de series tiempo (2010-2020), Cataldo et al. (2022) concluyeron que la abundancia de huevos y larvas de peces potamodromas en el embalse de Salto Grande se encuentra inversamente relacionada con la densidad de cianobacterias del complejo *Microcystis*. Las floraciones de *Microcystis* han sido implicadas en frecuentes eventos de mortalidad masiva de peces. Otros estudios indican que las floraciones de cianobacterias tienen un impacto negativo en el comportamiento alimentario de las larvas de peces en general y potamodromos en particular (Paolucci et al., 2017; Paolucci y Thuesen, 2015), como así también se han reportado efectos negativos sobre la reproducción del molusco invasor *Limnoperna fortunei* presente en Salto Grande (Boltovskoy et al., 2013), un importante recurso alimentario para especies de peces adultos y sus estadios larvales (Cataldo, 2015; Paolucci et al., 2017).

Uno de los resultados relevantes de esta investigación es que, a pesar de tres periodos estivales consecutivos de sequías extremas con ausencia de caudales de agua superiores a $15000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, no se desarrollaron *blooms* de cianobacterias en el embalse. Este fenómeno puede deberse a que los bajos niveles de agua produjeron un mayor desacople con suelo circundante de las llanuras aluviales (perímetro húmedo), determinando un menor ingreso de fósforo total (PT) por escorrentía de márgenes y de cursos de agua (Bordet et al., 2023). En consecuencia, a pesar de las excelentes condiciones lumínicas, altas temperaturas y mayores tiempos de residencia del agua durante el periodo extraordinario, la sostenida baja carga interna de fósforo total del embalse de Salto Grande fue insuficiente para subsidiar a las floraciones masivas de cianobacterias (Bordet et al., 2023).

Cataldo et al. (2022) analizaron el efecto del fenómeno ENOS sobre las floraciones de cianobacterias y el ictioplancton en este mismo ambiente, y observaron que la fase La Niña durante el verano de 2012 causó una drástica reducción del número de larvas de peces al mismo tiempo que se desarrollaba una gran floración de cianobacterias. Durante los años siguientes, junto con el aumento del valor del ION y el aporte de agua, las abundancias de huevos y larvas de peces migradores alcanzaron los mayores registros durante el periodo reproductivo 2015-2016, correspondiente a la fase El Niño (Figura 6). Los investigadores concluyeron que los peces migratorios presentan un nivel significativo de resiliencia que les permite adaptarse a los cambios ambientales. Teniendo en cuenta que durante el periodo de bajantes extremas el valor del ION entre octubre y marzo osciló entre -0.7 y $-1.3 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 6), los resultados de este estudio sustentan la hipótesis de que la identificación de las diferentes fases de ENOS se podría utilizar como herramienta predictiva de la actividad reproductiva de los peces migratorios.

A diferencia del periodo previo, donde las sequías se alternaban con ciclos de inundaciones, el efecto negativo de las sequías durante tres periodos consecutivos sobre

la actividad reproductiva plantea un interrogante sobre los límites de la capacidad de resiliencia de los peces para adaptarse a extensos periodos críticos. Sin embargo, la ausencia de un posible efecto perjudicial a la exposición de cianotoxinas, sumado a la capacidad de resiliencia de la actividad reproductiva de los peces migradores, permite afirmar que existen expectativas razonables para considerar que al finalizar el periodo prolongado de sequías los peces lentamente recuperen la actividad reproductiva anterior.

AGRADECIMIENTOS

El autor Daniel Cataldo agradece al Área de Gestión Ambiental de la Comisión Técnica Mixta de Salto Grande (Argentina-Uruguay) por su asistencia en el campo. Este trabajo fue financiado por el STAN CONICET-CTMSG (ST636 y ST6450).

REFERENCIAS

- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Veríssimo, S. y Okada, E. K., 2004. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: Effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. En: *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14(1), pp. 11–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11160-004-3551-y>
- Alves, J. C.; Andreotti, G. F.; Agostinho A. A. y Gomes, L., 2021. Effects of the El Niño Southern Oscillation (ENSO) on fish assemblages in a Neotropical floodplain. En: *Hydrobiologia*, 848, pp. 1811–1823.
- Bartram, J., 1999. The World Health Organization in Europe and its role in water and health. En: *Environmentalist*, 19(1), pp. 17–22. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006528704346>
- Benayache, N.Y.; Nguyen Quang, T.; Hushchyna, K.; McLellan, K.; Afri- Mehennaoui, F. Z. y Bouaïcha, N., 2019. An overview of cyanobacteria harmful algal bloom (CyanoHAB) issues in freshwater ecosystems. En: Gökçe, Didem, ed. *Limnology - some new aspects of inland water ecology*. DOI: 10.5772/intechopen.84155
- Beron, L., 1990. Features of the limnological behavior of Salto Grande's reservoir (Argentina-Uruguay). En: *Ecological Modeling*, 52, pp. 87–102.
- Boltovskoy, D.; Bordet, F.; Leites, V. y Cataldo D., 2021. Multiannual trends (2004–2019) in the abundance of larvae of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* and crustacean zooplankton in a large South American reservoir. En: *Austral Ecology*, 46(8), pp. 1221–1235. DOI: <https://doi.org/10.1111/aec.13058>
- Boltovskoy, D.; Correa, N.; Bordet, F.; Leites, V. y Cataldo, D., 2013. Toxic Microcystis (cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloomenhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. En: *Freshwater Biology*, 58(9), pp. 1968–1981. DOI: <https://doi.org/10.1111/fwb.12184>
- Bonetto, A. A.; Canon Verón, M. y Roldán, D., 1981. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en el río Paraná. En: *ECOSUR*, 16(8), pp. 29–40.

- Bordet, F.; Fontanarrosa, M. S. y O'Farrell, I., 2017. Influence of light and mixing regime on bloom-forming phytoplankton in a subtropical reservoir. En: *River Research and Applications*, 33(8), pp. 1315–1326. DOI: <https://doi.org/10.1002/rra.3189>.
- Bordet, F.; Collazos, G.; Irigoyen, M.; Simón, C.; Andrade, S. y Vidal, M., 2023. Incidencia de la ausencia de eventos hidrológicos sobre las floraciones de cianobacterias en el Embalse de Salto Grande. En: Universidad de Buenos Aires. *IV Congreso Iberoamericano de Limnología y X Congreso Argentino de Limnología: Comprender, proteger y recuperar con equidad las aguas del siglo XXI*. Buenos Aires, Argentina (31 de julio - 4 de agosto de 2023). Buenos Aires: UBA.
- Borús, Juan; Giordano, Leandro; Vita Sánchez, Maximiliano; Núñez, Víctor; Contreras, Guillermo y Pereira Andrea, 2021. Posibles escenarios hidrológicos en la Cuenca del Plata durante el periodo diciembre 2021 / enero-febrero 2022 [En línea]. Buenos Aires: Ministerio de Obras Públicas. [Consulta: 08 de diciembre de 2021]. Disponible en: https://www.ina.gov.ar/archivos/alerta/Escenario2021_Diciembre.pdf
- Camacho Guerreiro, A. I.; Amadio, S. A.; Fabre, N. N. y da Silva Batista, V., 2021. Exploring the effect of strong hydrological droughts and floods on populational parameters of *Semaprochilodus insignis* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Central Amazonia. En: *Environment, Development and Sustainability*, 23, pp. 3338–3348.
- Camilloni, I. y Barros V., 2000. The Parana River response to El Niño 1982–83 and 1997–98 events. En: *Journal of Hydrometeorology*, 1, pp. 412–430.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. y Baer, A., 2004. Migratory fish of South America: biology, fisheries and conservation status [En línea]. Ottawa: International Development Research Centre y World Bank. [Consulta: 11 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10986/14929>
- Cataldo, D.; Leites, V.; Bordet, F. y Paolucci, E., 2022. Effects of El Niño Southern Oscillation (ENSO) on the reproduction of migratory fishes in a large South American reservoir. En: *Hydrobiologia*, 849(15), pp. 3259–3274. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04941-6>
- Cataldo, D. y Paolucci, E., 2022. *Estudios ambientales: análisis genéticos de muestras de larvas de peces (OC 7791)*. Informe técnico. Convenio entre Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Comisión Técnica Mixta de Salto Grande. Informe final. (Informe inédito). CONICET y CTMSG.
- Cataldo, D., 2015. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with adult fishes. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer International Publishing. pp. 231–248. ISBN: 978-3-319-13493-2.
- Cataldo, D.; Gattás, F.; Leites, V.; Bordet, F. y Paolucci, E., 2020. Impact of a hydroelectric power plant on migratory fishes in the Uruguay river. En: *River Research and Applications*, 36(8), pp. 1598–1611. DOI: <https://doi.org/10.1002/rra.3670>
- Chalar, G., 2006. Eutrophication dynamics on different temporary scales: Salto Grande Reservoir (Argentina-Uruguay). En: Tundisi, J. G., T. Matsumura Tundisi y C. S. Galli (eds). *Eutrofização na América do Sul: causas, consequências e tecnologias de gerenciamento e controle*. Instituto Internacional de Ecología e Gerenciamento Ambiental. [s.l.]: Academia Brasileira de Ciências, Conselho Nacional de Desenvolvimento

- Científico e Tecnológico, Inter Academy Panel on International Issues, Inter American Network of Academies of Sciences. pp. 87–101.
- Chalar, G.; De Leon L.; Brugnoli E.; Clemente J. y Paradiso M., 2002. Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse Salto Grande. En: Fernández-Cirelli, A. C. G., ed. *El agua en Sudamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica*. Buenos Aires: Editorial Eudeba. pp. 123–142.
- Chorus, I. y Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences monitoring and management*. Boca Raton: Taylor y Francis Group. ISBN: 0-419-23930-8
- Chorus, I. y Welker, M., 2021. *Toxic cyanobacteria in water*. 2a ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN: 978-1-003-08144-9
- Comisión Argentina-Paraguaya del río Paraná, 1994. *La fauna íctica del río Paraná, tramo Argentino-Paraguayo*. [s.l.]: COMIP. ISBN: 987-99076-1-2.
- De León, L. y Chalar G., 2003. Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande (Argentina– Uruguay). Ciclo estacional y distribución espacial. En: *Limnetica*, 22, pp. 103–113.
- Delfino, R. y Baigún, C., 1985. Marcaciones de peces en el Embalse Salto Grande, Río Uruguay (Argentina - Uruguay). En: *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 16(1), pp. 85-93.
- De Resende, E. K., 2004. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná basin excluding the upper Paraná basin. En: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. y Baer, A. ed. *Migratory fish of South America: Biology, fisheries and conservation status*. [s.l.]: World Fisheries Trust, World Bank, IDRC. pp. 99-156. ISBN: 0-9683958-2-12
- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C. W., 2020. InfoStat [En línea]. Versión 2020. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. [Consulta: 20 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Fabré, N.; Castello, L.; Isaac, V. J. y Vandick, S. B., 2017. Fishing and drought effects on fish assemblages of the central Amazon Basin. En: *Fisheries Research*, 188, pp. 157–165.
- Ferrari, G. M., 2020. El caudal y la temperatura del agua son los principales factores que regulan el fitoplancton y las floraciones de cianobacterias en un gran río subtropical. En: *INNOTEC*, (20), pp. 30–66. DOI: <https://doi.org/10.26461/20.07>
- Fuentes, C. M. y Espinach Ros, A., 1998. Variación de la actividad reproductiva del sábalo, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), estimada por el flujo de larvas en el río Paraná Inferior. En: *Natura Neotropicalis*, 29, pp. 25-32.
- Fuentes, C. M.; Brow, D. y Paolucci, E. M., 2003. Reproducción del sábalo (*Prochilodus lineatus*-Valenciennes, 1847) y otras especies de interés comercial y deportivo en el río Uruguay inferior, estimada por la abundancia de estadios larvales en la deriva. [s.l.]: INIDEP. (Informe Técnico N° 80/03)
- Fuentes, C. M.; Gómez, M. I.; Brown, D. R.; Arcelus, A. y Espinach Ros A., 2016. Downstream passage of fish larvae at the Salto Grande dam on the Uruguay River. En: *River Res. Applic.*, 32, pp. 1879–1889. DOI: 10.1002/rra.3030.
- García, C. Z. y Martínez, C. B. R., 2012. Biochemical and genetic alterations in the freshwater neotropical fish *Prochilodus lineatus* after acute exposure to *Microcystis aeruginosa*. En: *Neotropical Ichthyology*, 10, pp. 613–622.
- Huang, B.; Thorne P. W.; Banzon V. F.; Boyer, T.; Chepurin, G.; Lawrimore, J. H.; Menne M. J.; Smith, T. M.; Vose R. S. y Zhang, H. M., 2017. Extended reconstructed sea surface

- temperature, version 5 (ERSSTv5): upgrades, validations, and intercomparisons. En: *Journal of Climate*, 30, pp. 8179–8205.
- Humphries, P. y Lake, P. S., 2000. Fish larvae and management of regulated rivers. En: *Regulated Rivers Research & Management*, 16, pp. 421–432.
- King, A. J.; Humphries, P. y Lake, P. S., 2003. Fish recruitment on floodplains: the roles of patterns of flooding and life history characteristics. En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(7), pp. 773–786. DOI: <https://doi.org/10.1139/f03-057>
- Kruk, C.; Segura, A.; Piñeiro, G.; Baldassini, P.; Pérez-Becoña, L.; García-Rodríguez, F.; Perera, G. y Piccini, C., 2023. Rise of toxic cyanobacterial blooms is promoted by agricultural intensification in the basin of a large subtropical river of South America. En: *Global Change Biology*, 29, pp. 1774–1790. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.16587>
- Menni, R. C., 2004. *Peces y ambientes en la Argentina continental*. Vol. 5. Buenos Aires: Museo Argentino de Ciencias Naturales. ISSN: 1515-7652.
- Mitsoura, A.; Kagalou, I.; Papaioannou, N.; Berillis, P.; Mente, E. y Papadimitriou, T., 2013. The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues. A histopathological study. En: *International Aquatic Research*, 5(1), pp. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/2008-6970-5-8>
- Mol, J. H. D.; Resida, J. S.; Ramlal y Becker, C. R., 2000. Effects of El Niño-related drought on freshwater and brackish-water fishes in Suriname, South America. En: *Environmental Biology of Fishes*, 59, pp. 429–440.
- Muñiz Saavedra, J. y Piacentino, G., 1991. Estudio del desarrollo ontogénico de *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes 1835). En: *Medio Ambiente*, 11, pp. 61–68.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Sanches, P. V.; Cavicchioli-Makrakis, M. y Pavanelli, C. S., 2001. *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM. ISBN: 85-85545-73-9
- NOAA, 2021. *Climate Prediction Center*. Maryland: NOAA. [Consulta 3 de mayo de 2021]. Disponible en: https://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ONI_v5.php
- O'Farrell, I.; Bordet, F. y Chaparro, G., 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. En: *Hydrobiologia*, 698(1), pp. 175–190. DOI: 10.1007/s10750-012-1102-4
- Osswald, J.; Rellán, S.; Gago, A. y Vasconcelos, V., 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. En: *Environment International*, 33(8), pp. 1070–1089. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.003>
- Paolucci, E. M. y Thuesen, E. V., 2015. Trophic relationships of *Limnoperna fortunei* with larval fishes. En: Boltovskoy, D., ed. *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Cham: Springer International Publishing. pp. 211–229. ISBN: 978-3-319-13493-2.
- 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://doi.org/10.1111/aec.12493>
- Penalba, O. C. y Vargas, W.M., 2008. Variability of low monthly rainfall in La Plata Basin. En: *Met. Apps*, 15, pp. 313–323. DOI: <https://doi.org/10.1002/met.68>

- Quirós, R. y Luchini, L., 1983. Características limnológicas del embalse de Salto Grande III: Fitoplancton y su relación con parámetros ambientales. En: *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 13, pp. 19–66.
- Rangel, L. M.; Silva, L. H. S.; Rosa, P.; Roland, F. y Huszar, V. L. M., 2012. Phytoplankton is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. En: *Hydrobiologia*, 693, pp. 13–28. DOI: 10.1007/s10750-012-1083-3
- Reynalte-Tataje, D.A.; Agostinho, A.A.; Bialecki, A.; Hermes-Silva, S.; Fernandes, R. Zaniboni-Filho, E., 2012. Spatial and temporal variation of the ichthyoplankton in a subtropical river in Brazil. En: *Environ Biol Fish.*, 94, pp. 403–419. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9955-3>
- Reynolds, C. S. y Jaworski, G. H. M., 1978. Enumeration of natural *Microcystis* populations. En: *British Phycological Journal*, 13(3), pp. 269–277. DOI: <https://doi.org/10.1080/00071617800650331>
- Rodríguez, M. A. y Lewis, W. M., 1997. Structure of fish assemblages along environmental gradients in floodplain lakes of the Orinoco River. En: *Ecological Monographs*, 67, pp. 109–128.
- Saurral, R. I.; Barros, V. R. y Lettenmaier, D. P., 2008. Land use impact on the Uruguay River discharge. En: *Geophys. Res. Lett.*, 35, pp. 215–235. DOI: 10.1029/2008GL033707.
- Smolders, A. J. P.; Van Der Velde, G. y Roelofs, J. G. M., 2000. El Niño caused collapse of the sábalo fishery (*Prochilodus lineatus*, Pisces: Prochilodontidae) in a South American river. En: *Naturwissenschaften*, 87, pp. 30–32. DOI: 10.1007/s001140050004
- Sverlij, S. B.; Espinach Ros, A. y Orti, G., 1993. Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). En: *Sinopsis Sobre La Pesca*, 154. ISBN: 9253033711
- Turesson, H. y Bronmark, C., 2007. Predator-prey encounter rates in freshwater piscivores: effects of prey density and water transparency. En: *Oecologia*, 153, pp. 281–290. DOI: 10.1007/s00442-007-0728-9
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. En: *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung der Theoretischen und Angewandten Limnologie*, 9, pp. 1–38.
- Venrick, E. L., 1978. How many cells to count? En: Sournia, A., ed. *Phytoplankton manual*. Paris: UNESCO Press. pp. 167–168. ISBN: 92-3-101572-9.
- Villar, C. A. y Bonetto, C., 2000. Chemistry and nutrient concentrations of the Lower Paraná River and its floodplain marshes during extreme flooding. En: *Archiv fur Hydrobiologie*, 148(3), pp. 461–479.
- Welcomme, R. L., 1979. *Fisheries ecology of floodplain rivers*. London: Longman. ISBN: 9780582463103, 0582463106
- Welcomme, R. L., 1985. *River fisheries*. Roma: FAO. (FAO Fish. Tech. Pap. No. 262). ISBN: 92-5-102299-2
- Zaniboni, Z. y Schulz, U. H., 2004. Migratory fishes of the Uruguay River. En: Carolsfeld, J.; Harvey, B., Ross, C. y Baer, A., eds. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status*. Washington: World Fisheries Trust, World Bank, IDRC. ISBN: 0-9683958-2-12. pp. 157–194

Ensayo en laboratorio de depredación de larvas de anfibios exóticos por peces autóctonos: base para el control biológico de la rana toro en Uruguay

Laboratory test of predation of exotic amphibian larvae by native fish: basis for the biological control of the bullfrog in Uruguay

Teste laboratorial de predação de larvas de anfibios exóticos por peixes nativos: bases para o controle biológico da rã-touro no Uruguai

 **MARCELO ITURBURU DI FIORE** (1)

 **GUSTAVO SAONA** (2)

 **ERNESTO BRUGNOLI** (3)

 **JOSÉ CARLOS GUERRERO** (4)

(1) Comité de Especies Exóticas Invasoras, Ministerio de Ambiente, Montevideo, Uruguay.

(2) Laboratorio de Bioensayos, Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, Intendencia de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

(3) Oceanografía y Ecología Marina, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(4) Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

RECIBIDO: 12/12/2023 → APROBADO: 27/5/2024 ✉ marcelo.iturburu@gmail.com

RESUMEN

La declinación de anfibios constituye una preocupación actual, siendo la presencia de especies exóticas invasoras (EEI) una de las principales amenazas a la biodiversidad. En Uruguay, una de las EEI que afecta la biodiversidad autóctona es el anuro exótico invasor *Aquarana catesbeiana* (rana toro), invadiendo más de 60 charcos en tres localidades. El presente trabajo propone el análisis de la viabilidad del control biológico de larvas de rana toro mediante el uso del pez nativo *Rhamdia quelen* (bagre negro). Se realizó un ensayo de depredación en laboratorio para evaluar si consume las larvas de la especie exótica invasora rana toro y de la rana nativa *Leptodactylus luctator*. Los renacuajos en los estadios 24-26 (utilizando el criterio de Gosner) de ambas especies se

expusieron a depredación directa y se determinó el número de larvas que consumió cada ejemplar de *R. quelen*. Cada pez depredó significativamente sobre ambas especies; sin embargo, la intensidad fue menor en las larvas exóticas (5 %) que en nativas (70 %). La introducción de especies de peces autóctonos para el control biológico constituye una oportunidad en cuerpos de agua permanentes donde *A. catesbeiana* se encuentra bien establecida. En una etapa inicial del proceso de invasión donde hay presencia de otras especies nativas de anfibios, *R. quelen* no serviría para biocontrol ya que eliminaría a las larvas de la especie nativa, favoreciendo a la rana toro.

Palabras clave: *Aquarana catesbeiana*, invasión biológica, biomanipulación.

ABSTRACT

The decline of amphibians is a current concern, with the presence of invasive alien species (IAS) being one of the main threats to biodiversity. In Uruguay, one of the IAS that affects native biodiversity is the invasive exotic anuran *Aquarana catesbeiana* (bullfrog), invading more than 60 ponds in three locations. The present work proposes the analysis of the viability of biological control of bullfrog larvae, through the use of the native fish *Rhamdia quelen* (black catfish). A laboratory predation test was carried out to evaluate whether it consumes the larvae of the invasive alien species bullfrog and the native frog *Leptodactylus luctator*. Tadpoles in stages 24-26 (using Gosner's criterion) of both species were exposed to direct predation and the number of larvae consumed by each *R. quelen* specimen was determined. Each fish preyed significantly on both species; however, the intensity was lower in exotic larvae (5 %) than in native ones (70 %). The introduction of native fish species for biological control constitutes an opportunity in permanent water bodies where *A. catesbeiana* is well established. In an initial stage of the invasion process where there is the presence of other native species of amphibians, *R. quelen* would not serve for biocontrol, since it would eliminate the larvae of the native species, favouring the bullfrog.

Keywords: *Aquarana catesbeiana*, biological invasion, biomanipulation.

RESUMO

O declínio dos anfíbios é uma preocupação atual, sendo a presença de espécies exóticas invasoras (EEI) uma das principais ameaças à biodiversidade. No Uruguai, uma das EEI que afeta a biodiversidade nativa é o anuro exótico invasor *Aquarana catesbeiana* (rã-touro), invadindo mais de 60 lagoas em três localidades. O presente trabalho propõe a análise da viabilidade do controle biológico de larvas de rã-touro, através da utilização do peixe nativo *Rhamdia quelen* (bagre preto). Um ensaio de predação em laboratório foi realizado para avaliar se ele consome larvas da espécie rã-touro exótica invasora e da rã nativa *Leptodactylus luctator*. Girinos nos estágios 24-26 (usando o critério de Gosner) de ambas as espécies foram expostos à predação direta e o número de larvas consumidas por cada espécime de *R. quelen* foi determinado. Cada peixe predava significativamente ambas as espécies; no entanto, a intensidade foi menor nas larvas exóticas (5 %) do que nas larvas nativas (70 %). A introdução de espécies de peixes nativas para controle

biológico constitui uma oportunidade em corpos d'água permanentes onde *A. catesbeiana* está bem estabelecida. Numa fase inicial do processo de invasão onde há presença de outras espécies nativas de anfíbios, *R. quelen* não serviria para biocontrole, pois eliminaria as larvas das espécies nativas, favorecendo a rã-touro.

