

ISSN 1688-6593 [en línea]

Número 16  
Julio - diciembre 2018

# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



---

## INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

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

### Equipo editorial

#### Dirección

Dr. Jorge Silveira,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

#### Consejo editorial

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

PhD. Federico Harte,  
Profesor adjunto de Food Science, Penn State University, Estados Unidos

MSc. Rosa Márquez,  
Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo Méndez,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Uruguay

PhD. Laura Moya Silva,  
Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez,  
INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel Volpe,  
Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

#### Edición

Lic. Marina Barrientos,  
Edición revistas INNOTEC, Centro de Información Técnica,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

## Acerca de INNOTEC

INNOTEC es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Editada en Montevideo, Uruguay, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

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

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



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

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-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 16 - Julio a diciembre de 2018

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, ints. 1314 y 1350  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
<http://www.latu.org.uy>  
<http://ojs.latu.org.uy>

---

### Administración de OJS y gestión de información

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

### Diseño

Manosanta Desarrollo Editorial

## Política editorial 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 [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

# SUMARIO

Instrucciones a los autores . . . . . 5

## ARTÍCULOS

### AGUAS

#### 08 Detección de poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp. con distintas preferencias ambientales. Estudio de caso: embalse de Salto Grande

Detection of toxic *Microcystis* spp. genotypes with different environmental preferences.

Case study: Salto Grande reservoir

Lepillanca, Facundo; Martínez de la Escalera, Gabriela; Bordet, Facundo; O'Farrell, Inés; Piccini, Claudia.

#### 17 Variabilidad y tendencia de la temperatura superficial de los grandes embalses del Río Negro

Surface water temperature trend and variability of the Negro River large reservoirs

Manta, Gastón; Alcántara, Ignacio.

#### 27 Variación de los hábitos tróficos en nueve especies de peces de la Laguna Garzón (Uruguay)

Feeding habits variation within nine fish species from Laguna Garzón (Uruguay)

García-Sposito, Camilo; Malfatti, Francisco; Laborde, Sabrina; Scarabino, Fabrizio; García-Rodríguez, Felipe; Bergamino, Leandro

NOTA TÉCNICA

### ALIMENTOS

#### 35 Understanding consumers' underlying motives for purchasing cheese with health benefits

Respuesta de los consumidores uruguayos a quesos con beneficios nutricionales

Arcia, Patricia; Curutchet, Ana; Costell, Elvira; Tárrega, Amparo.

#### 40 Bagazo de cervecería como ingrediente en el desarrollo de panificados. Impacto del rotulado en la intención de compra y aceptabilidad

Brewer's spent grain as an ingredient in the development of bakeries.

Impact of labeling on purchase intention and acceptability

Arcia, Patricia; Curutchet, Ana; Cozzano, Sonia; Rodríguez, Santiago.

#### 47 Efecto de la incentivación de las abejas con carbohidratos sobre la composición isotópica de 13C de mieles de Uruguay

Effect of energetic incentive of bees with carbohydrates on the 13C isotopic composition of honeys from Uruguay

Berriel, Verónica.

#### 51 Color and electrical conductivity of honeys produced by *Apis mellifera* in Uruguay

Color y conductividad eléctrica de las mieles producidas por *Apis mellifera* en Uruguay

Santos, Estela; Meerhoff, Erika; García Da Rosa, Eloísa; Ferreira, José; Raucher, Mario;

Quintana, Walter; Martínez, Ariel; González, Carlos; Mancebo, Yanina.

### METROLOGÍA

#### 56 Cuatro experiencias de automatización en Metrología y su impacto en el riesgo de calidad y la eficiencia operativa

Four automation experiences in Metrology and their impact on quality risk and operational efficiency

Constantino, Pablo; Acquarone, Alejandro; Mazini, Marcos; Robatto, Ofelia;

Ponticorbo, Verónica; Fajardo, Simone.

---

### **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 de acuerdo al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

#### **Los revisores se comprometen a:**

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

#### **El equipo editorial se compromete a:**

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

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

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

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

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

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

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

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

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

publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

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

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

## Proceso de revisión

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

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

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

## Normas de presentación y envío de los textos

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@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 en relación al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

**Reconocimientos.** 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 y español.

**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 y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

**Palabras clave,** 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, gráficos e imágenes, (ver sección *Estilo y formato de citas y referencias* en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

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

**Fórmulas, figuras, tablas y gráficos.** Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de visualización). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Las tablas se numeran según el orden de aparición en el texto, y su título explicativo debe ubicarse en el margen inferior. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

Los gráficos deben ser enviados en formato xls o doc, con los datos editables, para su eventual utilización en la etapa de diseño. No se consideran válidos los gráficos enviados en formato jpg, salvo en los casos en los que hayan sido creados en programas que no habilitan la exportación a Excel.

Además de estar insertadas en el artículo, cada figura, gráfico y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

## Estilo de citas y referencias según el sistema Harvard

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

### Ejemplos usuales de citas

*Registro de citas textuales*

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

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

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

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

(Alonso, 1988b, p.84)

*Registro de cita ideológica o paráfrasis*

---

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

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

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

### **Ejemplos usuales de referencias Monografías (libros)**

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. Título del libro en cursiva. Nº de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; Nº). ISBN (Este último si se posee)

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

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

### **Revistas como un todo**

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

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

### **Artículos de revistas**

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen(Número), páginas.

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.

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

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.bfafh.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.

# Detección de poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp. con distintas preferencias ambientales. Estudio de caso: embalse de Salto Grande

## Detection of toxic *Microcystis* spp. genotypes with different environmental preferences. Case study: Salto Grande reservoir

Lepillanca, Facundo (1); Martínez de la Escalera, Gabriela (1); Bordet, Facundo (2); O'Farrell, Inés (3); Piccini, Claudia (1) (1) Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, IIBCE, Montevideo, Uruguay. (2) Área de Gestión Ambiental, Comisión Técnica Mixta de Salto Grande, Montevideo, Uruguay. (3) Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Instituto IEGEBA (CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: [claudia.piccini@gmail.com](mailto:claudia.piccini@gmail.com)

RECIBIDO: 9/7/2018 – APROBADO: 11/10/2018

### Resumen

En este trabajo se evaluó la dinámica y toxicidad de *Microcystis* spp. en el embalse de Salto Grande en invierno y verano de 2013, así como la diversidad genética de sus poblaciones tóxicas mediante análisis de *melting* de alta resolución de amplicones del gen *mcyJ*. La abundancia de células de *Microcystis* spp. varió entre los distintos sitios y entre estaciones; en verano se detectó una abundancia significativamente mayor de células y genotipos tóxicos así como de microcistina-LR. Además, se detectaron dos grupos de genotipos *mcyJ* (*clusters* 1 y 2) con diferentes preferencias ambientales. El 1 estuvo integrado por muestras de *Microcystis* spp. obtenidas en condiciones de bajas temperaturas ( $\leq 17,6$  °C) y mayor conductividad ( $\sim 52$ - $58$   $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), con bajo número de células y ausencia de microcistina-LR. Las muestras incluidas en el *cluster* 2 se caracterizaron por ser de verano (temperatura entre 17,6 y 25,9 °C), tener menor conductividad ( $\sim 50$ - $52$   $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), alta abundancia de células y microcistina-LR. Nuestros resultados sugieren que las poblaciones tóxicas de *Microcystis* que florecen en verano serían diferentes a las que se mantienen durante el invierno y que la temperatura y conductividad del agua serían variables relevantes que controlarían su abundancia y toxicidad.

Palabras clave: *Microcystis*, genotipos tóxicos, *mcyJ*, HRM, embalse Salto Grande.

### Abstract

In this work, the dynamics and toxicity of *Microcystis* spp. in Salto Grande reservoir (Uruguay river), as well as the genetic diversity of their toxic populations were assessed in winter and summer during 2013. Cell abundance of *Microcystis* spp. varied amongst different sites and between seasons, showing a significantly higher cell and toxic genotype abundances (copies of *mcyE* gene) and microcystin-LR concentration during summer. Furthermore, when genetic diversity of toxic *Microcystis* was analyzed by high resolution melting analysis of *mcyJ* amplicons, two genotypes exhibiting different environmental preferences were detected (*cluster* 1 and 2). *Cluster* 1 included samples found at water conditions of low temperature (lower than 17,6 °C) and slightly higher conductivity ( $\sim 52$  to  $58$   $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), showing small *Microcystis* abundance and absence of microcystin-LR, whereas *cluster* 2 comprised samples from higher temperatures (between 17,6 and 25,9 °C) and lower conductivity ( $\sim 50$  to  $52$   $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) conditions, and with a higher cell abundance and microcystin-LR production. Our results suggest that toxic *Microcystis* spp. populations that bloom during summer are different from those that persist during winter and pointed to water temperature and conductivity as relevant variables that control their abundance and toxicity.

Keywords: *Microcystis*, toxic genotypes, *mcyJ*, HRM, Salto Grande reservoir.

## Introducción

Las floraciones son eventos en los que se produce un incremento de la biomasa de una o unas pocas especies de

cianobacterias en períodos cortos de tiempo. La importancia de estos eventos radica en el impacto que tienen sobre el ecosistema acuático, ya que alteran el ciclo de los nutrientes y disminuyen la disponibilidad de luz y oxígeno,



causando una disminución de la biodiversidad y deterioro de la calidad del agua (Sivonen y Jones, 1999; Havens, 2007; Karjalainen, et al., 2007). En Uruguay se han registrado floraciones de cianobacterias en diferentes ecosistemas acuáticos desde la década de los 80 (Quirós y Luchini, 1982; Feola, et al., 2008; Kruk, et al., 2015; Bonilla, et al., 2015) y las especies de cianobacterias formadoras de floraciones más frecuentes son *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena*, *Planktothrix agardhii* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Aubriot, et al., 2011; UNESCO, 2009; Vidal y Kruk, 2008; De León y Yunes, 2001; Bonilla, 1997).

Las floraciones son favorecidas por las actividades antropogénicas (actividad agrícola-ganadera, industrial y urbanización), tales como el uso de fertilizantes, el vertido al agua de desechos domiciliarios no procesados, entre otros (Mazzeo, et al., 2002; Chalar, 2009; Rodríguez-Gallego, 2010). Estas actividades aportan nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) al ecosistema acuático y pueden causar su eutrofización, favoreciendo el crecimiento de cianobacterias (De León y Yunes, 2001). Una de las preocupaciones asociadas a la presencia de floraciones de cianobacterias es debida a la capacidad de producir toxinas (cianotoxinas) que tienen algunas especies. Entre las especies potencialmente tóxicas que producen floraciones en todo el mundo se encuentran las pertenecientes al género *Microcystis* (Huisman, et al., 2005). Estas tienen la capacidad de producir microcistinas, una cianotoxina ampliamente conocida y reportada (Dittmann y Wiegand, 2006). A pesar de que existe abundante información acerca de la ecología de *Microcystis* spp. en diversos ecosistemas, no hay un consenso acerca de las condiciones ambientales que favorecen la producción de microcistinas y la proliferación de poblaciones capaces de producirlas.

Se ha descrito que durante una floración de *Microcystis* spp. conviven poblaciones tóxicas y no tóxicas y que la presencia de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas es el factor determinante de su toxicidad (Rinta-Kanto, et al., 2009). Así, las cianobacterias tóxicas serán portadoras de genes *mcy* (genotipo tóxico, *mcy+*) y las no tóxicas serán aquellas que carecen de dichos genes (genotipo no tóxico, *mcy-*). La biosíntesis de microcistinas es realizada a partir de dos complejos enzimáticos conocidos como el complejo polikétido sintetasa (KPS) y el complejo péptido sintetasa (NRPS), cuyos genes se organizan en un cluster genético integrado por dos operones bidireccionales conocido como cluster *mcy* (*mcyA-J*) (Tillett, et al., 2000).

Los primeros registros de floraciones de *Microcystis* spp. en Uruguay fueron en el embalse de Salto Grande (Quirós y Luchini, 1982) y en la actualidad se siguen registrando floraciones en todas las estaciones del año (Bordet, et al., 2017). Asimismo, Kruk et al. (2015) detectaron la presencia de floraciones de especies de *Microcystis* en el Río Uruguay tanto en verano como en invierno, sugiriendo que dadas las condiciones nutricionales adecuadas estos organismos son capaces de proliferar a bajas temperaturas. Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación mostraron que a lo largo del gradiente ambiental comprendido por el Río Uruguay y el Río de la Plata existen diferentes genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. identificados de acuerdo a las variaciones en las secuencias nucleotídicas del gen *mcyJ* (Martínez de la Escalera, comunicación personal). Cada genotipo identificado se asoció a un conjunto determinado de condiciones ambientales, principalmente en relación a

la temperatura, salinidad y turbidez. Este hallazgo llevó a proponer la existencia de ecotipos de *Microcystis* spp. adaptados a distintas condiciones ambientales (Martínez de la Escalera, comunicación personal). En este contexto, existirían distintas poblaciones de *Microcystis* adaptadas a condiciones ambientales claramente diferentes, tales como baja temperatura o alta conductividad, lo que evidencia la existencia de una gran diversidad intraespecífica que sería crucial para el éxito y proliferación de estos organismos.

Basados en estos antecedentes, la hipótesis de este trabajo propone que la estrategia que presentan las especies tóxicas del género *Microcystis* para prosperar en condiciones ambientales diversas de temperatura, salinidad, turbidez, disponibilidad de nutrientes, etcétera, involucra la existencia de alta diversidad a escala intraespecífica. Esta variabilidad incluye poblaciones con distinta capacidad para adaptarse a diversas combinaciones de las variables ambientales consignadas. Con el fin de contribuir a dilucidar esta hipótesis, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de poblaciones tóxicas de *Microcystis* en el embalse de Salto Grande y conocer las condiciones ambientales en las que prosperan. La diversidad genética se evaluó mediante el análisis de *melting* de alta resolución (HRM) de amplificaciones del gen *mcyJ*. La elección de este gen estuvo basada en evidencias que indican que no sufre recombinación (a diferencia de *mcyA,B,C*) y por tanto su secuencia presenta un mayor grado de conservación que la del resto de los genes del cluster *mcy*. Estas características lo convierten en candidato para estudios filogenéticos (Tanabe, et al., 2004, 2009; Kim, et al., 2010).

La técnica de *high resolution melting* (HRM por su sigla en inglés) se basa en la amplificación de un gen determinado mediante PCR en tiempo real y permite detectar poliformismos de nucleótido único (SNPs por su sigla en inglés). Por tanto, fue empleada para detectar variaciones en las secuencias del gen *mcyJ* teniendo en cuenta que el perfil de *melting* de una muestra estará integrado por los perfiles de cada organismo portador del gen allí presente. Esto determina que al hablar del genotipo tóxico de una muestra nos referimos al conjunto de genotipos *mcyJ* que la componen, cuya variabilidad se refleja en su perfil de *melting*.

## Materiales y Métodos

### Sitio de estudio y muestras

El embalse de Salto Grande comprende una obra de represamiento del Río Uruguay de carácter binacional argentino-uruguayo. Fue creado para la generación de energía hidroeléctrica, además de su utilización con fines domésticos y sanitarios, navegación y riego. Se presenta como un ambiente con dos subambientes diferenciados (Figura 1): una zona central que abarca un 70% de la superficie total, con un tiempo medio de permanencia histórico a cota máxima de 0,031 años, y cinco brazos laterales de distintas características (Quirós y Cuch, 1982; Quirós y Luchini, 1982). De ellos, el brazo Gualaguaycito está ubicado en las proximidades de la represa de Salto Grande correspondiente a la margen argentina, abarca un 8,5% de la superficie total, es el área más crítica respecto a la calidad del agua del embalse, y es zona de actividades náuticas deportivas y recreativas. A su vez, en la margen izquierda (uruguayo),

de condiciones morfométricas similares, se ubica el brazo Itapebí, que presenta diferencias limnológicas significativas con el brazo de margen derecha. El sitio Las Palmeras constituye una playa con condiciones tipo litoral respecto a los sitios canal, es de uso recreativo intenso, y presenta los registros máximos históricos de densidad y toxinas. El embalse se ubica pocos kilómetros aguas arriba de las ciudades de Concordia (Argentina) y Salto (Uruguay), 29° 43' y 31° 12' S y 57° 06' y 57° 55' O. Por su temperatura media anual mayor a 15 °C es considerado un sistema cálido tropical (Salas y Martino, 1991). En los brazos del embalse se han registrado floraciones de cianobacterias *Microcystis* spp. y *Dolichospermum* spp. (Quiros y Lucchini, 1982).

Se obtuvieron 19 muestras de tres estaciones de muestreo (Figura 1): Gualeguaycito, Las Palmeras (únicamente muestreado en los meses de invierno) e Itapebí en seis meses del año 2013 (febrero, abril, junio, julio, agosto, setiembre). En cada estación se extrajeron tres muestras a diferentes profundidades: nivel sub-superficial (0,2 m), límite inferior de la capa fótica (2,5 a 3 m) y una muestra a un metro de fondo. Todas las muestras se obtuvieron empleando una botella de Van Dorn.

En cada muestreo se midió conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), pH, oxígeno disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ ) mediante una sonda multiparamétrica Hydrolab DS5. Además, se determinó la concentración de nutrientes, nitrógeno total (NT,  $\text{mg L}^{-1}$ ) y fósforo total (PT,  $\text{mg L}^{-1}$ ), clorofila-*a* ( $\text{mg L}^{-1}$ ), abundancia de *Microcystis* spp. (células  $\text{mL}^{-1}$ ) y concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

La concentración de PT y NT fueron determinadas siguiendo las técnicas Standard Methods (American Public Health Association, et al., 2005).

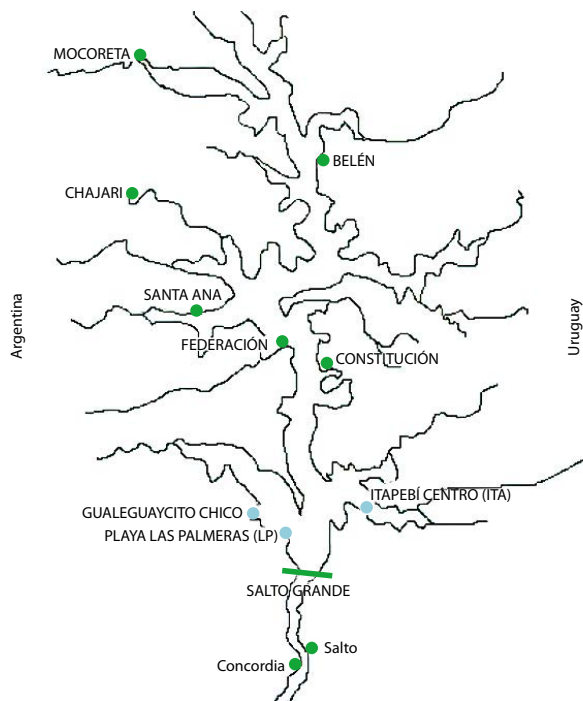
Para determinar la concentración de clorofila-*a*, las muestras de agua se almacenaron en bidones de 2 L y se filtraron luego de 3-6 horas empleando filtros GF/C (Whatman) que se conservaron en oscuridad a -20 °C. La extracción se realizó con acetona 90% y se aplicó el método espectrofotométrico tricromático (Lorenzen, 1967).

## Abundancia y toxicidad de *Microcystis* spp.

La abundancia de células de *Microcystis* spp. se estimó mediante conteo en cámaras de sedimentación de 1 y 20 mL en microscopio invertido (método Utermöhl descrito en Hasle, 1978). La concentración de microcistina-LR en las muestras de agua se determinó por HPLC-DAD en el LATU tanto para agua potable como para agua bruta con base en la Norma ISO 20179 (International Organization for Standardization, 2005; Lawton, et al., 1994). El límite de detección del ensayo fue de 0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## Extracción de ADN

Las muestras obtenidas se filtraron a través de filtros de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Millipore) y los filtros se aplicaron al método descrito por Martínez de la Escalera et al. (2014) con modificaciones. Los filtros fueron colocados en tubos de lisis con una matriz de esferas de cerámica (diámetro 1,4 mm) con 800  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (composición del buffer de extracción: 100 mM Tris-HCL pH= 8,0, 100 mM EDTA pH=8,0, 100 mM Na-Fosfato pH=8,0, 1,5M NaCl, 1% CTAB). Luego se ho-



**Figura 1.** Embalse de Salto Grande. Los puntos azules indican los sitios de muestreo Gualeguaycito y Las Palmeras en Argentina e Itapebí en Uruguay. Los puntos verdes muestran las principales ciudades de la cuenca y la línea indica la localización de la represa de Salto Grande.

mogeneizó en el equipo Fast Prep (MP Biomedicals) durante 40 segundos a 6,0  $\text{m s}^{-1}$ . Posteriormente se continuó según el método de Martínez de la Escalera et al. (2014).

## PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó la abundancia del gen *mcyE* involucrado en la síntesis de la microcistina mediante qPCR utilizando cebadores específicos (Sipari, et al., 2010). En cada reacción se utilizó 10 nmol de cada cebador, 2  $\mu\text{L}$  del ADN muestra (aproximadamente 5 ng) y 7,76  $\mu\text{L}$  del kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen), con un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . La PCR constó de 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C (Martínez de la Escalera, et al., 2017) y se realizó en un termociclador CFX96 Real Time System (BIORAD). Para cuantificar de manera absoluta el número de copias de *mcyE* se empleó un clon y se realizaron diluciones seriadas de 1/1E-4 a 1/1E-10 para generar curvas de calibración y determinar el número de copias del gen por mL de muestra.

## Análisis de HRM (*High Resolution Melting*)

Para realizar el análisis HRM primero se obtuvieron amplicones del gen *mcyJ* y luego se analizaron mediante la técnica de HRM. Del total de las muestras evaluadas en este trabajo (19) se emplearon 8 (3 muestras obtenidas en verano y 5 en invierno) que mostraron una amplificación eficiente del gen *mcyJ* mediante qPCR y por tanto fueron empleadas para realizar el HRM. Para ello, se utilizó el kit

MeltDoctor HRM (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 20 µL. Cada reacción contenía: 9.5 µL de agua, 0,5 µL de BSA (30 mg mL<sup>-1</sup>), 7,76 µL de mix MeltDoctor HRM, 0,12 µL de cada cebador (10 nmol) y 2 µL del ADN muestra (aproximadamente 5 ng). Se utilizó el termociclador CFX96 Real Time System (BIORAD) y el software Bio-Rad Precision Melt Analysis.

### Análisis de datos

Para detectar las relaciones entre las variables ambientales y biológicas se realizaron análisis de correlación de Spearman. El estudio de las diferencias significativas entre verano e invierno y entre los sitios de estudio en relación a los parámetros ambientales y biológicos fueron evaluados mediante el test de Kruskal-Wallis (KW).

Por último, los perfiles de *melting* obtenidos por HRM se analizaron mediante métodos de agrupamiento jerárquico aglomerativo: UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), utilizando la distancia euclidiana. Los análisis estadísticos se realizaron empleando la plataforma libre R versión 3.4.1.

## Resultados

### Caracterización ambiental

La temperatura del agua mostró estacionalidad; la máxima temperatura se registró en verano (25,9 °C) y la mínima en invierno (13,0 °C). La conductividad del agua fue similar en ambas estaciones y el pH fue ligeramente alcalino. Respecto a las concentraciones de nutrientes (fósforo y nitrógeno total) no se observaron diferencias significativas entre verano e invierno y tampoco entre los sitios de muestreo (Tabla 1).

La concentración de clorofila *a* fue significativamente mayor en verano en Gualeguaycito e Itapebí (KW,  $p < 0,05$ ) (Figura 2A).

### Abundancia y toxicidad de *Microcystis* spp.

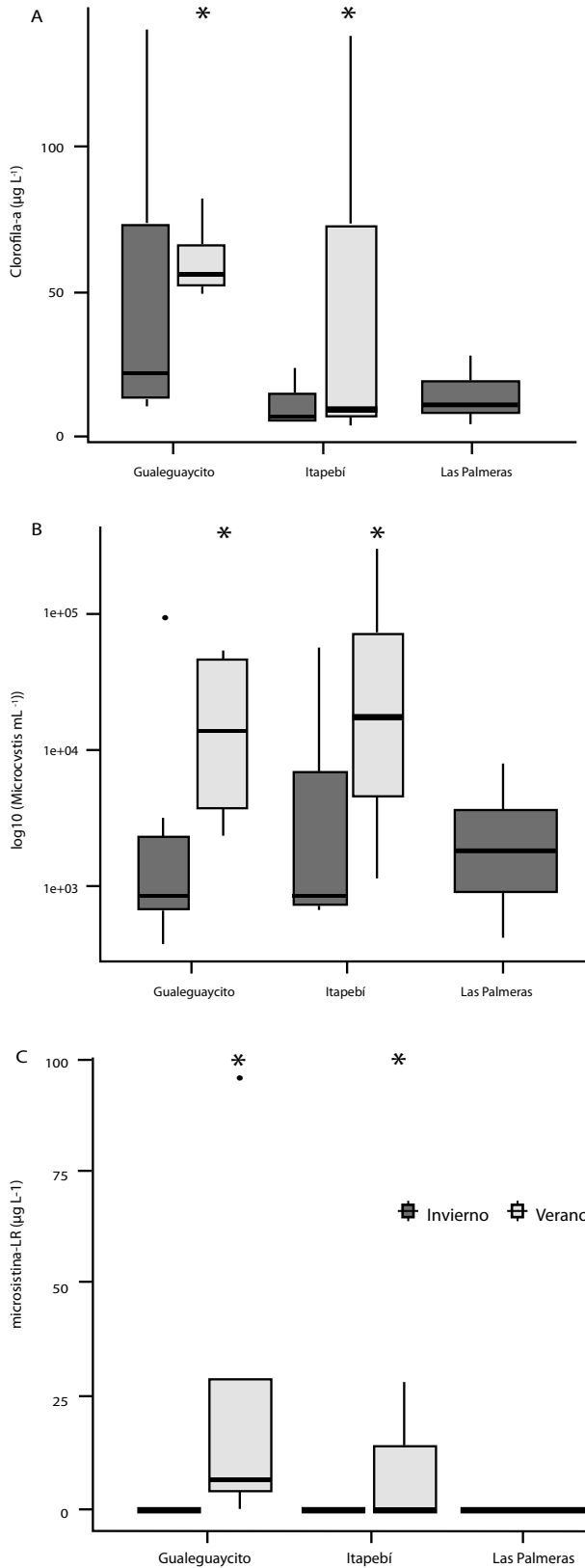
En general, se encontró una abundancia de células de *Microcystis* spp. significativamente mayor en las muestras correspondientes al verano en comparación al invierno (KW,  $p < 0,05$ ) (Figura 2B). En Gualeguaycito, la abundancia de *Microcystis* spp. varió entre 328 y 87.700 células mL<sup>-1</sup>. Por otro lado, Itapebí presentó una abundancia de *Microcystis* spp., que varió entre 585 y 267.000 células mL<sup>-1</sup>, mientras que Las Palmeras presentó menor abundancia de *Microcystis* spp. (0-6.975 células mL<sup>-1</sup>).

Cuando se analizó la abundancia de *mcyE* como *proxy* del potencial tóxico, el mayor valor se detectó en verano (5.228,3 copias mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, durante el invierno también se detectó el gen *mcyE* con una abundancia máxima de 2.490,9 copias mL<sup>-1</sup>. Si bien se observaron diferencias en la abundancia del gen *mcyE* entre verano e invierno, estas no fueron significativas (KW,  $p < 0,1$ ).

Al evaluar la presencia y concentración de microcistina-LR, esta se detectó únicamente en verano (Gualeguaycito e Itapebí). En Gualeguaycito, la concentración de la toxina varió entre 5,5 y 96 µg L<sup>-1</sup>, mientras que en Itapebí se encontró entre 0 y 5,5 µg L<sup>-1</sup> (Figura 2). El número de copias del gen *mcyE* se correlacionó positiva y significativamente con la temperatura del agua (Spearman,  $\rho = 0,67$ ,  $p = 0,01$ ) y con la concentración de microcistina-LR (Spearman,  $\rho = 0,45$ ,  $p = 0,049$ ). Sin embargo, la correlación con la abundancia de células de *Microcystis* spp. fue no significativa para un p-valor de 0,05 (Spearman,  $\rho = 0,42$   $p = 0,07$ ).

Sitios	T (°C) media (rango)	K (µS cm <sup>-1</sup> ) media (rango)	pH media (rango)	NT (µg L <sup>-1</sup> ) media (rango)	PT (µg L <sup>-1</sup> ) media (rango)
Gualeguaycito invierno	14,6 (13,0 – 17,0)	52,7 (48,3 – 54,6)	7,8 (7,53 – 8,27)	900 (500 – 1.100)	40 (60 – 20)
Gualeguaycito verano	23,4 (21,1 – 25,9)	52,1 (49,3 – 57,4)	8,5 (7,49 – 9,42)	750 (500 – 900)	60 (40 – 80)
Itapebí invierno	15,1 (13,8 – 17,0)	58,4 (54,7 – 60,5)	7,6 (7,45 – 7,78)	770 (500 – 1.000)	40 (20 – 70)
Itapebí verano	22,1 (21,4 – 22,6)	50,4 (49,4 – 51,5)	7,8 (7,53 – 8,34)	833 (600 – 1.900)	110 (110 – 120)
Las Palmeras invierno	16,2 (16,9 – 17,6)	57,7 (55,3 – 60,0)	7,8 (7,7 – 7,94)	800 (600 – 1.200)	56 (20 – 80)

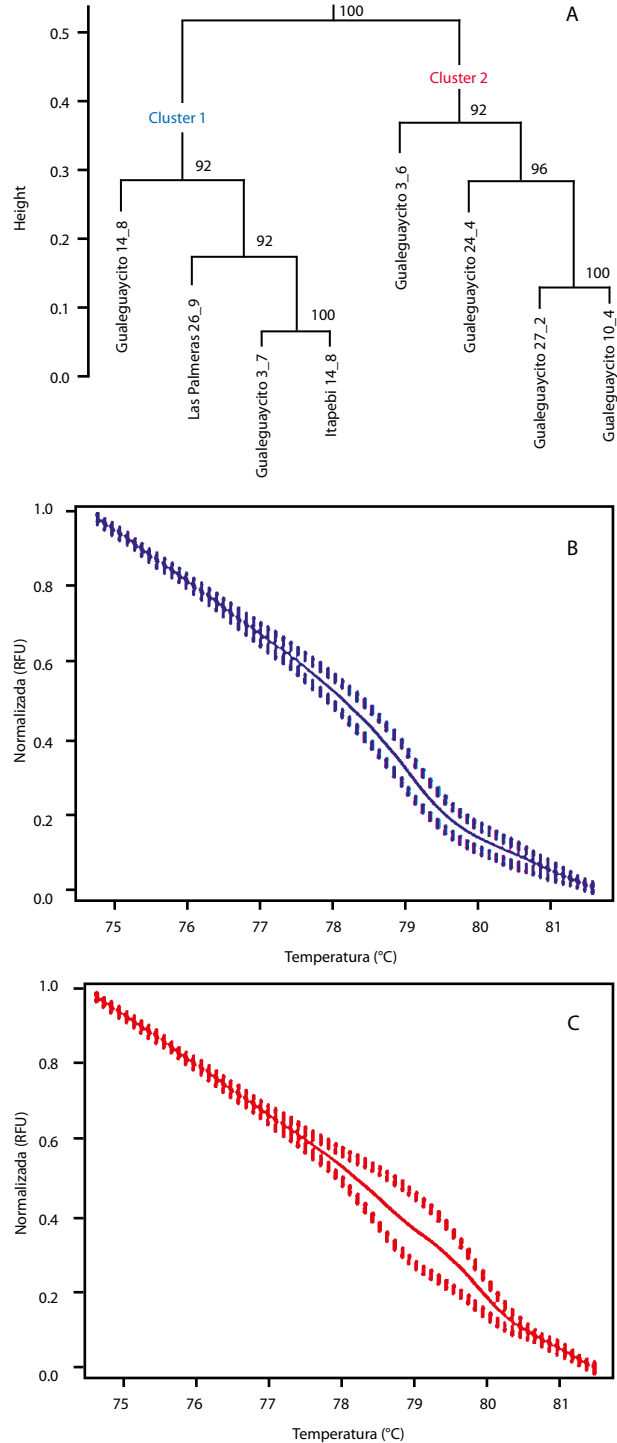
**Tabla 1.** Variables ambientales y nutrientes totales en cada sitio de muestreo: Gualeguaycito, Itapebí y Las Palmeras. Se muestran los valores medios y sus desvíos estándar. T: Temperatura, K: Conductividad, pH, NT: Nitrógeno total y PT: Fósforo total.



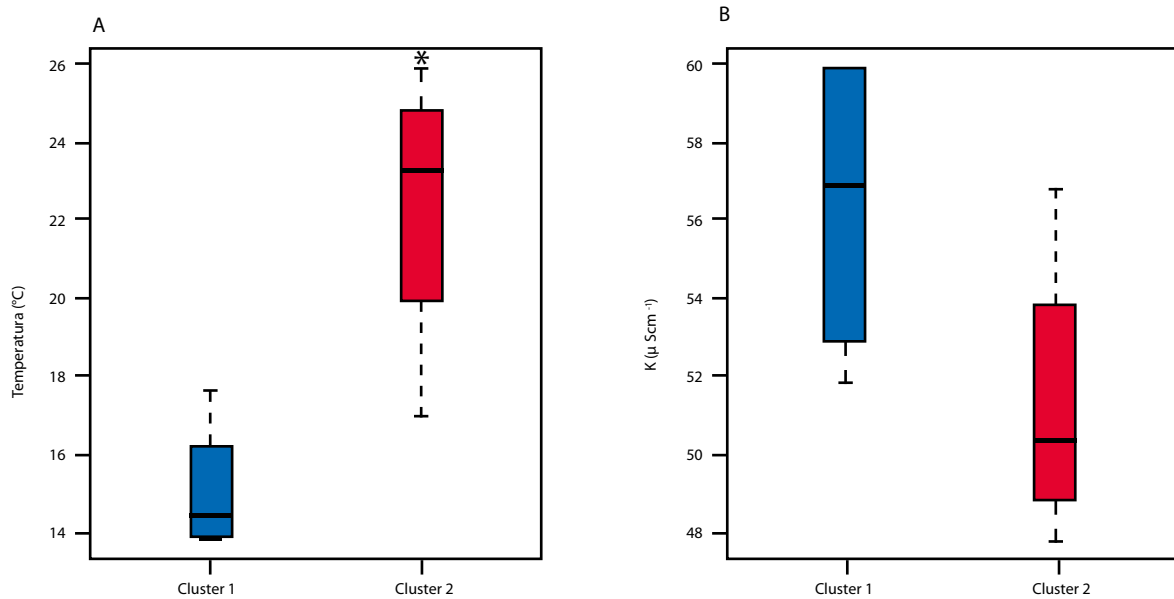
**Figura 2.** Variabilidad temporal (verano e invierno) y espacial (Gualeguaycito, Itapebí, Las Palmeras) de las variables biológicas medidas. (A) clorofila-a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (B) abundancia de *Microcystis* (células  $\text{mL}^{-1}$ ), (C) microcistina-LR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). \* diferencias significativas entre verano e invierno, test KW  $p < 0,05$ .

## Diversidad estacional de genotipos *mcyJ*

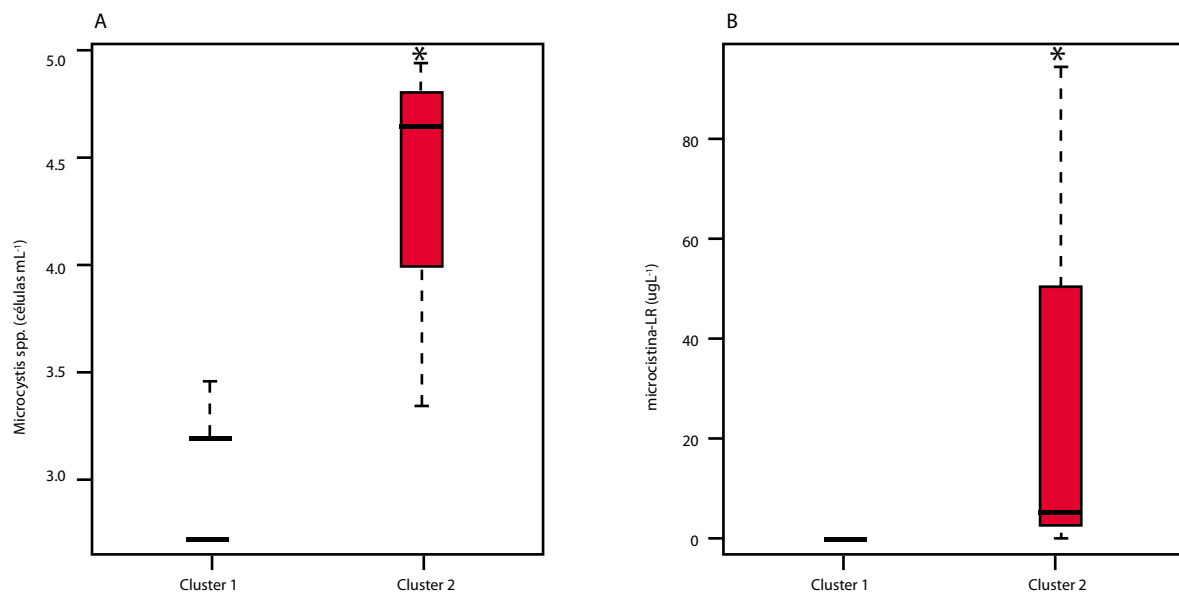
El análisis de *cluster* realizado a partir de los perfiles de *melting* de HRM del gen *mcyJ* obtenidos para cada muestra permitió distinguir dos grupos de genotipos tóxicos denominados *cluster 1* y *cluster 2* (Figura 3).



**Figura 3.** Dendrograma de los perfiles de *melting* agrupados utilizando la distancia euclidiana (A). Promedios (línea continua) y desvío estándar (líneas punteadas) de los perfiles de *melting* característicos del *cluster 1* (B) y *cluster 2* (C).



**Figura 4.** Variables ambientales asociadas a cada cluster. A) temperatura del agua (°C) y B) conductividad del agua (K,  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ). \* Diferencias significativas entre ambos clusters, test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Abundancia de *Microcystis* sp. (células  $\text{mL}^{-1}$ ) (A) y concentración de microcistina-LR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (B) de las muestras en cada cluster. \* Diferencias significativas entre ambos clusters, test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Se evaluaron las condiciones ambientales en las que aparecía cada cluster de genotipos y se observó que las muestras pertenecientes al cluster 1 aparecían a temperaturas bajas (entre 13,8 y 17,6 °C), mientras que el cluster 2 incluía muestras obtenidas en condiciones de temperatura entre 17,0 y 25,9 °C (KW,  $p < 0,05$ ) (Figura 4A). Asimismo, se observaron diferencias en la conductividad del agua entre ambos clusters aunque no fueron significativas (KW,  $p < 0,1$ ). El cluster 1 estaba integrado por muestras cuya conductividad se encontraba en el rango entre 48 y 57  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , mientras que las muestras que componían el cluster 2 pre-

sentaron conductividades entre 52 y 60  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (Figura 4B). Asimismo, se observaron diferencias significativas en el número de células de *Microcystis* spp. entre ambos clusters (Figura 5A). El 1 presentó una abundancia de *Microcystis* spp. significativamente menor que el 2 (0 – 2.875 células  $\text{mL}^{-1}$ ), que presentó una variación entre 2.100 y 87.700 células  $\text{mL}^{-1}$ . La toxicidad de las muestras (concentración de microcistina-LR) también presentó diferencias significativas entre clusters (KW,  $p < 0,05$ ) (Figura 5B); el cluster 2 fue el único que presentó muestras tóxicas, con concentraciones de microcistina-LR de 5,5 a 96  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## Discusión

En este trabajo se evaluó la diversidad genética de *Microcystis* spp. en el embalse de Salto Grande mediante HRM del gen *mcyJ*. Con base en el análisis de los perfiles de *melting* de los amplicones obtenidos se pudo detectar la presencia de dos grupos de genotipos *mcyJ* (indicador de poblaciones potencialmente tóxicas), cada uno caracterizado por proliferar a distintas condiciones de temperatura y conductividad del agua (Figura 3). Asimismo, la mayor abundancia de células de *Microcystis* spp. y las mayores concentraciones de microcistina-LR se detectaron durante el verano, a temperaturas del agua de entre 21 y 23 °C. Sin embargo, no se encontró relación entre la abundancia y toxicidad de las cianobacterias con los nutrientes, ya que estos presentaron valores similares a lo largo del año.

Debido a la concentración de fósforo total, de clorofila-*a* y a la abundancia de fitoplancton a lo largo del año, el embalse de Salto Grande se clasifica como un ambiente eutrófico (Chalar, et al., 1993) en el que las floraciones de cianobacterias son comunes (De León y Yunes, 2001; Chalar, 2009). Si bien la eutrofización es generalmente el factor que se considera responsable principal de las floraciones de cianobacterias (Reynolds, 2006; Schindler, et al., 2008), existe evidencia de que factores físicos tales como irradiancia, temperatura, turbulencia, mezcla vertical y flujo hidráulico contribuyen a la promoción de estos eventos (Paerl y Huisman, 2008; Kosten, et al., 2011; Paerl, 2014).

No obstante, hasta el momento no se conoce cuál es la combinación de condiciones ambientales e hidrológicas que estimulan la producción de toxinas por parte de las poblaciones tóxicas (O'Neil, et al., 2012; Pearl y Huisman, 2009). Desde los primeros estudios que analizaron la influencia del ambiente sobre la producción de microcistinas en cultivos, la temperatura ha sido propuesta como una variable relevante. En este sentido, se ha reportado que la producción de toxinas es generalmente mayor entre 20 y 25 °C (van der Westhuizen y Eloff, 1985; Watanabe y Oishi, 1985; van der Westhuizen, et al., 1986). Más recientemente, Davis et al. (2009) observaron que al aumentar la temperatura en condiciones controladas que simulaban un ambiente eutrófico la tasa de crecimiento de células tóxicas de *Microcystis* (cuantificadas a través de la presencia del gen *mcyD*) aumentaba significativamente en relación a la de células no tóxicas. Incluso en algunos casos las células no tóxicas mostraban una disminución de sus tasas de crecimiento, lo que lleva a concluir que el incremento de la temperatura por encima de los valores promedio de los ecosistemas (por ejemplo en un escenario de aumento de temperatura por calentamiento global) llevaría a un aumento selectivo de las poblaciones tóxicas de *Microcystis* (Davis, et al., 2009; Joung, et al., 2011). En adición, otros estudios que involucran expresión génica mostraron que la fracción de células productoras de toxina en *M. aeruginosa* es significativamente mayor a temperaturas entre 20 y 26 °C (Dziallas y Grossart, 2011). Estos resultados están en línea con los obtenidos en este trabajo, ya que se encontró mayor concentración de microcistina-LR a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento de las especies del género *Microcystis* (21-23 °C).

Diversos estudios han reportado resultados contrastantes al evaluar la asociación entre el ambiente y la diversidad de *Microcystis* spp. (Pobel, et al., 2012; Hu, et al., 2016), por lo que aún no hay evidencia clara acerca de cuáles son las variables ambientales que influyen sobre la diversidad ge-

nética de *Microcystis*. Por ejemplo, basándose en el análisis del gen *mcyA* mediante geles en gradiente desnaturizante, Hu et al. (2016) encontraron que la variación genotípica de una comunidad de *Microcystis* se relacionaba con distintas variantes de microcistina, lo que implica que la composición de la comunidad determinaría el tipo de toxina producida. Asimismo, se ha reportado que a diferentes temperaturas *M. aeruginosa* sufre cambios significativos en el patrón de microcistinas que produce, mientras que el contenido total de toxina por célula no cambia (Amé y Wunderlin, 2005). Por tanto, la temperatura no solo estimularía el crecimiento selectivo de poblaciones tóxicas, sino también el tipo de microcistina producida por estos organismos.

Tanto los hallazgos reportados en la literatura como los de este trabajo sugieren que a temperaturas que optimizan la tasa de crecimiento la producción de toxinas sería máxima. Dado que el rol de la microcistina en la biología y ecología de los organismos que la producen aún no está esclarecido, la información generada hasta el momento (tanto a partir de cultivos como de muestras ambientales) en relación a la temperatura brinda nuevos enfoques para analizar este tema.

En relación a la conductividad y su efecto sobre *Microcystis* spp., al momento se ha reportado que su aumento no tendría impacto diferencial en poblaciones tóxicas y no tóxicas (Tonk, et al., 2007; Joung, et al., 2011; Tanabe, et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en concentraciones de sales más altas que las encontradas normalmente en sistemas de agua dulce, evaluándose por lo general salinidades estuarinas a marinas. Cabe destacar que en este trabajo los cambios en la conductividad asociados a la aparición de uno u otro genotipo tóxico, si bien fueron significativos, estuvieron siempre en el rango de lo esperado para un sistema de agua dulce como el embalse de Salto Grande. Asimismo, dado que se evaluaron únicamente genotipos tóxicos, no es posible conocer el efecto de la conductividad sobre las poblaciones no tóxicas de *Microcystis*. Una hipótesis para explicar los resultados obtenidos es que el aumento de conductividad sea consecuencia de algún otro proceso hidrológico, por ejemplo la resuspensión de sedimento debida al viento (F. Bordet, comunicación personal), cuyo efecto sobre el metabolismo celular sea en detrimento de la producción de toxinas. Sería necesario realizar estudios específicos para detectar qué otra variable se asocia a los cambios de conductividad en el sistema de estudio.

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la temperatura y la conductividad son las variables más relevantes para determinar la abundancia de genotipos tóxicos de *Microcystis* en el gradiente ambiental Río Uruguay-Río de la Plata (Kruk, et al., 2015; Martínez de la Escalera, et al., 2017). O'Farrell et al. (2012) propusieron que la intensidad y frecuencia de floraciones de cianobacterias en el embalse de Salto Grande podrían ser en gran medida explicadas por el ciclo hidrológico y por la morfología del embalse, encontrándose mayores acumulaciones de biomasa en los brazos donde desembocan cursos de agua tales como Gualaguaycito e Itapebí. Es en estos sitios que presentan baja profundidad, altos tiempos de residencia del agua y acumulación de nutrientes provenientes de la cuenca donde se generan floraciones masivas de *Microcystis* spp. tóxicas, probablemente asociadas a mayores temperaturas que las que alcanza el resto del embalse. En este contexto, el hallazgo de genotipos *mcyJ* de *Microcystis* spp. con diferente potencial tóxico y asociados a diferentes temperaturas sugiere que la variable es relevante

no solo a la hora de condicionar la abundancia de poblaciones tóxicas, sino también para inducir la expresión de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas.

Con base en los resultados obtenidos, es de esperar que aquellas condiciones ambientales que favorezcan altas temperaturas del agua en el embalse promuevan el crecimiento de poblaciones de *Microcystis* spp. con genotipo tóxico y estimulen la producción de toxinas.

## Reconocimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de la tesina para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas (Facultad de Ciencias, UDELAR) de Facundo Lepillanca. Parcialmente financiado por PEDECIBA-Biología y por la Comisión Técnico-Mixta de Salto Grande.

## Referencias

- Amé, M.V. y Wunderlin, D.A., 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. En: *Water, Air, and Soil Pollution*, 168, pp.235-248.
- American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21a ed. Washington: APHA. Standard Method 4500 P B - P E Ascorbic Acid Method and 4500 N.C Persulfate Method. Approved 1997-Rev. 2011.
- Aubriot, L., Bonilla, S. y Falkner, G., 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuation. En: *FEMS Microbiology Ecology*, pp.1-16.
- Bonilla, S., 1997. Composición y abundancia fitoplanctónica de tres embalses en cadena sobre el río Negro, Uruguay. En: *Iheringia, Ser. Bot.*, 49, pp.47-61.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F. y Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *INNOTEC*, 10, pp.9-22.
- Bordet, F., Fontanarrosa, M. 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. <https://doi.org/10.1002/rra.3189>.
- Chalar, G., De León, L., de León, R., Fabián, D. y Gorga, J., 1993. *Evaluación de la eutrofización del embalse de Salto Grande. Análisis de las relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos. Informe final de la primera etapa*. Montevideo: Sección Limnología, Facultad de Ciencias. (Informe inédito).
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. En: *Limnologica*, 39(3), pp.200-208.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. En: *Harmful Algae*, 8(5), pp.715-725.
- De León, L. y Yunes, J.S., 2001. First report of a Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. En: *Environm. Toxicol.*, 16(1), pp.110-112.
- Dittmann, E. y Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. En: *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, pp.7-17. doi:10.1002/mnfr.200500162
- Dziallas, C. y Grossart, H.P., 2011. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. En: *PLoS ONE*, 6(9), pp.e25569.
- Feola, G., Brena, B., Rizzo, J. y Sienra, D. y Echezarreta, M. E., 2008. Programa de monitoreo de agua de playas y costa de Montevideo. Informe temporada estival: 2007-2008 [En línea]. Montevideo: IMM. [Consulta: 12 de junio de 2017]. Disponible en: [http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/informe\\_monitoreo\\_agua\\_playas\\_costas\\_temporada\\_estival\\_2007-2008.pdf](http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/informe_monitoreo_agua_playas_costas_temporada_estival_2007-2008.pdf)
- Hasle, R.G., 1978. The inverted microscope method. En: Sournia, A., ed. *Monographs on oceanographic methodology*. Vol 6, *Phytoplankton manual*. Paris: UNESCO. pp. 88-96.
- Havens, K.E., 2007. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. En: Hudnell, K.H., ed. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research*. Vol. 619. New York: Springer: pp.675-732.
- Hu, C., Rea, C., Yu, Z., Lee, J., 2016. Relative importance of *Microcystis* abundance and diversity in determining microcystin dynamics in Lake Erie coastal wetland and downstream beach water. En: *Journal of Applied Microbiology*, 120, pp.138-151. doi: 10.1111/jam.12983.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P. y Visser, P.M., eds., 2005. *Harmful Cyanobacteria*. Amsterdam: Springer.
- International Organization for Standardization, 2005. ISO 20179: *Water quality. Determination of microcystins - method using solid phase*. Ginebra: ISO.
- Joung, S.H., Oh, H.M., Ko, S.R., Ahn, C.Y., 2011. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. En: *Harmful Algae*, 10, pp.188-193.
- Karjalainen, M., Engström-Öst, J., Korpinen, S., Peltonen, H., Pääkkönen, J-P. y Rönkkönen, S. et al., 2007. Ecosystem consequences of cyanobacteria in the Northern Baltic Sea. En: *AMBIO*, (36), pp.195-202.
- Kim, S.G., Joung, S.H., Ahn, C.Y., Ko, S.R., Boo, S.M., Oh, H.M., 2010. Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir: population diversity of *Microcystis* spp. during algal bloom. En: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, pp.93-102.
- Kosten, S., Huszar, V.M.L., Becarés, E., Costa, L.S., van Donk, E., Hansson, L.A., Jeppesen, E., Kruk, C., Lacerot, G., Mazzeo, N., de Meester, L., Moss, B., Lürling, M., Nöges, T., Romo, S. y Scheffer, M., 2011. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. En: *Global Change Biology*, 18, pp.118-126.
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P. y Míguez, D., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. En: *INNOTEC*, 10, pp.23-39.
- Lawton, L.A., Edwards, C. y Codd, G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the

- determination of microcystins in raw and treated waters. En: *Analyst*, 119(7), pp.1525-1530.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. En: *Limnology and Oceanography*, 12, pp.343-346.
- Martínez de la Escalera, G., Antoniadés, D., Bonilla, S., Piccini, C., 2014. Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. En: *Molecular Ecology*, 23, pp.5791-5802.
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. y Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. En: *Harmful Algae*, 62, pp.73-83.
- Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., Meerhoff, M., Quintans, F., Rodríguez-Gallego, L. y Scasso, F., 2002. Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. En: Domínguez, A. y Prieto, R.G., eds. *Perfil ambiental del Uruguay*. Montevideo: Nordan-Comunidad. pp.39-56.
- O'Farrell, I., Bordet, F., Chaparro, G., 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. En: *Hydrobiologia*, 698, pp.175-190.
- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A. y Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. En: *Harmful Algae*, 14, pp.313-334.
- Paerl, H. y Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. En: *Science*, 320, pp.57-58.
- Paerl, H. y Huisman, J., 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. En: *Environ. Microbiol. Rep.*, 1, pp.27-37.
- Paerl, H., 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world. En: *Life*, 4(4), pp.988.
- Pobel, D., Godon, J.J., Humbert, J.F., Robin, J., 2012. High-frequency monitoring of the genetic diversity and the potential toxicity of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a French shallow lake. En: *FEMS Microbiology Ecology*, 79, pp.132-141. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01203.x
- Quirós, R. y Cuch, 1982. Características limnológicas del embalse de Salto Grande II: Distribución y Dinámica de nutrientes. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. En: *Ecología Argentina*, 8, pp.111-142.
- Quirós, R. y Luchini, L., 1982. Características limnológicas del embalse de Salto Grande, III: Fitoplancton y su relación con parámetros ambientales. En: *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 13, pp.49-66.
- Reynolds, C.S., 2006. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rinta-Kanto, J.M., Konopko, E.A., DeBruyn, J.M., Bourbonniere, R.A., Boyer, G.L. y Wilhelm, S.W., 2009. Lake Erie *Microcystis*: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. En: *Harmful Algae*, 8, pp.665-673.
- Rodríguez-Gallego, L., 2010. *Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo*. Montevideo: Facultad de Ciencias, UDELAR. (Tesis de Doctorado).
- Salas, H. y Martino, P., 1991. A simplified phosphorous trophic state model for warm-water tropical state. En: *Water Research*, 25(3), pp.341-350.
- Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D. L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G., Lyng, M. y Kasian, S.E.M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 32, pp.11254-11258.
- Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K., 2010. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase e gene expression. En: *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, pp.3797-3805.
- Sivonen, K. y Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. En: Chorus, I. y Bartram, J., eds. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Londres: E & FN Spon. pp.41-111.
- Tanabe, Y., Kaya, K. y Watanabe, M.M., 2004. Evidence for recombination in the Microcystin Synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. En: *Journal of Molecular Evolution*, 58, pp.633-641. doi: 10.1007/s00239-004-2583-1.
- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F. y Watanabe, M.M., 2009. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. En: *BMC Evolutionary Biology*, 9, pp.115. doi: 10.1186/1471-2148-9-115
- Tanabe, Y., Hodoki, Y., Sano, T., Tada, K. y Watanabe, M.M., 2018. Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *microcystis aeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes. En: *Frontiers in Microbiology*, 9, pp.1150.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Dohren, H., Borner, T. y Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. En: *Chemistry & Biology*, 7, pp.753-764.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P., M. y Huisman, J., 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. En: *Aquatic Microbial Ecology*, 46(2), pp.117-123.
- UNESCO y Bonilla, Sylvia, ed., 2009. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO. (Documento Técnico PHI-LAC, N° 16)
- van der Westhuizen, A.J. y Eloff, J.N., 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). En: *Planta*, 163(1), 55-59.
- van der Westhuizen, A.J., Eloff J.N. y Krüger G.H.J., 1986. Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*(UV-006). En: *Arch Hydrobiol.*, 108, pp.145-154
- Vidal, L. y Kruk, C., 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to latitude 34°53' S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3, pp.142-151.
- Watanabe, M.F. y Oishi, S., 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), pp.1342-1344.