Palabras-chave: *Aquarana catesbeiana*, invasão biológica, biomanipulação.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios ocupan un importante rol en los ecosistemas acuáticos y terrestres como depredadores y presas, actuando como un enlace crítico entre los niveles tróficos más bajos y altos de una comunidad (Brühl al., 2013). Constituyen uno de los grupos zoológicos más diversos y amenazados a nivel global; estudios recientes han concluido que casi un tercio de las especies conocidas están amenazadas de extinción y varias ya se han extinguido (Stuart et al, 2004; de Sá, R. O. 2005; Sodhi et al., 2008; Carreira y Maneyro, 2015; González, 2019). Este fenómeno se ha denominado declinación global de las poblaciones de anfibios (Alford y Richards, 1999; Maneyro y Langone, 2001), donde la introducción de especies exóticas es un factor de riesgo muy significativo para los anfibios autóctonos (Hoffmann et al., 2010; Capdevila et al., 2013).

Las bioinvasiones son uno de los cinco impulsores directos del cambio global (Roy et al. 2024), y presentan consecuencias económicas y ecológicas negativas, representando una seria amenaza a la biodiversidad (Mack et al., 2000). El número de especies exóticas invasoras (EEI) ha aumentado un 70 % desde la década de 1970 (Pagad et al., 2015), y sus impactos sobre la biodiversidad se están acelerando y seguirán aumentando en el futuro (Pyšek et al., 2020).

En Uruguay se reconocen 48 especies nativas de anfibios, donde un 25 % se encuentra amenazada o en riesgo de extinción (Maneyro et al., 2005; Carreira y Maneyro, 2015, 2019). A estos 48 anuros nativos se suma la presencia de una EEI: *Aquarana catesbeiana* (Maneyro et al., 2005; Laufer et al., 2008, 2009; Ruibal y Laufer, 2012). La rana toro se introdujo en 1986 en Uruguay por el Estado como una producción alternativa para consumo humano, llegando a instalarse 23 criaderos en 11 departamentos del país (Mazzoni y Carnevia, 1996; Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2000; Uruguay. Gobierno de Canelones, 2018; Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2008). La producción no prosperó por motivos económicos, por lo que se cerraron los criaderos, dejando en abandono los ejemplares en cautiverio debido a la ausencia de un protocolo de cierre de los mencionados sistemas productivos. Desde el año 2005 se reportan poblaciones asilvestradas en la naturaleza próximas a los antiguos ranarios (Maneyro et al., 2005; Laufer et al., 2009; Laufer y Gobel, 2017; Iturburu, 2018; Iturburu y Mello, 2022; Laufer et al., 2018, 2023; Iturburu et al., 2024).

A nivel global, esta especie es considerada como una de las 100 EEI más dañinas (Lowe et al., 2000) y como uno de los factores de pérdida de la diversidad de anfibios (Aguilar, 2012). Esta especie presenta un amplio espectro de alimentación compuesto por insectos y crustáceos (Morales, 2021; Hirai, 2004), peces (Gobel, 2013; Mueller et al., 2006), tortugas (Hirai, 2003), aves (López-Flores et al., 2003), serpientes (McAlpine y Dilworth, 1989), mamíferos (Bissattini et al., 2019), murciélagos (Kirkpatrick, 1982) y anfibios (Pearl

et al., 2004), donde se evidenció canibalismo (Leivas et al., 2012), depredando cualquier organismo de un tamaño menor al tamaño de la boca (Adriaens, et al., 2019). Estudios previos analizaron la alimentación de la rana toro en ambientes acuáticos de Uruguay (Laufer et al., 2021, 2023; Gobel, 2013) y la región (Cordovez et al., 2021). Sin embargo, aún no se conoce el rol de esta especie como presa de otros grupos, mecanismo que podría ser utilizado como control biológico (Louette, 2012). En particular, los peces son reconocidos como un grupo que puede impactar sobre los anfibios por su capacidad de depredación directa de huevos y larvas (Petranka, 1983). Entre las medidas documentadas para mitigar el impacto de esta EEI se señala que el control efectivo requiere abordar la especie en todas las etapas de desarrollo de forma simultánea.

La restauración del hábitat, la biomanipulación y la introducción de depredadores nativos podría ser una opción para mitigar el impacto de la presencia de la rana toro, donde la idoneidad de los sitios de reproducción disminuye (Adriaens et al., 2019). En Uruguay se han implementado acciones para erradicar la rana toro en charcos invadidos por parte de las instituciones oficiales encargadas de la conservación de la biodiversidad, aplicando métodos de control recomendados a nivel internacional (Iturburu et al., 2024), aunque los mismos no incluyen el control biológico como alternativa.

Los peces desempeñan un papel clave en la determinación de la composición de las comunidades de anfibios en ambientes de aguas permanentes, donde depredan más que en ambientes temporales (Woodward, 1983). Las presas y depredadores utilizados en el presente ensayo de laboratorio habitan cuerpos de aguas permanentes como los invadidos por la rana toro en Canelones (Maneyro y Carreira, 2012; Teixeira de Mello et al., 2011). *Rhamdia quelen* (bagre negro) es una especie nativa de pez Siluriforme, con hábitos omnívoros y amplia distribución en lagunas, arroyos y ríos del país, donde las ranas nativas también podrían ser presas potenciales de esta especie. Su talla muestra un tamaño de moderado a grande (hasta 47 cm), presentando una boca ancha con pequeños dientes que podrían favorecer la muerte o el consumo de las larvas de rana toro; que pueden llegar a un largo de 13 a 18 cm (Vaz Ferreira, 1969, Gomes et al., 2000; Gomiero et al., 2007). Si bien existe poca información sobre la alimentación del bagre negro en ambientes naturales, se produce en Uruguay para su siembra y cultivo, por lo que la hace factible de ser aplicada en diferentes ambientes acuáticos y utilizada como control biológico sobre larvas de una especie invasora, como lo es la rana toro.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la depredación de larvas de la especie exótica invasora rana toro (*Aquarana catesbeiana*) y del anfibio nativo rana criolla (*Leptodactylus luctator*) por el pez *Rhamdia quelen* (bagre negro). Se determinó el potencial uso de esta especie de pez como control biológico para incorporarlo a la gestión de la bioinvasión de la rana toro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos utilizados

Predador: especie autóctona de pez *Rhamdia quelen* (Quoy y Gaimard, 1824) (bagre negro) (Figura 1A). Se alimenta principalmente de otros peces, caracoles, cangrejos e

invertebrados acuáticos en general (Winemiller, 1989) y de juveniles de zooplancton y zoobentos. A medida que crece incluye peces de mayor tamaño en su dieta. Preferentemente de hábitos nocturnos (Gomes et al., 2000; Gomiero, 2007), tolera un amplio rango de temperaturas (entre 7 y 33 °C), si bien su óptimo crecimiento lo realiza entre 15 y 23 °C (Lermen et al., 2004). La desventaja es su alta diversidad genética y posible presencia de especies crípticas (Ríos, 2018; Ríos et al., 2016); para introducir individuos en un nuevo ambiente se recomienda tener en cuenta el origen geográfico, no trasladando ejemplares de distintas cuencas hidrográficas como medida de precaución (Zarucki et al., 2021).

Presas: larvas de anfibios utilizadas. *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892), perteneciente a la familia Leptodactylidae, habita zonas templadas y cálidas de Sudamérica. Se usó dicha especie debido a que: 1) puede constituir una presa potencial por su amplia distribución en Uruguay (Maneyro y Langone, 2001); 2) es un anfibio grande y al igual que la rana toro presenta una longitud >10 cm entre hocico y cloaca (Frost, 2024); 3) durante las pruebas preliminares las larvas fueron aceptadas como presas.

La especie *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802), originaria de Norteamérica, es de la familia Ranidae, y presenta una longitud hocico-cloaca de 10 a 20 cm, y entre 60 y 900 gr de peso. Las larvas son muy grandes y permanecen hasta 2 años en la metamorfosis (Figura 1B y 1C).

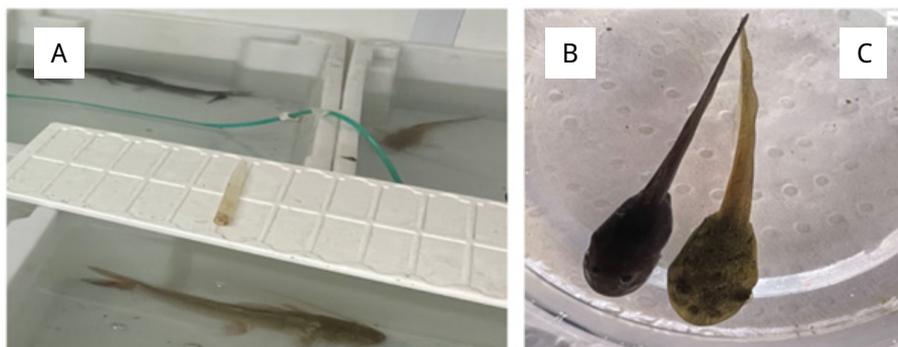


FIGURA 1. Organismos utilizados para el ensayo. Depredadores, **A:** peces autóctonos de bagre negro (*Rhamdia quelen*) y presas: **B:** larva de rana criolla (*Leptodactylus luctator*) y **C:** larva de rana toro (*Aquarana catesbeiana*).

Preparación y duración del ensayo de laboratorio

Colecta y acondicionamiento de animales: en mayo de 2022 se obtuvieron decenas de larvas de *L. luctator* a partir de desove artificial en el Laboratorio de vertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Udelar) (Maneyro, 2019). Las larvas se acondicionaron y mantuvieron en acuarios de 30 L, con una mezcla de agua del tajamar filtrada, y otra parte de la canilla declorada (aireada) que se dejó reposar un día. Para la colecta de anfibios se contó con el permiso de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (actual Dirección de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente) otorgado en el marco del Plan de erradicación de la rana toro, Canelones, Uruguay (Uruguay. Gobierno de Canelones, 2018). Se realizó de acuerdo con el Protocolo

Nº 1470 de colecta, experimentación y eutanasia para peces y anfibios (expediente 240012-000021-22) aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (Facultad de Ciencias, Udelar). Además, durante dicho mes se colectaron larvas de rana toro en tajamares invadidos en la localidad de Los Cerrillos (Iturburu et al., 2024), mediante redes de arrastre de 12 mm de tamaño de malla, 72 horas antes del inicio de los ensayos.

Las larvas se trasladaron y acondicionaron en acuarios de 30 L en el laboratorio de experimentación animal de la Facultad de Ciencias para su análisis. Se colocaron 15 juveniles de *R. quelen* en contenedores plásticos de 40 L (120 x 60 x 40 cm) con agua declorada y aireación durante el experimento (Figura 1). Los peces se obtuvieron de un criadero habilitado por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. La temperatura del aire del laboratorio se determinó mediante un Termómetro portátil TagTemp (novus) con registros cada 10 minutos; diariamente se determinaron los parámetros de calidad del agua mediante un multiparámetro *Horiba* (temperatura, conductividad, oxígeno disuelto y pH) en todos los acuarios utilizados (15) (Breijo y Domínguez, 2019).

Medición, y peso de presas y depredadores: previo al ensayo y en ambas especies de larvas se determinó la longitud (distancia hocico-base del tubo proctodeal) mediante una regla con una precisión de 0,1 cm y el peso de las larvas en una balanza (precisión 0,0001 g), al inicio y al final del experimento. Para ambas especies se utilizó el estadio pro-metamorfosis G1 (estadios 24-26), de acuerdo con la tabla de desarrollo normal de Gosner (1960), seleccionando larvas de igual talla y peso.

Experimentos de depredación

Las pruebas de depredación y selección de la presa se realizaron en forma simultánea, considerando un depredador por acuario. Las larvas de las dos especies se expusieron en forma simultánea a depredación por parte del bagre negro y se determinó el número de larvas consumidas por cada depredador en relación con el total de larvas ofertadas (Jara y Perotti, 2006), considerando un total de 15 acuarios (réplicas). El experimento de selección de presa y depredación registró 13 días de duración, con un período previo de 3 días de aclimatación sin alimentación y 10 días de ensayo. Se mantuvo un pez por acuario en las 15 réplicas consideradas. Día por medio se le ofrecieron dos larvas (una nativa y otra exótica) en forma simultánea a cada pez, y se registró el número de larvas consumidas; igualmente se revisaron los acuarios para reemplazar los animales no consumidos, muertos o restos, que fueron retirados y reemplazados por otras dos larvas. Al final de cada prueba, se registró si alguna de las larvas había sido consumida o rechazada. Se eliminaron los peces que murieron durante el experimento ($n = 3$) y se obtuvieron los resultados de 12 ejemplares durante los diez días de ensayo.

Análisis de datos

Se presentan los valores promedio \pm desvío estándar de los parámetros abióticos (aire y agua) determinados y las variables morfométricas (largo, peso) de las larvas y peces utilizados durante el experimento. En la descripción de los resultados del ensayo se utilizan frecuencias absolutas y en porcentaje. La hipótesis nula que se evaluó en este

trabajo fue que el pez *R. quelen* no presenta una preferencia por alguna de las especies presa ofrecidas, por tanto, consumirá con igual frecuencia larvas exóticas y nativas. Dado que la respuesta de consumo es binaria (si o no come) y se ofrecen dos tipos de presas simultáneamente al mismo conjunto de peces, las proporciones de consumo no son independientes y para su comparación se aplicó el test de McNemar (X^2_M) con su corrección por continuidad (Everitt, 1992). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Stata 18.0 y se consideró significativo el valor p menor o igual a 0,05.

RESULTADOS

Las condiciones ambientales y la alimentación fueron constantes durante todo el experimento. Durante el ensayo la temperatura del laboratorio mostró un promedio de 17,7 °C (± 2 , n = 1725), mientras que los parámetros fisicoquímicos del agua (total de parámetros n = 60) presentaron valores promedio de temperatura 17,1 ($\pm 0,9$) °C, pH 7,7 ($\pm 0,2$), conductividad 444,6 (± 13) $\mu\text{S cm}^{-1}$ y oxígeno disuelto 9,5 ($\pm 0,9$) mgL^{-1} . Las larvas de *L. lucatur* presentaron un peso promedio de 0,34 \pm 0,09 gr, mientras que para *A. catesbeiana* correspondieron a 0,74 \pm 0,18 gr. El largo total (LT) de las larvas (n = 120), considerando la distancia hocico-base del tubo proctodeal, mostró un rango de 10 a 20 mm. Los peces (12) de *R. quelen* presentaron un largo promedio de 21,0 ($\pm 2,6$) cm y un peso inicial promedio 91,6 ($\pm 43,3$) gr.

Se constató que las larvas de ambas especies (*L. lucatur* y *A. catesbeiana*) fueron depredadas por *R. quelen* (bagre negro), aunque la intensidad fue menor en las larvas exóticas y a medida que transcurrió el tiempo del experimento. Se ofertaron 120 larvas (60 nativas y 60 exóticas) a 12 ejemplares de *R. quelen*. Consumieron el 37,5 % (n = 45) de las ofertadas, con una preferencia (n = 42) de larvas de rana criolla (*L. lucatur*) frente a (n = 3) de larvas de rana toro (*A. catesbeiana*) (Tabla 1). De acuerdo con el test realizado, se observó una preferencia estadísticamente significativa por el consumo de la especie nativa, $X^2_M = 35,22$; valor-p < 0,0001 (Tabla 1).

TABLA 1. Distribución del consumo de larvas por día de alimentación, indicando frecuencia absoluta y porcentaje.

	Nativa	Exótica
Día 1	42 % (5/12)	8 % (1/12)
Día 3	58 % (7/12)	8 % (1/12)
Día 5	75 % (9/12)	0 % (0/12)
Día 7	100 % (12/12)	8 % (1/12)
Día 9	75 % (9/12)	0 % (0/12)
Total = 10 días (consumido/ofertado)	70 % (42/60)	5 % (3/60)

DISCUSIÓN

El ensayo de laboratorio realizado reflejó que *R. quelen* depredó un mayor porcentaje de los primeros estadios de larvas de especies de anuros nativos (70 %) que exóticos

(5 %). Diversos estudios indican que los depredadores alteran sus preferencias de presa cuando cambia la disponibilidad de alimentos o forrajeo óptimo (Stephens y Krebs, 1986); además, las presas pueden alterar su comportamiento ante el aumento de depredadores (Sih 1987; Lima y Dill, 1990). Igualmente, los cambios en las condiciones ambientales provocan cambios en el comportamiento de los predadores y presas (Ives y Dobson, 1987; Robinson y Wilson, 1998). En el presente estudio se mantuvieron estables las condiciones ambientales, se utilizaron los mismos peces durante los 13 días (10+3 aclimatación) del ensayo y el suministro de alimento fue constante.

Mecanismos de larvas de anfibios contra la depredación

Los anfibios han desarrollado diferentes estrategias para protegerse de los depredadores. Por lo general, la primera defensa es permanecer inmóviles y pasar desapercibidos; por eso muchos presentan una coloración de camuflaje que los confunde. Si este mecanismo falla, utilizan los saltos de escape (rápidos y ágiles). Por otro lado, en algunas ranas, la presencia de sustancias tóxicas en la piel les permite disuadir a los depredadores (Moreno et al., 2020). Un mecanismo de protección contra la depredación desarrollado por las larvas de los anfibios es el sabor desagradable (Peterson y Blaustein, 1991; Stebbins y Cohen, 1995). Los anfibios con dietas especializadas como, por ejemplo, el sapito oval (*Elachistocleis bicolor*) y el sapito de jardín (*Rhinella dorbignyi*) (Achaval y Olmos, 1997), se exponen más a sus depredadores que los de dietas generalistas (como es el caso de la rana toro) durante la búsqueda de alimento, teniendo como principal estrategia la defensa química (Achaval y Olmos, 1997; Maneyro y Carreira, 2006).

Las larvas de *A. catesbeiana* en sus diferentes estadios de desarrollo se catalogan como desagradables (Kats et al., 1988; Werner y McPeck, 1994), ya que los renacuajos no son apetecibles para su consumo por peces (Szuroczki y Richardson, 2011). Esto parecería ser la razón del bajo consumo de larvas exóticas por *R. quelen* y es lo que ha demostrado el desarrollo del presente ensayo de laboratorio. Un estudio basado únicamente en el sabor de la piel evidenció que los renacuajos de *A. catesbeiana* son desagradables para el pez luna (*Lepomis spp.*) (Kats et al., 1988). Además, mostró una clara variedad de preferencias de este pez entre larvas de anuros *A. catesbeiana*, *Lithobates clamitans* (rana verde) y *L. sylvaticus* (rana de madera).

Otros estudios muestran que es un ítem alimenticio para peces lucios (*Esox lucius*) o lubina negra (*Micropterus salmoides*), que depredan directamente sus renacuajos (Louette, 2012; Kruse y Francis, 1977). Los peces evitan a *A. catesbeiana* y *Bufo spp.* porque son desagradables (Werner y McPeck, 1994). Por otro lado, se sugiere que especies del género *Rhinella* desarrollan toxinas que las protegen de la depredación (Skelly y Werner, 1990; Anholt et al., 1996; Kiesecker et al., 1996; Jara y Perotti, 2006). Esto se puede deber a la presencia de bufoteninas, toxina descrita en otros representantes de la familia Bufonidae (Lawler y Hero, 1997; Crossland y Alford, 1998).

En el presente ensayo se encontró que *R. quelen* consumió las larvas de estadios tempranos de *A. catesbeiana*, aunque en una frecuencia muy baja. Por los resultados encontrados y ante una oferta conjunta parecería que el consumo de larvas exóticas fue de manera ocasional. La biomanipulación mediante la introducción de peces nativos puede tener impacto en individuos de rana toro y se han demostrado niveles

significativamente reducidos de larvas en menos de dos años, en estanques donde se introdujo la especie *Esox lucius* (pez lucio) (Louette, 2012). En el presente ensayo, al ofrecer dos larvas (una nativa y una exótica) en forma simultánea a cada pez, se observó que el consumo de larvas nativas aumentó a medida que transcurría el tiempo del ensayo. Esto sugiere una preferencia del bagre negro por las larvas de la rana criolla (*L. lucator*) más que por la especie exótica ofrecida. También se comprobó que consumió larvas de rana toro de primeros estadios de desarrollo (pro-metamorfosis G1, 24-26, Gosner) los dos primeros días, y luego prefirió las larvas nativas. Se sugiere que para el uso de *R. quelen* como control biológico en tajamares debería complementarse este estudio con experimentos en condiciones de campo que pueden mostrar resultados diferentes.

Relación entre tamaños de presa y depredador

El riesgo de depredación de las larvas de anfibios está influenciado por el tamaño de los depredadores (Travis et al., 1985). A medida que crecen, tanto el tamaño corporal como el de la boca de los peces carnívoros aumenta (Nilsson y Bronmark, 2000; Dorner y Wagner, 2003), y esto se relaciona positivamente con el tamaño de las presas (Duarte et al., 2007). En este sentido, se debe considerar el tamaño de los peces para depredar larvas de rana toro, con un máximo de 15 a 18 cm de longitud (López y Grassi, 2019), dado el estrecho vínculo entre la longitud del depredador y la longitud de la presa (Ibáñez et al., 2004, Ibáñez, 2005).

Por otro lado, para utilizar larvas de una presa alternativa de igual tamaño se seleccionaron larvas de la rana criolla, una de las ranas nativas de mayor tamaño de Uruguay, porque estadios mayores de las larvas de *A. catesbeiana* ya no eran comparables. En el presente estudio se eliminó el efecto de la diferencia en el tamaño de las presas ofrecidas, considerándose larvas de similar tamaño y peso. Al considerar a *R. quelen* como control biológico, debe tenerse en cuenta la talla adecuada de los peces a incluir que se asocia, al igual que la boca, con el tamaño de las presas. Dicha especie presentó un largo total entre 17,9 y 24 cm y pesos de entre 50,7 y 209,6 gr, consumió larvas de 1 a 2 cm de LT y pesos entre 0,24 a 0,42 gr para nativas y 0,51 a 0,91 gr para exóticas.

La biomanipulación de cuerpos de agua a realizarse con la presencia de rana toro debería ser particular para cada tajamar y de acuerdo con la etapa del proceso de invasión en la que se encuentre esta especie exótica invasora en dicho sistema. En una etapa inicial de invasión donde se reporta la presencia de otras especies de anfibios, el bagre negro no serviría para su control, ya que eliminaría las larvas nativas. Sin embargo, podría ser considerado como alternativa en etapas avanzadas de la bioinvasión, en cuerpos de agua muy invadidos donde la rana toro está bien establecida y no se reporta la presencia de anfibios nativos. Estas acciones permitirían integrar el control biológico al manejo de la rana toro en establecimientos productivos del país, donde no se puede prescindir del agua, como son los casos de predios frutícolas invadidos en Canelones (Iturburu et al., 2024).

La variación ontogénica afecta la depredación

Las glándulas responsables del sabor desagradable de los anfibios generalmente no están presentes en la etapa larval o se desarrollan al final de este período, justo antes de la metamorfosis (Formanowicz y Brodie, 1982; Zug et al., 2001). La variación ontogénica de los renacuajos afecta la depredación de anfibios como *Bufo spinulosus* (Jara y Perotti, 2006). Dichos autores encontraron que los renacuajos de los primeros estadios de desarrollo (estadios 24-26 y 32-34) no fueron palatables, mientras que los estadios 38-40 y 42-45 fueron progresivamente palatables. Para *A. catesbeiana* (Krusey y Francis, 1977) se encontró que los peces no consumieron los estadios de desarrollo larval 25-40 de Gosner (Gosner, 1960). Para evaluar el uso del bagre negro como controlador biológico, se recomienda evaluar otros estadios de desarrollo de Gosner más avanzados (ej. 32-34, 38-40, 42-45), que no fueron considerados en este trabajo.