# Variabilidad y tendencia de la temperatura superficial de los grandes embalses del Río Negro

## Surface water temperature trend and variability of the Negro River large reservoirs

Manta, Gastón (1); Alcántara, Ignacio (2, 3)

(1) Departamento de Ciencias de la Atmósfera, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(2) Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

(3) Departamento de Bioestadística, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Contacto: [gmanta@fisica.edu.uy](mailto:gmanta@fisica.edu.uy)

RECIBIDO: 4/7/2018 APROBADO: 4/10/2018

### Resumen

La temperatura del agua es un parámetro fundamental para comprender la dinámica de los cuerpos de agua continentales. Se estudió la variabilidad y tendencia de la temperatura superficial de los grandes embalses del Río Negro, Rincón del Bonete y Baygorria, utilizando 16 años de datos diarios satelitales (MUR-GHRSSST) con resolución espacial de 0,01° entre 2002 y 2018. La temperatura media fue de 18,8 °C y julio (enero) el mes más frío (cálido) con un promedio de 12,1 °C (25,2 °C). Mientras que otoño y primavera presentan la mayor variabilidad intraestacional, invierno presenta la mayor variabilidad interanual. La temperatura superficial del sistema mostró una tendencia significativa de aumento de 1,3 °C por década para primavera-verano, mientras que las estaciones de otoño e invierno no presentaron tendencia significativa. Se observó a su vez en el eje espacial una tendencia al aumento de la temperatura desde aguas arriba hacia aguas abajo. La información satelital fue correlacionada con mediciones *in situ* de oportunidad ( $n=67$ ) y se obtuvo una correlación de 0,94 y un error cuadrático medio de 1,92 °C. Generar series temporales de mediciones *in situ* dirigidas permitiría una evaluación del producto y consolidar su uso operativo. Los resultados demuestran la utilidad del sensoramiento remoto de la temperatura del agua en sistemas continentales como herramienta de monitoreo basado en información de libre acceso. Además, se describe por primera vez el ciclo estacional, la variabilidad y tendencia de los embalses del Río Negro, esperando que los resultados aporten para las medidas de manejo ambiental.

**Palabras clave:** Climatología, Rincón del Bonete, Baygorria, sensoramiento remoto, calentamiento aguas superficiales.

### Abstract

Water temperature is a fundamental parameter to understand the dynamics of continental waters. Surface water temperature trend and variability of the large reservoirs of the Negro River, Rincón del Bonete and Baygorria, using 16 years of satellite data (MUR-GHRSSST) with a spatial resolution of 0.01° between 2002 and 2018 was studied. The average temperature was 18.8 °C, with a minimum of 12.1 °C and maximum of 25.2 °C, in July and January, respectively. Spring and autumn showed the highest intraseasonal variability, and winter the highest interannual variability. The surface temperature of the reservoirs showed a significant trend towards warming of 1.3 °C per decade for spring-summer, while the seasons of autumn and winter did not exhibited a significant trend. The warming trend increased towards downstream. The satellite information was correlated with opportunistic observed data ( $n = 67$ ), with a correlation of 0.94 and a root mean square error of 1.92 °C. Generating time series of continuous measurements *in situ* would allow an evaluation of the product and viability for operational usage. These results demonstrate the utility of remote sensing of water temperature as a monitoring tool based on freely accessible information. In addition, the seasonal cycle, trend and variability of the reservoirs of the Río Negro were described for the first time. It is expected that these results contribute to the environmental management measures of the Negro River reservoirs.

**Keywords:** Climatology, Rincón del Bonete, Baygorria, Remote Sensing, Surface Water Warming.

## Introducción

En los sistemas lóticos (principalmente ríos y arroyos), la temperatura del agua varía a escalas de tiempo diarias, estacionales, interanuales, y a lo largo del eje longitudinal

del cauce (Webb, et al., 2008). También se produce una heterogeneidad térmica considerable a escalas de meso y micro-hábitat en respuesta a la temperatura del aire local y la velocidad del viento, que influyen en el enfriamiento por evaporación y la extensión de la sombra topográfica y ribereña

(Poole y Berman, 2001). En los cuerpos de agua lénticos (en especial lagos y embalses), las aguas superficiales se calientan principalmente por acción de la radiación proveniente del sol y pierden densidad. Esto tiene como consecuencia un aumento en la resistencia térmica a la mezcla de las capas de agua superficiales con respecto a las sub-superficiales (Hambricht, et al., 1994). Una diferencia de solo unos pocos grados es suficiente para evitar la circulación completa entre superficie y fondo, condición denominada estratificación térmica (Hutchinson, 1941). Otros fenómenos físicos tales como el viento o corrientes producen turbulencias que favorecen la mezcla de la columna de agua, particularmente en cuerpos de agua poco profundos (Tundisi, et al., 2004). En los casos de sistemas mixtos (ríos y embalses) existe una tendencia al aumento de la temperatura aguas abajo de las represas o embalses. Esto se debe a que el detenimiento del cauce incrementa el tiempo de residencia del agua y por lo tanto la superficie expuesta a la radiación solar es mayor, lo que permite un mayor calentamiento (Allan y Castillo, 2007).

La temperatura es un factor regulador del metabolismo de los organismos (Brown, et al., 2004). El aumento de la temperatura hasta un límite tolerable produce un incremento en las tasas de producción primaria y de respiración por parte de autótrofos y heterótrofos (Straile, 2005; Reynolds, 2006). A su vez, la temperatura también tiene efectos indirectos en los procesos físicos, resultando en gradientes de calor característicos que a su vez son responsables de gradientes químicos y de la distribución de organismos (Poole y Berman, 2001). En el caso de los microorganismos que viven en suspensión de la columna de agua (plancton), la estratificación térmica impone una barrera para su capacidad de migración vertical (Margalef, 1983). Algunas especies de cianobacterias con capacidad de regulación de la flotabilidad pueden posicionarse en profundidades favorables y dominar a otras especies del fitoplancton como los unicelulares y coloniales no flotantes (Reynolds, et al., 1987; Joehnk, et al., 2008).

El Río Negro es uno de los ríos más importantes de Uruguay. Presenta una amplia extensión de 810 km desde sus nacientes en Brasil a su desembocadura en el río Uruguay. Su cuenca de drenaje abarca aproximadamente 71.400 km<sup>2</sup>, de los cuales casi 69.000 km<sup>2</sup> le corresponden a Uruguay (Pérez, 2002). Cuenta con tres represas en cadena construidas para obtención de energía eléctrica: Rincón del Bonete (1070 km<sup>2</sup>), Rincón de Baygorria (100 km<sup>2</sup>) y Palmar (320 km<sup>2</sup>; Chalar, et al., 2014) (Figura 1). El uso predominante de los suelos de la cuenca es la ganadería extensiva (con pradera mejorada). Se destaca también el aumento reciente de agricultura intensiva y forestación (Chalar, et al., 2014; MGAP, 2017). El río es considerado como eutrófico (Chalar, et al., 2014; MVOTMA, 2018) y presenta frecuentemente floraciones de cianobacterias de los géneros *Microcystis* y *Dolichospermum*, especialmente en sus embalses durante los meses de verano (González-Piana, et al., 2011; Chalar, et al., 2014). Estudios recientes reportan concentraciones de cianotoxinas (Microcistinas) en niveles de riesgo moderado para el uso recreacional del río (González-Piana, et al., 2017); e inclusive el embalse de Baygorria cuenta con el registro más alto de microcistinas (38 mg.L<sup>-1</sup>) para el país (Bonilla, et al., 2015).

Si bien existen antecedentes de campañas de monitoreos sistemáticos de parámetros fisicoquímicos y biológicos *in situ* (ej. Chalar, et al., 2015; González-Piana, et al., 2017, DINAMA, 2018), las series temporales de temperatura por satélite no han sido aún exploradas para los embalses del Río Negro. El uso de datos satelitales presenta la ventaja de

tener una amplia cobertura espacio-temporal, lo cual permite evaluar la evolución del fenómeno en el tiempo. La principal desventaja es que se obtiene únicamente el dato de superficie, por lo que no sustituye las mediciones de perfiles *in situ* (Martin, et al., 2012).

Una lista de los instrumentos y técnicas empleadas clásicamente durante las primeras décadas de medición remota de temperatura superficial del agua (TSA) se encuentra resumida en Barton (1995). Los desafíos que presenta el uso de esta herramienta en ambientes continentales y costeros es la contaminación del dato (píxel), debido a que, principalmente por la resolución horizontal del sensor y la morfología de la costa, queda incluida tanto la tierra como el agua en el píxel (Martin, et al., 2012; Chang, et al., 2015). Debido a este problema, algunas de las primeras bases de datos de TSA de lagos, medidas a través de satélites y utilizando el producto AVHRR implementado por NASA/NOAA desde principios de 1970, solo tomaban en cuenta grandes cuerpos de agua ampliamente mayores a 10 km de diámetro (Sharma, et al., 2015). A principios de la década del 2000, el Experimento Global de Asimilación de Datos Oceánicos (GODAE) proporcionó un proyecto piloto de mediciones de TSA de alta resolución aquí utilizado, el cual se compone de una combinación ("blended") de varios productos de datos TSA, que incluye diferentes sensores satelitales y observaciones *in situ*, con medidas en tiempo real (Chang, et al., 2015; Dash, et al., 2012). Con esta nueva herramienta, estudios más recientes sugieren, a partir de la correlación con datos *in situ*, que a partir de 10 km de diámetro del cuerpo de agua se obtiene buena calidad de mediciones (Crosman, et al., 2017). A su vez, resaltan que la principal dificultad se encuentra en zonas de altas latitudes y regiones más nubosas (Crosman, et al., 2017). Esta herramienta ha sido implementada en Kraemer et al. (2017), donde estudiaron la relación entre la TSA obtenida del producto aquí utilizado y la Clorofila-*a* (obtenida mediante MODIS) en 188 lagos de todo el mundo cuyas áreas fueran mayores a 50 km<sup>2</sup>.

La motivación de este estudio es caracterizar la variabilidad y tendencia de la temperatura de superficie del Río Negro utilizando mediciones satelitales de TSA y evaluar las oportunidades e implicancias en el manejo de los grandes embalses del Río Negro.

## Materiales y Métodos

Se trabajó con datos diarios satelitales de TSA procesados por el "Grupo de alta resolución de temperatura superficial del mar" (GHRSSST por su sigla en inglés, <https://www.ghrsst.org/>) (Martin, et al., 2012). Estos datos se encuentran disponibles para descargar libremente en la página web del Centro de Archivo Activo de Distribución de Datos en Oceanografía Física (podaac) del Laboratorio de Propulsión a Chorro de la Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio de Estados Unidos (NASA; <https://podaac.jpl.nasa.gov/>) y también se pueden observar en tiempo real en varios sitios web (por ejemplo: <https://podaac-tools.jpl.nasa.gov/soto/>) La información se presenta grillada y sin datos faltantes (nivel de procesamiento 4), de modo que en cada píxel asignado como agua siempre hay un dato. Aunque en algún momento, ya sea por descenso del nivel del cuerpo de agua o por nubes, no sea posible su medición, este es interpolado estadísticamente. Este producto cuenta también con una variable llamada análisis de error, que es el desvío estándar del error estimado de la

medición y que se utilizó para encontrar diferencias espaciales en la precisión del dato.

El GHRSSST produce este conjunto de datos en tiempo real (latencia de un día) y en retrospectiva con mayor control de calidad (latencia de cuatro días), utilizando “wavelets” como funciones base en un enfoque de interpolación óptima en una grilla global de 0,01° (cerca de 1 km para latitudes medias). La versión utilizada en este trabajo es la “Multiscale Ultrahigh Resolution” (MUR). Esta versión se basa en observaciones nocturnas de los primeros milímetros del espejo de agua de varios instrumentos, incluido el Advanced Radiometer Scanning-EOS de la NASA (AMSRE), el espectrorradiómetro de imágenes de resolución moderada (MODIS Aqua y Terra) de la NASA, el radiómetro WindSat de microondas de la Armada de los EE.UU., el Radiómetro Avanzado de Muy Alta Resolución (AVHRR) y varios satélites NOAA de órbita polar, así como observaciones *in situ* del proyecto NOAA iQuam (Martin, et al., 2012).

Los conjuntos de datos de TSA basados en satélites tienen resoluciones drásticamente diferentes. Por ejemplo, el sensor de tipo infrarrojo puede tener una resolución muy alta de hasta 1 km en distancia horizontal, pero los datos del sensor de microonda suelen tener una resolución menor, cercana a 25 km. Todos los datos son generalmente muestreados en patrones irregulares bajo las órbitas de los satélites. Además de todo esto, hay muchos vacíos de datos (agujeros en la cobertura de datos) debido a contaminaciones por nubes, aerosoles y tierra. Para tratar objetivamente estos problemas de muestreo MUR utiliza una técnica llamada Análisis Variacional de Resolución Múltiple (MRVA). MRVA es un método de interpolación estadística basado en la descomposición wavelet, llamado “análisis de resolución múltiple”, cuya virtud es que el mapa de TSA se puede controlar sin degradar la representatividad local. La expresión matemática de la descomposición wavelet se encuentra en Chin et al. (1998). La principal ventaja de MUR es que al momento es el único análisis diario global de TSA disponible libremente en tiempo real con resolución horizontal de 0,01° (Crosman, et al., 2017).

El período de estudio analizado abarca desde que se encuentran los datos disponibles (1 de junio de 2002 hasta el 31 de mayo de 2018), hasta completar un total de 16 años. Se contó con 5845 días con datos en 1513 píxeles, totalizando un área de cobertura de 1513 km<sup>2</sup>. La climatología diaria se construyó haciendo el promedio para cada día del año y un suavizado con una media móvil centrada de 30 días. También se realizó un análisis espectral de la serie temporal utilizando el método de Lomb (Press, et al., 1992). Se trabajó con la media anual y medias estacionales; se consideran verano los meses de diciembre-enero-febrero, otoño: marzo, abril y mayo, invierno: junio, julio y agosto, y primavera: setiembre, octubre y noviembre. La variabilidad se estimó a partir del desvío estándar de la temperatura calculado para cada día del año promediado espacialmente, y luego distinguiendo a nivel espacial para cada estación del año la componente climatológica (la variabilidad promedio dentro de cada estación) y la componente interanual (la variabilidad año a año de cada estación).

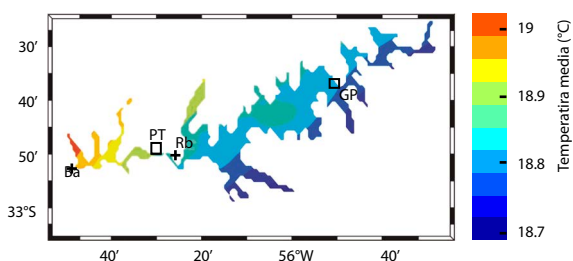
Para estudiar si los embalses del Río Negro tienden a aumentar o disminuir su temperatura, se realizó un análisis de tendencia ajustando un modelo de regresión lineal para la temperatura media para todo el año y a su vez para cada estación, utilizando como variable explicativa el paso del tiempo, siempre sobre el promedio anual (n=16), ya sea para cada estación o para todo el año. La significancia estadística se evaluó aplicando el test de Student con nivel de confianza

del 95%. En el caso del análisis espacial se graficó la pendiente del ajuste de la recta para cada píxel solo donde se encontró significancia estadística. Los mapas se presentan en líneas de contornos a los efectos de facilitar la visualización, ya que el producto de nivel 4 contiene un suavizado y sin datos fuera de rango (Martin, et al., 2012).

Para la comparación de los datos satelitales con observaciones *in situ* se utilizaron dos bases de datos. La primera, correspondiente a información disponible de forma libre del observatorio ambiental nacional de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA, 2018). Se utilizaron los datos correspondientes a la estación RN5 (-32.827500°;-56.423889°), que cuenta con 24 muestreos de datos de TSA medidos a 300 metros de la costa en Rincón del Bonete obtenidos entre 2010 y 2018. La segunda base corresponde a 43 datos de muestreos en Baygorria desde el 2002 a la fecha (Chalar, et al., 2014, 2015; González-Piana, et al., 2017). Los datos observados (medidos *in situ*) se graficaron contra los obtenidos del satélite en el punto de Baygorria más cercano a los medidos en campo. Se utilizaron los parámetros de la pendiente e intercepto de la regresión lineal para evaluar la consistencia de las observaciones asumiendo pendiente igual a 1 e intercepto a 0 (Piñeiro, et al., 2008). Como complemento, se calculó la raíz cuadrática del error medio (RMSE) para evaluar la exactitud entre los datos satelitales y los medidos *in situ*. Cabe destacar que estos muestreos no fueron dirigidos a encontrar sesgos en la medición satelital, sino que son parte de campañas de rutina que mantiene DINAMA, o como parte del convenio UTE-Facultad de Ciencias llevado a cabo en la sección Limnología (Chalar, et al., 2015).

## Resultados

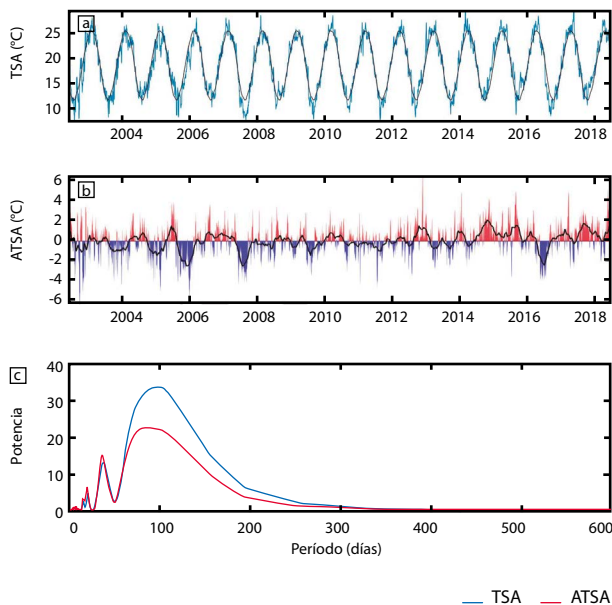
Los resultados se presentan en tres partes. En la primera parte se analizó una única serie temporal del Río Negro promediando los 1513 datos espaciales para cada día. En la segunda parte se trabajó por cada punto de 1 km<sup>2</sup> con una serie temporal y los resultados se presentan en forma de mapas. La tercera parte explora la validez de los datos en base al error asociado a la medición remota y al contraste con mediciones *in situ*. La Figura 1 muestra el mapa del área de estudio con la locación de las grandes represas y algunos centros poblados importantes superpuesto con la temperatura media superficial, la cual es 18,7 °C aguas arriba y 19,0 °C aguas abajo.



**Figura 1.** Mapa del área de estudio. En colores se muestra la temperatura media del agua superficial del Río Negro (°C) entre el 1 de junio de 2002 y el 31 de mayo de 2018. Los cuadrados indican la posición de ciudades: San Gregorio de Polanco (GP) y Paso de los Toros (PT). Las cruces indican represas: Rincón del Bonete (Rb) y Baygorria (Ba).

## Ciclo estacional, variabilidad y tendencia del Río Negro promediado espacialmente

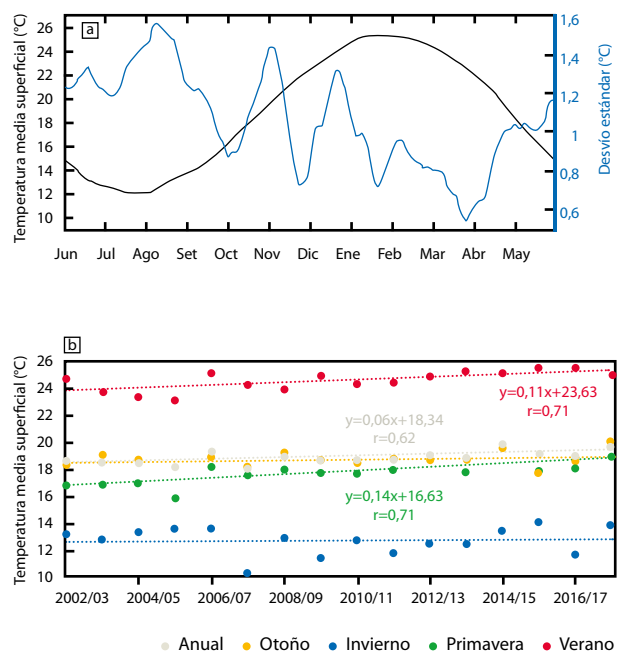
La Figura 2a muestra la serie temporal de TSA utilizada en esta sección, calculada como el promedio espacial de los datos utilizados. Se observa el predominio de la estacionalidad en la variabilidad de la serie temporal (Figura 2a, línea negra). El mínimo de TSA observado fue de 7,80 °C y sucedió el 2 de agosto de 2007, mientras que el máximo fue de 29,34 °C el 27 de febrero de 2017. De las anomalías se observa una dominancia de la variabilidad en escala de días, semanas y a nivel estacional, variando entre valores negativos y positivos. Los extremos de anomalías presentan valores cercanos a -6,00 °C y 6,00 °C. Estos valores tienen persistencia menor a una semana. Los extremos negativos sucedieron mayormente en setiembre de 2002 y diciembre de 2005 y los positivos en noviembre de 2012. También se observa una tendencia de mayor cantidad de valores positivos hacia el presente. Se destaca la predominancia de la variabilidad estacional que se mantiene aun en las anomalías (Figuras 2b y 2c). En cuanto a la cuantificación de las escalas de variabilidad a través del análisis espectral de la serie y las anomalías, se observan tres picos con una periodicidad de 90, 40 y 20 días, de mayor a menor intensidad, asociados con la variabilidad estacional e intraestacional (Figura 2c).



**Figura 2.** Análisis de serie temporal de datos diarios de temperatura superficial del agua (TSA) del promedio espacial de los embalses del Río Negro. a) Serie temporal en azul y climatología en negro. b) Anomalías diarias de TSA (ATSA), obtenidas luego de remover la climatología calculada a la serie temporal original; en negro se muestra la media móvil de 90 días de ATSA. c) Análisis espectral de la serie temporal de TSA y ATSA.

La serie temporal promediada espacialmente del Río Negro presenta un ciclo estacional con un promedio anual de 18,83 °C, mientras que el promedio mensual exhibe una

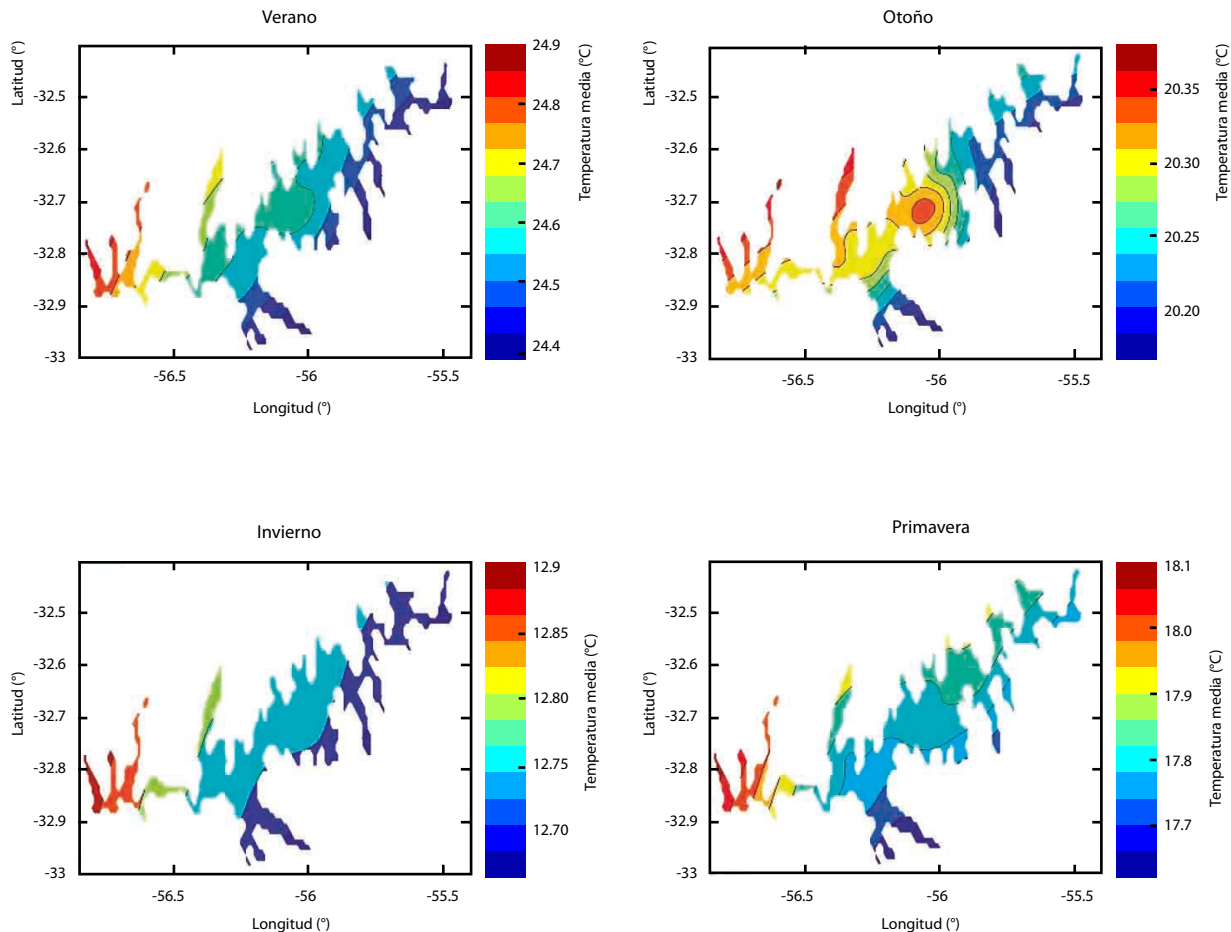
mínima de 12,08 °C y una máxima de 25,23 °C en julio y enero, respectivamente. El desvío estándar también presenta estacionalidad, con mayor variabilidad durante los meses de invierno, cuando se observa un pico máximo de 1,60 °C en agosto y un mínimo a fines de marzo de 0,60 °C. También se constatan 3 picos por encima de 1,00 °C a mediados de junio, principio de noviembre y fines de diciembre en momentos de transición (Figura 3a). En cuanto al análisis de tendencia de la media anual, presenta una correlación de 0,62 (p.valor <0,05) y una tasa de incremento anual (pendiente) de 0,06 °C por año. Esta tendencia está explicada por las estaciones de primavera y verano, ya que ni invierno ni otoño presentan una tendencia significativa. A su vez, tanto primavera como verano presentan un valor de correlación de 0,71. Sin embargo, la pendiente para primavera es mayor, 0,14 °C por año mientras que la de verano es 0,11 °C por año (Figura 3b).



**Figura 3.** a) Ciclo estacional de temperatura media del agua superficial del Río Negro promediado espacialmente (negro). En azul se muestra el desvío estándar. b) Temperatura media superficial del Río Negro, por año y por estación, en diferentes colores. Cada punto indica la media estacional para cada año. Además, se muestra el ajuste del modelo de regresión lineal, donde la variable explicativa es el tiempo (tendencia lineal). Se muestra la ecuación de la recta (donde “x” es el año desde 2002/03, e “y” es la temperatura predicha por el modelo). También se muestra el coeficiente de correlación de Pearson (r) para aquellos modelos en los que el ajuste es significativo (p.valor<0,05).

## Ciclo estacional, variabilidad y tendencia del Río Negro en el espacio

En el eje espacial se observan ciertas diferencias en el comportamiento de la temperatura superficial del Río Negro,



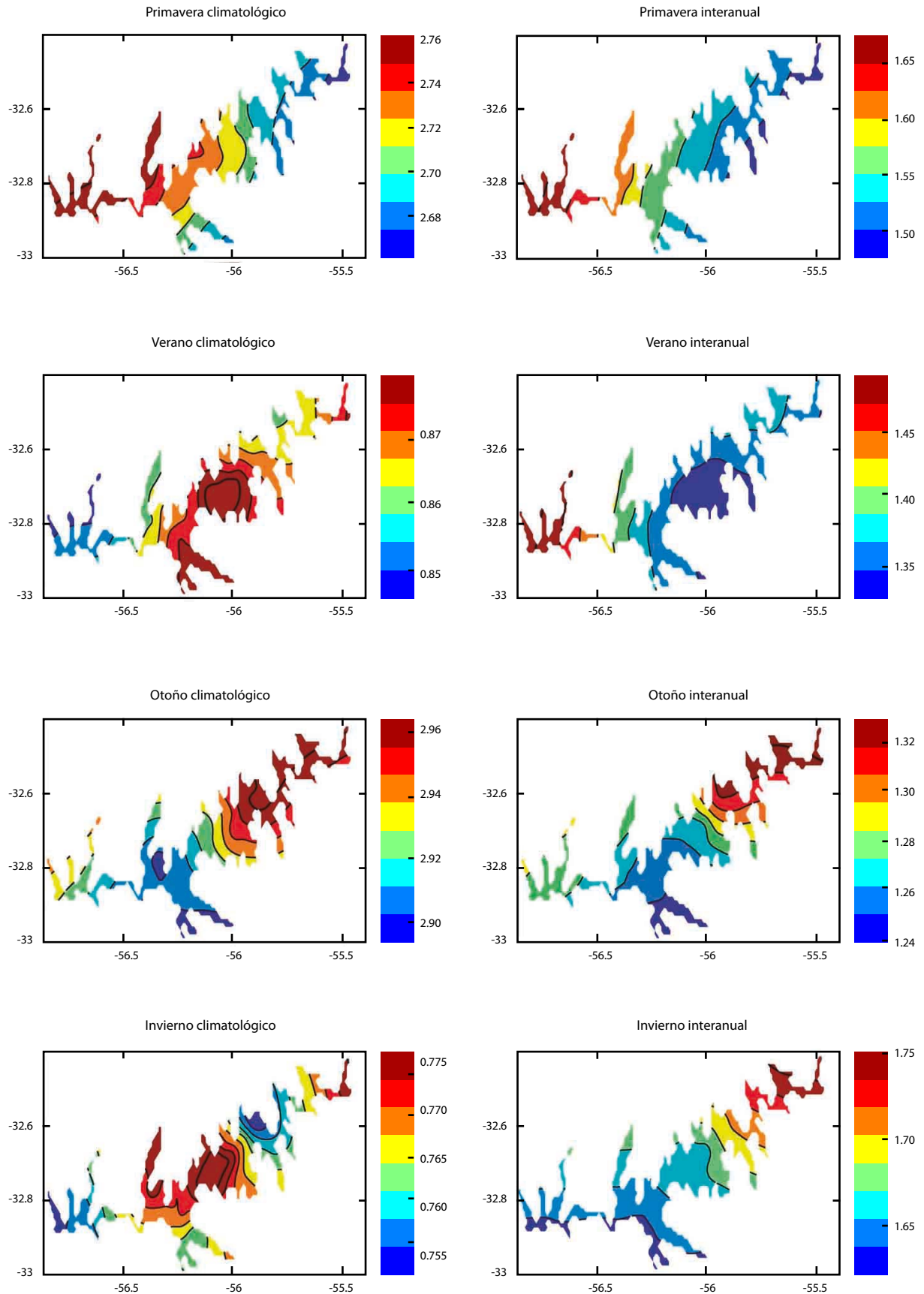
**Figura 4.** Temperatura media del agua superficial del Río Negro (°C) por estación en el período comprendido entre 1 de junio de 2002 y 31 de mayo de 2018.

que se analizan a continuación. La media por estación presenta un gradiente en el que la temperatura aumenta desde el Este hacia el Oeste a lo largo de todas las estaciones, y que a su vez crece en amplitud hacia los meses más cálidos, donde la diferencia es de 0,20 °C en invierno y 0,50 °C en verano. Invierno presenta una temperatura media de 12,80 °C y verano de 24,65 °C, respectivamente. En cuanto a las estaciones intermedias, otoño tiende a ser más cálido que primavera (20,30 °C y 17,90 °C, respectivamente) con una mayor amplitud en el gradiente E-O (0,40 °C contra 0,30 °C, Figura 4).

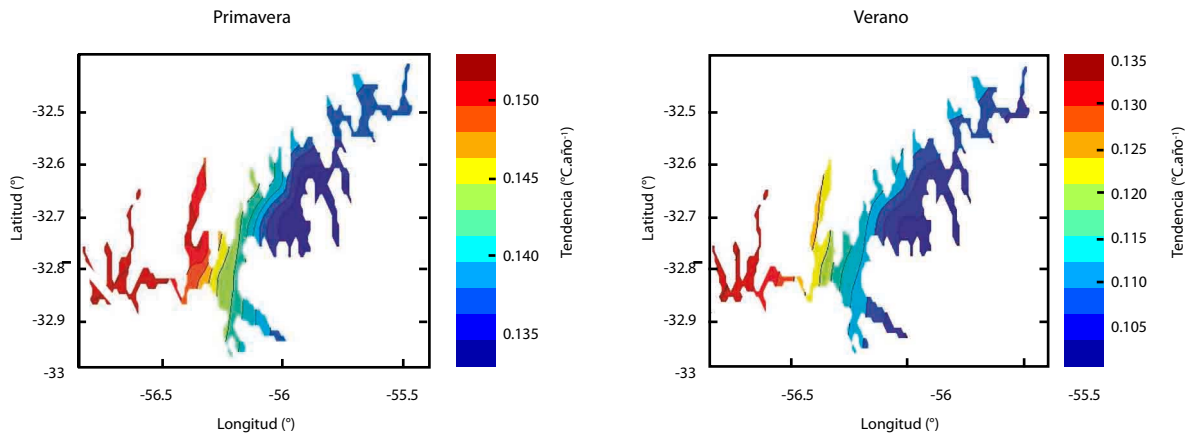
En cuanto a la variabilidad de la temperatura por estación, se observan patrones distintos en el desvío estándar dentro de cada estación (climatológico) y año a año para cada estación (interanual). En el desvío climatológico se observan los máximos para las estaciones de transición otoño y primavera con valores de 2,96 °C y 2,76 °C, respectivamente, mientras que invierno y verano presentan valores máximos de 0,78 °C y 0,88 °C, respectivamente. Otoño y primavera son las estaciones que presentaron mayor variabilidad. A su vez, se observa un patrón en el que primavera-verano tienen mayor variabilidad en la

región oeste de la zona de estudio (aguas abajo), y otoño-invierno la tienen en la región este de la zona de estudio (aguas arriba). La variabilidad interanual tiende a ser menor que la climatológica. Invierno y verano tienen la particularidad de que la variabilidad año a año es mayor que dentro de la estación. Esto se observa especialmente en invierno, cuando el desvío estándar interanual es más del doble que el climatológico, con máximos de 1,75 °C y 0,78 °C, respectivamente (Figura 5).

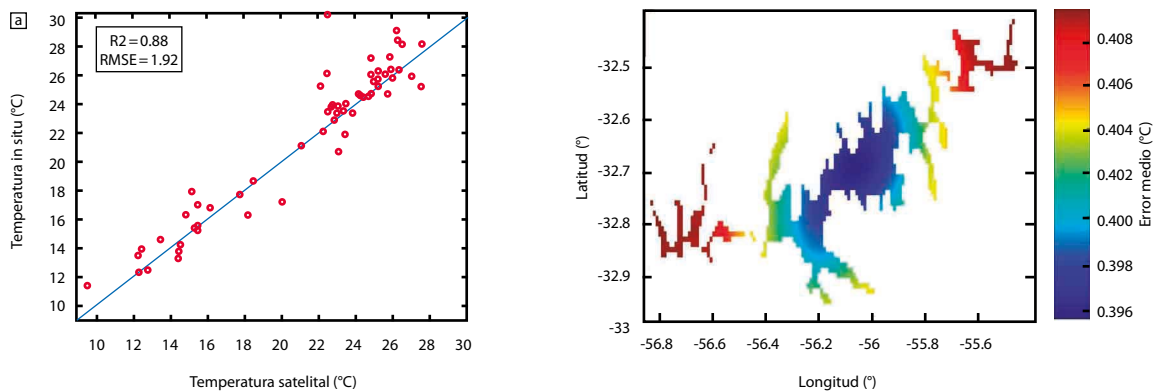
Primavera y verano son las únicas estaciones que presentan una tendencia lineal significativa y con pendiente positiva en toda el área de estudio. Para ambas estaciones la tendencia al calentamiento se incrementa hacia el Oeste, y es máxima al Oeste de la ciudad de Paso de los Toros. Sin embargo, la pendiente en primavera es en promedio 0,02 °C.año<sup>-1</sup> mayor que la de verano. En primavera el mínimo es de 0,13 °C.año<sup>-1</sup> y el máximo de 0,15 °C.año<sup>-1</sup>, mientras que en verano es 0,10 °C.año<sup>-1</sup> y 0,14 °C.año<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6). El análisis de tendencia para el desvío estándar interanual presenta una pendiente positiva pero no significativa para la media anual y tampoco para las estaciones (no se muestra).



**Figura 5.** Desvío estándar (°C) climatológico (izquierda) e interanual (derecha) de temperatura superficial en los grandes embalses del Río Negro. Desvío por estación del año a partir de datos diarios en el periodo comprendido entre 1 de junio de 2002 y 31 de mayo de 2018. Notar las diferencias de escalas.



**Figura 6.** Pendiente para la tendencia ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{año}^{-1}$ ) de temperatura superficial de las aguas de los grandes embalses del Río Negro en primavera (izquierda) y verano (derecha). Solo se muestran las estaciones con tendencia significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** a) Diagrama de puntos entre temperatura satelital y mediciones *in situ*. Cada punto representa un día de medición en Rincón del Bonete ( $n=64$ ). En azul se muestra la recta con pendiente 1:1. b) Error medio del dato satelital, promediado en cada punto para los 16 años de datos diarios utilizados.

### Comparación de los datos *in situ* con los satelitales

El ajuste de la regresión lineal entre ambas fuentes de datos presentó una pendiente de 0,97, intercepto igual a 0, varianza explicada del 88 % y un RMSE de 1,92  $^{\circ}\text{C}$  (Figura 7a). En cuanto al campo espacial del error medio del dato satelital, se observa un patrón concéntrico en el embalse, donde a mayor distancia de la costa, menor error. Los errores máximos se observan en los extremos, aguas arriba y aguas abajo. Sin embargo, las diferencias espaciales son menores a 0,01  $^{\circ}\text{C}$  en promedio (Figura 7b).

### Discusión

Trabajando con 16 años de datos satelitales (período 2002-2018) provenientes del producto MUR-GHRSSST se encontró una respuesta global de los embalses Baygorria y Rincón de Bonete al aumento de su temperatura en 0,70  $^{\circ}\text{C}$  por año en la media anual, determinado por una pendiente de incremento de 0,13  $^{\circ}\text{C}$  por año en primavera-verano. Este aumento, presente principalmente por un calentamiento durante los meses de primavera-verano, podría deberse al calentamiento de la atmósfera reportado para la región (Bidegain, et al., 2014;

IPCC, 2014). Considerando además que se analizaron 16 años de datos, no se descarta que al menos parte de esta tendencia observada podría responder a oscilaciones de baja frecuencia (ej. decadal), mayor al periodo estudiado (Chen y Tung, 2018).

La tendencia al calentamiento encontrada coincide con el rango de valores presentados por O'Reilly et al. (2015) de 0,34  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{década}^{-1}$  (rango -0,7 y 1,3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{década}^{-1}$ ). En ese trabajo, los autores analizan la TSA de verano (obtenida de datos *in situ* y satelitales) en 235 lagos distribuidos a nivel mundial (período 1985 y 2009) y además reportan que coincide con el aumento del promedio anual de la temperatura del aire (0,25  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{década}^{-1}$ ) y la temperatura superficial del océano (0,12  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{década}^{-1}$ ) durante un período mayor (1979-2012). Dado que los últimos 16 años han sido más cálidos que los anteriores 16 (Smith, et al., 2008), sería esperable que analizando el período tomado por O'Reilly et al. (2015) la pendiente de la tendencia de los embalses del Río Negro fuera menor que la encontrada en este trabajo.

La variabilidad espacial fue menor que la temporal, lo cual es esperable para la extensión de los embalses analizados y su ubicación en latitudes medias. En el eje espacial se encontró un gradiente de aumento de temperatura desde aguas arriba hacia aguas abajo del área estudiada. Este patrón podría relacionarse con los tiempos de residencia del agua, ya que

el límite de la región aguas abajo se encuentra después del embalse del Rincón del Bonete, cuyo tiempo de residencia es el mayor de los tres con un promedio de 150 días (Chalar, et al., 2014). Al incrementar el tiempo de residencia del agua, aumenta también la exposición a la radiación solar y, en consecuencia, al calentamiento durante los meses de primavera-verano (Allan y Castillo, 2007).

Teniendo en cuenta la comparación entre los muestreos *in situ* y los datos satelitales, los valores de pendiente e intercepto del modelo lineal indican que no hay inconsistencias entre los valores muestreados y los medidos por el satélite (Piñeiro, et al., 2008), y que a su vez el valor de RMSE calculado es esperado para un embalse de este tamaño (Crosmán, et al., 2017). Las diferencias encontradas entre los valores *in situ* y satelitales podrían deberse a que las mediciones *in situ* son hechas durante el día, mientras que las satelitales se realizan de noche. Para corregir este sesgo de observación, en principio sería necesario conocer la amplitud del ciclo diario de temperatura y corregir los datos. Por otra parte, el hecho de que hacia valores más altos la diferencia sea mayor puede ser explicado por el hecho de que el calentamiento diario en verano es aún mayor. A su vez, los valores muy alejados de la recta de pendiente 1 ( $>5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) son siempre con mediciones *in situ* mayores que las satelitales. Esto podría deberse tanto al ciclo diario de temperatura en el embalse, como a mediciones *in situ* en aguas más cercanas a las costas, donde el ciclo diario tiende a tener aún mayor amplitud debido a que aumenta la relación área · profundidad<sup>-1</sup>, por lo que sería esperable todavía mayor temperatura en los muestreos durante el día.

De la Figura 7 se puede discutir que a priori no hay razón para determinar que los datos satelitales carecen de utilidad debido a la posible contaminación del dato por la tierra. Y, a su vez, que este set de datos *in situ* utilizados no es suficiente para identificar sesgos en la medición satelital. Para ello sería necesario contar con una serie temporal de mediciones constantes, de por lo menos varios meses, superficiales, tomadas lejos de la costa y que tomen registros durante la noche (Grim, et al., 2013). De la Figura 7b se desprende que ante una eventual campaña de ajuste de la medición satelital sería recomendable colocar una boya de medición *in situ* donde el error medio es mínimo, cercana al punto (Lat: -32.70; Lon: -56.05). De esa forma, el producto satelital MUR podría ser utilizado de forma operativa y validado, como se ha demostrado en otros trabajos (Fiedler, et al., 2014; Kraemer, et al., 2017).

En cuanto a las posibles consecuencias ambientales derivadas de los resultados encontrados, bajo condiciones de estratificación térmica asociada al calentamiento de las capas superficiales y baja intensidad de viento se ha observado en Rincón del Bonete una tendencia a la acumulación de cianobacterias potencialmente tóxicas (González-Piana, et al., 2017; González-Piana, et al., 2018). Además, se ha encontrado una relación positiva entre el aumento de la temperatura del agua y la eutrofización con el desarrollo de floraciones en otros embalses y ríos del país: Salto Grande (Martínez de la Escalera, et al., 2017), Río Santa Lucía (Aubriot, et al., 2017) y para todos los sistemas lénticos y lóticos del país considerados en su conjunto (Haakonsson, et al., 2017). Esto se explica porque el aumento de la temperatura produce un aumento de las tasas metabólicas, favoreciendo así a los organismos más pequeños, como los procariontes (Daufresne, et al., 2009; Paerl, 2014). Además, los efectos indirectos de la temperatura, como la estratificación, la reducción de los tamaños corporales de los predadores y la dinámica y disposición de nutrientes son clave para determinar el predominio de las cianobacterias

capaces de formar floraciones (Oliver, et al., 2012; Lürling, et al., 2013; Robarts y Zohary, 1987).

En consecuencia, y de acuerdo a la tendencia de calentamiento encontrada durante primavera-verano, este tipo de fenómenos podrían volverse más intensos y recurrentes en este período. Las condiciones favorables podrían asociarse a condiciones sinópticas de viento débil y a aumento de estratificación, con la potencial pérdida de algunos de los servicios ecosistémicos que brindan hoy los grandes embalses del Río Negro.

## Conclusiones

Se caracterizó el ciclo estacional de temperatura superficial de los grandes embalses del Río Negro y su variabilidad a partir de datos satelitales. Estos presentan una media de 18,83 °C y un promedio mensual con una mínima de 12,08 °C y una máxima de 25,23 °C en julio y enero, respectivamente. Se observó una tendencia significativa de aumento de temperatura superficial del Río Negro en primavera-verano de 1,3 °C por década, no así en los meses de otoño e invierno que presentan una mayor variabilidad interanual. Existe un patrón espacial para primavera-verano en el que la temperatura y la tendencia al calentamiento aumentan desde aguas arriba hacia aguas abajo. Dado el estado eutrófico del Río Negro, sería recomendable contemplar un escenario de primaveras y veranos más cálidos en el manejo ambiental. La herramienta aquí presentada sirve como insumo para los actuales planes de monitoreo del río, y eventual modelación con variables biológicas, con la ventaja de su inmediatez a un costo prácticamente nulo, aunque debe ser validada con mediciones *in situ* dirigidas. A su vez, los resultados hallados sirven de insumo para las proyecciones del plan de manejo del Río Negro y sus posibles consecuencias ambientales.

## Reconocimientos

Al Group for High Resolution Sea Surface Temperature (GHRSSST) y DINAMA por la libre disponibilidad de los datos. También al Dr. Guillermo Chalar y su grupo de investigación (Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, UdelaR) y el convenio UTE- Fcien, por compartir la base de datos de temperatura *in situ* del embalse del Rincón del Bonete. A los revisores que colaboraron con la mejora sustancial del artículo.

## Referencias

- Allan, J.D. y Castillo, M.M., 2007. *Stream ecology: structure and function of running waters*. Berlín: Springer Science & Business Media.
- 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: *INNOTEC*, 14, pp.7-16.
- Barton, I.J., 1995. Satellite-derived sea surface temperatures: current status. En: *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 100(C5), pp.8777-8790.
- Bidegain, M., Crisci, C., del Puerto, L., Inda, H., Mazzeo, N., Taks, J. y Terra, R., 2014. *Clima de cambios: nuevos desafíos de adaptación en Uruguay. Volumen 1. Variabilidad climática de importancia para el sector productivo* [En línea]. Montevideo: FAO, MGAP. [Consulta: 20 de



- setiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/009/as253s/as253s.pdf>
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L. y de la Escalera, G.M., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. En: *INNOTEC*, (10), pp.9-22.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M. y West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. En: *Ecology*, 85(7), pp.1771-1789.
- Chalar, G., Fabián, D., González-Piana, M. y Piccardo, A., 2015. *Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro*. Montevideo: Facultad de Ciencias; UTE.
- Chalar, G., Gerhard, M., González-Piana, M. y Fabián, D., 2014. Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena. En: Marcovecchio, J.E., Botté, S.E. y Freije, R.H. *Procesos geoquímicos superficiales en Sudamérica*. Salamanca: Nueva Graficesa. pp.121-148.
- Chang, N. B., Imen, S. y Vannah, B., 2015. Remote sensing for monitoring surface water quality status and ecosystem state in relation to the nutrient cycle: A 40-year perspective. En: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(2), pp.101-166.
- Chen, X. y Tung, K.K., 2018. Global surface warming enhanced by weak Atlantic overturning circulation. En: *Nature*, 559(7714), pp.387.
- Chin, Toshio M., Milliff, Ralph F. y Large, William G., 1998. Basin-scale, high-wavenumber sea surface wind fields from a multiresolution analysis of scatterometer data. En: *Journal of atmospheric and oceanic technology*, 15(3), pp.741-763.
- Crosman, E., Vazquez-Cuervo, J. y Chin, T., 2017. Evaluation of the multi-scale ultra-high resolution (MUR) analysis of lake surface temperature. En: *Remote Sensing*, 9(7), pp.723.
- Dash, P., Ignatov, A., Martin, M., Donlon, C., Brasnett, B., Reynolds, R. W. y Grumbine, R., 2012. Group for high resolution sea surface temperature (GHRSSST) analysis fields inter-comparisons—Part 2: Near real time web-based level 4 SST Quality Monitor (L4-SQUAM). En: Drinkwater, Kenneth, Aristegui, Javier, eds. *Deep sea research part II: Topical studies in oceanography*, 77, pp.31-43.
- Daufresne, M., Lengfellner, K. y Sommer, U., 2009. Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), pp.12788-12793.
- DINAMA, 2018. *OAN observatorio ambiental nacional. Módulo calidad de agua. (Base de datos 12/09/2017)*. [En línea]. Montevideo: DINAMA. [Consulta: 20 de setiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.dinama.gub.uy/oan>.
- Fiedler, Emma K., Martin, Matthew J. y Roberts-Jones, Jonah, 2014. An operational analysis of lake surface water temperature. En: *Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography*, 66(1), pp.21247.
- González-Piana, M., Fabian, D., Delbene, L. y Chalar, G., 2011. Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Rio Negro reservoirs, Uruguay. En: *Harmful Algae News*, 43, pp.16-17.
- González-Piana, M., Fabián, D., Piccardo, A. y Chalar, G., 2017. Dynamics of total Microcystin LR concentration in three subtropical hydroelectric generation reservoirs in Uruguay, South América. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(4), pp.488-492.
- González-Piana, M., Piccardo, A., Ferrer, C., Brena, B., Pérez, M., Fabián, D. y Chalar, G., 2018. Effects of wind mixing in a stratified water column on toxic cyanobacteria and Microcystin-LR distribution in a subtropical reservoir. En: *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, pp.1-6.
- Grim, Joseph A., Kniewel, Jason C. y Crosman, Erik T., 2013. Techniques for using MODIS data to remotely sense lake water surface temperatures. En: *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, 30(10), pp.2434-2451.
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A. y Bonilla, S., 2017. Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. En: *Science of the Total Environment*, 609, pp.1132-1139.
- Hambright, K.D., Gophen, M. y Serruya, S., 1994. Influence of long-term climatic changes on the stratification of a subtropical, warm monomictic lake. En: *Limnology and Oceanography*, 39(5), pp.1233-1242.
- Hutchinson, G.E., 1941. Limnological studies in Connecticut: IV. The mechanisms of intermediary metabolism in stratified lakes. En: *Ecological Monographs*, 11(1), pp.21-60.
- IPCC, 2014. *Climate change 2013 – The physical science basis: Working Group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781107415324
- Joehnk, K.D., Huisman, J.E.F., Sharples, J., Sommeijer, B.E.N., Visser, P.M. y Stroom, J.M., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. En: *Global Change Biology*, 14(3), pp.495-512.
- Kraemer, B. M., Mehner, T. y Adrian, R., 2017. Reconciling the opposing effects of warming on phytoplankton biomass in 188 large lakes. En: *Scientific Reports*, 7(1), pp.10762.
- Lüring, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S. y Huszar, V.L., 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. En: *Freshwater Biology*, 58(3), pp.552-559.
- Margalef, R., 1983. *Limnología*. Vol. 1009. Barcelona: Omega.
- Martin, M., Dash, P., Ignatov, A., Banzon, V., Beggs, H., Brasnett, B. y Grumbine, R., 2012. Group for High Resolution Sea Surface temperature (GHRSSST) analysis fields inter-comparisons. Part 1: A GHRSSST multi-product ensemble (GMPE). En: *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 77, pp.21-30.
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I. y Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. En: *Harmful Algae*, 62, pp.73-83.
- MGAP, 2017. *Anuario estadístico DIEA 2017* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 28 de junio 2018]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>
- MVOTMA, 2018. *Indicadores ambientales. Concentración de fósforo total (PT)* [En línea]. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 28 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.dinama.gub.uy/indicadores\\_ambientales/ficha/oan-concentracion-de-fosforo-total/](https://www.dinama.gub.uy/indicadores_ambientales/ficha/oan-concentracion-de-fosforo-total/)
- Oliver, R.L., Hamilton, D.P., Brookes, J.D. y Ganf, G.G., 2012. Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. En: Whitton B., ed. *Ecology of cyanobacteria II*. Dordrecht: Springer. pp.155-194.
- O'Reilly, C. M., Sharma, S., Gray, D. K., Hampton, S. E., Read, J. S., Rowley, R. J. y Weyhenmeyer, G. A., 2015. Rapid and highly variable warming of lake surface waters around the globe. En: *Geophysical Research Letters*, 42(24), pp.10-773.