CONCLUSIONES

En el presente ensayo experimental se constató la depredación por *R. quelen* de larvas de anuros autóctonos (*L. lucator*), y ocasionalmente de larvas de anuros exóticos invasores de *A. catesbeiana*. *Rhamdia quelen* consumió larvas en estadios tempranos de desarrollo, 24-26 de Gosner (1960), y presentó una mayor preferencia por las larvas de la especie nativa frente a las exóticas en función del tiempo del ensayo de laboratorio.

Se sugiere realizar experimentos de campo para apoyar esta conclusión, así como evaluar otros factores del complejo presa-predador que pueden influir en el diseño de nuevos ensayos de experimentación o el uso potencial de *R. quelen* como controlador biológico de la rana toro. Entre dichos factores destacan el ambiente invadido, la relación del tamaño presa-predador, el estadio de desarrollo de las presas, la presencia de toxinas y otras defensas antidepredatorias en larvas de anfibios. También es necesario considerar la preferencia por larvas de otros anuros nativos que coexisten con la rana toro y evaluar otros posibles peces nativos predadores como potenciales biocontroladores de la rana toro (por ejemplo, "cabeza amarga" *Crenicichla sp.* o "tarariras" *Hoplias sp.*).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible por la colaboración de distintos colegas y el apoyo de la partida de Dedicación Total del programa de la Comisión Sectorial de Investigación Científica de Udelar de Ernesto Brugnoli y José Carlos Guerrero. El ensayo cumple con el Protocolo CEUA N° 1470, que contó con el seguimiento de Franco Teixeira de Mello. A los investigadores de Facultad de Ciencias Raúl Maneyro, Ernesto Elgue, Gisela Pereira, Diego Lecari y Bettina Tassino. A Jorge da Silveira, Alejandro Méndez, Juan C. Gambarotta, Piero Candoni y Claudia Turra. Brugnoli y Guerrero agradecen al PEDECIBA y SNI-ANII. El presente trabajo forma parte de la tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales (Facultad de Ciencias, Udelar) del primer autor.

REFERENCIAS

- Achaval, F. y Olmos, A., 1997. *Anfibios y reptiles del Uruguay*. Montevideo: Barreiro y Ramos. (Serie Fauna, 1).
- Adriaens, T.; Brys, R.; Half Maerten, D. y Devisscher, S., 2019. *Information on measures and costs related to the Union-listed species Lithobates catesbeianus. Technical note prepared by IUCN for the European Commission*. Gland: IUCN.
- Aguilar, K.V., 2012. Introducción de la rana toro *Lithobates catesbeiana*: implicaciones para la biodiversidad ecuatoriana [En línea]. En: *CEDAMAZ*, 2(1). [Consulta: 10 de Agosto de 2023]. Disponible en: <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/102>
- Alford, R. A. y S.J. Richards. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology [En línea]. En: *Annual Review of Ecology and Systematics*, (30), pp. 133-165. [Consulta: 20 de Agosto de 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/StephenRichards4/publication/222712022_Global_Amphibian_Declines_A_Problem_in_Applied_Ecology/links/54643cc60cf2cb7e9da9a721/Global-Amphibian-Declines-A-Problem-in-Applied-Ecology.pdf
- Anholt, R. R.; Lyman, R. F. y Mackay, T. F., 1996. Effects of single P-element insertions on olfactory behavior in *Drosophila melanogaster* [En línea]. En: *Genetics*, 143(1), pp. 293-301. [Consulta: 10 de Agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1207262/pdf/ge1431293.pdf>
- Bissattini, A. M.; Buono, V. y Vignoli, L., 2019. Disentangling the trophic interactions between American bullfrogs and native anurans: Complications resulting from post-metamorphic ontogenetic niche shifts. En: *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(2), pp. 270-281. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.3023>
- Breijo, M. y Domínguez, L., 2019. Principios rectores asociados a la experimentación con animales vertebrados. La realidad en Uruguay y sus regulaciones. En: Teixeira de Mello, Franco, ed. *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay*. Montevideo: CSIC, Comisión Honoraria de Experimentación Animal. pp. 19-26. [Consulta: 15 de Agosto de 2023]. Disponible en: https://www.chea.edu.uy/sites/chea/files/libro_experimentacion_con_animales_no_tradicionales_en_uruguay.pdf
- Brühl, C.A.; Schmidt, T.; Pieper, S.; Alscher, A.; Stuart, S.N.; Pounds, J. A.; Burkhardt, J.G., 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? En: *Scientific Reports*, 3, pp. 1783-1786. [Consulta: 22 de Febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep01135>
- Capdevila-Argüelles, L.; Zilletti, B. y Suárez-Álvarez, V. Á., 2013. Causas de la pérdida de biodiversidad: especies exóticas invasoras. En: *Memorias Real Sociedad Española de Historia Natural*, 2ª época, 10, pp. 55-75.
- Carreira, S. y Maneyro, R., 2019. *Libro rojo de anfibios y reptiles del Uruguay. Biología y conservación de anfibios y reptiles en peligro de extinción a nivel nacional*. Montevideo: Dinama.
- Carreira, S. y Maneyro, R., 2015. *Lista roja de los anfibios y reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)*. Montevideo: Dinama.
- Cordovez, C. A. C.; Herrera-González, I. T.; Amén, B. A. E.; Ochoa, K. A. R. y García, W. A. B., 2021. Composición dietética de especímenes adultos de la especie invasora *Lithobates*

- catesbeianus* (Shaw, 1804) en el Área Protegida Isla Santay, Ecuador.
En: *Investigación*, (16), pp. 42-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.31095/investigatio.2021.16.4>
- Crossland M.R. y Alford R.A., 1998. Evaluation of toxicity of eggs, hatchlings and tadpoles of the introduced toad *Bufo marinus* (Anura, Bufonidae) to native Australian aquatic predators. En: *Australian Journals of Ecology* 23 (2): pp. 129-137.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1998.tb00711.x>
- de Sá, R. O. 2005. Crisis global de biodiversidad: importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. En: *Agrociencia*, 9(1-2), 513. [Consulta: 10 de Abril de 2023].
Disponible en: <https://scholarship.richmond.edu/biology-faculty-publications/65/>
- Dorner, H. y Wagner, A., 2003. Size-dependent predator-prey relationships between perch and their fish prey. En: *Journal of Fish Biology*, 62, pp. 1021-1032.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00092.x>
- Duarte, F.; Ibáñez, C. M. y Chong, J., 2007. Cambios en la morfometría bucal y su relación con la dieta de *Thyrsites atun* (Euphrasen, 1791) en el centro-sur de Chile. [En línea]. En: *Revista Chilena de Historia Natural*, 80(4), pp. 407-417.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2007000400002>
- Everitt, B. S., 1992. *The analysis of contingency tables* [En línea]. 2a ed. Chapman and Hall. [Consulta: 12 de Abril de 2023]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=aSe1LbYz3v0C&oi=fnd&pg=PA11&dq=Everitt+1992&ots=HWjAJYEKs9&sig=6sDTc hitHzLZ1ZUaXiQz5flgAVY#v=onepage&q=Everitt%201992&f=false>
- Formanowicz Jr, D. R. y Brodie Jr, E. D., 1982. Relative palatability of members of a larval amphibian community [En línea]. En: *Copeia*, pp. 91-97.
DOI: <https://doi.org/10.2307/1444272>
- Frost, Darrel R., 2024. *Amphibian species of the world: an online reference* [En línea]. Version 6.2. New York: American Museum of Natural History. [Consulta: 12 de Junio 2024].
Disponible en: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>
- Gobel, N., 2013. Efectos comunitarios de la invasión de rana toro *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Cerro Largo [En línea]. Montevideo: Facultad de Ciencias, Udelar. (Tesis de Grado). [Consulta: 12 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1543/1/uy24-16726.pdf>
- Gomes, L. D. C.; Golombieski, J. I.; Gomes, A. R. C. y Baldisserotto, B., 2000. Biología do jundiá *Rhamdia quelen* (teleostei, pimelodidae). En: *Ciência Rural*, 30(1), pp. 179-185.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100029>
- Gomiero L. M.; Souza, U. P. y Braga, F. M. D. S., 2007. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque-Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. En: *Biota Neotropica*, 7(3), pp. 127-133.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300015>
- González, S., 2019. Libro rojo de los anfibios y reptiles del Uruguay. Biología y conservación de los anfibios y reptiles en peligro de extinción a nivel nacional de Santiago Carreira & Raúl Maneyro (Eds). DINAMA. Montevideo, Uruguay. 2019 [En línea]. En: *Educación en Ciencias Biológicas*, 4(1), pp. 42. [Consulta: 12 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://ojs.cfe.edu.uy/index.php/RevEdCsBiol/article/view/460>
- Gosner, K. L., 1960. Una tabla simplificada para clasificar embriones y larvas de anuros con notas sobre la identificación. En: *Herpetológica*, 16(3), pp. 183-190.

- Hirai, T., 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. En: *Ecological Research* 19 (4), pp. 375-380. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1703.2004.00647.x>
- Hirai, T., 2003. Reeves' pond turtle, *Chinemys reevesii*, eaten by exotic bullfrog, *Rana catesbeiana*. [En línea]. En: *Kansai Organization for Nature Conservation*, 25, pp. 3-5. [Consulta: 21 de Abril de 2023]. Disponible en: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698600012299648>
- Hoffmann, M.; Hilton-Taylor, C.; Angulo, A.; Böhm, M.; Brooks, T. M.; Butchart, S. H. y Veloso, A., 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. En: *Science*, 330(6010), pp. 1503-1509. DOI: 10.1126/ciencia.1194442
- Ibáñez, C.M., 2005. Relaciones morfométricas del draco rayado *Champscephalus gunnari* (Perciformes, Notothenioidei) y su presa el krill antártico *Euphausia superba* (Crustacea, Euphausiacea). En: *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* (Chile), 54, pp. 33-36. DOI: <https://doi.org/10.54830/bmnhn.v54.2005.279>
- Ibáñez, C.M.; González, C. y Cubillos, L., 2004. Dieta del pez espada *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, en aguas oceánicas de Chile central en invierno de 2003. En: *Investigaciones Marinas* (Chile), 32, pp. 113-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782004000200009>
- Iturburu, M.; Maneyro, R.; Elgue, E.; Brugnoli, E. y Guerrero, J. C., 2024. Eficiencia de técnicas de control de la bioinvasión de rã-touro (*Aquarana catesbeiana*) en área protegida e propiedades privadas (Canelones, Uruguay). En: *DELOS Desarrollo Local Sostenible*, 17(51), pp. 164-186. DOI: <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n51-009>
- Iturburu, M. y Mello, A. L., 2022. Comité de Especies Exóticas Invasoras de Uruguay: del diagnóstico a la acción, prioridades y desafíos de gestión [En línea]. En: Brazeiro, A.; Bresciano, D.; Brugnoli, E. y Iturburu, M. (eds). *Especies exóticas invasoras de Uruguay: distribución, impactos socioambientales y estrategias de gestión*. pp. 41-58. Montevideo: Retema, Udelar, CEEI-MA. [Consulta: 8 de Junio de 2023]. Disponible en: https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/CEEI_Invasiones%20Biologicas_WEB.pdf
- Iturburu, M., 2018. *Indicadores de presencia de especies exóticas invasoras prioritarias de Uruguay. Mapas con registros georeferenciados 2018*. Montevideo: CEEI, MVOTMA. ISBN 978-9915- 9331-3-9
- Ives, A. R. y Dobson, A. P., 1987. Antipredator behavior and the population dynamics of simple predator-prey systems. En: *The American Naturalist*, 130(3), pp. 431-447. DOI: <https://doi.org/10.1086/284719>
- Jara, F. G. y Perotti, M. G., 2006. Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* Philippi, 1902 (Anura: Bufonidae) [En línea]. En: *Cuadernos de Herpetología*, 19. [Consulta: 10 de Junio de 2023]. Disponible en: <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6431>
- Kats, L. B., Petranks, J. W. y Shih, A., 1988. Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. En: *Ecology*, 69(6), pp. 1865-1870. DOI: <https://doi.org/10.2307/1941163>
- Kiesecker, J. M.; Chivers, D. P. y Blaustein, A. R., 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. En: *Animal Behaviour*, 52(6), pp. 1237-1245. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0271>

- Kirkpatrick, R. D., 1982. *Rana catesbeiana* (Bullfrog) Food [En línea]. En: *Herpetological Review*, 13, 17. [Consulta: 30 de Mayo de 2024].
Disponible en: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950399825985792>
- Kruse, K.C. y Francis, M.G., 1977. A predation deterrent in larvae of the bullfrog, *Rana catesbeiana* [En línea]. En: *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3), pp. 248-252. DOI: [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1977\)106<248:APDILO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1977)106<248:APDILO>2.0.CO;2)
- Laufer, G.; Gobel, N.; Kacevas, N. y Lado, I., 2023. American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) distribution, impact on native amphibians and management priorities in San Carlos, Uruguay. En: *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (424), 20. DOI: <https://doi.org/10.1051/kmae/2023016>
- Laufer, G.; Gobel, N.; Berazategui, M.; Zarucki, M.; Cortizas, S.; Soutullo, A. y De Sa, R. O., 2021. American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) diet in Uruguay compared with other invasive populations in Southern South America [En línea]. En: *North-Western Journal of Zoology*, 17(1), e211502. [Consulta: 9 de Mayo de 2023]. Disponible en: <https://scholarship.richmond.edu/biology-faculty-publications/231/>
- Laufer, G.; Gobel, N.; Kacevas, N. y Lado, I., 2018. Una nueva población feral de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) en Uruguay, encontrada con participación ciudadana. En: *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 1(2), pp. 47-50. DOI: <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2018.2.23>
- Laufer, G. y Gobel, N., 2017. Habitat degradation and biological invasions as a cause of amphibian richness loss: a case report in Aceguá, Cerro Largo, Uruguay. En: *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 16(2), pp. 289-293. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v16i2p289-293>
- Laufer, G.; Arim, M. y Loureiro, M., 2009. *Informe de dos nuevas poblaciones invasoras de Rana Toro en Uruguay*. Informe técnico enviado a la Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo. Montevideo: DINAMA.
- Laufer, G.; Canavero, A.; Núñez, D. y Maneyro, R., 2008. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay [En línea]. En: *Biol Invasions*, 10, pp. 1183-1189. [Consulta: 30 de Mayo de 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gabriel-Laufer/publication/226801221_Bullfrog_Lithobates_catesbeianus_invasion_in_Uruguay/links/00b4953552f3659d10000000/Bullfrog-Lithobates-catesbeianus-invasion-in-Uruguay.pdf
- Lawler, K. L. y Hero, J. M., 1997. Palatability of *Bufo marinus* tadpoles to a predatory fish decreases with development. En: *Wildlife Research*, 24(3), pp. 327-334. DOI: <https://doi.org/10.1071/WR96089>
- Leivas, P.T.; Leivas F. W.T. y Moura, M.O., 2012. Diet and trophic niche of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura). En: *Zoología*, 29, pp. 405-412. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702012000500003>
- Lermen, C. L.; Lappe, R.; Crestani, M.; Vieira, V. P.; Gioda, C. R.; Schetinger, M.R.C.; Baldisse-Rotto, B.; Moraes, G.; Morsch, V. M., 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. En: *Aquacultura*, 239(1-4), pp. 497- 507. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.021>

- Lima, S. L. y Dill, L. M., 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. En: *Canadian Journal of Zoology*, 68(4), pp. 619-640.
DOI: <https://doi.org/10.1139/z90-092>
- López, C. A. y Grassi, E., 2019. Presencia de poblaciones ferales de rana toro (*Rana catesbeiana*) en la zona de amortiguamiento oriental del Parque Nacional Iguazú, Argentina. En: *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 28(2), pp. 87-9.
DOI: <https://doi.org/10.26462/28.2.5>
- López-Flores, M.; Cruz-Burgos, J. A. y Vilella, F. J., 2003. Predation of a white-cheeked pintail (*Anas bahamensis*) duckling by a bullfrog (*Rana catesbeiana*) [En línea]. En: *Caribbean Journal of Science 2*, pp. 240-242. [Consulta: 30 de Mayo de 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/FranciscoVilella/publication/242328515_Predation_of_a_White-cheeked_Pintail_Anas_bahamensis_Duckling_by_a_Bullfrog_Rana_catesbeiana/links/00b495384b03b7b53b000000/Predation-of-a-White-cheeked-Pintail-Anas-bahamensis-Duckling-by-a-Bullfrog-Rana-catesbeiana.pdf
- Louette, G., 2012. Use of a native predator for the control of an invasive amphibian. En: *Wildlife Research*, 39(3), pp. 271-278. DOI: <https://doi.org/10.1071/WR11125>
- Lowe, S.; Browne, M.; Boudjelas, S. y De Poorter, M., 2000. *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database* (Vol. 12). Auckland: Invasive Species Specialist Group.
- Mack, R.N.; Simberloff, D.; Mark Lonsdale, W.; Evans, H.; Clout, M. y Bazzaz, F.A., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, y control. En: *Ecological Applications*, 10(3), 689-710.
- Maneyro, R., 2019. Colecta y manejo de anfibios en el ambiente. Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay. En: Teixeira de Mello, Franco, ed. *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay*. Montevideo: Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CSIC. pp. 71-79
- Maneyro, R. y Carreira, S., 2012. *Guía de anfibios del Uruguay (N.º 597.809895 MANg)*. Montevideo: Ediciones de la Fuga.
- Maneyro, R. y Carreira, S., 2006. Herpetofauna de la costa uruguaya. En: Menafrá, R.; Rodríguez-Gallego, L.; Scarabino, F. y Conde, D., eds. *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre, pp. 233-246.
- Maneyro, R.; Laufer, G.; Núñez, D. y Canavero, A., 2005. Especies invasoras: primer registro de rana toro, *Rana catesbeiana* (Amphibia, Anura, Ranidae) en Uruguay. En: *Resúmenes de las VIII Jornadas de Zoología del Uruguay, Montevideo*, pp. 24-28.
- Maneyro, R. y Langone, J. A., 2001. Categorización de los anfibios de Uruguay [En línea]. En: *Cuadernos de Herpetología*, 15(2): pp. 107-118. [Consulta: 18 de enero de 2023]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6355>
- Mazzoni, R. y Carnevia, D., 1996. Análisis de la situación y perspectivas de la ranicultura en Uruguay. En: *Bol. I. I. P.* (13), pp. 5-19.
- McAlpine, D. F. y Dilworth, T. G., 1989. Microhabitat and prey size among three species of *Rana* (Anura: Ranidae) sympatric in eastern Canada. En: *Canadian Journal of Zoology*, 67(9), pp. 2244-2252. DOI: <https://doi.org/10.1139/z89-317>
- Moreno, J. S.; Rodríguez, J. J. J y García-Cardente, L., 2020. *Anfibios y reptiles de la Gran Senda de Málaga*. Málaga: Diputación de Málaga, Equipo Gran Senda de Málaga, Delegación de Medio Ambiente, Turismo Interior y Cambio Climático.

- Morales González, M. B., 2021. *Dieta de la rana toro Lithobates catesbeianus en Jalpan, Apapantilla, Puebla* [En línea]. Puebla: Benemérita Ciudad de Puebla. (Tesis de Licenciatura). [Consulta: 13 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/ea43caf7-c6e4-4907-932c-66f118bdbc56>
- Mueller, G.A.; Carpenter, J. y Thornbrugh, D., 2006. Bullfrog tadpole (*Rana catesbeiana*) and red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) predation on early life stages of endangered razorback sucker (*Xyrauchentexanus*). En: *The Southwestern Naturalist* 51(2), pp. 258-261. DOI: [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2006\)51\[258:BTRCAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2006)51[258:BTRCAR]2.0.CO;2)
- Nilsson P. A y Brónmark, C., 2000. Prey vulnerability to a gape-size limited predator: behavioural and morphological impacts on northern pike piscivore [En línea]. En: *Oikos*, 88, pp. 539-546. [Consulta: 15 de Mayo de 2024]. Disponible en: <http://www.nativefishlab.net/library/internalpdf/21274.pdf>
- Pagad, S.; Genovesi, P.; Carnevali, L.; Scalera, R. y Clout, M., 2015. *IUCN SSC Invasive Species Specialist Group: invasive alien species information management supporting practitioners, policy makers and decision takers* [En línea]. [Consulta: 28 de Julio de 2023]. Disponible en: https://researchspace.auckland.ac.nz/bitstream/handle/2292/33532/MBI_2015_Pagad_et_al_correctedproof.pdf?sequence=9
- Pearl, C.A.; Adams, M. J.; Buryand, R. B. y McCreary, B., 2004. Asymmetrical effects of introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) on native ranid frogs in Oregon. En: *Copeia*, pp. 11-20. DOI: <https://doi.org/10.1643/CE-03-010R2>
- Peterson, J.A. y Blaustein, A.R., 1991. Unpalatability in anuran larvae as a defense against natural salamander predators. En: *Ethology Ecology & Evolution*, 3(1), pp. 63-72. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.1991.9525389>
- Petranka, J. W., 1983. Fish predation: a factor affecting the spatial distribution of a stream-breeding salamander. En: *Copeia*, pp. 624-628. DOI: <https://doi.org/10.2307/1444326>
- Pyšek, P.; Hulme, P. E.; Simberloff, D.; Bacher, S.; Blackburn, T. M.; Carlton, J. T. y Richardson, D. M., 2020. Scientists' warning on invasive alien species. En: *Biological Reviews*, 95(6), pp. 1511-1534. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12627>
- Ríos, N., 2018. Caracterización genética del bagre negro *Rhamdia quelen* en cuencas de Uruguay [En línea]. Montevideo: UdelaR. (Tesis de Doctorado). [Consulta: 2 de Julio de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/30744>
- Ríos, N.; Bouza Fernández, M.C.; Gómez Pardo, M.B.; Gutiérrez, V.; Guerra Varela, J.; Martínez Portela, P. y García, G., 2016. Patrones de diferenciación genética en *Rhamdia quelen* en las cuencas de Uruguay [En línea]. En: *Journal of Basic & Applied Genetics*, 27(1). [Consulta: 2 de Julio de 2023]. Disponible en: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/26150/2016_bag_rios_patrones.pdf?sequence=1
- Robinson, B.W., y Wilson, D.S., 1998. Optimal foraging, specialization, and a solution to Liem's paradox. [En línea]. En: *The American Naturalist*, 151(3), 223-235. [Consulta: 09 de agosto de 2023]. Disponible en: https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=CwHNgXwAAAAJ&citation_for_view=CwHNgXwAAAAJ:d1gkVwhDpl0C
- Roy, H.; Pauchard, A.; Stoett, P.; Renard Truong, T.; Meyerson, L.; Bacher, S.; Galil, B.; Hulme, P.; Ikeda, T.; Sankaran, K.V.; McGeoch, M.; Nuñez, M.; Ordonez, A.; Rahlao, S.; Schwindt, E.; Seebens, H.; Sheppard, A.; Vandvik, V.; Aleksanyan, A.; Ansong, M.; August, T.; Blanchard, R.; Brugnoli, E., et al. (+65 autores), 2024. Curbing the major and growing