- Paerl, H.W., 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. En: *Life*, 4(4), pp.988-1012.
- Pérez, M.D.C., 2002. Fitoplancton del río Negro, Uruguay. En: *Limnetica*, 21(1-2), pp.81-92.
- Piñeiro, G., Perelman, S., Guerschman, J. P. y Paruelo, J. M., 2008. How to evaluate models: observed vs. predicted or predicted vs. observed? En: *Ecological Modelling*, 216(3-4), pp.316-322.
- Poole, G.C. y Berman, C.H., 2001. An ecological perspective on in-stream temperature: natural heat dynamics and mechanisms of human-caused thermal degradation. En: *Environmental Management*, 27(6), pp.787-802.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. y Flannery, B.P., 1992. *Numerical recipes*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., 2006. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Robarts, R.D. y Zohary, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. En: *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), pp.391-399.
- Sharma, S., Gray, D. K., Read, J. S., O'Reilly, C. M., Schneider, P., Quadrat, A. y Lenters, J. D., 2015. A global database of lake surface temperatures collected by *in situ* and satellite methods from 1985–2009. En: *Scientific Data*, 2, pp.150008.
- Smith, T.M., Reynolds, R.W., Peterson, T.C. y Lawrimore, J., 2008: Improvements to NOAA's historical merged land–ocean surface temperatures analysis (1880–2006). En: *Journal of Climate*, 21, pp.2283–2296.
- Straile, D., 2005. Food webs in lakes—seasonal dynamics and the impact of climate variability. En: Belgrano, A., Sharler, U., Dunne, J. y Ulanowicz, R., eds. *Aquatic food webs. An ecosystem approach*. En: New York: Oxford University Press. pp.41-50.
- Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T., Arantes Junior, J.D., Tundisi, J. E.M., Manzini, N. F. y Ducrot, R., 2004. The response of Carlos Botelho (Lobo, Broa) reservoir to the passage of cold fronts as reflected by physical, chemical, and biological variables. En: *Brazilian Journal of Biology*, 64(1), pp.177-186.
- Webb, B.W., Hannah, D.M., Moore, R.D., Brown, L.E. y Nobilis, F., 2008. Recent advances in stream and river temperature research. En: *Hydrological Processes*, 22(7), pp.902-918.

NOTA TÉCNICA

# Variación de los hábitos tróficos en nueve especies de peces de la Laguna Garzón (Uruguay)

## Feeding habits variation within nine fish species from Laguna Garzón (Uruguay)

García-Sposito, Camilo (1); Malfatti, Francisco (1); Laborde, Sabrina (1); Scarabino, Fabrizio (1); García-Rodríguez, Felipe (2); Bergamino, Leandro (1)

(1) Centro Universitario Regional del Este, UdelaR, Rocha, Uruguay.

(2) Instituto Oceanográfico, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil.

Contacto: [camilogarcia1001@gmail.com](mailto:camilogarcia1001@gmail.com)

RECIBIDO: 11/4/2018 – APROBADO: 31/8/2018

### Resumen

Se analizó el rol trófico de nueve especies de peces capturadas en la Laguna Garzón (costa atlántica uruguaya) mediante la evaluación de la composición isotópica de nitrógeno y carbono. La captura se realizó en mayo de 2017 utilizando redes de enmalle de 10 cm y 15 cm entre nudos opuestos, con una longitud total de 200 m y un tiempo de actividad de 12 h. Los resultados indicaron una variación isotópica en las especies analizadas debido a diferentes hábitos tróficos. Las mayores posiciones tróficas (PT) ocuparon el segundo nivel trófico, con especies como la anchoa *Lycengraulis grossidens* (PT = 3,8), el testolín azul *Prionotus punctatus* (PT = 3,4), la corvina blanca *Micropogonias furnieri* (3,4), y el dientado *Oligosarcus jenynsii* (PT = 3,0). Los modelos isotópicos mostraron que algunas especies estuvieron asociadas al ambiente bentónico, y se alimentaron preferentemente de material orgánico del sedimento (*Mugil liza*), o de cangrejos (*M. furnieri*), en contraste con especies que estuvieron asociadas a la columna de agua, como el pejerrey *Odontesthes argentinensis*. De esta forma, la fauna bentónica residente y la materia orgánica del sedimento y en suspensión estarían sustentando los hábitos de alimentación de los peces analizados en la Laguna Garzón.

**Palabras clave:** variabilidad isotópica, redes tróficas, peces costeros, estuario.

### Abstract

Trophic role including nine fish species from a coastal lagoon in Uruguay (Laguna Garzón) was assessed using carbon and nitrogen stable isotope measurements. To this end, samples of food sources and fishes were collected in May 2017 for isotopic analysis. Fishes were collected by deploying a net of 10 and 15 cm (200 m long) for 12 hs. The results indicated an isotopic variation within the fish species examined thus suggesting different trophic habits. The highest trophic positions (TP) were observed for the anchovy *Lycengraulis grossidens* (TP = 3,8), the bluewing searobin *Prionotus punctatus* (TP = 3,4), the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (3,4), and dog-tooth characid *Oligosarcus jenynsii* (TP = 3,0). Model calculations showed that the main prey for the fish species in Garzón derived from benthic (e.g. *M. furnieri*, *Mugil liza*) and pelagic environment (*Odontesthes argentinensis*). Therefore, benthic fauna together with sedimentary carbon sources support this fish assemblage in Laguna Garzón.

**Keywords:** isotopic variation, food webs, coastal fishes, estuary.

## Introducción

Las lagunas costeras se caracterizan por ser ecosistemas altamente productivos, dado el gran aporte de nutrientes que reciben tanto del continente como de los ríos y el mar adyacente, en combinación con una alta disponibilidad lumínica (Knoppers, 1994). Estos sistemas costeros brindan numerosos servicios ecosistémicos para la biodiversidad y para el hombre, entre ellos, el sustento de pesquerías artesanales, sitios de alimentación y reproducción para diversas especies de peces y aves, la recrea-

ción y el control de la erosión (Costanza, et al., 1997; Fabiano y Santana, 2006). Sin embargo, a pesar de la relevancia para la conservación que estos sistemas costeros presentan, están siendo significativamente amenazados debido al incremento de asentamientos humanos en estas regiones costeras, lo que configura una amenaza física y ecológica para estos sistemas altamente vulnerables (Conde, et al., 2015). En este contexto, la generación de información acerca de la composición, estructura y funcionamiento de los ecosistemas es muy importante para la toma de decisiones de gestión responsable.

Uno de los aspectos centrales para la toma de decisiones de gestión es el conocimiento de las relaciones alimenticias entre las especies de un ecosistema. Este tipo de información permite predecir cuáles son las potenciales consecuencias de una medida específica sobre el resto de la comunidad biótica y sus recursos (Polis y Winemiller, 1996). En las lagunas costeras, algunos de los productores primarios que se han identificado y que sustentan la red trófica incluyen micro y macroalgas, epífitas, material orgánico del sedimento y detritus de origen terrestre (Vizzini y Mazzola, 2003; Pernet, et al., 2012; Park, et al., 2013; Careddu, et al., 2015). Asimismo, García et al. (2007) realizaron un estudio puntual durante la primavera austral sobre los hábitos alimenticios en un ensamblaje de peces y sugieren que los productores primarios autóctonos representan la mayor fuente de alimento. En algunos casos las relaciones alimenticias pueden variar espacial y temporalmente (Kanaya, et al., 2007; Claudino, et al., 2013), y en otros no (Rodríguez-Graña, et al., 2008).

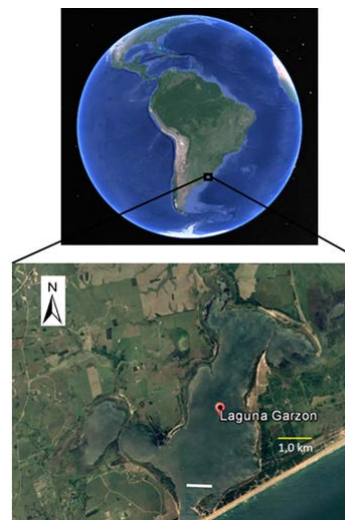
Estudios sobre los hábitos alimenticios, como el análisis de contenido estomacal, proveen información sobre la composición de presas y relaciones tróficas y son difíciles de interpretar en el material ingerido en estado triturado y mezclado. Como complemento, la determinación de isótopos estables se ha transformado en una potente herramienta para definir las relaciones tróficas entre los componentes de la comunidad (Fry, 2007). Este hecho se basa en que las proporciones de isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C} = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N} = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) de los animales depende de la ingesta. En general, el  $\delta^{13}\text{C}$  en los tejidos de los consumidores se incrementa en 0-1‰ respecto de su dieta y, por lo tanto, permite distinguir la fuente de alimentación desde la base del ecosistema (McCutchan, et al., 2003; Caut, et al., 2009). A su vez, el  $\delta^{15}\text{N}$  se estima que incrementa en 2-4‰ en el tejido del consumidor respecto al valor de su dieta, y puede ser utilizado para estudiar la posición trófica de un organismo en la cadena trófica (Post, 2002; McCutchan, et al., 2003).

La costa atlántica uruguaya contiene un cordón de lagunas que son ecosistemas con distintos grados de protección y sus pesquerías tradicionales (ej. camarón rosado, *Farfantepenaeus paulensis*) sustentan asentamientos humanos de escasos recursos (Santana y Fabiano, 1999). En particular, existen trabajos que han detallado los hábitos de alimentación (Norbis y Galli, 2004; Olson, et al., 2013) y las relaciones alimenticias (Rodríguez-Graña, et al., 2008) en la Laguna de Rocha y se considera importante ampliar este tipo de estudios en el resto de las lagunas costeras. El objetivo de este estudio fue evaluar las variaciones isotópicas de nueve especies de peces capturados en la Laguna Garzón y establecer las principales relaciones energéticas.

## Materiales y Métodos

### Área de estudio

La Laguna Garzón es una laguna somera (profundidad media = 0,6 m; área = 18 km<sup>2</sup>), salobre, que se encuentra dentro de una cuenca de aproximadamente 695 km<sup>2</sup>, ubicada en la costa sureste de Uruguay (34°46' S, 54°33' O) (Figura 1). Esta laguna presenta una conexión intermitente con el Océano Atlántico, con dos efluentes importantes, el Arroyo Garzón y Arroyo de la Cruz, que desembocan en el NW. La población de habitantes permanente en el área es relativamente baja, los principales usos de esta laguna y su cuenca incluyen la ganadería, forestación, agricultura y urbanización para actividades turísticas, y no se registran actividades industriales (Rodríguez-Gallego, et al., 2017).



**Figura 1.** Mapa de la Laguna Garzón (34°46' S, 54°33' O) en Uruguay. La línea blanca indica la zona en la que fue posicionada la red de enmalle utilizada para el muestreo de peces durante mayo de 2017. Imagen satelital extraída de Google Earth, 20 de marzo de 2017.

### Muestreo de peces y fuentes de alimento

Para la colecta de peces se realizó una sola campaña durante mayo de 2017. La captura se efectuó mediante el calado de una red de enmalle de 10 cm y 15 cm de apertura entre nudos opuestos, por una altura de 2 m y una longitud total de 200 m, durante la noche y por un período de 12 horas, desde las 7:00 PM hasta las 7:00 AM del día siguiente. La zona de calado de la red de enmalle se ubicó en la parte sur de forma perpendicular a la línea de costa (Figura 1). Asimismo, dada la escasa profundidad de estas lagunas se asume que la red abarcó toda la columna de agua. Una vez capturados, los especímenes fueron congelados a una temperatura de -20 °C hasta el momento de ser examinados en el laboratorio. Los ejemplares fueron identificados según las claves taxonómicas de Figueiredo y Menezes (2000) y Dyer (2006).

Además, para los análisis isotópicos se colectaron las potenciales fuentes de alimento, incluyendo material orgánico del sedimento (MOS), material orgánico particulado en suspensión (MOP = fitoplancton + detritus) e invertebrados bentónicos. Para la obtención de MOP se colectó un bidón de 5 L con agua de la laguna y posteriormente el agua se filtró por triplicado a través de filtros Whatman GF/F almacenándolos hasta su procesamiento a -20 °C. El MOS se colectó usando un cilindro de PVC con 40 cm de profundidad y 27 cm de diámetro y se seleccionó el primer cm de sedimento para análisis isotópico. Posteriormente, el sedimento fue tamizado a través de una malla de 0,5 mm y los organismos retenidos se separaron por especie (mínimo cinco ejemplares vivos por especie) y se los congeló para su posterior procesamiento de análisis isotópico. El MOS se compone de fitobentos, bacterias y detritus de diferente origen. Se colectaron tres muestras del sedimento en la zona de muestreo, que posteriormente se almacenaron congeladas a -20 °C en frascos plásticos sin uso previo.

### Parámetros fisicoquímicos

Las variables fisicoquímicas del agua (temperatura, pH, % de oxígeno disuelto), se registraron *in situ* con un sensor

multiparámetro Horiba y se tomaron muestras de agua para el análisis de clorofila. Para la determinación de clorofila a, en el laboratorio se filtraron 500 mL de agua con filtros Whatman GF/C, y se realizó una extracción de 24h a oscuras con etanol al 96% (Jespersen y Christoffersen, 1987). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis (modelo SP-2100) ubicado en el Centro Universitario Regional del Este-sede Rocha.

## Análisis de isótopos estables

Para el análisis isotópico en peces se tomaron muestras de músculo dorsal, debido a que presentan menor variación isotópica (Pinnegar y Polunin, 1999). Además, se procesaron moluscos, se descartaron las valvas y solo se usó tejido blando, mientras que en crustáceos decápodos se extrajeron muestras de músculo del segmento abdominal, y en poliquetos se utilizó el organismo entero. Los tejidos de los organismos fueron secados a 60 °C por 24 h, molidos en un mortero de ágata hasta obtener un polvillo que fue finalmente colocado en cápsulas de estaño. Con el propósito de no alterar las medidas isotópicas, no se aplicó la acidificación de muestras (Serrano, et al., 2008). El análisis isotópico en peces fue realizado para cada individuo capturado por especie; se tomaron entre siete y 10 individuos, según su disponibilidad. En moluscos y crustáceos decápodos fueron realizadas tres réplicas que incluyeron entre cinco y ocho organismos de la misma especie.

Las muestras homogeneizadas preparadas para la medición isotópica de carbono y nitrógeno fueron analizadas por la University of North Carolina-Wilmington (UNCW) mediante la combustión en un analizador elemental Thermo Flash HT Plus. La proporción de isótopos estables de un elemento se expresa a través de la anotación delta ( $\delta$ ), que representa la diferencia relativa entre las proporciones isotópicas en la muestra y en un estándar (Vienna Pee Dee Belemnite para el carbono y  $N_2$  para el nitrógeno), según la Ecuación 1.

$$\delta^{13}C \text{ o } \delta^{15}N (\text{‰}) = [(R_{\text{MUESTRA}} / R_{\text{ESTÁNDAR}}) - 1] 1000 \quad [\text{Ec. 1}]$$

Donde R es la cantidad de isótopo pesado dividida por la cantidad del ligero, tanto en la muestra como en el estándar:  $^{13}C/^{12}C$ ,  $^{15}N/^{14}N$ .

## Análisis de datos

La posición trófica (PT) de cada consumidor en la Laguna Garzón se basó en su valor promedio de  $\delta^{15}N$  para el período de estudio, el cual ha sido demostrado como un indicador confiable de la PT (del Río, et al., 2009). Esta estimación se llevó a cabo siguiendo la fórmula propuesta por Vander Zanden et al. (1997) y modificada por Post (2002):

$$PT_i = [(\delta^{15}N_i - \delta^{15}N_{cp}) / 2,9] + 2 \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde  $PT_i$  es la posición trófica promedio del pez  $i$ ;  $\delta^{15}N_i$  es el promedio de  $\delta^{15}N$  obtenido del músculo del pez  $i$ ;  $\delta^{15}N_{cp}$  es el promedio de  $\delta^{15}N$  de los consumidores primarios (en este estudio se considera un promedio entre el caracol *Heleobia* aff. *australis* y filtradores *Tagelus* aff. *plebeius*); 2,9 corresponde al enriquecimiento trófico promedio de  $\delta^{15}N$  que ocurre de presa a predador, siguiendo el trabajo de McCutchan et al. (2003), y 2 es la posición trófica de los consumidores primarios. Se consideran organismos base a los consumidores primarios,

ya que permiten integrar cambios temporales discontinuos en la base de la red trófica a la vez que abarcan un período de tiempo similar al de los consumidores secundarios (Post, 2002).

Para poder evaluar cuantitativamente la contribución de cada fuente de alimento en la dieta de los peces, se utilizó la aproximación bayesiana de modelos mixtos (SIAR, Stable Isotope Analysis in R; Parnell, et al., 2010). Esta aproximación permite incorporar variabilidad en los parámetros de entrada e incluye los valores isotópicos en consumidores, fuentes de alimento y los factores de enriquecimiento isotópico (músculo en peces:  $1,3 \pm 0,13\text{‰}$ ; para  $\delta^{13}C$  y  $2,9 \pm 0,3\text{‰}$  para  $\delta^{15}N$ ; McCutchan, et al., 2003). Para la selección de presas en cada modelo se realizó una revisión bibliográfica de estudios de peces en zonas costeras de Uruguay (Milessi, et al., 2010; Rodríguez-Graña, et al., 2008; Stebniki, 2014; Olsson, et al., 2013). Asimismo, las fuentes de alimento consideradas para cada modelo SIAR debieron formar un polígono de mezcla isotópica que contenga a cada consumidor siguiendo las recomendaciones de Phillips et al. (2014).

## Resultados

### VARIABLES AMBIENTALES

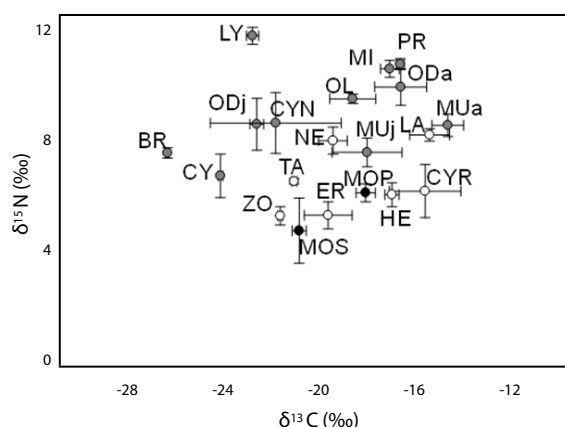
En mayo de 2017 se observó que la Laguna Garzón presentó una temperatura de 19 °C, una conductividad de 17,6 mS/cm y un pH relativamente neutro, con un valor de 7,9. Asimismo, el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en el agua fue 97,2, y el total de sólidos disueltos 10,9 mg/L. El análisis de clorofila a en el agua fue un promedio de 6,11  $\mu\text{g/L}$ .

### Caracterización isotópica de los peces analizados

Se capturaron un total de nueve especies de peces (Tabla 1) y para las especies *Odontesthes argentinensis* y *Mugil liza* se identificaron dos grupos de tallas diferentes: mayores a 30 cm y menores a 10 cm.

Especie	n	Tamaños (cm)
<i>Lycengraulis grossidens</i>	4	15,3 (14-16)
<i>Mugil liza J</i>	6	4,3 (4-7)
<i>Mugil liza A</i>	5	31,8 (30-35)
<i>Micropogonias furnieri</i>	7	23,8 (23-25)
<i>Oligosarcus jenynsii</i>	5	19,2 (18-20)
<i>Cyphocharax voga</i>	3	-
<i>Cynoscion guatucupa</i>	7	-
<i>Odontesthes argentinensis J</i>	4	4,5 (4-6)
<i>Odontesthes argentinensis A</i>	10	17,7 (15-20)
<i>Brevoortia aurea</i>	3	12,6 (11-14)
<i>Prionotus punctatus</i>	3	20,5 (19-22)

**Tabla 1.** Valores promedio de tamaños para cada especie colectada en la Laguna Garzón en mayo de 2017. En paréntesis se indica el rango de tamaños encontrado. n: número de especímenes colectados; J: juveniles; A: Adultos.



**Figura 2.** Valores medios ( $\pm$  desvío estándar) de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , en fuentes de materia orgánica (círculos negros), consumidores primarios (círculos blancos) y peces (círculos grises), colectados en la Laguna Garzón en mayo de 2017. MOP: material orgánico particulado; MOS: material orgánico del sedimento; ZO: Zooplancton; ER: *Erodona mactroides*; LA: *Laeonereis pandoensis*; HE: *Heleobia* aff. *australis*; NE: *Nephtys fluviatilis*; TA: *Tagelus* aff. *plebeius*; ODj; juveniles de *Odontesthes argentinensis*; MUj; juveniles de *Mugil liza*; MUa: adultos *Mugil liza*; BR: *Brevoortia aurea*; CYR: *Cyrtograpsus angulatus*; MI: *Micropogonias furnieri*; PR: *Prionotus punctatus*; CY: *Cyphocharax voga*; CYN: *Cynoscion guatucupa*; LY: *Lycengraulis grossidens*; OL: *Oligosarcus jenynsii*.

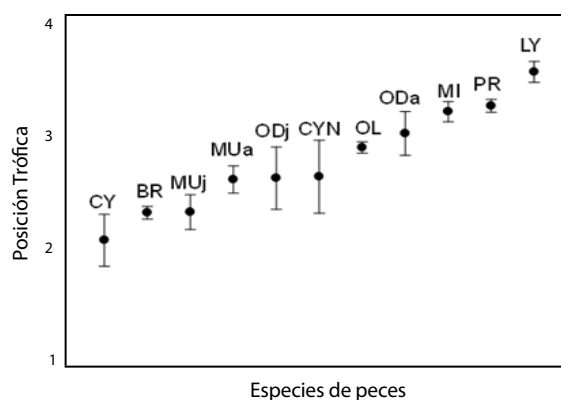
Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en los peces mostraron una gran variación entre las especies colectadas. La lacha (*Brevoortia aurea*) y el sabalito (*Cyphocharax voga*) mostraron los valores más bajos (desde  $-26,23 \pm 0,06\text{‰}$  a  $-24,09 \pm 0,1\text{‰}$ , respectivamente), mientras que los juveniles de la lisa (*Mugil liza*) y los adultos de pejerrey (*Odontesthes argentinensis*) presentaron los valores más altos (desde  $-18,05 \pm 1,4\text{‰}$  y  $-16,80 \pm 0,05\text{‰}$  respectivamente) (Figura 2). Los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  mostraron un rango de  $7,89 \pm 0,04\text{‰}$  (*C. voga*) a  $12,2 \pm 0,03\text{‰}$  (anchoa, *Lycengraulis grossidens*) (Figura 2).

### Determinación de las posiciones tróficas

La PT media más alta en la Laguna Garzón estuvo ocupada por la anchoa (*Lycengraulis grossidens*), seguida por el testolín azul (*Prionotus punctatus*) y la corvina blanca (*Micropogonias furnieri*) (PT = 3,85, 3,42, 3,40, respectivamente) (Figura 3). El sabalito (*Cyphocharax voga*) mostró valores de  $\delta^{15}\text{N}$  correspondientes a una PT de un consumidor primario (2,1), mientras que los juveniles de *M. liza* y *B. aurea* tuvieron valores similares (Figura 3). Asimismo, adultos de *M. liza*, *O. argentinensis*, la pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y el dientudo (*Oligosarcus jenynsii*) tuvieron valores  $\delta^{15}\text{N}$  correspondientes a una PT intermedia entre consumidores primarios y predadores topos (Figura 3).