- threats from invasive alien species is urgent and achievable. En: *Nature, Ecology and Evolution*. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-024-02412-w>
- Ruibal, M. y Laufer, G., 2012. Bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Ranidae) tadpole diet: description and analysis for three invasive populations in Uruguay. [En línea]. En: *Amphib-Reptil*, 33, pp. 355-363. [Consulta: 25 de Mayo de 2023]. Disponible en: https://brill.com/view/journals/amre/33/3-4/article-p355_5.xml?ebody=citedby-89771
- Sih, A., 1987. Prey refuges and predator-prey stability. En: *Theoretical Population Biology*, 31(1), pp. 1-12. DOI: [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(87\)90019-0](https://doi.org/10.1016/0040-5809(87)90019-0)
- Skelly, D. K. y Werner, E. E., 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. En: *Ecology*, 71(6), pp. 2313-2322. DOI: <https://doi.org/10.2307/1938642>
- Sodhi, N. S.; Bickford, D.; Diesmos, A. C.; Lee, T. M.; Koh, L. P.; Brook, B. W. y Bradshaw, C. J., 2008. Measuring the meltdown: drivers of global amphibian extinction and decline. [En línea]. En: *PLOS ONE*, 3(2), e1636. [Consulta: 18 de Julio de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001636>
- Stebbins, R. C. y Cohen, N. W., 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton: Princeton University Press.
- Stephens, D. W. y Krebs, J.R., 1986. *Foraging theory* (Vol. 1). Princeton: Princeton University Press.
- Stuart, S. N.; Chanson, J. S.; Cox, N. A.; Young, B. E.; Rodrigues, A. S. L., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. En: *Ciencia*, 306, pp. 1783-1786. DOI: 10.1126/ciencia.110353
- Szuroczki, D. y Richardson, Jean M. L., 2011. Palatability of the larvae of three species of lithobates. En: *Herpetológica*, 67(3), pp. 213-221. DOI: 10.2307/41238997
- Teixeira de Mello, F.; González-Bergonzoni, I. y Loureiro, M., 2011. *Peces de agua dulce del Uruguay*. Montevideo: PPR-MGAP. 188 pp.
- Travis, J.; Keen, W. H. y Julianna, J., 1985. The role of relative body size in a predator-prey relationship between dragonfly naiads and larval anurans. En: *Oikos*, pp. 59-65. DOI: <https://doi.org/10.2307/3565222>
- Uruguay. Gobierno de Canelones, 2018. *CECOED trabaja en acciones para evitar la propagación de la rana toro* [En línea]. Canelones: Gobierno de Canelones. [Consulta: 15 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://imcanelones.gub.uy/es/noticias/cecoed-trabaja-en-acciones-para-evitar-la-propagación-de-la-rana-toro>
- Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2000. *Producciones alternativas: ranas, martineta y carpincho*. Montevideo: INIA. pp. 5-26.
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2008. *Estrategia General para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible Proyecto TCP/URU/3101* [En línea]. Montevideo: Dinara. [Consulta: 15 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/estrategia_de_desarrollo.pdf
- Vaz Ferreira, Raúl, 1969. *Peces del Uruguay*. Montevideo: Nuestra Tierra. (Nº 23).
- Werner, E. E. y McPeck, M. A., 1994. Direct and indirect effects of predators on the distribution on two anuran species along an environmental gradient. En: *Ecology*, 75, pp. 1368-1382. DOI: <https://doi.org/10.2307/1937461>

- Winemiller, K. O., 1989. Ontogenetic diet shifts and resource partitioning among piscivorous fishes in the Venezuelan Llanos. [En línea]. En: *Environmental Biology of Fishes*, 26, pp. 177-199. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00004815>
- Woodward, B. D., 1983. Predator-prey interactions and breeding-pond use of temporary-pond species in a desert anuran community. En: *Ecology*, pp. 1549-1555. DOI: <https://doi.org/10.2307/1937509>
- Zarucki, M.; Loureiro, M.; Díaz, D.; Serra, W. S. y Fabiano, G., 2021. Situación de las especies de peces exóticas e invasoras en Uruguay. En: Brazeiro, A., Bresciano, D.; Brugnoli, E. and Iturburu, M., eds. *Especies exóticas invasoras de Uruguay: distribución, impactos socioambientales y estrategias de gestión*. Montevideo: Retema-Udelar/CEEI, Ministerio de Ambiente. pp. 215-226.
- Zug, G. R.; Vitt, L. y Caldwell, J. P., 2001. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Cambridge: Academic Press.

Potencial probiótico de *Lactococcus lactis* GU967439 aislado de leche cruda: estudios *in vitro*

Probiotic potential of *Lactococcus lactis* GU967439 isolated from raw milk: an *in vitro* study

Potencial probiótico de *Lactococcus lactis* GU967439 aislado de leite cru: estudos *in vitro*

 CAMILA MOREIRA (1)(2)

 SILVANA CARRO (1)

(1) Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(2) Departamento de Producción Animal, IPAV, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, San José, Uruguay.

RECIBIDO: 27/11/2023 → APROBADO: 3/4/2024 ✉ camimorei22@gmail.com

RESUMEN

Las cepas probióticas nativas son elegidas para la producción de productos lácteos funcionales debido a que presentan ventajas tecnológicas. La selección preliminar se basa en ensayos *in vitro* que predicen su seguridad y propiedades funcionales. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* la sensibilidad a antibióticos, el pasaje por el tracto gastrointestinal y la actividad antimicrobiana de la cepa nativa *Lactococcus lactis* GU967439, aislada de leche cruda proveniente de una quesería artesanal de Colonia, Uruguay. Se utilizó a *L. lactis* ATCC N° 11454 como referencia. *L. lactis* GU967439 fue sensible a todos los antibióticos activos frente a Gram positivos. Además, fue resistente a la simulación del jugo gástrico a pH 3, pancreatina y bilis. El sobrenadante libre de células de *L. lactis* GU967439 inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT) y presentó mejor actividad que la cepa *L. lactis* ATCC N° 11454. Sin embargo, ninguna de las cepas inhibió a los microorganismos Gram negativos evaluados (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Estos resultados dan base a futuros trabajos que permitan continuar caracterizando el potencial probiótico de *L. lactis* GU967439.

Palabras clave: bacterias ácidolácticas, resistencia gastrointestinal, actividad antimicrobiana, bacteriocinas, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

Native probiotic strains are chosen for the production of functional dairy products due to their technological advantages. The preliminary selection of these strains is based on different *in vitro* tests that predict their safety and functional properties. This study aimed to evaluate *in vitro* antibiotic resistance, the effect of the passage through the gastrointestinal tract, and the antimicrobial activity of the native strain *Lactococcus lactis* GU967439 isolated from raw milk from a farm in Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay. *Lactococcus lactis* ATCC N° 11454, was used as reference. *L. lactis* GU967439 was susceptible to antibiotics against Gram positives. In addition, it was resistant to the simulation of gastric juice at pH 3, pancreatin and bile. The cell-free supernatant of *L. lactis* GU967439 presented *in vitro* activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT) and had better activity than *L. lactis* ATCC N° 11454. However, none of them inhibited Gram-negative indicators (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). These results allow for future studies to continue characterizing the probiotic potential of *L. lactis* GU967439.

Keywords: lactic acid bacteria, gastric resistance, antimicrobial activity, bacteriocins, antibiotic resistance.

RESUMO

As cepas probióticas nativas são escolhidas para a produção de derivados lácteos funcionais devido às vantagens tecnológicas que apresentam. A seleção preliminar é baseada em ensaios *in vitro* que predizem a sua segurança e também as propriedades funcionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a sensibilidade aos antibióticos, a passagem pelo trato gastrointestinal e a atividade antimicrobiana da cepa nativa *Lactococcus lactis* GU967439, isolada do leite cru proveniente de um estabelecimento artesanal em Colonia, Uruguai. *L. lactis* ATCC N° 11454 foi utilizada como referência. A cepa *L. lactis* GU967439 foi sensível a todos os antibióticos ativos contra microrganismos Gram-positivos. Além disso, foi resistente à simulação do suco gástrico em pH 3, pancreatina e bile. O sobrenadante livre de células de *L. lactis* GU967439 inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT) e mostrou melhor atividade do que a cepa N° 11454 de *L. lactis* ATCC, no entanto, nenhuma das cepas avaliadas apresentou atividade contra os microrganismos Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Esses resultados abrem caminho para estudos futuros que nos permitirão continuar a caracterizar o potencial probiótico de *L. lactis* GU967439.

Palavras-chave: bactérias lácticas, resistência gastrointestinal, atividade antimicrobiana, bacteriocinas, resistência a antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidad suficiente, ejercen efectos benéficos en la salud del hospedador. Para seleccionar estas cepas es necesario determinar su seguridad, características fisiológicas y efectos benéficos *in vitro* previos a la realización de ensayos *in vivo* (FAO y WHO, 2002). En relación con la seguridad de las bacterias candidatas a probióticos, uno de los principales criterios evaluados es la ausencia de resistencias adquiridas transferibles a antibióticos (Vizoso-Pinto et al., 2006).

La selección de bacterias nativas con propiedades tecnológicas y probióticas es fundamental para el desarrollo de productos lácteos funcionales. Desde el punto de vista tecnológico, las bacterias autóctonas (o nativas) presentan una fase de latencia de crecimiento más corta y son más eficientes acidificando la matriz, siendo de elección para la producción de alimentos fermentados (Torres et al., 2019). Los probióticos deben resistir a la presencia de enzimas en la cavidad oral, al pH ácido en el estómago y a la presencia de bilis en el duodeno (Kimoto-Nira et al., 2010) para llegar viables y en cantidad suficiente al intestino grueso, donde la mayoría de estos microorganismos desempeña su rol benéfico (Mainville et al., 2005). Entre los beneficios asociados a los probióticos se destaca el control de patógenos intestinales por la producción de compuestos antimicrobianos, entre ellos: ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (péptidos con capacidad antimicrobiana) (Stoyanova et al., 2012).

Las bacterias probióticas más utilizadas son *Lactobacillus spp.*, un género de bacterias ácidolácticas (BAL) y bifidobacterias. Las BAL se encuentran en ambientes muy nutritivos como la leche, la carne o los vegetales, y son los microorganismos más utilizados en el procesamiento de alimentos fermentados (Atanassova et al., 2003, Hladíková et al., 2012). Muchas investigaciones se han enfocado tanto en optimizar la participación de las BAL durante los procesos de elaboración como en ampliar sus aplicaciones utilizándolas como probióticos.

Lactococcus lactis, una de las BAL utilizadas en la elaboración de alimentos lácteos fermentados, posee actividad antimicrobiana y se ha sugerido su uso en la producción de alimentos funcionales (Zhou et al., 2010). Anteriormente, algunos autores comprobaron la actividad antilisterial *in vitro* y en quesos de *L. lactis* GU967439 aislada de leche cruda proveniente de una quesería artesanal de Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay (Fraga, et al., 2013, González-Revello et al., 2016). Para continuar caracterizando la cepa, el presente trabajo se propuso evaluar la resistencia a antibióticos, el efecto del pasaje por el tracto gastrointestinal y la actividad antimicrobiana *in vitro* de la cepa nativa de *L. lactis* GU967439.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se utilizó *L. lactis* GU967439 aislada de leche cruda proveniente de una quesería artesanal de Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay, y la cepa de referencia American Type Culture Collection (ATCC) N° 11454 de *L. lactis*.

Sensibilidad a antibióticos

Se determinó la sensibilidad a antibióticos siguiendo el método de difusión de Kirby-Bauer con modificaciones propuestas por Ture y Boran (2015). Se suspendieron colonias aisladas de cultivos frescos de *L. lactis* en diluyente estéril (NaCl 0,85%) para lograr una turbidez similar a 0,5 de la escala Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente). Las suspensiones fueron inoculadas con hisopos estériles en placas que contenían Müller-Hinton agar (HiMedia®, India). Posteriormente, se depositaron discos con antibiótico (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) utilizando pinzas estériles, y se incubaron en estufa a 30 °C en aerobiosis, durante 24 horas. Los discos utilizados contenían uno de los siguientes antibióticos (microgramos/disco): penicilina (10 U), ampicilina (10 µg), piperacilina (100 µg), carbenicilina (100 µg), amoxicilina y clavulánico (30 µg), cefalotina (30 µg), cefradina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefoperazona (75 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), teicoplanina (30 µg), ampicilina (30 µg), gentamicina (120 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg), estreptomina (10 µg), tobramicina (10 µg), telitromicina (15 µg), doxiciclina (30 µg), linezolid (30 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), ácido nalidixílico (30 µg), moxifloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), pefloxacina (5 µg), colistin (10 µg), eritromicina (5 µg), vancomicina (5 µg) y tetraciclina (30 µg).

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición en milímetros, incluyendo el diámetro de los discos de antibióticos, y se clasificaron en resistentes, moderadamente sensibles y sensibles, según Charteris et al. (1998a), Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009), Cetinkaya et al. (2012), Khemariya et al. (2013), Haghshenas et al. (2014), y Ture y Boran (2015).

Resistencia a la simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal

Resistencia a jugos gástricos y pancreáticos

La tolerancia a los jugos gástricos y pancreáticos se testeó de acuerdo a la metodología propuesta por Charteris et al. (1998b), con algunas modificaciones (Monteagudo-Mera et al., 2012). Se simuló el jugo gástrico suspendiendo pepsina porcina (Sigma, USA) en solución fisiológica salina (NaCl, 0,5%, p/v) a una concentración final de 3 g/L y se ajustó el pH a 2, 2,5 y 3 con HCl 5M. El jugo pancreático se preparó suspendiendo pancreatina en una solución salina estéril (0,5% NaCl, p/v) a una concentración final de 1 g/L y ajustando el pH a 8,0 con NaOH 5M.

Se obtuvieron cultivos *overnight* (concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL) de *L. lactis* en caldo MRS (HiMedia®, India), y se tomaron alícuotas de 1,0 mL en tubos tipo *eppendorf* estériles, que fueron centrifugados (10000 RPM, 10 minutos, 4 °C) y lavados 2 veces con PBS (10 Mm, pH 7). Los *pellets* de células fueron resuspendidos en 0,3 mL de NaCl (0,5% p/v) y adicionados con 1 mL de solución gástrica o pancreática, y luego incubados en baño María a 37 °C durante 120 y 240 minutos respectivamente.

Se realizaron recuentos de células viables en MRS agar (HiMedia®, India) de los cultivos *overnight* y posterior a la incubación. Finalmente, se determinó la tasa de supervivencia de *L. lactis* luego de la incubación a pH 2, 2,5 y 3 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \log \text{ UFC final} / \log \text{ UFC inicial} \times 100 \quad (1)$$

Tolerancia a las sales biliares

Para evaluar la tolerancia a las sales biliares se utilizó el método propuesto por Maragkoudakis et al. (2006). Se obtuvieron cultivos *overnight* que fueron centrifugados y lavados de la misma manera que para el ensayo anterior, y luego resuspendidos en 5 mL de caldo MRS (HiMedia®, India) suplementado con bilis bovina al 0,3% para obtener una concentración aproximada de 2×10^7 UFC/mL. La suspensión se incubó a baño María a 37 °C por 240 minutos. Se tomaron alícuotas (0,1 mL) de cada cultivo previo a la incubación y luego de la misma para realizar recuento de células viables en MRS agar (HiMedia®, India), y se calculó la tasa de supervivencia.

Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana se evaluó mediante el método *Agar well diffusion* (Fraga, 2008) frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Streptococcus bovis* 2.5 (WT), *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Para ello, se utilizaron 25 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, HiMedia®, India) para *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, caldo BHI suplementado con 0,6% (p/v) de extracto de levadura para *L. innocua* y caldo MRS para *S. bovis*, adicionados de agar al 0,8%. Los medios fundidos y atemperados a 45 °C fueron inoculados con cultivos *overnight* de los microorganismos indicadores, obteniendo una concentración final aproximada de 10^6 UFC/mL y dispuestos en placas de Petri que contenían cilindros metálicos de 10 mm. Una vez solidificado el medio de cultivo, se retiraron los cilindros quedando en su lugar pocillos que fueron inoculados con 100 µl de diluciones seriadas ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, etc.), con solución buffer fosfato estéril (PBS, 10 Mm pH 7) del sobrenadante libre de células (SLC) de *L. lactis*.

El SLC se obtuvo de la siguiente manera: a partir de un cultivo *overnight* de *L. lactis* en caldo MRS, se inoculó un matraz que contenía 100 mL de caldo MRS para obtener una concentración aproximada de 1×10^3 UFC/mL y se incubó a 30 °C durante 11 horas en aerobiosis. Se determinó el recuento de *L. lactis* tras la incubación mediante siembra de gotas en superficie en MRS agar, y se incubaron a 30 °C, durante 24 horas en microaerofilia. Posteriormente, se obtuvieron alícuotas de 1,5 mL en tubos tipo *ependorf* estériles y fueron tratados con ondas de ultrasonido (Jeken®, Digital Ultrasonic Cleaner PS-06^a, 50W, 40 kHz, 160 segundos) para favorecer la liberación de bacteriocinas adsorbidas a las células productoras (Rodríguez, 2016). Por último, el SLC se obtuvo centrifugando los cultivos a 10000 RPM durante 15 minutos a 4 °C y se ajustó a pH 6 con

NaOH 1M para eliminar el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos. Se utilizó 100 µL de Nisina (Nisaplin®, Danisco) en una concentración de 100 mg/mL como control positivo y 100 µL de MRS ajustado a pH 6 con NaOH 1M como control negativo. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37 °C durante 24 horas y la producción de bacteriocinas se expresó en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL), definidas como el inverso de la dilución más alta que presentó halo de inhibición de crecimiento (Schillinger y Lucke, 1991).

Análisis estadísticos

La resistencia al jugo gástrico a pH 2, 2,5 y 3 se analizó mediante el test de Student de 2 colas y la resistencia a la pancreatina y bilis se analizó utilizando el test de Welch. La actividad antimicrobiana de *L. lactis* GU967439 y ATCC N° 11454 se comparó mediante el test de Mann Whitney. Los análisis fueron realizados utilizando el software Rstudio (versión 4.3.2). Para todos los casos se utilizó $\alpha = 0.05$, y los ensayos se realizaron por triplicado de forma independiente.

RESULTADOS

Sensibilidad a antibióticos

L. lactis ATCC N° 11454 y GU967439 fueron sensibles a todos los antibióticos activos frente a microorganismos Gram positivos y fueron resistentes al ácido nalidixílico, colistina, estreptomina y aztreonam.

Resistencia a la simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal

En la Tabla 1 se observa el efecto de la simulación de los jugos gástricos a distintos valores de pH (3, 2,5 y 2) en el recuento de células viables (expresado como log₁₀UFC), la tasa supervivencia y la comparación entre los recuentos iniciales y finales tras 120 minutos de incubación de las cepas de *L. lactis*.

TABLA 1. Supervivencia de *L. lactis* a la simulación del jugo gástrico a pH 3, 2,5 y 2 durante 120 min (n = 3, ± DE).

	Tolerancia a la simulación del jugo gástrico (pepsina 3 g/L)		Tasa de supervivencia (%)
	t = 0 min	t = 120 min	
	pH 3		
GU967439	8,58 ± 1,01 ^a	9,10 ± 0,63 ^a	94,70 ± 3,55
ATCC N° 11454	9,29 ± 0,16 ^a	8,28 ± 0,43 ^a	89,08 ± 3,35
	pH 2,5		
GU967439	9,23 ± 0,45 ^a	5,09 ± 1,46 ^b	55,29 ± 16,66
ATCC N° 11454	7,48 ± 0,14 ^a	5,40 ± 0,01 ^b	72,32 ± 1,54
	pH 2		
GU967439	8,67 ± 0,06 ^a	3,90 ± 0,24 ^b	45,05 ± 2,55
ATCC N° 11454	7,73 ± 0,33 ^a	3,73 ± 0,68 ^b	48,15 ± 7,22

Valores representan la media de tres réplicas. ± Desvío estándar de la media. Valores con superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$, test de Welch).

Las cepas presentaron una reducción significativa de células viables en la simulación del jugo gástrico a valores de pH de 2 y 2,5; sin embargo, ambas mostraron células viables.

TABLA 2. Supervivencia de *L. lactis* a la simulación del jugo pancreático (pancreatina 1 g/L, pH = 8) durante 240 minutos (n = 3, ± DE).

	Tolerancia a la simulación del jugo pancreático (pancreatina 1 g/L, pH=8)		Tasa de supervivencia (%)
	t = 0 min	t = 240 min	
GU967439	8,66 ± 0,06 ^a	8,42 ± 0,33 ^a	97,11 ± 0,02
ATCC N° 11454	7,72 ± 0,32 ^a	7,48 ± 0,15 ^a	96,76 ± 0,14

Valores representan la media de tres réplicas. ± Desvío estándar de la media. Valores con superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$, test de Student de 2 colas).

TABLA 3. Supervivencia de *L. lactis* a la bilis bovina (0.3 %) durante 240 minutos (n = 3, ± DE).

	Tolerancia a la bilis (Bilis bovina 3 %)		Tasa de supervivencia (%)
	t = 0 min	t = 240 min	
GU967439	8,93 ± 0,26 ^a	8,45 ± 0,81 ^a	94,62 ± 8,72
ATCC N° 11454	7,01 ± 0,40 ^a	6,79 ± 0,48 ^a	96,85 ± 1,71

Valores representan la media de tres réplicas. ± Desvío estándar de la media. Valores con superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$, test de Student de 2 colas).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el recuento de células viables tras la incubación de *L. lactis* en presencia de pancreatina o bilis.

Actividad antimicrobiana

En la Tabla 4 se muestra la actividad inhibitoria del SLC de las cepas de *L. lactis* expresada como medianas de UA/mL frente a cada microorganismo indicador, y la comparación de la actividad entre las cepas de *L. lactis*.

TABLA 4. Actividad antimicrobiana del SLC en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) de *L. lactis* frente a microorganismos indicadores.

	Mediana de UA/mL	
	<i>L. lactis</i> GU967439	<i>L. lactis</i> ATCC N° 11454
Indicadores Gram +		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	320 ^a	20 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	320 ^a	10 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	160 ^a	0 ^b
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	640 ^a	80 ^b
<i>Streptococcus bovis</i> 2.5 (WT)	640 ^a	10 ^b
Indicadores Gram -		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	0

Valores con superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$, test de Mann Whitney).

El SLC de *L. lactis* GU967439 fue capaz de inhibir todos los microorganismos Gram positivos utilizados como indicadores y mostró mejor actividad que el de *L. lactis* ATCC N° 11454 ($p < 0.05$).

Por otro lado, ninguna de las cepas presentó actividad frente a los microorganismos Gram negativos utilizados como indicadores.

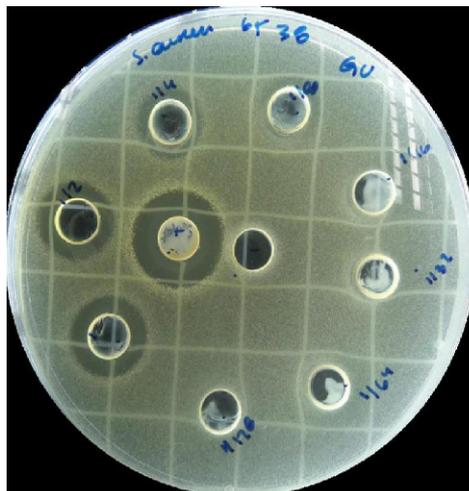


FIGURA 1. Resultado de la actividad antimicrobiana expresada en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) con halos de inhibición del SLC de *Lactococcus lactis* GU967439 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC N° 6538.

DISCUSIÓN

Sensibilidad a antibióticos

Las bacterias multirresistentes constituyen una amenaza emergente para el sistema alimentario. Las bacterias probióticas pueden participar en la transferencia de genes resistentes a antibióticos a la microbiota patógena o comensal del intestino, lo que incrementa la necesidad de evaluar la seguridad de los microorganismos utilizados (Selvin et al., 2020). La expresión del mismo patrón de sensibilidad en *L. lactis* GU967439 y ATCC 11454 sugiere que *L. lactis* GU967439 no adquirió elementos de resistencia a antibióticos.

Resistencia a la simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal

Las cepas bacterianas probióticas deben sobrevivir a condiciones desfavorables durante su pasaje por el tracto gastrointestinal para ser capaces de colonizar el colon y ejercer un efecto benéfico en la salud del consumidor/huésped (Dimitrellou et al., 2016). Particularmente, la resistencia al pH bajo (pH 1,5 - 3,0) del estómago es uno de los criterios más importantes en la selección de probióticos (Solieri et al., 2014). Narimani et al. (2015) clasificaron 144 cepas en 4 grupos de acuerdo con la tasa de supervivencia a pH 2,5 por tres horas en susceptible (Tasa de supervivencia <10%), moderadamente resistente (Tasa de supervivencia 10 - 60%), resistencia buena (Tasa de supervivencia

60 - 80%) y resistencia muy buena (Tasa de supervivencia >80%). De acuerdo a la clasificación mencionada, *L. lactis* GU967439 es clasificado como muy resistente a pH3 (Tasa de supervivencia 94,7%) y moderadamente resistente a pH 2,5 y 2 (Tasa de supervivencia 55,19% y 45,05% respectivamente). Sin embargo, no se conoce con exactitud si la resistencia a la simulación de las condiciones gástricas infiere de forma efectiva la tolerancia al ambiente gástrico *in vivo*.

Los alimentos funcionan como vehículos protectores de las cepas probióticas. Específicamente, los quesos presentan características que favorecen la viabilidad de estos microorganismos. Entre ellas se encuentran la disponibilidad de nutrientes, la formación de una matriz sólida de grasa y proteína con alta capacidad buffer, un bajo contenido de oxígeno y pH alto en comparación a otros productos lácteos (Rolim et al., 2020). Por lo anterior, posiblemente la viabilidad de *L. lactis* GU967439 se incremente aún más al ser administrado como parte de productos lácteos.

Asimismo, la habilidad de tolerar las enzimas pancreáticas presentes en el intestino delgado es otro criterio de selección de bacterias probióticas (Padmavathi et al., 2018). En el presente estudio, la presencia de pancreatina no redujo significativamente el recuento de *L. lactis* GU967439, por lo que no representaría una barrera para su viabilidad. Otro factor estresante al que se exponen los probióticos son las sales biliares que desorganizan las membranas celulares bacterianas (Ruiz et al., 2013). Tras la incubación durante 240 minutos de *L. lactis* GU967439 con bilis al 0,3%, no se encontraron diferencias significativas entre los recuentos iniciales y finales.

Actividad antimicrobiana

Lorenzo y Raffo (2015) demostraron la producción de diacetilo por *L. lactis* GU967439. Posteriormente, Rodríguez (2016) caracterizó el SLC y concluyó que la bacteriocina contenida posiblemente se trate de un lantibiótico distinto a la nisina. Más adelante, Hernández (2021) detectó mediante PCR la presencia del gen de la nisina en el genoma de *L. lactis* GU967439 y a su vez, el espectro de masas reveló una señal similar a la de la nisina Z. Por lo anterior, la mejor actividad antimicrobiana de *L. lactis* GU967439 es posible que se deba a que produce más de un compuesto con actividad antimicrobiana. Por otro lado, las bacteriocinas presentan una elevada actividad antimicrobiana frente a cepas relacionadas (Yongkiettrakul et al., 2019), lo que explicaría la ausencia de actividad frente a microorganismos Gram negativos testeados en este estudio.

CONCLUSIONES

La demanda creciente de nuevos alimentos funcionales lleva a la necesidad de caracterizar y seleccionar nuevas cepas probióticas. En el presente trabajo se demostró que *L. lactis* GU967439 posiblemente no adquirió elementos de resistencia a antibióticos de otras cepas, representando una cepa segura para su consumo. Además, presentó una tasa de supervivencia adecuada a la simulación del jugo gástrico a pH 3, y resistió la presencia de pancreatina y bilis. Asimismo, el SLC de *L. lactis* GU967439 exhibió actividad inhibitoria *in vitro* frente a un amplio rango de microorganismos Gram positivos utilizados como

indicadores y presentó mejor actividad que la cepa *L. lactis* ATCC N° 11454. Sin embargo, ni *L. lactis* ATCC N° 11454 ni *L. lactis* GU967439 presentaron actividad frente a los microorganismos Gram negativos empleados. Estos resultados dan lugar a futuros trabajos que permitan continuar caracterizando el potencial probiótico de *L. lactis* GU967439.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC), de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de la República.

REFERENCIAS

- Atanassova, M.; Choiset, Y.; Dalgalarrodo, M.; Chobert, J.; Dousset, X.; Ivanova, I. y Haertle, T., 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. En: *International Journal of Food Microbiology*, (87), pp. 63-73. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00054-0)
- Cetinkaya, F.; Coplu, C.; Simsek, H.; Mus, T.T. y Cibik, R., 2012. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus* isolated from Turkish raw milk cheeses. En: *Medycyna Wet*, (68), pp. 49-53.
- Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L. y Collins, J. K., 1998a. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. En: *Journal of food protection*, (61), pp. 1636-1643. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K., 1998b. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. En: *Journal of applied microbiology*, (84), pp. 759-768. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x>
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th International Supplement, M100-M519*. Pittsburgh: CLSI
- Dimitrellou, D.; Kandylis, P.; Petrovic, T.; Dimitrijevic-Brankovic, S.I.; Levic, S.; Nedovic, V. y Kourkoutas, Y., 2016. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. En: *LWT Food Science and Technology*, (71), pp. 169-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.007>
- FAO y WHO, 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Ontario: FAO y WHO.
- Fraga, M., 2008. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. En: *Antonie van Leeuwenhoek*; (93), pp. 71-78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9180-4>
- Fraga, M.; Perelmuter, K.; Giacaman, S. S.; Zunino, P. M. y Carro, S. B., 2013. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. En: *Food Science and Technology*, (33), pp. 801-804. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400029>

- González - Revello, Á.; Carro, S.; Cal, K.; Giacaman, S. y Aldrovandi, A., 2016. *Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo. En: *Innotec*, (12), pp. 15-26.
DOI: <https://doi.org/10.26461/12.02>
- Haghshenas, B.; Abdullah, N.; Nami, Y.; Radiah, D.; Roseli, R. y Khosroushahi, Y., 2014. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. En: *Anaerobe*, (30), pp. 51-59.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.009>
- Hernández, M., 2021. *Identificación y caracterización de una sustancia inhibidora tipo bacteriocina producida por una cepa nativa de Lactococcus lactis aislada de queserías artesanales*. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Ciencias. (Tesis de Grado).
- Hladíková, Z.; Smetankova, J.; Greif, G. y Greifova, M., 2012. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. En: *Acta Chimica Slovaca*, (5), pp. 80-85. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0013-3>
- Kimoto-Nira, H.; Suzuki, C.; Sasaki, K.; Kobayashi, M. y Mizumachi, K., 2010. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. En: *International Journal of Food Microbiology*, (143), pp. 226-229.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.033>
- Khemariya, P.; Singh, S.; Nath, G. y Gulati, A. K., 2013. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of nisC *Lactococcus lactis* from dairy and non-dairy sources. En: *Czech Journal of Food Sciences*, (31), pp. 323-331.
DOI: <https://doi.org/10.17221/316/2012-CJFS>
- Lorenzo, G. y Raffo, M., 2015. *Lactococcus lactis* nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua*. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. (Tesis de Grado).
- Mainville, I.; Arcand, Y. y Farnworth, E. R., 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. En: *International Journal of Food Microbiology*, (99), pp. 287-296.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020>
- Maragkoudakis, P. A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. y Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. En: *International Dairy Journal*, 16, pp. 189-199.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- Monteagudo-Mera, A.; Rodríguez-Aparicio, L.; Rúa, J.; Martínez- Blanco, H.; Navasa, N. y García-Armesto, M. R., 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. En: *Journal of Functional Foods*, (4), pp. 531-541. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>
- Narimani, T.; Tarinejad, A. y Hejazi, M. A., 2015. Isolation and biochemical and molecular identification of *Lactobacillus* bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Khoi city. En: *Journal of Food Science & Technology*, 12(48).
- Padmavathi, T.; Bhargavi, R.; Priyanka, P. R.; Niranjan, N. R. y Pavitra, P. V., 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial

- purification. En: *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, (16), pp. 357-362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>
- Rodríguez, I., 2016. *Implementación de una técnica de purificación de la/s bacteriocina/s producidas por Lactococcus lactis nativo*. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. (Tesis de Grado).
- Rolim, F. R.; Neto, O. C. F.; Oliveira, M. E. G.; Oliveira, C. J. y Queiroga, R. C., 2020. Cheeses as food matrixes for probiotics: in vitro and in vivo tests. En: *Trends in Food Science & Technology*, (100), pp. 138-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.008>
- Ruiz, L.; Margolles, A. y Sánchez, B., 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. En: *Frontiers in Microbiology*, (4), pp. 396. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
- Selvin, J.; Maity, D.; Sajayan, A. y Kiran, G. S., 2020. Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. En: *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, (22), pp. 202-205.
- Schillinger, U. y Lucke, F. 1991 El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. En: *Fleischwirtsch*, (1), pp. 35-40.
- Solieri, L.; Bianchi, A.; Mottolese, G.; Lemmetti, F. y Giudici, P., 2014. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. En: *Food Microbiology*, (38), pp. 240-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.003>
- Stoyanova, L. G.; Ustyugova, E. A. y Netrusov, A. I., 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. En: *Applied Biochemistry and Microbiology*, (48) pp. 229-243.
- Torres, S.; Fabersani, E.; Marquez, A. y Gauffin-Cano, P., 2019. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. En: *European Journal of Nutrition*, (58), pp. 27-43.
- Ture, M. y Boran, H., 2015. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: *Journal of Veterinary Research*, (59) pp. 37-42. DOI: <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0006>
- Vizoso-Pinto, M. G.; Franz, C. M.; Schillinger, U. y Holzapfel, W. H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human feces and traditional fermented products. En: *International Journal of Food Microbiology*, (109), pp.205-214. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>
- Yongkiettrakul, S.; Maneerat, K.; Arechanajan, B.; Malila, Y.; Srimanote P. y Gottschalk, M., 2019. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients. En: *Thailand. BMC Veterinary Research*, (15), pp. 1-12.
- Zhou, X.; Wang, Y.; Yao, J. y Li, W., 2010. Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). En: *International Journal of Engineering, Science And Technology*, (2), pp. 73-80.

Propiedades ópticas, comportamiento de flujo y dureza de geles basados en nanoemulsión

Optical properties, flow behavior and hardness of gels based on nanoemulsion

Propriedades ópticas, comportamento de fluxo e dureza de géis à base de nanoemulsão

 **CRISTÓBAL ROJAS PIZARRO** (1)

 **MATÍAS MENESES GARRIDO** (1)

 **KAREN VIELMA DOMÍNGUEZ** (1)

 **NATALIA RIQUELME HINOJOSA** (1)

 **CARLA ARANCIBIA AGUILAR** (1)

(1) Laboratorio de Investigación en Propiedades de los Alimentos (INPROAL), Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

RECIBIDO: 13/10/2023 → APROBADO: 29/12/2023  carla.arancibia@usach.cl

RESUMEN

Debido al aumento de la población mayor (> 60 años), la industria alimentaria tiene el desafío de diseñar alimentos para este grupo etario considerando los cambios deglutorios que ocurren producto del envejecimiento. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes mezclas de hidrocoloides en las propiedades físicas de geles basados en nanoemulsiones. Se prepararon 4 muestras utilizando una nanoemulsión base (194 nm) con diferentes mezclas de agentes gelificantes: 5,25 % APS-Aislado de proteína de soja o APL-Aislado de proteína de lactosuero y 0,75 % AG-Agar o CAR-*k*-carragenina. Los geles se caracterizaron según sus propiedades ópticas, de flujo y textura. Los resultados mostraron que todos los geles tuvieron una coloración amarilla-beige, especialmente aquellos con APL. Por otro lado, todos los geles presentaron una leve caída de la viscosidad en el tiempo, lo cual facilitaría su deglución debido a una baja fluidificación. Además, la dureza de los geles fue < 600 N/m², considerándose adecuada para las necesidades deglutorias de las personas mayores. En conclusión, el uso de mezclas de hidrocoloides permite obtener geles basados en nanoemulsiones con propiedades de flujo y texturales adecuadas para una deglución fácil

y segura, lo cual permitiría el desarrollo de alimentos adaptados a los requerimientos sensoriales de las personas mayores.

Palabras clave: agentes gelificantes, propiedades de flujo, textura.

ABSTRACT

Due to the increase in the elderly population (> 60 years), the food industry has as challenge to design foods for this population group, considering the swallowing changes that occur because of aging. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of different hydrocolloid mixtures on the physical properties of gels based on nanoemulsions. Four samples were prepared using a base nanoemulsion (194 nm) with different mixtures of gelling agents: 5.25 % APS-Soy Protein Isolate or APL-Whey Protein Isolate and 0.75 % AG-Agar or CAR-*k*-carrageenan. The gels were characterized according to their optical, flow, and texture properties. The results showed that all gels had a yellow-beige color, especially those with APL. On the other hand, all the gels showed a slight drop in viscosity over time, which would facilitate their swallowing due to low fluidization. Furthermore, the hardness of the gels was < 600 N/m², which is considered adequate for the swallowing needs of older people. In conclusion, using hydrocolloid mixtures allows us to obtain gels based on nanoemulsions with flow and textural characteristics suitable for easy and safe swallowing, enabling the development of foods adapted to the sensory requirements of older people.

Keywords: gelling agents, flow properties, texture.

RESUMO

Devido ao aumento da população idosa (> 60 anos), a indústria alimentícia tem o desafio de elaborar alimentos para essa faixa etária considerando as alterações de deglutição que ocorrem em decorrência do envelhecimento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes misturas de hidrocolóides nas propriedades físicas de géis à base de nanoemulsões. Foram preparadas 4 amostras utilizando uma nanoemulsão base (194 nm) com diferentes misturas de agentes gelificantes: 5,25 % APS-Proteína Isolada de Soja ou APL-Isolado Protéico de Soro de leite e 0,75 % AG-Agar ou CAR-*k*-carragenina. Os géis foram caracterizados quanto às suas propriedades ópticas, de fluxo e de textura. Os resultados mostraram que todos os géis apresentaram coloração bege-amarelada, principalmente aqueles com APL. Por outro lado, todos os géis apresentaram leve queda de viscosidade ao longo do tempo, o que facilitaria sua deglutição devido à baixa fluidização. Além disso, a dureza dos géis foi < 600 N/m², considerada adequada para as necessidades de deglutição de idosos. Concluindo, a utilização de misturas hidrocolóides permite obter géis à base de nanoemulsões com propriedades de fluxo e textura adequadas para uma deglutição fácil e segura, o que permitiria o desenvolvimento de alimentos adaptados às necessidades sensoriais dos idosos.

Palavras-chave: agentes gelificantes, propriedades de fluxo, textura.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el mundo ha experimentado un aumento de la población mayor a 60 años. Tal es así que se espera que este grupo etario tenga un crecimiento del 22 % para el año 2050 (Organización Mundial de la Salud, 2021), lo que corresponde a 2.100 millones de habitantes. Esta situación conlleva a cambios relacionados con la calidad de vida y la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento, como la disfagia (Wirth et al., 2016), la cual puede disminuir la eficiencia de la deglución, provocando un mayor riesgo de neumonía por aspiración y asfixia (Barrón-Pavón et al., 2020). Además, las personas mayores tienen con frecuencia una mala dentadura o utilizan prótesis dentales, lo que disminuye su rendimiento masticatorio (Bayram et al., 2021). Por lo tanto, es fundamental que el diseño de alimentos para este grupo de la población considere los cambios fisiológicos bucales que ocurren durante el envejecimiento, con el fin de obtener una alimentación segura y satisfactoria.

Desde el punto de vista tecnológico, se han planteado diversas estrategias para el diseño de alimentos destinados a las personas mayores, como el desarrollo de alimentos con textura modificada (ATM), los cuales presentan una textura suave y húmeda y, además, son fáciles de masticar y tragar, provocando que el proceso de deglución sea más lento, seguro y eficiente (Munialo et al., 2020). Dentro de los ATM, los geles basados en nanoemulsión (del tipo gel débil) tienen un gran potencial (Fontes-Candia et al., 2020), ya que presentan una estructura semisólida flexible que contiene una gran cantidad de líquido en los espacios intersticiales de las cadenas poliméricas (Wanasingha et al., 2021). De esta forma, estas matrices alimentarias se distinguen por tener un alto contenido de humedad y una textura suave, sin ser muy adhesiva (León et al., 2018), características adecuadas para las necesidades deglutorias de las personas mayores.

Diversas investigaciones se han llevado a cabo respecto a la obtención de geles basados en emulsiones (Farjami y Madadlou, 2019; Lu et al., 2019; Lin et al., 2020; Wan et al., 2023), donde la mayoría se ha enfocado en el desarrollo de geles utilizando nuevas fuentes de agentes gelificantes, especialmente polisacáridos, como la semilla de *Artemisia sphaerocephala* (Yue et al., 2022), la semilla de *Plantago ovata* (Zhou et al., 2022), entre otros.

Otras fuentes de proteínas han sido estudiadas para garantizar una mayor sostenibilidad medioambiental, especialmente aquellas de origen vegetal (Fasolin et al., 2019). Sin embargo, presentan deficiencias en sus propiedades gelificantes debido a las diferencias en su composición aminoacídica, estructura secundaria e interacciones moleculares en comparación con su contraparte de origen animal (Gómez-Mascaraque y Pinho, 2021). Por esta razón, es necesario estudiar el uso de mezclas proteínas-polisacáridos como agentes gelificantes con el fin de mejorar sus propiedades funcionales y, con ello, permitir el desarrollo de geles proteicos suaves y de fácil deglución para las personas mayores.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que las propiedades físicas de los geles basados en nanoemulsión se pueden modular de acuerdo al tipo y la concentración de hidrocoloides (Riquelme et al., 2023). También, Lin et al. (2021) han utilizado mezclas alginato/proteína de lactosuero (APL) y proteína de soja (APS) para la elaboración de geles basados en emulsión con licopeno, encontrando que la adición de APL promovió la formación de interacciones moleculares más

fuerzas con el alginato en comparación con el APS. Además, los geles con alginato/APL presentaron un mayor módulo de Young, lo que retrasó la liberación del licopeno durante el proceso de digestión *in vitro*. Por otro lado, Ma et al. (2022) obtuvieron geles basados en emulsión con alicina utilizando una mezcla de proteína de soja y goma arábiga, estudiando el efecto de un pre-tratamiento por ultrasonido. Los autores revelaron que el ultrasonido mejoró significativamente la capacidad de retención de agua, la dureza, la viscosidad y el módulo de Young de los geles debido a la formación de una estructura de red más homogénea y densa. Por lo tanto, estos estudios indican que se pueden obtener geles con diferentes propiedades físicas (reológicas y de textura), dependiendo de la mezcla de hidrocoloides utilizada, lo cual puede ser útil para el desarrollo de alimentos con textura modificada.

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar geles basados en nanoemulsión utilizando mezclas de hidrocoloides (proteínas: de lactosuero y soja, y polisacáridos: agar y *k*-carragenina), evaluando su color, viscosidad aparente y fuerza de gel con el fin de obtener matrices alimentarias que sirvan para mitigar los problemas deglutorios de las personas mayores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

Los geles basados en nanoemulsión se prepararon con: aceite de canola (Belmont, Watts S.A., Chile) como fase lipídica; y lecitina de soja (Metarin-P Cargill, Blumos S.A., Chile), almidón modificado (Capsul®, Ingredion, EE.UU.) y polisorbato 80 de grado alimentario (P1754, Sigma-Aldrich®, EE.UU.) como emulsificantes; agua purificada, obtenida de un sistema de filtración por osmosis inversa (Vigaflow S.A., Chile), como fase acuosa; y aislado de proteínas de lactosuero-APL (88 % b.s., Provon 292, Blumos, Chile), aislado de proteína de soja-APS (90 % b.s., Angelini Organics SPA, Chile), agar (Tractor Bean, Chile) y *k*-carragenina (Sabores y Fragancias Comercial Ltda., Chile) como agentes gelificantes.

Elaboración de los geles basados en nanoemulsión

Preparación de nanoemulsión base

La nanoemulsión (NE) base se preparó siguiendo las siguientes etapas: i) primero, se dispersaron los emulsificantes (0,5 % p/p polisorbato 80, 1 % p/p Capsul® y 6,5 % p/p lecitina de soja) en agua purificada (82 % p/p) mediante agitación magnética (MS-H280-Pro, DLAB, China) a 500 rpm durante 60 min. ii) Luego, se preparó una pre-emulsión dispersando la fase lipídica (10 % p/p aceite de canola) en la fase acuosa mediante una homogeneización de alta velocidad (Ultraturrax T25D, IKA, Alemania) a 12.000 rpm por 30 min. iii) Finalmente, para disminuir el tamaño de gota y obtener la nanoemulsión base, la pre-emulsión se sometió a un proceso de homogeneización por altas presiones (J04010078, SPX, Dinamarca), aplicando una presión igual a 700 bar durante 5 ciclos.

La NE base presentó un tamaño de gota igual a 194 ± 3 nm y un índice de polidispersión de $0,13 \pm 0,04$, valores que fueron determinados a través de un equipo de Dispersión Dinámica de la Luz (Zetasizer, NanoS90, Malvern Instruments, Reino Unido). Además, se evaluó la estabilidad física de la NE base durante el almacenamiento (35 días a 5°C), mediante el índice de cremado (IC) (McClements, 2015), obteniendo valores igual a $3,8 \pm 0,18$ % después de 35 días de almacenamiento, lo que indicó una buena estabilidad física de la NE base.

Preparación de geles basados en nanoemulsión

Los geles basados en nanoemulsión se prepararon con una mezcla de hidrocoloides como agentes gelificantes (proteínas: aislado del lactosuero-APL y aislado de proteína de soja-APS y polisacáridos: *k*-carragenina-CAR y agar-AG), la cual se adicionó a la NE base. La nomenclatura y formulación de las muestras se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1. Nomenclatura y formulación de los diferentes geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides.

Muestra	Tipo y concentración de hidrocoloides (% p/p)		
	Nanoemulsión	Proteína	Polisacárido
APL + CAR	Nanoemulsión 93,28 %	Aislado de proteína de lactosuero (APL) 5,97 %	<i>k</i> -carragenina (CAR) 0,75 %
APL + AG	Nanoemulsión 93,28 %	Aislado de proteína de lactosuero (APL) 5,97 %	Agar (AG) 0,75 %
APS + CAR	Nanoemulsión 93,42 %	Aislado de proteína de soja (APS) 5,83 %	<i>k</i> -carragenina (CAR) 0,75 %
APS + AG	Nanoemulsión 93,42 %	Aislado de proteína de soja (APS) 5,83 %	Agar (AG) 0,75 %

Nota: La concentración de proteína total en los geles fue de 5,25 % p/p y se calculó a través de la concentración en base seca del aislado de proteína de lactosuero (88 % b.s.) y de proteína de soja (90 % b.s.), según el tipo de gel.