### Importancia de fuentes de alimento en la dieta de peces

Las estimaciones de los modelos de mezcla isotópica en la Laguna Garzón identificaron una variación en la contribución relativa de las diferentes fuentes de alimento en la dieta de

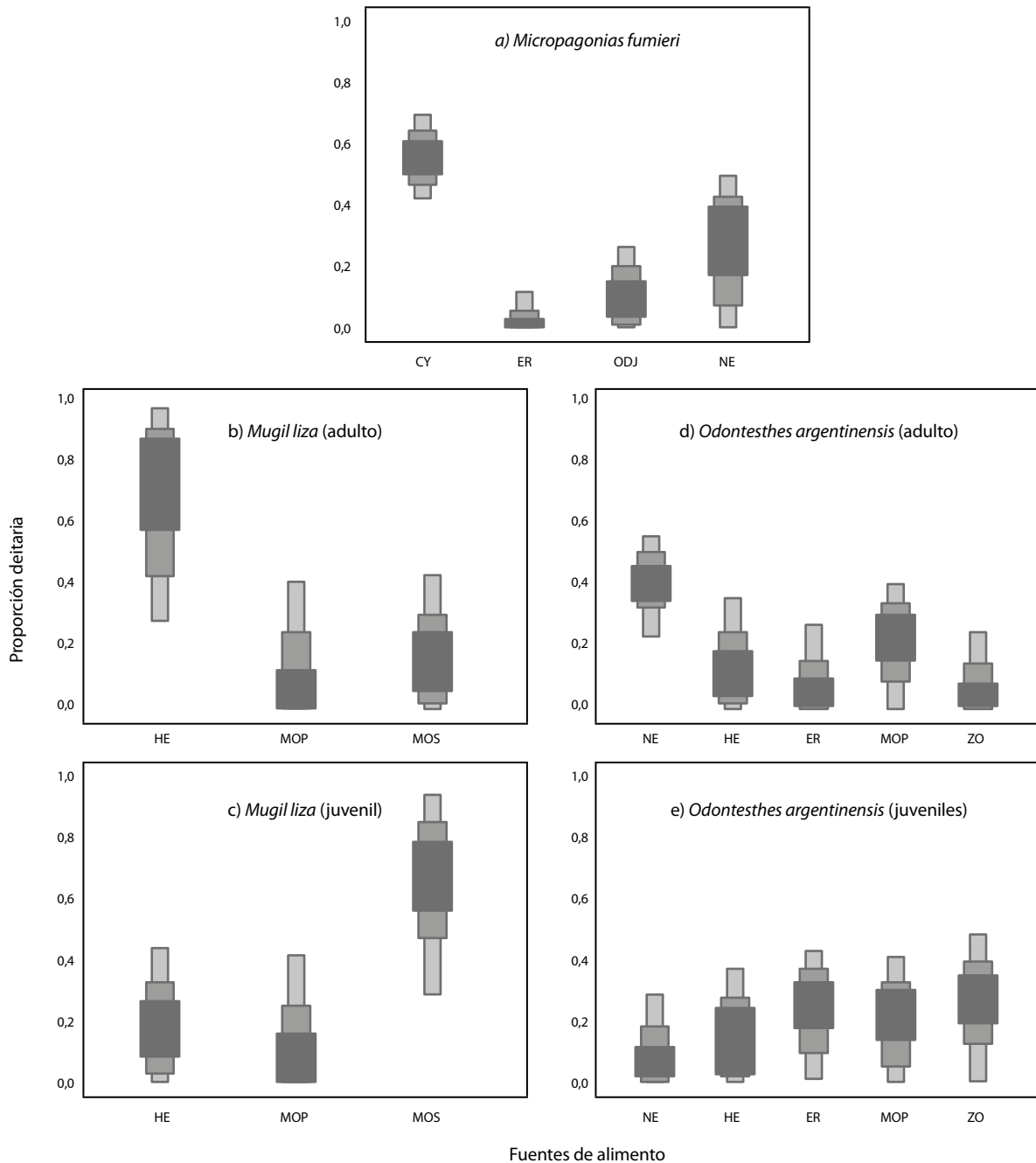


**Figura 3.** Estimación de las posiciones tróficas a partir de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en músculo, para las especies de peces colectadas en la zona sur de la Laguna Garzón en mayo de 2017. Las abreviaciones de las especies se muestran en la Figura 2.

los peces (Figura 4). En este sentido, *Micropogonias furnieri* seleccionó principalmente cangrejos *Cyrtograpsus angulatus*, con una contribución media en su dieta de 50%. Asimismo, el caracol *Heleobia* aff. *australis* fue la fuente principal de alimento en adultos de *M. liza*, mientras que para los juveniles de esta especie, el MOS representó la mayor parte de su dieta, con una contribución media de 60%. En individuos adultos de *O. argentinensis* los modelos isotópicos identificaron que poliquetos *Nephtys fluviatilis* y MOP de la columna de agua fueron los principales componentes dietarios, mientras que para juveniles de pejerrey el consumo de poliquetos disminuyó y aumentó el consumo de zooplancton.

## Discusión

Este estudio mostró una variabilidad en la composición isotópica para las nueve especies de peces capturados en la Laguna Garzón, lo que evidencia la presencia de diferentes hábitos alimenticios y de fuentes de materia orgánica presentes en el sistema. Debido a que las diversas fuentes basales de alimento mostraron valores isotópicos distintos, fue posible la identificación de las vías de transferencia en la red trófica. Se observó que existen vías de transferencia de energía bentónicas y pelágicas hacia los niveles tróficos superiores. Asimismo, los hábitos alimenticios en pejerrey *O. argentinensis* cambiaron con la ontogenia; los individuos juveniles están asociados a hábitos planctónicos, mientras que los organismos adultos estuvieron asociados predominantemente al sistema bentónico en términos dietarios y consumiendo preferentemente poliquetos. Estos resultados están en línea con los mostrados por Stebniki (2014) en estuarios a lo largo de la costa del Río de la Plata, donde tallas menores de *O. argentinensis* presentaron una alimentación asociada más planctónica que las tallas mayores. Asimismo, la dieta de *M. liza* también mostró variaciones en la ontogenia con un mayor consumo de *Heleobia* aff. *australis* en adultos, mientras que juveniles estuvieron más asociados al material orgánico del sedimento. Esta especie *M. liza* se ha definido como iliófaga, detritívora y capaz de ingerir mayormente diatomeas (Olivera y Soares 1996; Claudino, et al., 2013), y, en consecuencia, caracterizada con una posición



**Figura 4.** Resultados de los modelos mixtos isotópicos (SIAR) en la Laguna Garzón, mostrando las estimaciones de las contribuciones de cada fuente de alimento en la dieta de peces *Micropogonias furnieri* (a), adultos y juveniles *Mugil liza* (b, c, respectivamente), adultos y juveniles *Odontesthes argentinensis* (d, e, respectivamente). Las abreviaciones de las fuentes de alimento se muestran en la Figura 2. En cada gráfico las cajas (desde más oscura a más clara) representan los intervalos de credibilidad al 50, 75 y 95% de la media estimada. Los factores de fraccionamiento aplicados fueron:  $\delta^{13}\text{C} = 1,3 \pm 0,13\text{‰}$  y  $\delta^{15}\text{N} = 2,9 \pm 0,3\text{‰}$  (McCutchan, et al., 2003).

trófica de consumidor primario, tal como se ha encontrado en organismos juveniles de *M. liza* en este trabajo. Pequeños organismos asociados al sedimento como microcrustáceos, anfipodos, bivalvos y gasterópodos también han sido reportados en la dieta de *M. liza*, en línea con los resultados isotópicos obtenidos en este trabajo (Thompson, et al., 2015).

Las fuentes de materia orgánica colectadas en la Laguna Garzón incluyeron el MOP en suspensión (el cual integra al material vivo del fitoplancton y al detritus), MOS y plantas

vasculares. Dado que los valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  fueron similares entre las especies de peces y las fuentes basales, los resultados de este trabajo indican que existe una transferencia de energía desde las fuentes basales de materia orgánica de la laguna hacia los consumidores, entre ellos, las diversas especies de peces. Estos resultados sugieren que los peces capturados permanecen un tiempo de residencia en el área de estudio, suficiente para que las fuentes de alimento sean transferidas hacia los consumidores. Sin embargo, en la

lacha *B. aurea* y el sabalito *C. voga* se observaron valores isotópicos distintos y separados en la vía de transferencia desde MOP y MOS de la laguna. Esto podría deberse a que la principal fuente de materia orgánica en estos organismos no fue colectada en este estudio y amerita más esfuerzos de muestreo que incluyan el perifiton, o bien estas especies poseen tiempos de residencia menores en Garzón en comparación con el resto de las especies. En el caso de *C. voga* se ha identificado en arroyos templados un alto porcentaje de material vegetal en su dieta (González-Bergonzoni, 2011). Además, el fuerte vínculo entre consumidores y las fuentes del MOP originado en la columna de agua de la laguna sugiere una contribución trófica de producción autóctona hacia los niveles tróficos superiores, en concordancia con otros estudios en lagunas costeras (García, et al., 2007; Franca, et al., 2011; Prado, et al., 2014).

Las estimaciones de las PT de peces a partir de los datos isotópicos mostraron un máximo de 3,8, representando el segundo nivel trófico ocupado por la anchoa (*Lycengraulis grossidens*), seguido de la corvina blanca (*Micropogonias furnieri*), el testolín azul (*Prionotus punctatus*) y el dientudo (*Oligosarcus jenynsii*), lo cual está dentro del rango que describe Milessi et al. (2010) para los peces que habitan en la Laguna de Rocha. Además, estos resultados son corroborados por estudios previos de dieta, como en adultos de anchoa *L. grossidens* reconocidos piscívoros que habitan ambientes marinos, estuarinos y de agua dulce (Mai y Veira, 2013) y en adultos de *P. punctatus* alimentándose generalmente de organismos bentónicos como cangrejos y camarones (Soares et al., 1998). Se identificaron como consumidores primarios con posiciones tróficas entre dos a tres especies como *M. liza*, *B. aurea* y juveniles de pejerrey *O. argentinensis*, lo cual concuerda con otros trabajos que identifican material orgánico particulado y zooplancton como principales componentes en sus dietas (Stebniki, 2014). Los modelos SIAR mostraron que en la corvina blanca organismos bentónicos como los cangrejos *Cyrtograpsus angulatus* fueron los dominantes en su dieta. Estos resultados están en línea con los del trabajo de Olsson et al. (2013), quienes realizaron evaluaciones en contenido estomacal de corvinas de la laguna de Rocha (Uruguay). En el caso de la lisa *M. liza*, el material orgánico del sedimento presentó una alta contribución en la dieta, como se ha mostrado en otros trabajos de dieta en lagunas costeras (Rodríguez-Graña, et al., 2008; Claudino, et al., 2013). Por otra parte, se observó que los juveniles de pejerrey mostraron un mayor consumo sobre zooplancton, mientras que los adultos consumieron mayoritariamente poliquetos. Este cambio en el hábito trófico en pejerrey ha sido observado en otros ambientes estuarinos y podría deberse a cambios morfológicos en la posición de la boca (Bemvenuti, 2006; Stebniki, 2014).

Los bajos valores de conductividad registrados en este trabajo son característicos de sistemas salobres y similares a los encontrados en Laguna Garzón y de Rocha durante los meses de mayores precipitaciones (Conde, et al., 2000; Giménez, et al., 2014; Rodríguez-Gallego, et al., 2017). Durante el muestreo aquí reportado la Laguna Garzón presentaba cerrada la conexión con el océano desde diciembre de 2016 (Verónica Pombo, comunicación personal) impidiendo la intrusión marina y aumentando los tiempos de residencia del agua en la laguna. En este contexto, en la Laguna Garzón la apertura de la barra arenosa en los meses de invierno, frecuentemente en julio, podría cambiar la composición y estructura del ensamblaje de peces por mezcla y reemplazo de aguas (ej. Saad, et al., 2002), que deberían investigarse en futuros estudios.

Este trabajo mostró la diversidad de hábitos alimenticios en nueve especies de peces capturados en la Laguna Garzón, los cuales incluyen: 1) vías planctónicas, alimentadas de material orgánico particulado, como en el caso de pejerrey *O. argentinensis*, y 2) vías bentónicas, alimentadas de cangrejos y poliquetos, como la corvina blanca. En momentos en que la conexión de la laguna con el océano adyacente está cerrada, el tiempo de residencia de estos organismos parecería ser suficiente para asimilar la fuente de alimento basal del sistema. Este hecho acentúa el rol ecosistémico de la Laguna Garzón como ambiente de alimentación para las especies analizadas.

## Reconocimientos

Los autores agradecen a Soledad Ghione, Verónica Pombo, Héctor Caymaris y Daniel Sosa del SNAP por el apoyo logístico en los muestreos. También agradecemos a Wilson Sebastián Serra (Centro Universitario Regional del Este, sede Rocha) por la ayuda en el reconocimiento taxonómico de las especies de peces. A los pescadores locales “Beto” y “Ñeca”, quienes nos permitieron utilizar sus herramientas de trabajo (bote y redes) para la colecta de peces y hacer de su casa una estación de trabajo. A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), que brindó apoyo financiero por medio de los fondos PAIE y proyecto CSIC I+D 2016 N°13, al PEDE-CIBA-Geociencias y al SNI-ANII.

## Referencias

- Bemvenuti, M., 2006. Silversides in South Brazil: morphological and ecological aspects. En: *Biocell*, 30, pp.111-118.
- Careddu, G., Costantini, M., Calizza, E., Carlino, P., Bentivoglio, F., Orlandi, L. y Rossi, L., 2015. Effects of terrestrial input on macrobenthic food webs of coastal sea are detected by stable isotope analysis in Gaeta Gulf. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 154, pp.158-168.
- Caut, S., Angulo, E. y Courchamp, F., 2009. Variation in discrimination factors ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. En: *Journal of Applied Ecology*, 46, pp.443-453.
- Claudino, M., Abreu, P. y García, A., 2013. Stable isotopes reveal temporal and between-habitat changes in trophic pathways in a southwestern Atlantic estuary. En: *Marine Ecology Progress Series*, 489, pp.29-42.
- Conde, D., Aubriot, L., y Sommaruga, R., 2000. Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the Southern Atlantic Ocean. En: *Marine Ecology Progress Series*, 207, pp.19-31.
- Conde, D., Vitancurt, J., Rodríguez-Gallego, L., de Álava, D., Verrastro, N., Chreties, C. y Seijo, L., 2015. Solutions for sustainable coastal lagoon management: from conflict to the implementation of a consensual decision tree for artificial opening. En: Baztan Omer, Juan, Chouinard, Bethany, Jorgensen, Paul, Tett, Jean-Paul y Vanderlinden, Liette Vasseur. *Coastal zones: solutions for the 21st Century*. Cap.13. Nueva York: Elsevier.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R., Paruelo, J., Raskin, R., Sutton, P. y van den Belt, M., 1997. The value



- of the world's ecosystem services and natural capital. En: *Nature*, 387, pp.253–260.
- del Río, M., Wolf, N., Carleton, S. y Gannes, L., 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. En: *Biological Reviews*, 84, pp.91-111.
- Dyer, B., 2006. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). En: *Biocell*, 30, pp. 69-88.
- Fabiano, G. y Santana, O., 2006. Las pesquerías en las lagunas salobres de Uruguay. En: Menafrá, R., et al., eds. *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre Uruguay. pp. 557–565.
- Figueiredo, J. y Menezes, N., 2000. *Manual de peixes marinhos do sudeste de Brasil VI*. San Pablo: Universidad de San Pablo
- Franca, S., Vasconcelos, S., Tanner, C., Maguas, M., Costa y Cabral, H., 2011. Assessing food web dynamics and relative importance of organic matter sources for fish species in two Portuguese estuaries: A stable isotope approach. En: *Marine Environmental Research*, 72, pp.204–215.
- Fry, B., 2007. *Stable isotope ecology*. New York: Springer Science.
- García, A., Hoeinghaus, D., Vieira, J. y Winemiller, K., 2007. Isotopic variation of fishes in freshwater and estuarine zones of a large subtropical coastal lagoon. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73, pp.399-408.
- Giménez, L., Venturini, N., Kandratavicius, N., Hutton, M., Lanfranconi, A., Rodríguez, M., Brugnoli, E., y Muniz, P., 2014. Macrofaunal patterns and animal- sediment relationships in Uruguayan estuaries and coastal lagoons (Atlantic coast of South America). En: *Journal of Sea Research*, 87, pp.46-55.
- González-Bergonzoni, I., 2011. *Dieta de peces de agua dulce: efectos de factores climáticos y complejidad del hábitat*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesis de Maestría), pp. 61
- Jespersen, A., Christoffersen, K., 1987. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. En: *Archive of Hydrobiologia*, 109, pp.445–454.
- Kanaya, G., Takagi, S., Nobat, E. y Kikuchi, E., 2007. Spatial dietary shift of macro- zoobenthos in a brackish lagoon revealed by carbon and nitrogen stable isotope ratios. En: *Marine Ecology Progress Series*, 345, pp.117-127.
- Knoppers, B., 1994. *Aquatic primary production in coastal lagoons*. En: Kjerfve, B., ed. *Coastal lagoon processes*. Amsterdam: Elsevier.
- Mai, A. y Veira, J., 2013. Review and consideration on habitat use, distribution and life history of *Lycengraulis grossidens* (Agassiz, 1829) (Actinopterygii, Clupeiformes, Engraulidae). En: *Biota Neotrop.*, 13, pp.121-130.
- McCutchan, J., Lewis, W., Kendall, C. y McGrath, C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. En: *Oikos*, 102, pp.378- 390.
- Milessi, A., Calliari, D., Rodríguez, L., Conde D., Sellanes, J. y Rodríguez-Gallego, L., 2010. Trophic mass-balance model of a subtropical coastal lagoon, including a comparison with a stable isotope analysis of the food-web. En: *Ecological Modelling*, 221, pp.2859-2869.
- Norbis, W. y Galli, O., 2004. Feeding habits of the flounder *Paralichthysorbignyanus* (Valenciennes 1839) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. En: *Ciencias Marinas*, 30, pp.619–625.
- Oliveira, I. y Soares, L., 1996. Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. En: *Bol. Inst. Pesca*, 23, pp.95-104.
- Olsson, D., Forni, F., Saona, G., Verocai, J. y Norbis, W., 2013. Temporal feeding habits of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in a shallow coastal lagoon (southwestern Atlantic Ocean, Uruguay). En: *Ciencias Marinas*, 39, pp.265-276.
- Park, H., Choy, E., Lee, K. y Kang, C., 2013. Trophic transfer between coastal habitats in a seagrass-dominated macrotidal embayment system as determined by stable isotope and fatty acid signatures. En: *Marine and Freshwater Research*, 64, pp.1169-1183.
- Parnell, A., Inger, R., Bearhop, S. y Jackson, A., 2010. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. En: *PLOS One*, 5, pp.e9672.
- Pernet, F., Malet, N., Pastoureaud, A., Vaquer, A., Quéré, C. y Dubroca, Laurent, 2012. Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. En: *Journal of Sea Research*, 68, pp.20-32.
- Phillips, D., Inger, R., Bearhop, S., Jackson, A., Moore, J., Parnell, A., Semmens, B. y Ward, E., 2014. Best practices for use of stable isotope mixing models in food-web studies. En: *Canadian Journal of Zoology*, 92, pp.823-835.
- Pinnegar, J., y Polunin, N., 1999. Differential fractionation of  $\delta^{13}C$  and  $\delta^{15}N$  among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. En: *Functional Ecology*, 13, pp.225-231.
- Polis, G. y Winemiller, K., 1996. *Food webs: integration of patterns and dynamics*. New York: Chapman and Hall.
- Post, D., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. En: *Ecology* 83, pp.703-718.
- Prado, P., Vergara, C., Caiola, N. e Ibáñez, C., 2014. Influence of salinity regime on the food-web structure and feeding ecology of fish species from Mediterranean coastal lagoons. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 139, pp.1-10.
- Rodríguez-Gallego, L., Achkar, M., Defeo, O., Vidal, L., Meerhoff, E. y Conde, D., 2017. Effects of land use changes on eutrophication indicators in five coastal lagoons of the Southwestern Atlantic Ocean. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 188, pp.116-126.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, C., Conde, D., Sellanes, J. y Urrutia, R., 2008. Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. En: *Marine Ecology Progress Series*, 362, pp.69-83.
- Saad, A.M., Baumord, A.C., y Caramaschi, E.P., 2002. Effects of artificial canal openings on fish community structure of Imboassica Coastal Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. En: *Journal of Coastal Research*, 36, pp. 634-639.
- Santana, O. y Fabiano G., 1999. *Medidas y mecanismos de administración de los recursos pesqueros de las lagunas costeras del litoral atlántico del Uruguay (Lagunas de José Ignacio, Garzón, de Rocha y de Castillos)*. Plan de Investigación Pesquera INAPE-PNUD URU/92/003. Apéndice 1. Montevideo: INAPE, PNUD.
- Serrano, O., Serrano, L., Mateo, M., Colombini, I., Chelazzi, L., Gagnarli, E. y Fallaci, M., 2008. Acid washing effect on elemental and isotopic composition of whole beach arthropods: implications for food web studies using stable isotopes. En: *Acta Oecologica*, 34, pp. 89-96.



- Soares, L.S.H., Jarre-Teichmann, A. y Rosi-Wongtschowski, C.L., 1998. Field estimates of food consumption of the searobin *Prionotus punctatus* (Bloch, 1797) on the continental shelf off Ubatuba, southeastern Brazil. En: *Revista Brasileira de Oceanografía*, 46, pp.45-60.
- Stebniki, 2014. *Hábitos tróficos de cuatro especies de peces en los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande (Dpto. Canelones, Uruguay)*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesis de Grado), 39 pp.
- Thompson G, Callico Fortunato, R., Chiesa, I. y Volpedo, A., 2015. Trophic ecology of Mugil liza at the southern limit of its distribution (Buenos Aires, Argentina). En: *Brazilian Journal of Oceanography*, 63, pp.271-278.
- Vander Zanden, M., Cabana, G. y Rasmussen, J., 1997. Comparing trophic position of freshwater littoral fish species using stable nitrogen isotopes ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and literature dietary data. En: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, pp.1142-1158.
- Vizzini, S. y Mazzola, A., 2003. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon. En: *Marine Biology*, 142, pp.1009-1018.

# Understanding consumers' underlying motives for purchasing cheese with health benefits

## Respuesta de los consumidores uruguayos a quesos con beneficios nutricionales

Arcia, Patricia (1,2); Curutchet, Ana (2); Costell, Elvira (3); Tárrega, Amparo (3)

(1) Latitud – LATU Foundation, Montevideo, Uruguay.

(2) Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería y Tecnologías, UCU, Montevideo, Uruguay.

(3) Physical and Sensory Properties Laboratory. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain.

Corresponding author: [parcia@latitud.org.uy](mailto:parcia@latitud.org.uy)

RECIBIDO: 12/6/2018 – APROBADO: 26/9/2018

### Abstract

In Uruguay, dairy is the sector that has expanded most with the introduction of functional products. Cheese is a widely consumed dairy product and it is also an interesting alternative to develop healthy products. For this it is important to identify which health benefits of cheese interest consumers most. This work aimed to study and explain the response of Uruguayan consumers to cheeses with different nutritional characteristics. Laddering technique was applied to understand consumers' underlying motives for purchasing, or not purchasing, cheese with different health claims. According to results, consumers expected that by the consumption of specific functional cheeses they will look more attractive and achieve a better quality of life. The main reasons given by the other consumers for not buying cheese with health benefits were expected lack of pleasure and distrust in the claimed health benefit.

**Keywords:** cheese, health benefits, laddering, motives to purchase.

### Resumen

En Uruguay, el sector lácteo es el que más se ha expandido con la introducción de productos funcionales. El queso es un producto lácteo ampliamente consumido y también es una alternativa interesante para desarrollar productos saludables. Para esto, es importante identificar qué beneficios para la salud son los que más le interesan a los consumidores. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar y explicar la respuesta de los consumidores uruguayos a quesos con diferentes características nutricionales. Se aplicó la técnica de escalamiento ("laddering") para comprender los motivos subyacentes de los consumidores para comprar o no comprar queso con diferentes declaraciones de propiedades saludables. De acuerdo a los resultados, los consumidores esperan mediante el consumo de quesos con determinada funcionalidad verse más atractivos y alcanzar una mejor calidad de vida. Las principales razones dadas por los consumidores para no comprar queso con beneficios para la salud son la falta de placer al consumirlos y la desconfianza en el supuesto beneficio para la salud.

**Palabras clave:** quesos, beneficios para la salud, escalamiento, motivos para comprar.

## Introduction

Recent years have witnessed an increase in the number of products incorporating new ingredients such as fiber, prebiotics, probiotics, vitamins, minerals and antioxidants, or those with reduced content of certain components like fat, sodium or sugar (Ye, et al., 2018). However, not all consumers consider the possible health benefit of a food to be an added value, thus it is not always a guarantee of a product's market success. The acceptance of a food depends on the interaction between the food and the consumer (Shepherd, 1989). Therefore, the combination of sensory and non-sensory factors may generate more complete and realistic information about consumer behavior in purchasing situations (Asioli, et al., 2017). On one hand, consumer response to a product can vary greatly

depending on consumer characteristics (Bruhn, et al., 1992; Wilcock, et al., 2004; Guerrero, et al., 2000; Caporale y Monteleone, 2001; van Kleef, et al., 2002; Sijtsema, et al., 2004) and their motivations due to particular interest in health, weight concerns, sensory pleasure, ideological reasons, convenience, price or familiarity (Crossley and Khan, 2001; Lindeman and Stark, 1999). On the other hand, consumers' reaction to health benefits can also differ depending on the type of food. Functional foods are not perceived by consumers as a homogenous category and the reasons for choosing a functional product differ within different food categories (Urala and Lähteenmäki, 2004, 2007; Ares and Gámbaro, 2007). Consumers perceive products that are intrinsically healthy such as yogurt, cereals and juice, as preferable and credible carriers for functional ingredients (Annunziata and Vecchio, 2011).

Ares et al. (2008) showed that Uruguayan consumers were in general willing to consume food products with a positive impact on their health, particularly those that could reduce the risk of cardiovascular diseases or cancer, or boost their immune system. In Uruguay, as in the rest of the world, dairy is the sector that has expanded most with the introduction of functional products (Bimbo, et al., 2017; Siró, et al., 2008; Menrad, 2003). Among them, yogurt-like products (enriched with fiber, vitamins or omega-3, prebiotics or probiotic) are the most popular.

Cheese is a widely consumed dairy product and it is also an interesting alternative to develop healthy products (Awaishah, 2011; Rodrigues, et al. 2011; Guttierrez and Barreto, 2010; Fritzen-Freire, et al., 2010; Noronha, et al., 2007). According to OECD/FAO (2015), the global production of dairy products is constantly growing over time. In particular, within the group of processed dairy products, cheese consumption is expected to continue to account for the greatest share at an annual average rate of 1,6%.

For the above-mentioned reasons, it is important to identify which health benefits of cheese interest consumers most. To date there is no information about Uruguayan consumers' opinion on cheeses with specific nutritional characteristics.

Laddering technique can be used to understand how product information is processed by consumers. Laddering is based on an in-depth one-to-one interviewing technique, following Means-End Theory (Gutman, 1982). Laddering seeks to determine sets of links between the key perceptual elements across the range of attributes, consequences and values. Its main objective is to go from the lowest (surface/concrete) to the highest level of consumer values (deep/abstract) (Gandia, et al., 2017). These association networks, or ladders, represent combinations of elements that serve as the basis for distinguishing between and among products in a given product class (Sørensen and Askegaard, 2007).

Gandia et al. (2017) used laddering technique to analyze consumer behavior of beverages obtained from capsules, allowing differentiating the attributes of each brand, as well as defining common/cumulative elements. On the other hand, Arsil et al. (2018) used data from laddering technique to segment the market based on consumers' motivation. They investigate the motives of urban consumers when purchasing local food products using means-end chain (MEC) analysis.

The aim of this work was to understand the differences in opinion towards the health benefits that Uruguayan consumers give to different health benefits on semi-soft cheese.

## Materials and Methods

The study was carried out for a well known type of cheese in Uruguay, a semi-soft cheese: Dambo cheese. The health benefits considered were: low-fat, salt-reduced, fiber-enriched and probiotic. These benefits were considered as relevant according the results obtained in a conjoint study carried out before (data not shown). A regular product was considered as reference.

### Soft laddering

In order to elicit the A-C-V sequential links (Phillips and Reynolds, 2009; Reynolds and Gutman, 1988), one-on-one and in-depth interviewing technique was chosen. This type of laddering technique is called "soft laddering".

Five different versions of Dambo cheese labels were created varying the health benefit indicated on it: low-fat, salt-reduced, fiber-enriched, probiotic and a regular one. Figure 1 shows as example one of the five labels created. A group of 41 consumers (68% were women and 32% were men; 54% from 18 to 40 years old and 46% from 40 to 66 years old), workers of LATU, and frequently consumers of cheeses participated in this evaluation. Each consumer was interviewed by an interviewer who was previously familiarized with the methodology in an individual session of 30-45 minutes. First, the five labels were simultaneously presented in random order and the interviewer asked the participant: "If you were at the supermarket buying cheese, which of these cheeses would you choose according to their label? And from the remaining samples, which one would you choose? And then?" Thus the interviewer continued asking until the rank order of choice was completed for all five labels. After that, and in accordance with the rank order chosen, each label was presented individually to the consumer, who was asked if he/she would buy, or not, the corresponding cheese and the reasons for buying or for not buying the product established using a series of "why" questions (Sørensen and Askegaard, 2007).