Los aislados proteicos (APL y APS) se dispersaron en la NE base mediante agitación magnética (600 rpm, 120 min), y se almacenaron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h para una completa hidratación de las proteínas. Una vez finalizado el tiempo en refrigeración, se adicionaron los polisacáridos (0,75 % p/p de agar o *k*-carragenina) a la NE con proteínas y se sometieron a un proceso térmico (90°C por 30 min) con agitación mecánica (50 rpm) en un baño termorregulado (WB14, Memmert, Alemania). El sol (pre-gel) obtenido se enfrió a temperatura ambiente (25°C) en recipientes de plástico cerrados y se almacenaron en refrigeración a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h para su posterior caracterización. Cabe destacar que se prepararon al menos dos lotes de cada gel basado en nanoemulsión para su posterior caracterización.

Caracterización de los geles basados en nanoemulsión

Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de los geles se determinaron mediante un colorímetro (MiniScan XE Plus, HunterLab, EE.UU.), donde se obtuvieron los parámetros del espacio de color CIE*Lab*. Antes de comenzar las mediciones, el colorímetro se calibró utilizando un fondo blanco y negro. Luego, se añadieron 25 g de cada muestra en placas Petri transparentes cubriendo toda la superficie de la placa de forma uniforme. Se obtuvieron los valores de los parámetros L^* (claridad), a^* (componente rojo-verde) y b^* (componente azul-amarillo), y se calculó el índice de blancura (IB) utilizando la Ecuación 1 propuesta por Ullah et al. (2018).

$$IB (\%) = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

Comportamiento de flujo

Las propiedades reológicas de los geles se caracterizaron en un reómetro rotacional (Rheolab QC, Anton Paar, Austria), equipado con una geometría de cilindros concéntricos (CC27, Anton Paar, Austria). Para ello, las muestras (~12 g) se cargaron en la geometría de medición y se dejaron reposar durante 10 min para estabilizar su estructura y alcanzar la temperatura del ensayo (37 °C). Se realizaron dos ensayos: (i) la curva de viscosidad a una velocidad de cizalla creciente (1-100 s⁻¹) durante 60 s a 37 °C, desde donde se obtuvieron los valores de viscosidad aparente a distintas velocidades de cizalla (10, 50 y 100 s⁻¹); y (ii) el ensayo de destrucción estructural al registrar la caída de la viscosidad durante 60 s a una velocidad de cizalla constante de 50 s⁻¹. Se eligió esta velocidad de cizalla ya que se correlaciona con la cizalla en boca (He et al., 2016; Laguna et al., 2020). Las curvas de la caída de la viscosidad se ajustaron a un modelo de segundo orden planteado por Nguyen et al. (1998) (Ecuación 2), con el propósito de determinar la cinética de destrucción estructural de los geles.

$$\left(\frac{[\eta_0 - \eta_e]}{[\eta - \eta_e]} \right) = kt + 1 \quad (2)$$

Donde η_0 es la viscosidad aparente al $t = 0$, η_e es la viscosidad aparente en el equilibrio $t \rightarrow \infty$, k es la constante de velocidad de destrucción estructural y t es el tiempo de cizallamiento.

Fuerza de gel

Para determinar la dureza de los geles se aplicó un análisis de compresión utilizando un texturómetro (Z0.5, Zwick, Alemania). Este análisis consiste en la compresión perpendicular de la muestra hasta un 20 % de su altura original, obteniéndose una curva de fuerza de compresión en el tiempo a partir de la cual se determinó el parámetro dureza (fuerza de gel/área). Para ello, se utilizó una sonda de 5 cm de diámetro y una

velocidad de 0,1 mm/s. Cabe destacar que todos los geles tenían la misma forma cilíndrica (3,6 cm de diámetro y 1,25 cm de altura) antes de la compresión.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tipo de polisacárido y tipo de proteína) y un post-test de Tukey ($\alpha = 0,05$) con el fin de determinar las diferencias significativas existentes entre las muestras para los diferentes parámetros evaluados, utilizando el programa XLSTAT (Lumivero, 2023).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades ópticas de los geles basados en nanoemulsión

Las propiedades ópticas de los geles pueden proporcionar información útil sobre la microestructura y la disposición de las gotas de aceite en la estructura del gel (Li et al., 2021). Primero, se determinaron los parámetros CIE_{Lab} y el índice de blancura (IB) de los diferentes agentes gelificantes estudiados (en polvo) (Tabla 2), observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) según el tipo de proteína, donde el APS presentó un color intrínseco más amarillo que el APL. Respecto a los polisacáridos, también se observaron diferencias ($p < 0,05$) en los parámetros L^* , a^* y b^* ; sin embargo, tanto CAR como AG presentaron valores similares de IB, indicando una coloración menos blanquecina.

Respecto a los geles basados en nanoemulsiones, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) debido principalmente al tipo de proteína (Tabla 2). Los valores del parámetro L^* fueron significativamente ($p < 0,05$) más altos en los geles elaborados con APS que en aquellos que contenían APL, lo cual fue independiente del tipo de polisacárido (Tabla 2). Este comportamiento puede responder a las diferencias estructurales que presentan los geles elaborados con ambas proteínas. Según Alves y Tavares (2019), las proteínas presentes en el APS (especialmente la glicinina) tienen la capacidad de formar agregados densos e insolubles durante la formación del gel, los cuales podrían provocar la formación de una estructura compacta que presente una mayor reflectancia de la luz y, por lo tanto, una mayor claridad del gel (Li et al., 2021). En cambio, los geles elaborados con APL se caracterizan por poseer una estructura de red más ordenada debido a la formación de filamentos y estructuras lineales unidas por enlaces disulfuro (Khalesi et al., 2021), que podrían reflejar menos luz (Chantrapornchai y McClements, 2002).

Respecto a los parámetros a^* y b^* , también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras según el tipo de proteína (Tabla 2), donde los geles con APL presentaron los valores más altos de a^* y b^* , independiente del tipo de polisacárido, lo que indicó una coloración más amarillenta-beige (Figura 1). Esto se puede atribuir a un pardeamiento del gel durante el tratamiento térmico debido a la reacción de Maillard entre la lactosa residual y los aminoácidos con grupo amino del aislado de proteína de suero (Wang et al., 2020). Finalmente, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores del índice de blancura (IB), según el tipo de proteína (Tabla 2). Los geles elaborados

con APL presentaron los valores más bajos de IB; en cambio, los geles con APS presentaron valores significativamente mayores en este parámetro, lo cual está de acuerdo con lo observado en la Figura 1.

TABLA 2. Propiedades ópticas de los geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides.

Muestra	L^*	a^*	b^*	IB (%)
APL materia prima	89,8 ± 2,2 ^a	6,9 ± 3,7 ^b	13,0 ± 1,3 ^c	81,8 ± 0,8 ^a
APS materia prima	84,8 ± 0,8 ^b	4,5 ± 0,03 ^b	16,6 ± 0,4 ^b	77,1 ± 0,2 ^{ab}
CAR materia prima	82,0 ± 0,6 ^c	19,4 ± 1,3 ^a	6,9 ± 0,5 ^d	72,6 ± 1,2 ^b
AG materia prima	87,1 ± 0,6 ^a	-10,6 ± 4,8 ^e	19,9 ± 2,2 ^a	73,9 ± 3,4 ^b
APL + CAR	81,3 ± 0,4 ^c	-0,03 ± 0,01 ^c	17,7 ± 0,5 ^b	74,3 ± 0,1 ^b
APL + AG	81,9 ± 0,7 ^c	0,14 ± 0,03 ^c	17,4 ± 0,2 ^b	74,9 ± 0,3 ^b
APS + CAR	85,4 ± 0,3 ^b	-1,03 ± 0,06 ^d	12,2 ± 0,1 ^c	80,8 ± 0,1 ^a
APS + AG	84,8 ± 0,2 ^b	-0,80 ± 0,02 ^d	12,7 ± 0,5 ^c	80,2 ± 0,5 ^a

Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar, L^* : claridad, a^* : componente rojo-verde, b^* : componente azul-amarillo, IB: índice de blancura. Cada valor representa la media ± SD. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las muestras (test de Tukey; $p < 0,05$).

Finalmente, el color de las matrices alimentarias es de suma importancia para el desarrollo de alimentos aceptados sensorialmente, ya que los geles blanquecinos permiten la adición de una amplia gama de aditivos alimentarios (colorantes y saborizantes), con el fin de mejorar su calidad sensorial y aceptación por las personas mayores (Aguilera y Park, 2016).

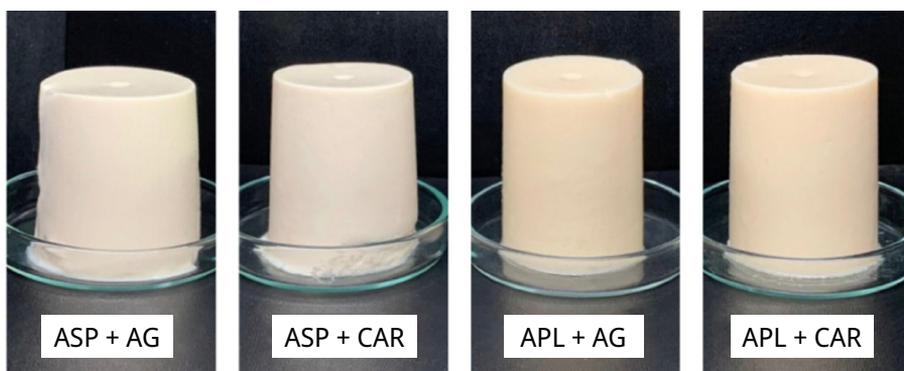


FIGURA 1. Fotografías de los geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides. Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar.

Comportamiento de flujo

La Figura 2 muestra las curvas de viscosidad aparente *versus* la velocidad de cizalla, donde se puede observar una disminución de los valores de viscosidad al aumentar la velocidad de cizalla en todos los geles, indicando un comportamiento No-Newtoniano del tipo pseudoplástico (Cui et al., 2022). Este comportamiento puede deberse a que el cizallamiento provoca la destrucción parcial de la estructura del gel, reduciendo su resistencia al flujo y, por lo tanto, su viscosidad aparente (Ikeda y Foegeding, 1999; Liang et al., 2020). Este tipo de comportamiento es ideal para el desarrollo de alimentos de fácil deglución ya que estos alimentos son más seguros y fáciles de tragar en comparación con los de comportamiento Newtoniano, los cuales al ser más fluidos representan un mayor riesgo de aspiración durante su consumo por personas con problemas de deglución (Torrez-Ortiz et al., 2022).

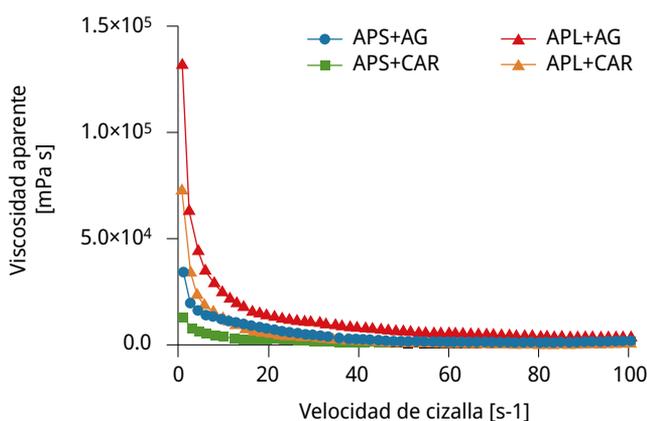


FIGURA 2. Curva de viscosidad durante el cizallamiento para los distintos geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides. Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar.

Con el fin de comparar las muestras se determinó la viscosidad aparente a diferentes velocidades de cizalla (10, 50 y 100 s⁻¹), donde se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras, según el tipo de proteína y polisacárido (Tabla 3). De forma general, los geles elaborados con APL presentaron valores de viscosidad aparente más altos que aquellos con APS, a todas las velocidades de cizalla estudiadas. Este resultado indicaría que el APL presenta interacciones proteína-proteína más fuertes que el APS (Lin et al., 2021), lo que aumenta la resistencia a fluir de los geles. Las interacciones moleculares del APL se deben a la presencia del grupo tiol libre (-SH) en su composición aminoacídica, lo cual facilita la agregación y gelificación de las proteínas desnaturalizadas (Zhang et al., 2023). En cambio, el APS presenta interacciones proteína-proteína débiles debido a la ausencia de aminoácidos azufrados en su composición (Qin et al., 2022).

De igual forma, los geles que contenían AG presentaron una viscosidad aparente mayor que los con CAR, para todas las velocidades de cizalla estudiadas (Tabla 3). Esto se puede deber a que el AG, al enfriarse, tiende a formar geles rígidos

y fuertes debido a su estructura molecular (β -1,3-ligado-D-galactosa y α -1,4-ligado 3,6-anhidro-L-galactosa) (Burey et al., 2008), donde las dobles hélices de sus cadenas se comienzan a asociar y agregar durante el enfriamiento dando lugar a estructuras de red más fuertes (Martínez-Sanz et al., 2020). En cambio, la CAR forma geles más fluidos debido a que tiene menos regiones helicoidales, por lo que durante la agitación se pueden generar cadenas poliméricas no gelificadas en la fase continua (agregados), produciéndose geles no tan uniformes y más débiles (Garrec et al., 2013).

También se puede establecer la hipótesis de que existe una sinergia entre los hidrocoloides, ya que los geles APL+AG presentaron los valores más altos de viscosidad aparente a todas las velocidades de cizalla estudiadas (Tabla 3). En este sentido, la presencia de APL+AG pudo haber actuado de forma sinérgica en la formación de la estructura del gel, ya que las moléculas de agua se unen al AG debido a su naturaleza hidrofílica, lo que reduce el contenido de agua en el sistema proteico. De esta forma, aumenta progresivamente la formación de enlaces disulfuro por las interacciones proteína-proteína (especialmente en la proteína de lactosuero), lo cual contribuye a la formación de una red de gel estable y compacta (Li et al., 2023).

TABLA 3. Viscosidad aparente a diferentes velocidades de cizalla para los distintos geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides.

Muestra	$\eta_{10s^{-1}}$ (mPa s)	$\eta_{50s^{-1}}$ (mPa s)	$\eta_{100s^{-1}}$ (mPa s)
APL + CAR	8493 ± 783 ^{bc}	2113 ± 139 ^b	1631 ± 48 ^b
APL + AG	19636 ± 2820 ^a	5762 ± 297 ^a	2964 ± 101 ^a
APS + CAR	5040 ± 439 ^c	1041 ± 104 ^c	560 ± 21 ^d
APS + AG	10733 ± 1891 ^b	2221 ± 386 ^b	1128 ± 195 ^c

Nota: η : viscosidad aparente, APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar.

Por otro lado, la Figura 3 presenta la caída de la viscosidad aparente al cizallar el gel a 50 s⁻¹ durante 60 s, como medida del grado de destrucción estructural. En general, se evidenció que los geles presentaron un grado similar de destrucción estructural, observándose cambios menores en los valores de viscosidad aparente durante el tiempo de cizalla (Figura 3). Mezger (2014) ha mencionado que los sistemas coloidales alimentarios, como cremas, dispersiones y geles, presentan cierto grado de destrucción estructural durante el cizallamiento en el tiempo debido a que las moléculas de proteínas y polisacáridos se despliegan y orientan en dirección al flujo, reduciendo su resistencia a fluir, tal como se observó en este trabajo.

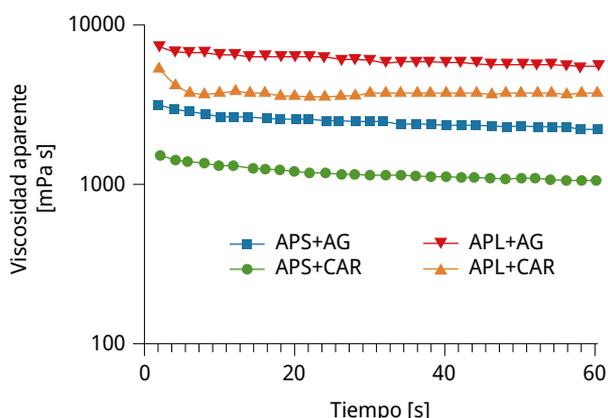


FIGURA 3. Curva de la caída de la viscosidad en el tiempo de los distintos geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides. Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar.

Las curvas de viscosidad aparente durante el tiempo se ajustaron a un modelo de destrucción estructural (R^2 : 0,98-0,99), encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros cinéticos (η_0 viscosidad aparente inicial, η_e viscosidad aparente en el equilibrio y k constante de velocidad de destrucción estructural) entre los geles con diferente composición (Tabla 4). Cabe destacar que la muestra APL-CAR no tuvo un buen ajuste al modelo de destrucción estructural ($R^2 < 0,2$), por lo cual no se determinaron sus parámetros cinéticos. Como era de esperar, los geles presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de viscosidad aparente inicial (η_0), lo cual concuerda con los resultados anteriores (Figura 3). Las muestras APL + AG y APS + AG presentaron los mayores valores de η_0 , lo cual se puede deber a un sinergismo del agar en la reología de los geles.

Se ha observado que la presencia de algunos polisacáridos (agar, goma gelana y metilcelulosa) provoca modificaciones en la microestructura de los geles mixtos (proteína-polisacárido), formándose estructuras mucho más heterogéneas en comparación con los geles solo de proteínas, lo cual aumenta la fuerza del gel (Ryu y McClements, 2024) y, por lo tanto, su viscosidad aparente inicial. Por otro lado, los geles elaborados con APS presentaron una mayor velocidad de destrucción estructural (k), independiente del tipo de polisacárido. Esto se puede atribuir a la formación de una estructura menos firme en los geles con APS debido a la formación de interacciones más débiles entre las cadenas proteicas (Lin et al., 2021), lo cual generó una destrucción más rápida de su estructura debido al cizallamiento, provocando una leve fluidificación de su estructura en el tiempo. Respecto a la viscosidad en el equilibrio (η_e), se observaron menores valores en los geles con APS, especialmente aquellos con CAR (Tabla 4). No obstante, a pesar de estas diferencias en los parámetros cinéticos, no se observaron grandes cambios en los valores de viscosidad durante el tiempo de cizallamiento en cada gel estudiado, lo cual representa una ventaja para el desarrollo de alimentos para las personas mayores, ya que un efecto muy fluidificante durante el consumo (disminución drástica de la viscosidad) puede aumentar el riesgo de aspiración en pacientes con disfagia (Giura et al., 2021).

TABLA 4. Parámetros cinéticos del modelo de destrucción estructural de segundo orden para los distintos geles basados en nanoemulsión, elaborados con mezclas de hidrocoloides como agentes gelificantes.

Muestra	η_0 (mPa)	k (s ⁻¹)	η_e (mPa)
APL + CAR	NA	NA	NA
APL + AG	7411 ± 164 ^a	0,04 ± 0,01 ^b	4818 ± 106 ^a
APS + CAR	1569 ± 25 ^c	0,08 ± 0,01 ^a	897 ± 65 ^c
APS + AG	3236 ± 188 ^b	0,08 ± 0,01 ^a	1863 ± 123 ^b

Nota: η_0 : viscosidad aparente al $t = 0$, η_e : viscosidad aparente en el equilibrio $t \rightarrow \infty$, k : constante de velocidad de destrucción estructural. NA: no se ajustó al modelo. APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: k -carragenina, AG: agar.

Fuerza de gel

Se determinó la fuerza de los geles basados en nanoemulsión a través de un ensayo de compresión, donde el punto máximo de la curva corresponde a la fuerza necesaria para deformar la matriz (Peleg, 2019). En general, se puede observar que el punto máximo de la curva ocurrió aproximadamente a los 20 s del ensayo en todas las muestras (Figura 4). Además, no se observó fracturabilidad en los geles, indicando que estas matrices se pueden considerar geles suaves (Zang et al., 2023).

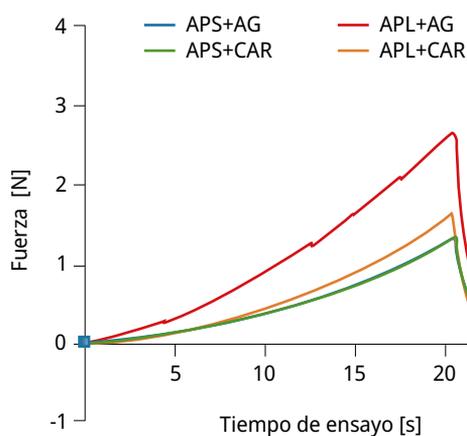


FIGURA 4. Fuerza de gel de los distintos geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides. Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: k -carragenina, AG: agar.

A partir de la curva de fuerza de gel, se determinaron los valores del parámetro dureza (Figura 5). En primer lugar, se identificó que el tipo de proteína utilizada tuvo

un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la dureza de los geles, donde los geles con APL exhibieron los mayores valores (509-586 N/m²) en comparación con los elaborados con APS (354-363 N/m²) (Figura 5). Tal como se mencionó anteriormente, esta tendencia se puede deber a las diferencias en las interacciones proteicas durante la gelificación de las muestras. En el caso de los geles con APL, predominan las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de puente disulfuro, los cuales aumentan la resistencia del gel (Alavi et al., 2018). Mientras que los geles de APS presentan interacciones débiles entre sus cadenas, lo cual reduce la rigidez de la red del gel (Siegwein et al., 2011).

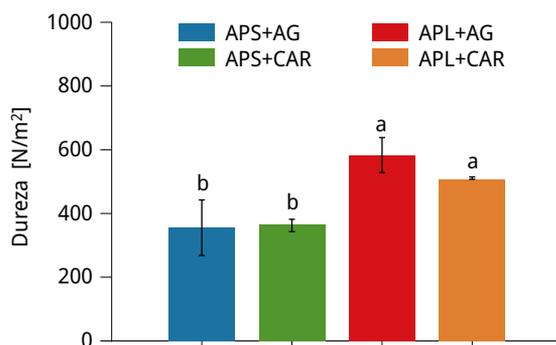


FIGURA 5. Dureza de los distintos geles basados en nanoemulsión elaborados con mezclas de hidrocoloides. Nota: APS: aislado de proteína de soja, APL: aislado de proteína de lactosuero, CAR: *k*-carragenina, AG: agar.

Respecto a lo establecido por la International Dysphagia Diet Standardization Initiative (IDDSI), la dureza obtenida (< 1500 N/m²) (Wada et al., 2017) en todos los geles basados en nanoemulsión corresponde a una textura de un alimento que no requiere masticación, donde la compresión con la lengua es suficiente para romperlo (Cichero, 2019), lo cual facilita su deglución. Por lo tanto, estos geles podrían servir para el desarrollo de alimentos de fácil deglución destinados a las personas mayores.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron geles basados en nanoemulsión a partir del uso de diferentes mezclas de hidrocoloides (aislado de proteína de soja, aislado de proteína de lactosuero, agar y *k*-carragenina) como agentes gelificantes. Los resultados demostraron que las propiedades físicas de los geles son afectadas por la naturaleza del hidrocoloide y sus interacciones intermoleculares. En relación con las propiedades ópticas, todos los geles presentaron un índice de blancura sobre el 74 %, lo cual podría permitir la adición de colorantes que mejoren su calidad sensorial. Por otro lado, los geles mostraron valores de viscosidad aparente que lo categorizan como un alimento espeso que no requiere masticación. Además, presentaron una leve caída de la viscosidad producto del cizallamiento, lo cual podría disminuir los riesgos por aspiración

en las personas mayores. La dureza de los geles es idónea para un consumo seguro, siendo adecuado para las necesidades deglutorias de las personas mayores.

Finalmente, el uso de mezclas de agentes gelificantes permite obtener geles basados en nanoemulsión con características reológicas y texturales adecuadas para una deglución fácil y segura, donde estas características favorecen el desarrollo de postres tipo "flan" adaptados a los requerimientos sensoriales de las personas mayores, lo que podría contribuir a la mejora de su calidad de vida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, Chile) por el financiamiento de esta investigación, mediante el proyecto FONDECYT Regular N° 1231555, dirigido por la Dra. Carla Arancibia. También agradecen a la Vicerrectoría de Investigación, Innovación y Creación (VRIIC, USACH, Chile) por el contrato de investigación USA2155_Dicyt de la Dra. Natalia Riquelme. Por último, se agradece al Dr. Rommy Zúñiga (Universidad Tecnológica Metropolitana) por facilitar el equipo texturómetro para los ensayos de TPA.