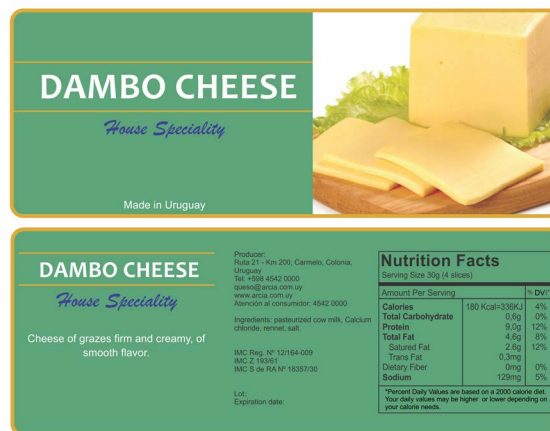


Figure 1. Example of labels created for this study: a salt-reduced cheese.

## Data analysis

To analyze the order of choice of the Dambo cheese labels, the Friedman Analysis of Variance was applied and significance of differences between samples determined by the Fisher test ( $\alpha=0,05$ ), as modified for non-parametric data (Meilgaard, et al., 1999). Data from the laddering task were analyzed as proposed by Reynolds and Gutman (1988). Attributes, consequences and values having the same meaning were grouped together and coded. The grouping processes were performed by three researchers, who defined by consensus between them the codes and dimensions and the name or label assigned to each of them. The researchers involved in this task had previous experience in semantic analyses applied to different qualitative techniques.

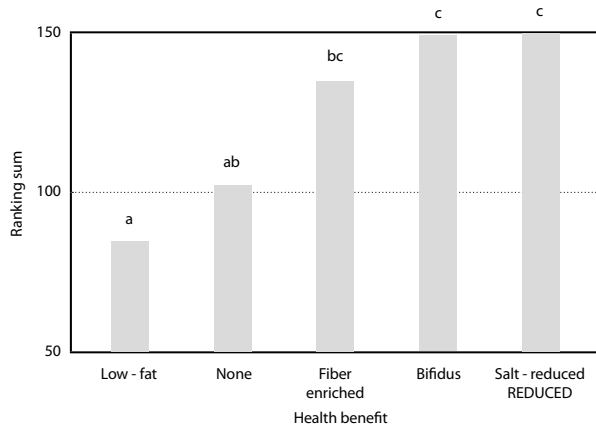
With this information, diagrams showing relationships among attributes, consequences and values (Hierarchical value maps: HVM) were constructed.

Data analyses were performed using the software XLSTAT 2011.1.02 Version (Addinsoft, France).

## Results and Discussion

### Understanding how health benefits affect willingness to purchase cheese

Laddering technique was used to provide information about consumers' motivations for purchasing or rejecting cheeses with different health benefits. According to the ranking results, the order of choice of labels significantly varied among cheeses with different health benefits ( $p < 0,0001$ ). The first position of choice was taken by the label indicating low-fat, followed by the regular cheese, and the fiber-enriched label, and in the last position were the labels of bifidus-containing and salt-reduced cheeses (Figure 2).



**Figure 2.** Order of consumers choice (from first to last) of cheese labels with different health benefits (rank sum values).

In the case of the low-fat cheese, its preference instead of the regular one is in accordance with Bimbo et al. (2017), who suggest that individuals prefer dairy food products with health and nutrition claims rather than identical ones without a claim, suggesting that the presence of a claim increases the healthiness perception of products and therefore their acceptance (Ares, et al., 2009; Bech-Larsen y Grunert, 2003).

Participants' responses indicating the reasons for buying, or not buying, each type of cheese were analyzed and summarized, keeping the MEC theory abstraction levels (Reynolds

and Gutman, 1988). Overall, four attributes (corresponding to the four health benefits), 14 consequence codes and five value codes were elicited from all the responses, considering both the reason for buying and for not buying the samples. A total of 20 ladders were obtained. Then dominant connections were graphically represented in a tree diagram, termed a Hierarchical Value Map (HVM). So, HVM with the reasons for buying cheeses is shown in Figure 3. In general, behind the choice of cheeses with a health benefit consumers wanted to look more attractive and achieve a better quality of life.

Many participants would purchase low-fat cheeses but gave different reasons. Most of them did not want to gain weight. For these people it was important to look attractive, and they associated this condition with weight control. There were also people that would buy low-fat cheese looking for a better quality of life, either because they had high levels of cholesterol and they wanted to control the fat intake, or just because they wanted to prevent certain diseases.

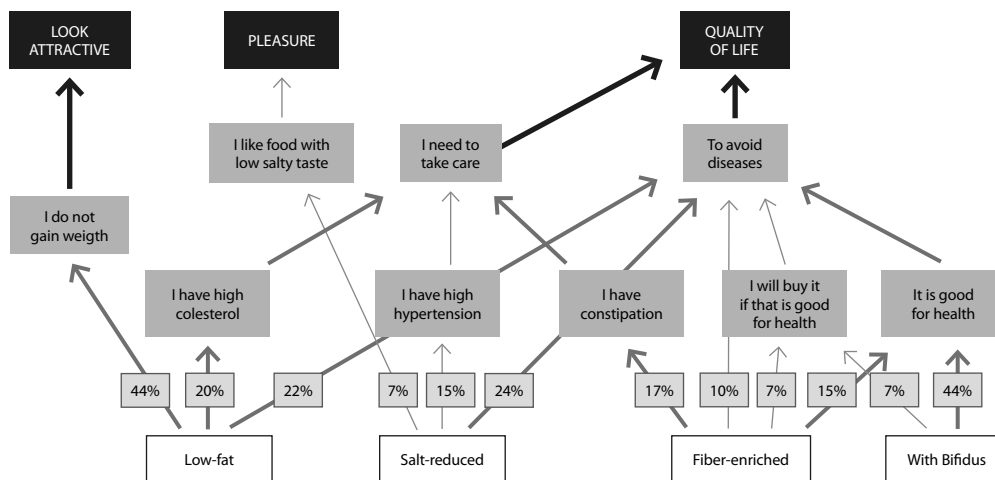
Similarly, some participants indicated that they would buy the salt-reduced cheese to reduce salt intake, either because they had hypertension or just because they considered that was good to prevent diseases.

The reasons indicated by participants interested in fiber-enriched cheese were the prevention of diseases or to improve constipation. Participants interested in bifidus and some people interested in fiber indicated that they would buy these cheeses because they were good for health, even if they did not really know their mechanisms of action.

According to these results, consumers would buy and consume a specific product because they believe that they can achieve a desired value through the attributes of the product and their consequences.

On the other hand, the final reason participants gave for not buying cheeses with health benefits were the expected lack of pleasure and distrust of the claimed health benefit (Figure 4). Pleasure was the basic value that people look for through consumption of regular cheese and it was also the most frequently mentioned reason for rejecting cheeses with changes in composition.

For salt-reduced, low-fat and fiber-enriched cheeses some participants expected them to taste bad and were not willing to compromise pleasure to obtain a health benefit they considered they did not need. According to Bimbo et al. (2017),



**Figure 3.** Laddering plot of consumer motivations for buying cheese with health benefits.

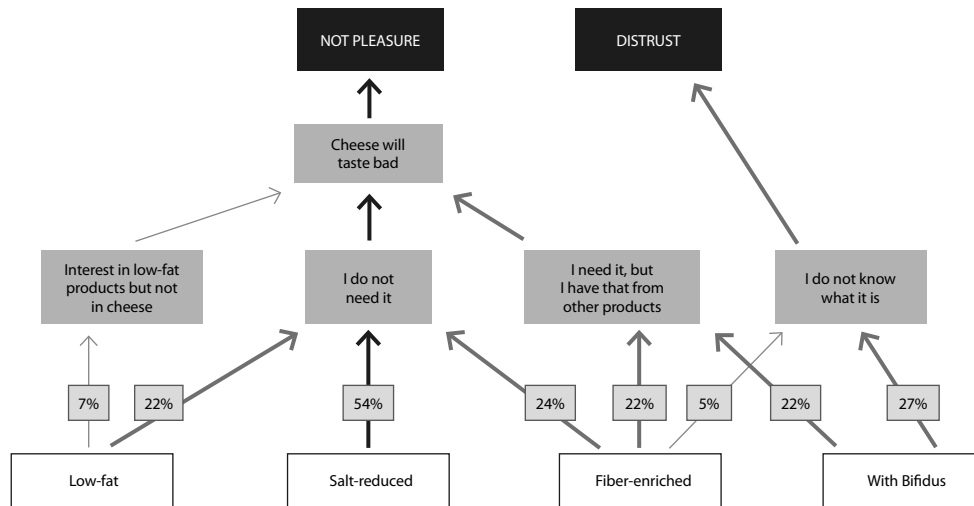


Figure 4. Laddering plot of consumer motivations for not buying cheeses with health benefits.

the presence of nutrition claim may generate negative effects on consumers' perceived pleasantness.

Some of the participants were interested in fiber, bifidus and low-fat, but preferred to obtain them from other kinds of product and not from cheese. Finally, bifidus and fiber were the health benefits that caused people to distrust the product. The lack of knowledge about the effects of fiber and bifidus on health led these people to doubt their possible benefits.

In summary, the main reasons why Uruguayan participants would buy cheese with health benefits were to achieve a better quality of life and to look more attractive. But they were also concerned about both the pleasure and the real effect on health that the product could provide.

Accordingly, Ares et al. (2010) found that the main reasons why Uruguayan consumers choose yogurt were, among different benefits, healthiness and pleasure. The same basic motivations for buying health products were observed for consumers from other countries, like the United States, Denmark and Norway (Johansen, et al., 2011) and Italy (Annunziata and Vecchio, 2011). Urala and Lähtenmäcki (2004) found that Finnish consumers stated the same motivations for choosing among functional food alternatives but also gave other reasons, like convenience, price and familiarity.

According to Valls et al. (2013), consumers demand for health-enhancing foods has spurred in part because of socio-economic changes, such as the longer life expectancy, the rise of health care costs, the social costs of non-transmittable diseases, and the widespread desire for a better quality of life. In this context, the projections of overall cheese market outline a steady growth ascribable to different factors such as the change in consumers' lifestyle, the innovation in cheese types and their versatility and the broadening of applications of cheese in our diet and as an ingredient in food processing (Masotti, et al., 2018).

One limitation of this work is that gender and age are not variables studied. Bimbo et al. (2017) confirm that gender and age play an important role in explaining different patterns of acceptance in relation to identified combinations of carriers and ingredients. Willingness to use/purchase functional and nutrition-modified dairy products increases with age, as older consumers perceive higher rewards from consuming such food versions, and show more interest in health. The second limitation is that brand was not studied. A review made by

Bimbo et al. (2017) found that brand affects consumer's food choices when it is associated with nutrition and health claim.

## Conclusion

The use of laddering technique employed in this study allowed to explore consumer motivation with respect to functional cheeses.

Behind the choice of cheeses with a health benefit, consumers wanted to look more attractive and achieve a better quality of life. Meanwhile, expected lack of pleasure and distrust were the basic reasons people gave for rejecting a cheese with health benefits.

## Acknowledgments

The financial support of MICINN, Spain (Tárrega's contract within the Juan de la Cierva Programme) and financial support of Latitud Foundation, Uruguay, for Arcia's stay at IATA, are all gratefully acknowledged.

## References

- Annunziata, A. y Vecchio, R., 2011. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. En: *Journal of Functional Food*, 3, pp.223-228.
- Ares, G. y Gámbaro, A., 2007. Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. En: *Appetite*, 49, pp.148-158.
- Ares, G., Giménez, A. y Deliza, R., 2010. Influence of three non-sensory factors on consumer choice of functional yogurts over regular ones. En: *Food Quality and Preference*, 21, pp.361-367.
- Ares, G., Giménez, A. y Gámbaro, A., 2008. Influence of nutritional knowledge on perceived healthiness and willingness to try functional foods. En: *Appetite*, 51, pp.663-668.
- Ares, G., Gimenez, A., y Gámbaro, A., 2009. Consumer perceived healthiness and willingness to try functional

- milk desserts. Influence of ingredient, ingredient name and health claim. En: *Food Quality and Preference*, 20, pp.50-56.
- Arsil, P., Li, E., Bruwer, J. y Lyons, G., 2018. Motivation-based segmentation of local food in urban cities: A decision segmentation analysis approach. En: *British Food Journal*, <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2018-0060>.
- Asioli, D., Varela, P., Hersleth, M., Almli, V.L., N.V. Olsen y T. Næs, T. 2017. A discussion of recent methodologies for combining sensory and extrinsic product properties in consumer studies. En: *Food Quality and Preference*, 56, pp.266-273.
- Awaisheh, S. S., 2011. Development of probiotic soft cheese manufactured using goat's milk with the addition of thyme. En: *Milchwissenschaft*, 66, pp.51-54.
- Bech-Larsen, T. y Grunert, K. G. 2003. The perceived healthiness of functional foods. A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods En: *Appetite*, 40 (1), pp.9-14.
- Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., De Devitiis, B y Carlucci, D. 2017. Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. En: *Appetite*, 113, pp.141-154.
- Bruhn, C.M., Cotter, A., Diaz-Knauf, K., Sutherland, J., West, E., Wightman, N., Williamson, E. y Yaffee, M., 1992. Consumer attitudes and market potential for foods using fat substitutes. En: *Journal Dairy Science*, 75, pp.2569-2577.
- Caporale, G. y Monteleone, E., 2001. Effect of expectations induced by information on origin and its guarantee on the acceptability of a traditional food: olive oil. En: *Sciences des Aliments*, 21, pp.243-254.
- Crossley, M. y Khan, S., 2001. Motives underlying food choice: dentist, porters and dietary health promotion. En: *British Dental Journal*, 191, pp.198-202.
- Fritzen-Freire, C. B., Müller, C. M. O., Laurindo, J. B. y Prudêncio, E. S., 2010. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. En: *Journal of Food Engineering*, 96, pp.621-627.
- Gandia, R. M., Sugano, J. Y., de Barros Vilas Boas, L. H. y Mesquita, D. L., 2018. Beverage capsule consumption: a laddering study. En: *British Food Journal*, 120(6), pp.1250-1263.
- Guerrero, L., Colomer, Y., Guàrdia, M.D., Xicola, J. y Clotet, R., 2000. Consumer attitude towards store brands. En: *Food Quality and Preference*, 11, pp.387-395.
- Gutman, J. 1982. A means-end chain model based on consumer categorization processes. En: *Journal of Marketing*, 46, pp.60-72.
- Gutierrez, R. y Barreto, A. L. 2010. Characterization of Requeijao cheese potentially prebiotic by the addition of inulin and soy protein. En: *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 28, pp.289-302.
- Johansen, S. B., Næs, T. y Hersleth, M., 2011. Motivation for choice and healthiness perception of calorie-reduced dairy products. A cross-cultural study. En: *Appetite*, 56, pp.15-24.
- Lindeman, M. y Stark, K., 1999. Pleasure, pursuit of health, or negotiation of identity? Personality correlates of food choice motives among young and middle-aged women. *Appetite*, 33, pp.141-161.
- Masotti F., Cattaneo S., Stuknyté, M. y De Noni, I. 2018. Status and developments in analogue cheese formulations and functionalities. En: *Trends in Food Science & Technology*, 74, pp. 158-169.
- Meilgaard, M., Civille, G. y Carr, B. 1999. *Sensory Evaluation y Techniques*. Florida: CRC Press, pp. 25-30.
- Menrad, K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181-188.
- Noronha, N., O'Riordan, E. D. y O'Sullivan, M., 2007. Replacement of fat with functional fibre in imitation cheese. En: *International Dairy Journal*, 17, pp.1073-1082.
- OECD-FAO, 2015. *Agricultural Outlook 2015-2024*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: OECD Publishing, pp. 21-59
- Reynolds, T. J. y Gutman, J., 1988. Laddering theory, method, analysis, and interpretation. En: *Journal of Advertising Research*, 28, pp.11-31.
- Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Pereira, C. I. Gomes, A. M., Malcata, F. X. y Freitas, A. C., 2011. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. En: *LWT - Food Science and Technology*, 44, pp.100-108.
- Shepherd, R., 1989. Factors influencing food preferences and choice. In: *Handbook of the Psychobiology of Human Eating* (Ed. R. Shepherd), pp.3-14. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Sijtsema, S. J., Backus, G. B. C., Linnemann, A. R. y Jongen, W. M. F., 2004. Consumer orientation of product developers and their product perception compared to that of consumers. En: *Trends in Food Science & Technology*, 15, pp.489-497.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing, and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51, pp.456-467.
- Sørensen, E. B. y Askegaard, S., 2007. Laddering: how (not) to do things with words. En: *Qualitative Marketing Research: An International Journal*, 10, pp.63-77.
- Urala, N. y Lähteenmäki, L., 2004. Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. En: *Food Quality and Preference*, 15, pp.793-803.
- Urala, N. y Lähteenmäki, L., 2007. Consumers' changing attitudes towards functional foods. En: *Food Quality and Preference*, 18, pp.1-12.
- Valls, J., Pasamontes, N., Pantaleón, A., Vinaixa, S., Vaqué, M. Soler, A. et al. 2013. *Prospects of functional foods/ nutraceuticals and markets*. En: *Natural Products*. Berlín: Springer-Verlag.
- van Kleef, E., van Trijp, H. C. M., Luning, P. y Jongen, W. M. E., 2002. Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'? En: *Trends in Food Science & Technology*, 13, pp.93-101.
- Wilcock, A., Pun, M., Khanona, J. y Aung, M., 2004. Consumer attitudes, knowledge and behaviour: a review of food safety issues. En: *Trends Food Science & Technology*, 15, pp.56-66.
- Ye, Q.; Georges, N. y Selomulya, C., 2018. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. En: *Trends in Food Science & Technology*, 78, pp.167-179.

# Bagazo de cervecería como ingrediente en el desarrollo de panificados. Impacto del rotulado en la intención de compra y aceptabilidad

## Brewer's spent grain as an ingredient in the development of bakeries. Impact of labeling on purchase intention and acceptability

Arcia, Patricia (1, 2) Curutchet, Ana (2); Cozzano, Sonia (2); Rodríguez, Santiago (2)

(1) Latitud - Fundación LATU, Montevideo, Uruguay

(2) Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería y Tecnologías, UCU, Montevideo, Uruguay

Contacto: [parcia@latitud.org.uy](mailto:parcia@latitud.org.uy)

RECIBIDO: 19/4/2018 – APROBADO: 18/9/2018

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue revalorizar el residuo generado por la industria cervecera como un nuevo ingrediente rico en fibra y proteínas para el desarrollo de panes. Se evaluó el efecto de la información nutricional a presentar en forma de etiquetado frontal de octógonos en la aceptabilidad e intención de compra de los productos desarrollados, contemplando el *claim* “fuente de fibra” y la advertencia por “EXCESO DE SODIO”. Se elaboraron panes con BSG (*Brewer's Spent Grain*), cumpliendo el *claim* “fuente de fibra”, panes enriquecidos con fibra y panes de referencia sin incorporación de BSG. Las pruebas de aceptabilidad sensorial realizadas demuestran que el pan “fuente de fibra” presenta un valor significativamente inferior al pan de referencia y al pan enriquecido con fibra, que no presentan diferencias significativas entre sí. Tras las pruebas de aceptabilidad e intención de compra con información nutricional, se observó que la presencia de la advertencia “EXCESO DE SODIO” representada en el envase disminuye la intención de compra de los consumidores por panes con ese mensaje, mientras que la presencia del *claim* “fuente de fibra” lo aumentaría. Es una oportunidad para la industria, que debería focalizar esfuerzos hacia la reformulación y/o desarrollo de productos aceptables.

**Palabras clave:** subproducto de cervecería, fibra, pan, etiquetado frontal.

### Abstract

The objective of this work was to revalue the waste generated by the brewing industry as a new ingredient rich in fibre and proteins for the development of bread. The effect of nutritional warnings used as front of pack nutritional information on the acceptability and purchase intention of the developed products were evaluated considering the claim “fibre source” and sodium warning. Breads were made with BSG (*Brewer's spent grain*), complying the claim “source of fibre”, bread enriched with fibre and bread without incorporation of BSG. Acceptability test among them showed that bread “source of fibre” presented a value significantly lower than the bread without incorporation of BSG and bread enriched with fibre, which did not present significant differences between them. In the case of acceptability and purchase intention evaluation considering nutritional information, it was observed that the presence of warning “excess salt” represented on the packaging decreases the intention of consumers to buy that kind of product, while the presence of the claim “fibre source” would increase it. It is an opportunity for the industry, who should focus efforts towards the reformulation and/or development of acceptable products.

**Keywords:** Brewer's spent grain, fibre, bread, labeling.

## Introducción

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más consumidas en todo el mundo, con una producción mundial anual estimada de 39 millones de toneladas (Lynch, et al., 2016). Esta

industria utiliza como principal materia prima en su proceso cebada malteada, la cual es sometida a un proceso de cocción y maceración del que resulta el mosto cervecero, licor que luego continúa hacia la etapa de fermentación para la elaboración de la cerveza. En este proceso se producen cantidades



importantes de residuo insoluble, conocido localmente como bagazo cervecero e internacionalmente como “Brewer’s spent grain” (BSG) (Lynch, et al., 2016). Este subproducto representa el 85% de los residuos y es en promedio el 31% del peso original de malta utilizado durante el proceso (Nigam, 2017).

Actualmente, el destino más común dado por la industria para este subproducto es su disposición para alimentación animal, a pesar de ser una buena fuente de fibra, particularmente la insoluble (Buffington, 2014). El bagazo de cervecería es un material de alto valor, que contiene hemicelulosa, lignina y alto contenido de proteína (Fillaudeau, et al., 2006), monosacáridos de xilosa, glucosa y arabinosa, minerales y aminoácidos (Mussatto, 2009).

La gestión ambiental de los residuos tiene costo para todas las empresas. Además, en muchos casos se está perdiendo el costo oportunidad de su transformación en un ingrediente funcional con valor económico y nutricional para la industria alimentaria. La valorización de estos residuos representa una estrategia competitiva que abre la puerta a nuevas posibilidades de negocios de cara a la creciente demanda de alimentos funcionales.

Esta estrategia se encuentra alineada con los nuevos conceptos que han surgido en los últimos años de economía circular, que tiene como una de sus premisas la recuperación de materiales para que puedan ingresar en nuevos procesos de producción y llegar nuevamente a consumo (World Economic Forum, 2017). A su vez, encuentra otro punto de contacto con las políticas manifestadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación de llegar a “pérdidas y desperdicios cero, hambre cero” (FAO, 2015).

Todo esto en su conjunto permite considerar que los residuos generados en el proceso de maceración de la malta son un subproducto con potencial en su valor nutricional y tecnológico. El bagazo de cervecería, o BSG, ha sido utilizado en la elaboración de productos como panes, galletas, muffins, tortas, snacks, entre otros (Lynch, et al., 2016; Mussatto, 2014), como ingrediente de productos funcionales (Kanauchi, et al., 2001; Ainsworth, et al., 2007; Ktenioudaki, et al., 2012; Fărcaș, et al., 2014). El pan presenta especial interés, ya que es un alimento muy consumido en todo el mundo y tiene el potencial para convertirse en un producto alimenticio funcional por su importante rol en la dieta humana diaria (Flander, et al., 2007). Los beneficios potenciales en la salud que la fibra dietaria genera han sido ampliamente estudiados y documentados, y se vinculan a la prevención del estreñimiento, la reducción en el riesgo de cáncer colorrectal y de enfermedades cardiovasculares, y la producción de ácidos grasos de cadena corta (Lattimer, et al., 2010; Zhu, et al., 2015).

Un aspecto que se debe contemplar si se espera que un producto llegue al mercado es el rotulado nutricional que le correspondería según la reglamentación vigente que aplique. En este aspecto, en el año 2018 se aprobó en Uruguay un Decreto sobre el etiquetado frontal (Uruguay, 2018), que prevé la inclusión de advertencias octogonales en el frente del empaque para el sodio, azúcares, grasas y grasas saturadas si los valores de estos ingredientes se encuentran por encima de los niveles establecidos en el decreto. Hasta el momento existe poca investigación sobre la percepción del etiquetado frontal y de otros tipos de etiquetado nutricional fuera de los Estados Unidos, Oceanía y Europa (Mandle, et al., 2015). Algunos estudios recientes sugieren que los consumidores tienden a elegir productos que no contienen advertencias en el etiquetado frontal frente a los que sí las incluyen (Arrúa,

et al., 2017; Ares, et al., 2018a; Ares, et al., 2018b; Machín, et al., 2018). Como aún faltan evidencias de la influencia de este aspecto en las elecciones de los consumidores sobre productos reales, se entiende necesario tenerlo en cuenta para el desarrollo de nuevos productos y/o reformulación de existentes.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar panes con incorporación de harina de bagazo de cervecería como nuevo ingrediente rico en fibra, evaluando su aceptabilidad por consumidores, y analizar el efecto de la información nutricional en el etiquetado frontal en la intención de compra y aceptabilidad de los productos desarrollados.

## Materiales y Métodos

### Obtención de la harina de bagazo (BSG)

El bagazo de cervecería fue provisto por la empresa FNC S.A. (Montevideo, Uruguay). Se secó a 50 °C en un horno de convección forzada hasta peso constante, se molió en un molino de laboratorio (Retsch ZM 200) y se tamizó con malla de 1 mm, obteniéndose así la harina de bagazo de cervecería (BSG).

La BSG se utilizó como “aporte” de fibra en la formulación de panes enriquecidos según el procedimiento que se detalla a continuación.

### Elaboración de los panes

Para la elaboración de los panes se utilizaron los siguientes ingredientes: harina de trigo, harina de bagazo de cervecería (BSG), leche en polvo descremada, azúcar, sal, levadura deshidratada, aceite y agua, según formulación establecida en Tabla 1 para el Ensayo 1 y Tabla 2 para el Ensayo 2.

Todos los ingredientes fueron dispuestos en el molde de pan de una panetera Punktal, siguiendo el programa de cocción para pan básico proporcionado por el equipo (temperatura de horneado 120 °C; tiempo de horneado 55 min; tiempo total 3 hs). Los panes fueron desmoldados en caliente y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se almacenaron en congelación (-18 °C), hasta 24 hs antes de su análisis, momento en el cual se dispusieron a temperatura ambiente.

### Ensayo 1

Se consideró como variable el contenido de fibra a dos niveles, teniendo en cuenta el cumplimiento (Fórmula I) o no (Fórmula II) del *claim* “fuente de fibra”. Se formuló además un pan de referencia, sin incorporación de fibra (Fórmula Referencia).