REFERENCIAS

- Aguilera, J. M. y Park, D., 2016. Texture-modified foods for the elderly: status, technology and opportunities. En: *Trends in Food Science and Technology*, 57, pp. 156-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.001>
- Alavi, F.; Momen, S.; Emam-Djomeh, Z.; Salami, M. y Moosavi-Movahedi, A. A., 2018. Radical cross-linked whey protein aggregates as building blocks of non-heated cold-set gels. En: *Food Hydrocolloids*, 81, pp. 429-441. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.016>
- Alves, A. C. y Tavares, G. M., 2019. Mixing animal and plant proteins: Is this way to improve protein techno-functionalities? En: *Food Hydrocolloids*, 97, 105171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.016>
- Barrón-Pavón, V.; Artiaga Núñez, C.; Higuera Espinoza, V.; Rodríguez-Fernández, A.; García-Flores, V.; Sanhueza-Garrido, M. y González-Stager, A., 2020. Ingesta alimentaria y presbifagia en adultos mayores activos de la comunidad de Chillán, Chile. En: *Revista Chilena de Nutrición*, 47, pp. 580-587. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000400580>
- Bayram, H. M.; Ilgaz, F.; Serel Arslan, S.; Demir, N. y Rakıcioğlu, N., 2021. The relationship between dysphagia, oral health, masticatory performance and activities of daily living in elderly individuals as assessed by the eating assessment tool. En: *Progress in Nutrition*, 23, pp. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.23751/pn.v23i1.9101>
- Burey, P.; Bhandari, B.; Howes, T. y Gidley, M. J., 2008. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, pp. 361-377. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390701347801>

- Chantrapornchai, W. y McClements, D. J., 2002. Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. En: *Food Hydrocolloids*, 16, pp. 467-476. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00124-2)
- Cichero, J. A. Y., 2019. Evaluating chewing function: expanding the dysphagia field using food oral processing and the IDDSI framework. En: *Journal of Texture Studies*, 51, pp. 56-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/jtxs.12462>
- Cui, Y.; Li, C.; Guo, Y.; Liu, X.; Zhu, F.; Liu, Z.; Liu, X. y Yang, F., 2022. Rheological & 3D printing properties of potato starch composite gels. En: *Journal of Food Engineering*, 313, 110756. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2021.110756>
- Farjami, T. y Madadlou, A., 2019. An overview on preparation of emulsion-filled gels and emulsion particulate gels. En: *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp. 85-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.043>
- Fasolin, L. H.; Pereira, R. N.; Pinheiro, A. C.; Martins, J. T.; Andrade, C. C. P.; Ramos, O. L. y Vicente, A. A., 2019. Emergent food proteins—Towards sustainability, health and innovation. En: *Food Research International*, 125, 108586. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Fontes-Candia, C.; Ström, A.; Lopez-Sanchez, P.; López-Rubio, A. y Martínez-Sanz, M., 2020. Rheological and structural characterization of carrageenan emulsion gels. En: *Algal Research*, 47, 101873. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101873>
- Garrec, D. A.; Guthrie, B. y Norton, I. T., 2013. Kappa carrageenan fluid gel material properties. Part 1: rheology. En: *Food Hydrocolloids*, 33, pp. 151-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.014>
- Giura, L.; Urtasun, L.; Belarra, A.; Ansorena, D. y Astiasarán, I., 2021. Exploring tools for designing dysphagia-friendly foods: A review. En: *Foods*, 10, 1334. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10061334>
- Gómez-Mascaraque, L. G. y Pinho, S. C., 2021. Microstructural analysis of whey/soy protein isolate mixed gels using confocal Raman microscopy. En: *Foods*, 10, 2179. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10092179>
- He, Q.; Hort, J. y Wolf, B., 2016. Predicting sensory perceptions of thickened solutions based on rheological analysis. En: *Food Hydrocolloids*, 61, pp. 221–232. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.05.010>
- Ikeda, S. y Foegeding, E. A., 1999. Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. En: *Food Hydrocolloids*, 13, pp. 245-254. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00006-5)
- Khalesi, H.; Sun, C.; He, J.; Lu, W. y Fang, Y., 2021. The role of amyloid fibrils in the modification of whey protein isolate gels with the form of stranded and particulate microstructures. En: *Food Research International*, 140, 109856. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109856>
- Laguna, L.; Manickam, I.; Arancibia, C. y Tárrega, A., 2020. Viscosity decay of hydrocolloids under oral conditions. En: *Food Research International*, 136, 109300. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109300>
- León, A. M.; Medina, W. T.; Park, D. J. y Aguilera, J. M., 2018. Properties of microparticles from a whey protein isolate/alginate emulsion gel. En: *Food Science and Technology International*, 24, pp. 414-423. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013218762210>

- Li, Y.; Kang, Z.; Sukmanov, V. y Ma, H., 2021. Effects of soy protein isolate on gel properties and water holding capacity of low-salt pork myofibrillar protein under high pressure processing. En: *Meat Science*, 176, 108471.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108471>
- Li, M.; Hou, X.; Lin, L.; Jiang, F.; Qiao, D. y Xie, F., 2023. Legume protein/polysaccharide food hydrogels: Preparation methods, improvement strategies and applications. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 243, 125217.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125217>
- Liang, X.; Ma, C.; Yan, X.; Zeng, H.; McClements, D. J.; Liu, X. y Liu, F., 2020. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. En: *Food Hydrocolloids*, 102, 105569. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.FOODHYD.2019.105569>
- Lin, D.; Kelly, A. L. y Miao, S., 2020. Preparation, structure-property relationships and applications of different emulsion gels: Bulk emulsion gels, emulsion gel particles, and fluid emulsion gels. En: *Trends in Food Science & Technology*, 102, pp. 123-137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.024>
- Lin, D.; Kelly, A. L.; Maidannyk, V. y Miao, S., 2021. Effect of structuring emulsion gels by whey or soy protein isolate on the structure, mechanical properties, and in-vitro digestion of alginate-based emulsion gel beads. En: *Food Hydrocolloids*, 110, 106165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106165>
- Lu, Y.; Mao, L.; Hou, Z.; Miao, S. y Gao, Y., 2019. Development of emulsion gels for the delivery of functional food ingredients: From structure to functionality. En: *Food Engineering Reviews*, 11, pp. 245-258. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09194-z>
- Lumivero, 2023. *XLSTAT Statistical and data analysis solution*. Vers. 2023.2.1414. Paris: Lumivero.
- Ma, C.; Li, S.; Yin, Y.; Xu, W.; Xue, T.; Wang, Y.; Liu, X. y Liu, F., 2022. Preparation, characterization, formation mechanism and stability of allicin-loaded emulsion gel. En: *LWT*, 161, 113389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113389>
- McClements, D. J., 2015. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. Boca Ratón: CRC Press.
- Martínez-Sanz, M.; Ström, A.; Lopez-Sanchez, P.; Knutsen, S. H.; Ballance, S.; Zobel, H.; Sokolova, A.; Gilbert, E. P. y López-Rubio, A., 2020. Advanced structural characterisation of agar-based hydrogels: Rheological and small angle scattering studies. En: *Carbohydrate Polymers*, 236, 115655.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115655>
- Mezger, T. G., 2014. Rotational test. Cap. 3. En: Mezger, T. *The rheology book*. Hanover: Vincentz Network. pp. 29-73.
- Munialo, C. D.; Kontogiorgos, V.; Euston, S. R. y Nyambayo, I., 2020. Rheological, tribological and sensory attributes of texture-modified foods for dysphagia patients and the elderly: A review. En: *International Journal of Food Science & Technology*, 55, pp. 1862-1871. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14483>
- Nguyen, Q. D.; Jensen, C. T. B. y Kristensen, P. G., 1998. Experimental and modeling studies of the flow properties of maize and waxy maize starch pastes. En: *Chemical Engineering Journal*, 70, pp. 165-171. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0923-0467\(98\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0923-0467(98)00081-5)

- Organización Mundial de la Salud, 2021. *Envejecimiento y salud* [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: xxxxx.]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
- Peleg, M., 2019. The instrumental texture profile analysis revisited. En: *Journal of Texture Studies*, 50, pp. 362-368. DOI: <https://doi.org/10.1111/jtxs.12392>
- Qin, P.; Wang, T. Y Luo, Y., 2022. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. En: *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>
- Riquelme, N.; Savignones, C.; López, A.; Zúñiga, R. N. y Arancibia, C., 2023. Effect of gelling agent type on the physical properties of nanoemulsion-based gels. En: *Colloids and Interfaces*, 7, pp. 49. DOI: <https://doi.org/10.3390/colloids7030049>
- Ryu, J. y McClements, D. J., 2023. Impact of heat-set and cold-set gelling polysaccharides on potato protein gelation: gellan gum, agar, and methylcellulose. En: *Food Hydrocolloids*, 149, 109535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109535>
- Siegwein, A. M.; Vodovotz, Y. y Fisher, E. L., 2011. Concentration of soy protein isolate affects Starch-Based confections' texture, sensory, and storage properties. En: *Journal of Food Science*, 76, pp. E422-E428. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02241.x>
- Torrez-Ortiz, K.; Sotelo-Díaz, L. y Caez-Ramírez R., 2022. Mechanical and rheological categorization of food patterns suitable for older adults with swallowing limitation. En: *International Journal of Food Properties*, 25, pp. 2627-2660. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2140811>
- Ullah, I.; Hu, Y.; You, J.; Yin, T.; Xiong, S.; Din, Z. U.; Huang, Q. y Liu, R., 2018. Influence of okara dietary fiber with varying particle sizes on gelling properties, water state and microstructure of tofu gel. En: *Food Hydrocolloids*, 89, pp. 512-522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.006>
- Wada, S.; Kawate, N. y Mizuma, M., 2017. What type of food can older adults masticate: Evaluation of mastication performance using color-changeable chewing gum. En: *Dysphagia*, 32, pp. 636-643. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00455-017-9807-1>
- Wan, C.; Cheng, Q.; Zeng, M. y Huang, C., 2023. Recent progress in emulsion gels: from fundamentals to applications. En: *Soft Matter*, 19, pp. 1282-1292. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2SM01481E>
- Wanasingha, N.; Dorishetty, P.; Dutta, N. K. y Choudhury, N. R., 2021. Polyelectrolyte gels: fundamentals, fabrication and applications. En: *Gels*, 7, pp. 148. DOI: <https://doi.org/10.3390/gels7030148>
- Wang, Y.; Zhao, J.; Zhang, W.; Liu, C.; Jauregi, P. y Huang, M., 2020. Modification of heat-induced whey protein gels by basic amino acids. En: *Food Hydrocolloids*, 100, 105397. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105397>
- Wirth, R.; Dziewas, R.; Beck, A. M.; Clave, P.; Heppner, H. J.; Langmore, S.; Leischker, A.; Martino, R.; Pluschinski, P.; Rösler, A.; Shaker, R.; Warnecke, T.; Sieber, C. C.; Volkert, D. y Hamdy, S., 2016. Oropharyngeal dysphagia in older persons: from pathophysiology to adequate intervention: a review and summary of an international expert meeting. En: *Clinical Interventions in Aging*, 11, pp. 189-208. DOI: <https://doi.org/10.2147/cia.s97481>

- Yue, J.; Chen, X.; Yao, X.; Gou, Q.; Li, D.; Liu, H.; Yao, X. y Nishinari, K., 2022. Stability improvement of emulsion gel fabricated by *Artemisia sphaerocephala* Krasch. polysaccharide fractions. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 205, pp. 253-260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.069>
- Zang, J.; Pan, X.; Zhang, Y.; Tu, Y.; Xu, H.; Tang, D.; Zhang, Q.; Chen, J. y Yin, Z., 2023. Mechanistic insights into gel formation of egg-based yoghurt: The dynamic changes in physicochemical properties, microstructure, and intermolecular interactions during fermentation. En: *Food Research International*, 172, 113097. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.FOODRES.2023.113097>
- Zhang, L.; Zhang, Z.; Euston, S. R.; Li, B.; Li, E.; Fu, C. y Chen, G., 2023. Structural and gelling properties of whey proteins influenced by various acids: Experimental and computational approaches. En: *Food Hydrocolloids*, 144, 109003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109003>
- Zhou, P.; Wen, L.; Ai, T.; Liang, H.; Li, J. y Li, B., 2022. A novel emulsion gel solely stabilized by the hot water extracted polysaccharide from psyllium husk: Self-healing plays a key role. En: *Food Hydrocolloids*, 130, 107718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107718>

Comparación interlaboratorio en medición de energía eléctrica en Panamá y República Dominicana: un ejercicio clave para mantener la confianza y el reconocimiento internacional

Interlaboratory comparison for electric energy in Panama and the Dominican Republic: a key exercise to maintain confidence and international recognition

Comparaçãõ interlaboratorial em mediçãõ de energia elétrica no Panamá e na República Dominicana: um exercício fundamental para manter a confiança e reconhecimento internacional

 **JULIO GONZÁLEZ VANNUCCHI** (1)

 **NÉSTOR JUAN RODRÍGUEZ DE LA CRUZ** (2)

 **CARLOS ESPINOSA BEJARANO** (1)

 **JUAN RAFAEL BATISTA DONASTORG** (2)

 **JERRY IRVAM MESA NINA** (2)

 **JAIME ESTRELLA ENGELMANN** (1)

 **SAÚL GARCÍA TOVAR** (1)

(1) Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP), Ciudad de Panamá, Panamá.

(2) Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), Santo Domingo, República Dominicana.

RECIBIDO: 23/5/2024 → APROBADO: 24/6/2024 ✉ jgonzalez@cenamep.org.pa

RESUMEN

Este artículo describe los resultados de una comparación entre dos laboratorios nacionales de metrología, ubicados en Panamá y República Dominicana, con mediciones de energía eléctrica realizadas desde agosto hasta octubre de 2023. La intercomparación se desarrolló con el objetivo de respaldar las capacidades de medición y calibración (CMC) del INDOCAL (República Dominicana) en la magnitud de energía eléctrica, específicamente para el servicio de calibración de patrones de dicha magnitud. Para ello se realizó la comparación de sus resultados de medición contra aquellos emitidos por un laboratorio con CMC reconocidas y publicadas en la base de datos del Buró Internacional de Pesas y Medidas (BIPM), en este caso el CENAMEP AIP (Panamá). Debido a que los participantes tuvieron de manera consistente un $E_n < 1$, no fue necesario implementar acciones correctivas en los laboratorios participantes para la mejora de sus procesos

de calibración de patrones de energía eléctrica. Con los resultados de este estudio se fortalece la confianza de la gestión técnica de los dos laboratorios participantes y, en consecuencia, de la infraestructura nacional de la calidad en ambos países.

Palabras clave: incertidumbre, error normalizado, patrón de referencia, trazabilidad.

ABSTRACT

This article describes the results of a comparison between two national metrology laboratories, located in Panama and the Dominican Republic, regarding electrical energy measurements carried out from August to October 2023. The intercomparison was developed with the objective of supporting calibration and measurement capabilities (CMC) of INDOCAL (Dominican Republic) in the magnitude of electrical energy, specifically for the calibration service of standards of this magnitude. To this purpose, the comparison of their measurement results was carried out against those issued by a laboratory with a recognized CMC and published in the database of the International Bureau of Weights and Measures (BIPM), in this case CENAMEP AIP (Panama). Because the participants consistently had an $E_n < 1$, it was not necessary to implement corrective actions in the participating laboratories to improve their electrical energy standard calibration processes. The results of this study strengthen the confidence of the technical management of the two participating laboratories and, consequently, of the national quality infrastructure in both countries.

Keywords: normalized error, reference standard, traceability, uncertainty.

RESUMO

Este artigo descreve os resultados de uma comparação entre dois laboratórios nacionais de metrologia, localizados no Panamá e na República Dominicana, com medições de energia elétrica realizadas de agosto a outubro de 2023. A intercomparação foi desenvolvida com o objetivo de apoiar capacidades de medição e calibração (CMC) do INDOCAL (República Dominicana) na magnitude de energia elétrica, especificamente para o serviço de calibração de padrões dessa magnitude. Para tanto, foi realizada a comparação de seus resultados de medição com aqueles emitidos por um laboratório com CMC reconhecidos e publicados na base de dados do Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), neste caso o CENAMEP AIP (Panamá). Como os participantes tiveram consistentemente $E_n < 1$, não foi necessário implementar ações corretivas nos laboratórios participantes para melhorar seus processos de calibração de padrões de energia elétrica. Os resultados deste estudo fortalecem a confiança da gestão técnica dos dois laboratórios participantes e, conseqüentemente, da infraestrutura nacional de qualidade dos dois países.

Palavras-chave: erro normalizado, incerteza, padrão de referência, rastreabilidade.

INTRODUCCIÓN

La Norma ISO/IEC 17025:2017, en su numeral 7.7.2 inciso b, establece que las comparaciones interlaboratorios y los ensayos de aptitud son una herramienta valiosa para asegurar el control de la calidad y la validez de los resultados de los ensayos y calibraciones llevados a cabo por un laboratorio determinado (International Organization for Standardization, 2017).

El Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP) y el Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), en cumplimiento con lo establecido por dicha norma y con el fin de evaluar la calidad de sus mediciones, realizaron una comparación interlaboratorio en la magnitud de energía eléctrica, específicamente para el servicio de calibración de patrones de energía eléctrica. Esta comparación se desarrolló del 30 de agosto al 23 de octubre del año 2023.

Por su parte, este estudio se realizó visualizando a la infraestructura de la calidad (IC) como el marco referencial para el desarrollo económico y social tanto de Panamá como de República Dominicana. En ambos países, la IC es considerada como parte de toda su infraestructura, con el mismo nivel de jerarquía que tienen las carreteras, los hospitales, los centros de educación, los sistemas de transporte y las redes de distribución eléctrica, entre otros recursos. Esta consideración se observa, por ejemplo, en el documento “Visión Metrológica Panamá 2050” (Centro Nacional de Metrología de Panamá, CENAMEP AIP, 2023), así como también en el “Plan Estratégico Institucional 2021-2024” de la República Dominicana (Instituto Dominicano para la Calidad, INDOCAL, 2021), en el que la meta es claramente la inserción competitiva en la economía global y el bienestar social.

Adicionalmente, cuando la IC funciona de manera adecuada apoya al desarrollo industrial, la competitividad del comercio, el uso eficiente de los recursos naturales, la seguridad alimentaria, la salud y el combate al cambio climático (Canelas-Santiesteban et al., 2022). En este mismo sentido, un sistema confiable de la IC depende de las interacciones efectivas entre una serie de iniciativas, instituciones (públicas y privadas), actividades y personas. Dichas instituciones pueden ser las entidades regulatorias, los organismos evaluadores de la conformidad, las entidades de normalización y reglamentación técnica, los laboratorios de prueba y los laboratorios de calibración, entre otras.

El CENAMEP AIP, en su calidad de Laboratorio Nacional de Metrología, y como uno de los actores claves de la IC en Panamá, tiene entre sus funciones establecer comparaciones interlaboratorios para mejorar o evidenciar la competencia técnica de los laboratorios de calibración y ensayos (Panamá, 2007). De igual modo, el INDOCAL está llamado al apoyo a la IC a través de su “Política No. 22. El desarrollo industrial, una prioridad”, tal como se menciona en su Plan Estratégico Institucional 2021 – 2024 (Instituto Dominicano para la Calidad, INDOCAL, 2021).

La energía eléctrica es fundamental para muchos aspectos de la vida en la sociedad moderna y lo será aún más a medida que se amplíe su papel en la logística, el transporte, la comunicación y la calefacción. Se estima que la demanda global de la energía para el 2025 aumentará en 2500 TWh con respecto a la demanda del 2022; y, partiendo de estas aseveraciones incluidas en el Electricity Market Report (International Energy Agency, 2023), se espera que los países realicen esfuerzos para monitorear y evaluar factores como la disponibilidad, el acceso y la calidad del suministro eléctrico que recibe la población.

En este sentido, garantizar una adecuada medición de esta magnitud (así como de los parámetros ligados a ella), toma alta relevancia y es en este momento en que la metrología, a través de mediciones confiables en los laboratorios nacionales, debe garantizar la equidad en las transacciones de compra y venta de energía eléctrica. Estas transacciones van desde la correcta facturación por el consumo de energía en los hogares hasta los grandes acuerdos comerciales de compra y venta entre la industria y las empresas distribuidoras, así como aquellas transacciones realizadas entre países a través de los organismos regionales de transmisión de la energía eléctrica.

En este artículo se describen los resultados de la comparación realizada entre dos laboratorios nacionales de metrología: el CENAMEP AIP y el INDOCAL. El objetivo primordial de esta intercomparación fue respaldar las capacidades de medición y calibración (CMC) del INDOCAL en la magnitud de energía eléctrica, específicamente para el servicio de calibración de patrones de energía eléctrica, mediante el análisis estadístico y evaluación de los resultados emitidos por el INDOCAL contra los emitidos por el CENAMEP AIP, quien posee su CMC publicada y reconocida internacionalmente por el BIPM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sobre el protocolo de la comparación

El marco de trabajo bajo el cual se realizó la comparación interlaboratorio fue establecido en un documento previamente elaborado, denominado protocolo de comparación. El objetivo de este protocolo fue contar con una hoja de ruta mutuamente acordada que sirviera como guía de trabajo para las actividades y los aspectos técnicos más importantes de la comparación llevada a cabo en ambos laboratorios.

El CENAMEP AIP se encargó de elaborar el protocolo y el documento fue presentado, discutido y acordado en reuniones virtuales desarrolladas entre los participantes. Algunos de los tópicos incluidos en el documento final fueron: objetivo de la comparación, requisitos de participación, cronograma de participación, descripción del patrón viajero, instrucciones generales de medición, valor de referencia de la comparación, método de evaluación de desempeño a utilizar, plantillas para el reporte de los resultados y su confidencialidad, e informe final. Estos aspectos se describen en las siguientes secciones.

Laboratorios participantes y patrón viajero

Las dos entidades participantes fueron el Laboratorio Nacional de Mediciones Eléctricas del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL) y el Laboratorio Primario de Energía y Potencia (E2) del CENAMEP AIP. Este último organizó y coordinó las actividades de la comparación, así como también proporcionó el patrón viajero y sus valores de referencia. Para la comparación se utilizó un patrón de energía y potencia eléctrica monofásico de clase 0.01, marca Radian Research, Inc., modelo RD-23-433. Las principales características técnicas del patrón viajero empleado en este estudio se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1. Información del patrón viajero empleado en esta intercomparación.

Características	Información del patrón
Modelo	Radian Research, Inc., RD-23-433
Entrada de corriente	0.2 A - 67 A
Entrada de tensión	30 V - 630 V, auto rango
Frecuencia	45 Hz - 75 Hz
Ángulo de fase	0° a 360°
Constante Kh	100 000 imp/Wh
Temperatura	20 °C - 30 °C
Alimentación eléctrica	120 V - 240 V, 50 Hz - 60 Hz

Puntos de comparación

En la Tabla 2 se presentan los parámetros medidos durante la intercomparación, los mismos que fueron acordados por los dos laboratorios participantes. En dicha tabla, los caracteres FP representan el factor de potencia, donde FP 1.0 corresponde al factor de potencia unitario, FP 0.5i corresponde al factor de potencia 0.5 inductivo y FP 0.5c corresponde al factor de potencia 0.5 capacitivo.

TABLA 2. Puntos de comparación empleados en el estudio en los dos países.

Número	Tensión (V)	Corriente (A)	Factor de potencia (FP)
1	120	0.5	1.0
2	120	5.0	1.0
3	120	5.0	0.5i
4	120	5.0	0.5c
5	120	10.0	1.0
6	120	10.0	0.5i

Cabe indicar que para todas las mediciones sólo se utilizó la fase A del patrón RD-23-433 y una frecuencia de 60Hz.

Programa de la comparación y metodología

El programa de participación de los dos laboratorios en esta comparación tuvo como punto de origen al CENAMEP AIP (como laboratorio piloto), para luego continuar en el INDOCAL y finalmente retornar al CENAMEP AIP. El traslado del patrón viajero durante la comparación tuvo como responsabilidad primaria al INDOCAL; para ello, envió a su personal técnico

del Laboratorio Nacional de Mediciones Eléctricas a retirar y posteriormente a devolver dicho patrón a las instalaciones físicas del CENAMEP AIP, en Ciudad de Panamá. Mediante esta modalidad de traslado, se agilizó y cumplió con el cronograma trazado para la comparación. Finalmente, se realizó una medición final en el CENAMEP AIP (piloto), para asegurar la ausencia de posible deriva por el traslado del equipo. Las fechas de participación para las mediciones en cada uno de los laboratorios fueron:

- En el Laboratorio Primario de Energía y Potencia (E2) del CENAMEP AIP: del 30 de agosto al 10 de octubre de 2023.
- En el Laboratorio Nacional de Mediciones Eléctricas del INDOCAL: del 13 al 19 de octubre de 2023.

Método y trazabilidad de las mediciones por participante

En el protocolo de la comparación, se acordó dentro del alcance y requisitos de participación que el laboratorio participante debía ostentar la capacidad técnica e instrumental, para ejecutar el servicio de calibración de patrones de energía eléctrica de una clase de exactitud de 0.05 %. Adicionalmente, el laboratorio debía emplear un sistema de medición basado en el método de comparación directa de pulsos entre los emitidos por un equipo bajo prueba, contra los registrados o contabilizados por un patrón de referencia.

Con base en lo anterior, para la calibración del patrón viajero los participantes utilizaron sus propias instalaciones, equipos y métodos de medición, determinando el error y estimando la incertidumbre asociada para cada uno de los puntos de comparación indicados en la Tabla 2. Por otra parte, en la Tabla 3 se presentan los métodos de calibración y los patrones de referencia utilizados por los participantes con su fuente de trazabilidad.

TABLA 3. Métodos de calibración, patrones y fuente de trazabilidad empleados en el estudio.

Laboratorio	Método	Patrón	Clase	Trazabilidad
INDOCAL	Comparación directa	Radian Research, Inc. RD-22-332	0.005	Radian Research, Inc.* (fábrica)
CENAMEP AIP	Comparación directa	ZERA, COM 3003	0.008	PTB (Alemania)

* Este equipo tiene trazabilidad al National Institute of Standards and Technology, NIST, de Estados Unidos de América.

Cálculo de la incertidumbre: presupuesto

En la Tabla 4 se presenta el presupuesto de incertidumbre para el punto de: 120 V, 5 A y FP 1. En dicho presupuesto se plasman las componentes que se consideraron con base

en el sistema de medida (variación de las indicaciones de error, calibración del patrón de referencia, resolución y deriva del patrón, e influencia de la temperatura).

TABLA 4. Presupuesto de incertidumbre para el punto de medición 120 V, 5 A, FP 1.

Componentes principales de la incertidumbre (<i>y_i</i>)	Incertidumbre estándar <i>u_i(y_i)</i>		Método tipo A o B de evaluación/Función de distribución de probabilidad	Coficiente de sensibilidad (<i>C_i</i>)	Contribución de la incertidumbre <i>u_i(R_i)</i>		Grados de libertad (<i>n_i</i>)
Desviación de las lecturas del patrón viajero	0.4	μWh/ VAh	Tipo A (Normal)	1	0.4	μWh/ VAh	44
Incertidumbre de calibración estándar	20.0	μWh/ VAh	Tipo B (Normal)	1	20.0	μWh/ VAh	1000
Resolución del patrón	0.6	μWh/ VAh	Tipo B (Rectangular)	1	0.6	μWh/ VAh	1000
Deriva del patrón	14.4	μWh/ VAh	Tipo B (Rectangular)	1	14.4	μWh/ VAh	1000
Coficiente de temperatura estándar	2.9	μWh/ VAh	Tipo B (Rectangular)	1	2.9	μWh/ VAh	1000
Suma de raíces cuadráticas de incertidumbres estándar tipo A y grados de libertad efectivos					0	μWh/ VAh	7
Suma de raíces cuadráticas de incertidumbres estándar de tipo B y grados de libertad efectivos					25	μWh/ VAh	617000
Incertidumbre estándar combinada y grados de libertad efectivos					25	μWh/ VAh	613838
Incertidumbre ampliada (factor de cobertura del 95,45%)					50	μWh/ VAh	2.0

Procedimientos utilizados

En la Figura 1 se presenta el esquema simplificado del proceso llevado a cabo para el desarrollo de la comparación interlaboratorio en los dos países. Se presentan las etapas, las principales actividades conducidas en ambos laboratorios y sus respectivos entregables.

En términos generales, este estudio tuvo un total de cuatro etapas (planeación; ejecución; análisis y evaluación; y emisión de resultados), con entregables que iniciaron con el protocolo de la comparación hasta la confección del informe final de este estudio (Figura 1).



FIGURA 1. Esquema simplificado del proceso realizado en la comparación interlaboratorio en los dos países.

Valor de referencia y aseguramiento de los resultados

Los valores de referencia fueron establecidos por el CENAMEP AIP de acuerdo con lo acordado por los participantes en una reunión inicial de la comparación. Dicho centro, para establecer los valores de referencia realizó mediciones semanales en cada punto de medida al patrón viajero, por un periodo aproximado de un mes, previo al traslado del equipo hacia el INDOCAL (caracterización del patrón).

Adicionalmente, a fin de asegurar los resultados y descartar alguna posible deriva por el traslado del equipo, el CENAMEP AIP realizó también una medición final luego del retorno del patrón y verificó que las diferencias encontradas entre estas mediciones y las realizadas inicialmente se mantuvieran dentro de los niveles de incertidumbres reportadas por el piloto (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre las comparaciones realizadas

En la Tabla 5 se describen los resultados emitidos por los laboratorios participantes luego de la calibración del patrón viajero. Los errores e incertidumbres asociadas fueron expresados en $\mu\text{Wh}/\text{VAh}$.

TABLA 5. Resultados emitidos por los laboratorios participantes.

Puntos de medición Patrón viajero		Error			Incertidumbre ($k = 2$)		
		0°	+60°	-60°	0°	+60°	-60°
INDOCAL	120 V 0.5 A	26	-	-	59	-	-
	120 V 5.0 A	17	15	19	59	62	62
	120 V 10.0 A	14	-	27	59	-	62
CENAMEP AIP	120 V 0.5 A	15	-	-	50	-	-
	120 V 5.0 A	18	-29	66	50	50	50
	120 V 10.0 A	13	-	64	50	-	50

Cabe indicar que en la Tabla 5, el valor 0° representa un factor de potencia unitario; +60° un factor de potencia 0.5 capacitivo y -60° un factor de potencia 0.5 inductivo.

A continuación, en la Figura 2 se presentan los resultados generados por los dos laboratorios participantes para cada uno de los puntos de prueba.

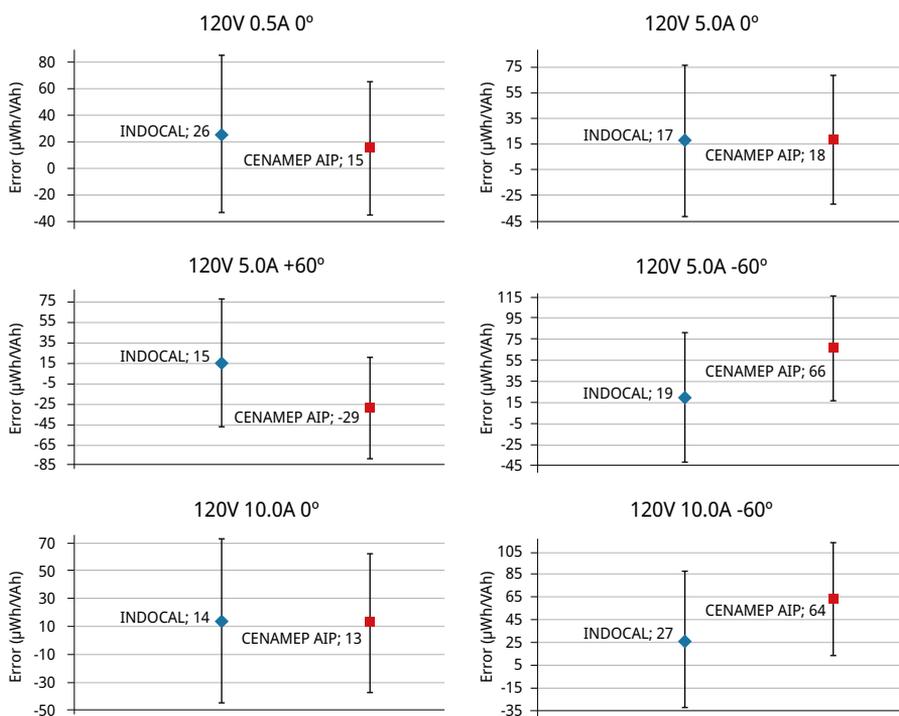


FIGURA 2. Resultados generados por los dos laboratorios participantes (donde 0° representa un factor de potencia unitario; +60° es un factor de potencia 0.5 capacitivo; y, -60° es un factor de potencia 0.5 inductivo).

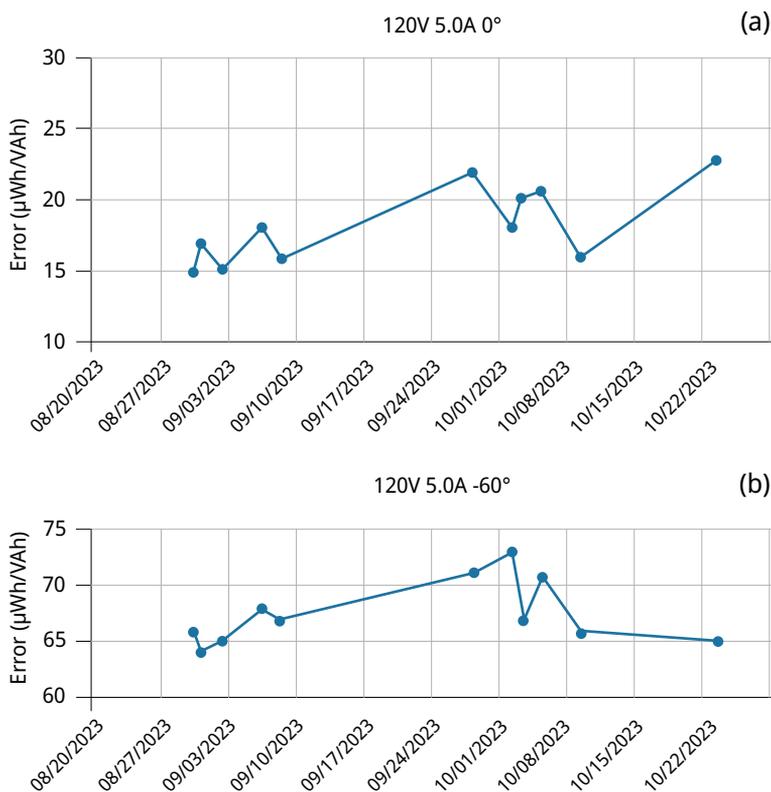
En las seis secciones de la Figura 2, es posible observar los valores de error reportados por cada participante en los distintos puntos de prueba ensayados, donde el punto de

color azul representa el valor de error reportado por el INDOCAL (en $\mu\text{Wh}/\text{VAh}$), mientras que el punto de color rojo corresponde a los errores reportados por el CENAMEP AIP. En ambos casos, las barras que acompañan por ambos lados a los puntos azules y rojos representan los valores de incertidumbre que declararon los laboratorios participantes, INDOCAL y CENAMEP AIP, respectivamente.

Con base en lo establecido y acordado en el protocolo de la comparación, los participantes en ambos países utilizaron la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida JCGM 100:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008) para estimar la incertidumbre de sus mediciones.

Sobre el aseguramiento de los resultados

Para asegurar los resultados de la intercomparación y descartar posible deriva por el traslado del equipo, el CENAMEP AIP realizó una medición luego del retorno del patrón y verificó que las diferencias encontradas entre las mediciones finales y las realizadas inicialmente se mantuvieran dentro de niveles adecuados de incertidumbre. En la Figura 3 se muestra el estudio de deriva realizado al patrón, con mediciones semanales realizadas desde agosto hasta octubre de 2023. Esta última fecha corresponde a la medición realizada al retorno del equipo desde República Dominicana. Se presentan tres imágenes para los puntos de: 120V 5.0A 0°, 120V 5.0A -60° y 120V 5.0A +60°. Las diferencias encontradas entre las mediciones realizadas antes de enviar el patrón, contra las realizadas a su retorno, no superaron los 20 $\mu\text{Wh}/\text{VAh}$.



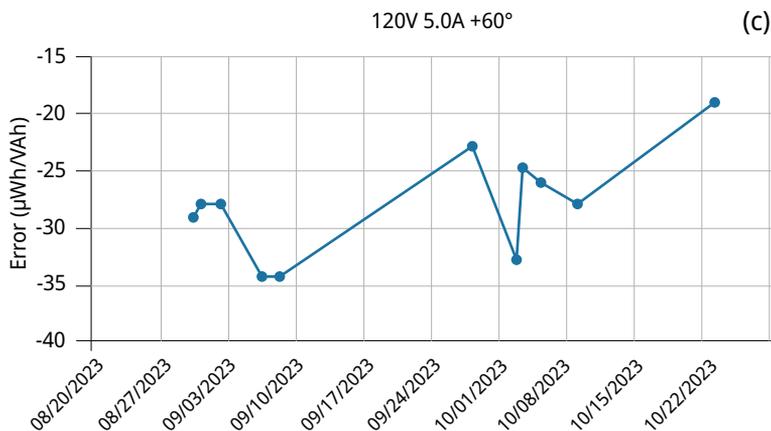


FIGURA 3. Mediciones realizadas para descartar posible deriva por el traslado del equipo. Datos generados para los puntos: (a) 120V 5.0 A 0°, (b) 120V 5.0 A -60° y (c) 120V 5.0 A +60°.

Evaluación de los resultados

Sobre la base de lo acordado y establecido en el protocolo de la comparación, para la evaluación de los resultados se utilizó la herramienta estadística denominada error normalizado (E_n). El error normalizado permite comparar los resultados emitidos por los laboratorios participantes y los emitidos por el laboratorio piloto, considerando las incertidumbres respectivas de ambos asociadas a la medición.

La Norma ISO/IEC 17043:2023 (International Organization for Standardization, 2023) en su Anexo B, acápite B.4.1.3, establece al error normalizado como una de las herramientas estadísticas a utilizar en la evaluación de resultados de una comparación interlaboratorio, mientras que la Norma ISO 13528:2022 (International Organization for Standardization, 2022) en su numeral 9.7.1, lo define mediante la siguiente ecuación:

$$E_n = \frac{|x - X|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1)$$

Donde:

E_n = error normalizado.

x = resultados reportados por el laboratorio participante.

X = valor de referencia (resultados del laboratorio piloto).

U_{lab} = incertidumbre expandida del resultado del laboratorio participante.

U_{ref} = incertidumbre expandida del resultado del laboratorio piloto.

De igual manera, según la Norma ISO/IEC 17043:2023 (en su Anexo B, acápite B.4.1.3 literal e) y la Norma ISO 13528:2022 (en su numeral 9.7.2), un valor de $|E_n| > 1.0$ indica que el resultado no es satisfactorio y amerita un adecuado seguimiento y correctivos por parte del participante, a modo de vislumbrar la causa raíz que originó la desviación. En contraste, un valor de $|E_n| \leq 1.0$ indica un resultado satisfactorio.

Con base en lo anterior, para esta comparación, la evaluación del grado de equivalencia entre los laboratorios se calculó mediante la diferencia entre los valores reportados por el laboratorio INDOCAL contra el valor de referencia emitido por el laboratorio piloto (el CENAMEP AIP).

$$D_{CENAMEP - INDOCAL} = X_{CENAMEP} - X_{INDOCAL} \quad (2)$$

Y, empleando la incertidumbre expandida con factor de cobertura $k = 2$, se genera:

$$U(D_{CENAMEP - INDOCAL}) = \sqrt{u^2(X_{CENAMEP}) + u^2(X_{INDOCAL})} \quad (3)$$

A partir de esta diferencia y la incertidumbre correspondiente, la ecuación (1) para el cálculo del error normalizado para cada valor nominal de la comparación quedó de la siguiente forma:

$$E_n = \frac{|D_{CENAMEP - INDOCAL}|}{U(D_{CENAMEP - INDOCAL})} \quad (4)$$

Según lo expuesto, en la Tabla 6 se presentan los grados de equivalencia entre los dos laboratorios participantes.

TABLA 6. Grados de equivalencia entre los dos laboratorios participantes.

Tensión (V)	Corriente (A)	Ángulo (°)	Diferencia CENAMEP - INDOCAL (μWh/VAh)	Incertidumbre expandida (μWh/VAh)	Error normalizado (E_n)
120	0.5	0	-11.3	77	0.1
	5.0	0	0.5	80	0.0
	5.0	-60	47.0	80	0.6
	5.0	+60	-44.7	77	0.6
	10.0	0	-1.1	80	0.0
	10.0	-60	37.3	80	0.5

En la Tabla 6 se puede apreciar que las mayores diferencias entre los errores reportados por los participantes fueron en los puntos de prueba con un factor de potencia 0.5 inductivo (ángulo de -60°) y 0.5 capacitivo (ángulo de 60°), motivo por el cual al aplicar la herramienta estadística del E_n , esos puntos resultaron con valores superiores o iguales a 0.5. En la Figura 2 es posible visualizar estas diferencias.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados reportados por el participante INDOCAL (en la Tabla 5), se calcularon los errores normalizados para cada punto de la comparación. Por otra parte, en la Tabla 6 se plasman estos resultados y se concluye que los mismos son consistentes dentro de la incertidumbre reportada por este laboratorio. Además, dichos datos indican una equivalencia aceptable al compararlos con los resultados emitidos por el CENAMEP AIP (laboratorio piloto), ya que luego de aplicar el estadístico error normalizado (E_n) no se obtuvieron valores superiores a la unidad.

La ausencia de valores no satisfactorios, es decir un $|E_n| > 1.0$, luego de aplicar el error normalizado, constituyó para los laboratorios participantes un respaldo técnico y un incremento en la confiabilidad de sus mediciones y los valores de incertidumbre reportados. Por ello, luego de este ejercicio, no hubo cabida para el levantamiento de algún tipo de acción correctiva.

Ambos laboratorios participantes acordaron que los valores de referencia, para todos los puntos de prueba, fueran establecidos por el CENAMEP AIP, debido a que este laboratorio ha mantenido el reconocimiento y publicación de sus CMC en energía eléctrica por más de 15 años. A ello se suma el hecho de haber participado con resultados satisfactorios en las últimas dos comparaciones a nivel del Sistema Interamericano de Metrología (SIM) en la magnitud de energía eléctrica: comparaciones SIM.EM-S7 (Carranza et al., 2016) y SIM.EM-S14 (González et al., 2019).

Adicionalmente, con el resultado obtenido en esta comparación, el INDOCAL valida sus capacidades en el servicio de calibración de patrones de energía eléctrica. Esto, sin duda, ayudará a reforzar el rol del INDOCAL como fuente de trazabilidad en lo referente a mediciones de energía eléctrica en República Dominicana y en la región del Caribe, impactando positivamente a toda la infraestructura de la calidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a sus respectivos laboratorios, autoridades y entidades en República Dominicana (INDOCAL) y en Panamá (CENAMEP AIP), por facilitar los recursos de trabajo y la logística para la conducción de esta comparación interlaboratorio; se agradece el apoyo del Ing. Lorenzo Ramírez y del Magister Javier Arias, directores generales de ambas entidades, respectivamente.

El Laboratorio Nacional de Mediciones Eléctricas del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL) agradece al personal del CENAMEP AIP por el soporte técnico y logístico durante los procesos de la comparación interlaboratorio. Se agradece también, y de manera especial, el apoyo del INDOCAL, en las manos del Ing. Rubén Neris (director de metrología) y a los colaboradores del Laboratorio Nacional de Mediciones Eléctricas, los ingenieros Analdo Ramírez, Euri Tejada y Wascar García.

Los nombres de los laboratorios participantes y los resultados emitidos son presentados en esta publicación en común acuerdo con todos los participantes y los autores de este artículo científico.

REFERENCIAS

- Canelas-Santiesteban, E.; Harmes-Liedtke, U.; Valqui, A.; Flores-Campos, M.; Lugo, G.; Liewald, W. y Rivadeneira, M., 2022. *Infraestructura de la calidad para la economía circular en América Latina y el Caribe* [En línea]. Quito: Consejo de la Infraestructura de la Calidad de América (QICA). (Documentos para la infraestructura de la calidad de América; 1). [Consulta: 15 de enero de 2024]. Disponible en: <https://qica.site/wp-content/uploads/2023/03/Estudio-IC-EC-ESP-Online-PTB.pdf>.
- Carranza, R.; Campos, S.; Castruita, A.; Nelson, T.; Ribeiro, A.; So, E.; Spaggiari, A.; Slomovitz, D.; Izquierdo, D.; Postigo, H.; Díaz, H.; Sánchez, H.; González, J.; Ramos, R. y Zipaquirá A., 2016. Final Report. Supplementary comparison of 50/60 Hz energy SIM. EM-S7. En: *Metrología*, (53), 1A 01008.
DOI: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0026-1394/53/1A/01008>.
- Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP), 2023. *Visión metroológica Panamá 2050* [En línea]. Panamá: NOVAPRINT, S.A. ISBN 978-9962-8557-0-5. [Consulta: 19 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.cenamep.org.pa/wp-content/uploads/2023/07/LIBRO%20-%20CENAMEP%20-%20PARA%20PLATAFORMA%20DIGITAL.pdf>.
- González, J.; Espinosa, C. y Halawa, M., 2019. Final report. Bilateral comparison of 50/60 Hz energy SIM. EM-S14. En: *Metrología*, (56), 1A 01006.
DOI: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0026-1394/56/1A/01006>.
- Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), 2021. *Plan estratégico institucional 2021-2024* [En línea]. Santo Domingo: INDOCAL. [Consulta: 19 de enero de 2024]. Disponible en: <https://indocal.gob.do/transparencia/plan-estrategico/>.
- International Energy Agency, 2023. *Electricity market report 2023* [En línea]. París: IEA Publications. [Consulta: 19 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.iea.org/reports/electricity-market-report-2023>.
- International Organization for Standardization, 2017. ISO/IEC 17025:2017. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2022. ISO/IEC 13528:2022. *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2023. ISO/IEC 17043:2023. *Evaluación de la conformidad - Requisitos generales para la competencia de los proveedores de ensayos de aptitud*. Ginebra: ISO.
- Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG1), 2008. *JCGM 100:2008. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement* [En línea]. Sèvres Cedex: JCGM. [Consulta: 19 de enero de 2024]. Disponible en: https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6.
- Panamá. Ley No. 52, de 11 de diciembre de 2007. *Gaceta Oficial Digital* [En línea], 19 de diciembre de 2007, No. 25943. [Consulta: 19 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/25943/8093.pdf>.