A la Fórmula I se le agregó harina de bagazo de cervecería (BSG) en la cantidad suficiente para que el pan resultante pudiera cumplir con el *claim* “fuente de fibra” en MERCOSUR (2012) (por lo menos 2,5 g de fibra dietaria por 50 g). Este resultado se alcanzó sustituyendo un 15,6% de la harina de trigo por BSG, de acuerdo al contenido de fibra determinado en el BSG (44,6 g de fibra dietaria/100 g de harina de bagazo) (Tabla 3).

Para formular el pan II, enriquecido con BSG pero sin lo suficiente para cumplir el *claim* “fuente de fibra”, se estableció sustituir un 7,8% de harina de trigo por BSG (Tabla 1). En estudios preliminares se ensayaron diferentes incorporaciones

Ingredientes	Cantidad (%)		
	Pan Referencia	Pan con BSG “fuente de fibra” (Fórmula I)	Pan con BSG (Fórmula II)
Agua	33,37	33,37	33,37
Harina de trigo	53,30	45,00	49,15
Harina de bagazo de cervecera (HBC)	-	8,30	4,15
Aceite de girasol	4,86	4,86	4,86
Azúcar	3,60	3,60	3,60
Leche en polvo	3,20	3,20	3,20
Sal	1,20	1,20	1,20
Levadura	0,47	0,47	0,47

**Tabla 1.** Formulación de los panes para el Ensayo 1.

Ingredientes	Cantidad (%)			
	Formula I	Fórmula II	Fórmula III	Fórmula IV
Agua	33,37	33,37	33,77	33,77
Harina de trigo	45,00	49,15	45,55	49,75
Harina de bagazo de cervecera (HBC)	8,30	4,15	8,40	4,20
Aceite de girasol	4,86	4,86	4,92	4,92
Azúcar	3,60	3,60	3,64	3,64
Leche en polvo	3,20	3,20	3,24	3,24
Sal	1,20	1,20	-	-
Levadura	0,47	0,47	0,48	0,48
Con <i>claim</i> “fuente de fibra”	SI	NO	SI	NO
Con advertencia “EXCESO DE SODIO”	SI	SI	NO	NO

**Tabla 2.** Formulación de los panes para el Ensayo 2.

de BSG a los panes (por debajo del mínimo para alcanzar el *claim* “fuente de fibra”) y se halló que una sustitución del 7,8 % de harina de trigo por BSG era adecuada para obtener un pan que fuera aceptado por los consumidores (datos no mostrados).

## Ensayo 2

A las formulaciones establecidas en el Ensayo 1 se les incorpora como variable el contenido de Sodio, para contemplar la advertencia respecto al ingrediente (“EXCESO DE SODIO” o sin advertencia), según el Decreto sobre etiquetado frontal 272/018 (Uruguay, 2018) aprobado en agosto del 2018 en Uruguay. En este caso, resultaron cuatro fórmulas de pan (I, II, III y IV). Por un lado, las fórmulas I y II desarrolladas en el Ensayo 1, con un contenido de sal usualmente encontrado en panes del mercado uruguayo, que resultan en niveles de Sodio por encima de lo establecido en el Decreto de Etiquetado

Frontal, y por tanto deberían incluir en el rotulado la advertencia “EXCESO DE SODIO”. Por otro lado, las fórmulas III y IV, que representan las formulaciones I y II pero sin agregado de sal, con niveles de Sodio por debajo de lo establecido en el Decreto, y que, por tanto, no deben incluir la advertencia en cuestión (Tabla 2).

## Composición nutricional

Se determinó la composición nutricional de la harina de bagazo de cervecera. El contenido de proteína y de fibra dietaria total (FDT) se determinaron de acuerdo a los métodos de la AOAC 984.13 (AOAC International, 2012a) y 985.29 (AOAC International, 2012b), respectivamente. El contenido graso se estimó de acuerdo a la ISO 6492 (International Organization for Standardization, 1999). El contenido de humedad se determinó por análisis gravimétrico en estufa a 105 °C hasta peso constante. Las cenizas se

determinaron por incineración en mufla, de acuerdo a la ISO 5984 (International Organization for Standardization, 2002, cor.1 2005). El contenido de carbohidratos totales se determinó por diferencia entre el peso total y la suma de los gramos de proteínas, lípidos, fibra dietaria, humedad y cenizas contenidas en 100 gramos de muestra. Se determinó además el contenido de sodio, de acuerdo al método de la AOAC 2011.14 (AOAC International, 2016).

## Evaluación sensorial por consumidores

### Ensayo 1

Los panes elaborados en el Ensayo 1 (Tabla 1) fueron evaluados por 77 consumidores, estudiantes y funcionarios de la Universidad Católica del Uruguay y del Parque Tecnológico del LATU, consumidores habituales de pan, 48% hombres y 52% mujeres, con edades entre los 18 y 69 años. Una rodaja de cada pan fue servida en platos codificados con números aleatorios de tres dígitos y entregados a cada participante para su evaluación. Los participantes fueron invitados a probar cada muestra de pan e indicar su agrado general utilizando una escala hedónica de 9 puntos (1: "No me gusta en absoluto" a 9: "Me gusta muchísimo").

### Ensayo 2

Para evaluar el efecto de la información nutricional presentada en el etiquetado frontal, se realizó una segunda evaluación con consumidores, quienes evaluaron los panes elaborados en el Ensayo 2 (Tabla 2). En esta oportunidad se presentó a los consumidores una rodaja de cada pan formulado junto con su posible etiqueta. Participaron en esta etapa 81 consumidores, estudiantes y funcionarios de la Universidad Católica del Uruguay y del Parque Tecnológico del LATU, consumidores habituales de pan, 48% hombres y 52% mujeres, con edades entre los 18 y 65 años. Una rodaja de cada pan fue servida en platos codificados con números aleatorios de tres dígitos y entregados a cada participante para su evaluación junto con su etiqueta correspondiente. Los participantes fueron invitados a evaluar cada etiqueta indicando su intención de compra (1: "Definitivamente no lo compraría" a 7: "Definitivamente lo compraría") y probar cada muestra de pan indicando su agrado general utilizando una escala hedónica de 9 puntos (1: "No me gusta en absoluto" a 9: "Me gusta muchísimo").

### Diseño de etiquetas

Se diseñaron etiquetas de los panes formulados con la información nutricional que le corresponde a cada formulación en cuestión, considerando como variables la inclusión o no del *claim* "fuente de fibra" y la advertencia o no de "EXCESO DE SODIO". Para esta última se tomó el diseño octogonal de fondo negro y borde blanco, con la expresión en su interior "EXCESO DE SODIO", como establece el Decreto sobre etiquetado frontal 272/018 (Uruguay, 2018), y su tamaño se estableció de acuerdo a las especificaciones establecidas.

Las etiquetas no corresponden a ningún producto en particular disponible en el mercado uruguayo de modo de evitar la influencia en la respuesta de los consumidores. Las etiquetas fueron diseñadas por una empresa de diseño gráfico con experiencia en el diseño de envases de alimentos. En la Figura 1 se presenta una imagen de las etiquetas diseñadas.



Figura 1. Imagen de las etiquetas diseñadas presentadas en la evaluación sensorial realizada para el Ensayo 2.

### Análisis estadístico

El Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor fue utilizado para analizar los datos de la aceptabilidad de las muestras elaboradas para el Ensayo 1 (productos sin información) sobre los datos de aceptabilidad e intención de compra para el Ensayo 2 (productos con etiqueta). El ANOVA de dos factores fue utilizado para evaluar el efecto de la fibra (enriquecido; fuente de fibra) y del contenido de sal (con sal; sin sal) sobre la aceptabilidad e intención de compra para las muestras del Ensayo 2. Las diferencias significativas entre muestras fueron determinadas con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Los análisis fueron ejecutados usando XLSTAT Versión 2011 (Addinsoft 1995-2010, France).

## Resultados y Discusión

### Composición proximal de la harina de bagazo de cervecera

Se determinó la composición proximal de la harina de bagazo de cervecera (BSG), incluyendo la estimación de proteínas, materia grasa, cenizas, fibra dietaria y carbohidratos y sodio, parámetros requeridos para el rotulado nutricional de los productos envasados (Tabla 3).

	Harina de bagazo de cervecería
Proteínas	23,81 ± 0,31
Lípidos	6,24 ± 0,01
Cenizas	3,76 ± 0,06
Fibra dietaria	44,61 ± 0,29
Carbohidratos	14,89 <sup>1</sup>
Sodio <sup>2</sup>	240

<sup>1</sup>- Contenido de carbohidratos determinado por diferencia.

<sup>2</sup>- Contenido de sodio expresado en mg/kg

**Tabla 3.** Composición proximal de la harina de bagazo de cervecería en g/100 g.

Los valores obtenidos en este trabajo concuerdan con los informados por Aliyu y Bala (2010), quienes reportan para el BSG valores de proteínas entre un 15–26%, materia grasa 3,9–10% y fibra dietaria entre 50–70%.

Ktenioudaki et al. (2012) evaluaron el BSG por su potencial como ingrediente funcional en productos horneados y mostraron que la adición de un 25–35% aumentaba significativamente el contenido de proteínas de snacks y que la adición del 15% duplica el contenido de fibra. Este resultado reafirma el potencial que presenta la harina de bagazo como ingrediente funcional, fuente de fibras y proteínas, y su posible incorporación a alimentos para consumo humano, dándole un mayor valor agregado que el derivado de su uso más frecuente en alimentación animal.

### Desarrollo de panes enriquecidos con harina de bagazo de cervecería

Se realizó una evaluación sensorial con consumidores, quienes evaluaron la aceptabilidad de panes con incorporación de BSG (fórmulas I y II) y de un pan referencia sin incorporación de BSG. Los valores medios de aceptabilidad obtenidos para cada pan se presentan en la Tabla 4.

De acuerdo al ANOVA, la aceptabilidad del pan enriquecido con BSG (sustitución del 4,15% de BSG en la formulación total) no presenta diferencia significativa con el pan sin BSG (pan referencia), y ambos son significativamente más aceptables que el pan “fuente de fibra” (sustitución del 8,30% de BSG en la formulación total) ( $p$  valor <0,0001).

	Aceptabilidad
Pan con BSG “fuente de fibra” (fórmula 1)	5,5 <sup>a</sup>
Pan con BSG (fórmula II)	6,5 <sup>b</sup>
Pan Referencia	6,8 <sup>b</sup>

Letras diferentes implican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Valor medio de aceptabilidad para los panes del Ensayo 1.

Ktenioudaki et al. (2013) obtuvieron resultados similares al estudiar la incorporación de BSG en panes, y lograron

productos aceptables con una incorporación de un 10% de BSG en la fórmula total. Por encima de este porcentaje, la aceptabilidad disminuyó significativamente, generando rechazo en el consumidor.

El BSG demuestra ser una buena alternativa como ingrediente funcional, debido a que se pueden formular panes con 1,25% de fibra dietaria (Fórmula II) sin afectar significativamente la aceptabilidad. Para formular panes con 2,5% de fibra dietaria, y así denominarlos como “fuente de fibra” (Fórmula 1), se deberían realizar cambios más significativos en la formulación.

### Efecto de la información nutricional en la aceptabilidad e intención de compra

Para evaluar el impacto de la información nutricional en la intención de compra y la aceptabilidad de los panes formulados, se consideró evaluar como variable el contenido de sodio, además del contenido de fibra. La variable sodio se plantea porque, en general, la mayoría de los panes envasados disponibles en el mercado presentan un contenido de sodio por encima del límite que establece el Decreto de Rotulado Frontal, y por tanto deberían presentar una advertencia por “EXCESO DE SODIO”. Se evaluaron los panes con incorporación de BSG y con el contenido de sal usualmente encontrado en los panes del mercado uruguayo, y las mismas formulaciones pero sin incorporación de sal.

Como muestra la Tabla 5, la intención de compra y la aceptabilidad variaron significativamente entre las cuatro formulaciones estudiadas para el Ensayo 2.

	Intención de compra	Aceptabilidad
Pan con BSG “fuente de fibra” con sal (Fórmula I)	4,4 <sup>b,c</sup>	5,9 <sup>a,b</sup>
Pan con BSG con sal (Fórmula II)	3,8 <sup>c</sup>	6,6 <sup>a</sup>
Pan con BSG “fuente de fibra” sin sal (Fórmula III)	5,4 <sup>a</sup>	4,5 <sup>c</sup>
Pan con BSG sin sal (Fórmula IV)	4,7 <sup>b</sup>	5,1 <sup>b,c</sup>

Letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.** Valor medio de intención de compra y aceptabilidad para los panes del Ensayo 2.

En lo que a la información respecta, los consumidores prefirieron el pan “fuente de fibra” y sin sal frente al resto de las formulaciones y rechazaron el pan enriquecido con fibra con sal. Los panes “fuente de fibra” con sal y el pan enriquecido con fibra sin sal tuvieron intención de compra intermedia (escala utilizada para intención de compra 1–7).

Esto lleva a pensar que la información respecto al contenido de sal y fibra tuvo un impacto real en la elección de los consumidores. Para evaluarlo, se estudió el impacto del efecto fibra y el efecto sal independientemente mediante una ANOVA de dos factores. Como se observa en la Tabla 6, ambos efectos, sal y fibra, fueron significativos tanto para la

intención de compra como para la aceptabilidad. Sin embargo, la interacción no lo fue.

	Intención de compra	Aceptabilidad
Sal	<0,0001	<0,0001
Fibra	0,0005	0,0020
Sal*Fibra	0,6422	0,8411

**Tabla 6.** p-valor de los efectos fijos utilizados para el ANOVA de dos factores (sal y fibra) sobre la intención de compra y la aceptabilidad para los panes del Ensayo 2.

Por lo tanto, ambos efectos son percibidos de forma independiente por el consumidor, la advertencia “EXCESO DE SODIO” tiene un impacto negativo y la presencia del *claim* “fuente de fibra” tiene un impacto positivo (Tabla 5).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la presencia de la frase “EXCESO DE SODIO” presentada en el envase provocaría una disminución en la intención de compra de los consumidores. Por lo menos, para este componente y en este tipo de alimento, se estaría cumpliendo con el propósito que tiene la implementación de este sistema de advertencias, que es desalentar el consumo de productos considerados como no saludables (Corvalán, et. al., 2013; Chile, 2015). Este sistema de octógonos basado en advertencias sobre cierto tipo de nutrientes o componentes, se implementa en Chile desde el año 2015.

Machín et al. (2018) obtuvieron resultados similares al evaluar el impacto de la presencia de diferentes sistemas de advertencia sobre la intención de compra de los consumidores. En su estudio, los consumidores fueron invitados a imaginar que debían comprar productos para preparar un almuerzo saludable. En este trabajo, hipotéticamente los uruguayos consumirían un 19% menos de sodio en su dieta si los alimentos estuvieran rotulados con los octógonos. De la misma forma, Ares et al. (2018b), focalizando el estudio en tres categorías de productos y también de modo teórico, encontraron que para panes, yogures y queso crema los uruguayos prefirieron los productos sin advertencias frente a los productos con advertencias.

Se debería ampliar la investigación a otras categorías de productos con evaluaciones prácticas y en distintos segmentos de la población, para evaluar el efecto de este sistema de rotulado en la aceptación de los consumidores uruguayos por los alimentos que componen su dieta.

Al evaluar los panes sensorialmente y valorar la aceptabilidad, el pan enriquecido y con sal fue el preferido y el pan “fuente de fibra” sin sal fue el menos aceptado por los consumidores (Tabla 5). Al evaluar los efectos por separado en ANOVA de dos factores (Tabla 6), tanto el efecto fibra como el efecto contenido de sal fueron significativos.

El pan con mayor intención de compra inicial (fórmula III) fue el que obtuvo menor aceptabilidad sensorial, mientras que el pan con menor intención de compra inicial fue el que obtuvo mayor aceptabilidad sensorial.

Si bien el consumidor compraría el pan “fuente de fibra” y sin advertencia de sal, luego al probarlo lo rechazaría (valor de aceptabilidad menor a 5), lo cual indica que sería oportuno realizar esfuerzos y trabajar en la reformulación de los productos para alcanzar productos aceptables y cumplir con el propósito del rotulado con octógonos.

## Conclusiones

El subproducto generado por la industria cervecera, BSG, es factible de ser utilizado como ingrediente funcional. Se destacan como componentes más relevantes un contenido de fibra dietaria de 44,6% y proteínas del 23,8%.

La incorporación de fibra en la formulación de panes podría ser una buena alternativa para mejorar la aceptación de fórmulas reducidas en sal.

La presencia de la advertencia “EXCESO DE SODIO” representada en el envase disminuye la intención de compra de los consumidores por panes con cebada con dicho mensaje, mientras que la presencia del *claim* “fuente de fibra” aumenta la intención de compra de los panes que la contengan.

Si bien la información determina la elección inicial de los consumidores por los panes, el producto será rechazado si no alcanza valores de aceptabilidad sensorial favorables. Es una oportunidad para la industria, que debería focalizar sus esfuerzos hacia la reformulación y/o desarrollo de productos aceptables y sin mensajes percibidos como negativos por los consumidores.

Este trabajo demuestra que, a través de la reformulación de alimentos con ingredientes beneficiosos para la salud de los consumidores como el BSG, se puede dar solución a la industria para alcanzar productos aceptables manteniendo una adecuada intención de compra.

## Reconocimientos

A FNC S.A. por proveernos del bagazo para todos los ensayos.  
A Syrah Comunicación Visual por el diseño de las etiquetas.

## Referencias

- Ainsworth, Ibanoglu, S., Plunkett, A., Ibanoglu, E. y Stojceska, V., 2007. Effect of brewers spent grain addition and screw speed on the selected physical and nutritional properties of an extruded snack. En: *J. Food Eng.*, 81, pp.702–709.
- Aliyu, S. y Bala, M., 2010. Brewer's spent grain: a review of its potentials and applications. En: *Afr. J. Biotechnol.*, 10, pp.324–331.
- AOAC International, 2012a. *Official methods of analysis of AOAC international*. 19a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 984.13, first action 1984–final action 1994.
- AOAC International, 2012b. *Official methods of analysis of AOAC international*. 19a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 985.29, first Action 1985–final action 1986.
- AOAC International, 2016. *Official methods of analysis of AOAC international*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 2011.14, first action 2011–final action 2013.
- Ares, G., Aschemann-Witzel, J., Curutchet, M.R., Antúnez, L., Machín, L. y Vidal, L., 2018a. Nutritional warnings and product substitution or abandonment: policy implications derived from a repeated purchase simulation. En: *Food Quality and Preference*, 65, pp.40–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.12.001>
- Ares, G., Aschemann-Witzel, J., Curutchet, M.R., Antúnez, L., Machín, L., Vidal, L. y Giménez, A., 2018b. Product reformulation in the context of nutritional warning labels: exploration of consumer preferences towards food concepts in three food categories. En: *Food Research*

- International*, 107, pp.669-774. <https://doi:10.1016/j.foodres.2018.03.021>
- Arrúa, A., Curutchet, M.R., Rey, N., Barreto, P., Golovchenko, N., Sellanes, A., Velazco, G., Winokur, M., Giménez, A. y Ares, G., 2017. Impact of front-of-pack nutrition information and label design on children's choice of two snack foods: Comparison of warnings and the traffic-light system. En: *Appetite*, 116, pp.139-146.
- Buffington, J., 2014. The economic potential of brewer's spent grain (BSG) as a biomass feedstock. En: *Adv. Chem. Eng. Sci.*, 4, pp.308-318.
- Chile. Decreto 13/15, de 16 de abril de 2015. *Diario Oficial*, 26 de junio de 2015. [En línea]. [Consulta: setiembre 2017] Disponible en: <http://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/cl/cl074es.pdf>
- Corvalán, C., Reyes, M., Garmendia, M.L. y Uauy, R. 2013. Structural responses to the obesity and non-communicable disease epidemic: The Chilean law of food labelling and advertising. En: *Obesity Reviews*, 14, pp.79-87.
- FAO. Organización para las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura, 2015. *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe*. Roma: FAO. (Boletín; 2).
- Fărcaș, A., Tofană, M., Socaci, S., Mudura, E., Scrob, S., Salanță, L. y Mureșan, V., 2014. Brewers' spent grain – A new potential ingredient for functional foods. En: *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(2), pp.137-141.
- Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P. y Daufin, G., 2006. Water, wastewater and waste management in brewing industries. En: *Journal of Cleaner Production*, 14, pp.463-471.
- Flander, L., Salmenkallio-Marttila, M., Suortti, T. y Autio, K., 2007. Optimization of ingredients and baking process for improved wholemeal oat bread quality. En: *LWT-Lebensmittel-wissenschaft & Technologie*, 40, pp.860-870.
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K. y Araki, Y., 2001. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. En: *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, 59, pp.59-62.
- International Organization for Standardization, 1999. ISO 6492: *Animal feeding stuffs -- determination of fat content*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2002 cor.1 2005. ISO 5984: *Animal feeding stuffs -- Determination of crude ash*. Ginebra: ISO.
- Ktenioudaki, A., Chaurin, V., Reis, S.F. y Gallagher, E., 2012. Brewer's spent grain as a functional ingredient for breadsticks. En: *Int. J. Food Sci. Tech.*, 47, pp.1765-1771.
- Ktenioudaki, A., Crofton, E., Scannell, A.G.M., Hannon, J.A., Kilcawley, K.N. y Gallagher, E., 2013. Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. En: *J. Cereal Sci.*, 57, pp.384-390.
- Lattimer, J.M. y Haub, M.D., 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. En: *Nutrients*, 2, pp.1266-89.
- Lynch, K.M., Steffen, E.J. y Arendt, E.K., 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. En: *J. Inst. Brew.*, 122, pp.553-568.
- Machín, L., Aschemann-Witzel, J., Curutchet, M.R., Giménez, A. y Ares G., 2018. Does front-of-pack nutrition information improve consumer ability to make healthful choices? Performance of warnings and the traffic light system in a simulated shopping experiment. En: *Appetite*, 121, pp.55-62.
- Mandle, J., Tugendhaft, A., Michalow, J. y Hofman, K., 2015. Nutrition labelling: a review of research on consumer and industry response in the global south. En: *Global Health Action*, 8(1), pp.25912-10.
- MERCOSUR, 2012. *MERCOSUR/GMC/RES. N° 01/12. Reglamento técnico Mercosur sobre información nutricional complementaria (declaraciones de propiedades nutricionales)* [En línea]. Buenos Aires: GMC. [Consulta: agosto de 2017]. Disponible en: [http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/resolucion\\_mercosur\\_1\\_2012.pdf](http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/resolucion_mercosur_1_2012.pdf)
- Mussatto, S. I., 2009. Biotechnological potential of brewing industry by-Products. En: Singh-Nee Nigam, Poonam, Pandey, Ashok, (eds.). *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. Berlín: Springer, pp.313-326.
- Mussatto, S.I., 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. En: *J. Sci. Food Agric.*, 94, pp.1264-127.
- Nigam, P.S., 2017. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. En: *Waste Management*, 62, pp.255-261.
- Uruguay. Decreto 272/018, de 29 de agosto de 2018. *Diario Oficial*, 31 de agosto de 2018, No. 30.018, p.10.
- World Economic Forum, 2017. *From linear to circular-accelerating a proven concept* [En línea]. Ginebra: World Economic Forum. [Consulta: 3 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://reports.weforum.org/toward-the-circular-economy-accelerating-the-scale-up-across-global-supply-chains/from-linear-to-circular-accelerating-a-proven-concept/>
- Zhu, F., Du, B., Zheng, L. y Li, J., 2015. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. En: *Food Chemistry*, 12, pp.186-207.

# Efecto de la incentivación de las abejas con carbohidratos sobre la composición isotópica de $^{13}\text{C}$ de mieles de Uruguay

## Effect of energetic incentive of bees with carbohydrates on the $^{13}\text{C}$ isotopic composition of honeys from Uruguay

Berriel, Verónica (1)

(1) Centro de Aplicaciones de Tecnología Nuclear en Agricultura Sostenible, Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Contacto: [vberriel@fagro.edu.uy](mailto:vberriel@fagro.edu.uy)

RECIBIDO: 30/5/2018 – APROBADO: 9/10/2018

### Resumen

En el mercado internacional, las mieles son sometidas a una rigurosa prueba analítica que determina su autenticidad o su adulteración con azúcares artificiales derivados de plantas C-4. En caso de mal manejo de la incentivación, es posible que la prueba de autenticidad dé como resultado que las mieles están adulteradas con azúcares exógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de la práctica de incentivación local en la prueba analítica de determinación de adulteración por azúcares C-4. Para este estudio fueron colectadas mieles de 20 apiarios. Los resultados indicaron que el manejo de los apiarios según las normas de buenas prácticas de los apicultores no revisten peligro de que las mieles sean catalogadas como adulteradas. Sin embargo, se encontró que en un apiario donde se incentivó a las abejas en un período no oportuno la prueba de autenticidad dio como resultado que la miel estaba adulterada por azúcares C-4. Por lo tanto, es recomendable que la práctica de incentivación sea realizada solo en momentos de escasez de alimentos para las abejas, para que estas no acopien el mismo alimento y los controles analíticos demuestren el alto estándar de calidad de las mieles uruguayas.

**Palabras clave:** miel, adulteración con azúcares C-4,  $^{13}\text{C}$ .

### Abstract

In the international market, honeys are subjected to a rigorous analytical test that determines their authenticity or adulteration with artificial sugars derived from C-4 plants. In case of mishandling of the supply of the energetic incentive, it is possible that the honeys result in this authenticity test as adulterated with exogenous sugars. The objective of this work was to evaluate the incidence of the practice of feeding with energetic incentive in the analytical test of determination of adulteration by C-4 sugars. For this study honey from 20 apiaries were collected. The results showed that the apiary-handling carried out according to the standards of good practices of beekeepers are not risk for honey to be classified as adulterated. However, it was found that in an apiary where bees had an energetic incentive in a not opportune period, the honey resulted in the authenticity proof as adulterated by C-4 sugars. Therefore, it was recommended that the practice of energetic incentive be carried out only in times of food shortage for the bees, so that they do not collect the same food, and the analytical controls demonstrate the high quality standard of Uruguayan honeys.

**Keywords:** honey, C-4 sugar adulteration,  $^{13}\text{C}$ .

## Introducción

La miel se define como una sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar o de las secreciones de las plantas, o de las excreciones de insectos succionadores de plantas. Durante la síntesis de la miel ocurre la combinación de las sustancias extraídas de las plantas con las propias secreciones, luego esta mezcla se deposita, deshidrata y por último añeja en el panal (Bogdanov y Martin, 2002).

De la definición anterior se desprende que cualquier sustancia exógena agregada a la miel de manera voluntaria

(por ejemplo, para incrementar el volumen del producto) o involuntaria (por ejemplo, durante la alimentación de las abejas) es considerada una adulteración (Guler, et al., 2014; Borovšak, et al., 2017). Sin embargo, el bajo costo de los jarabes y la dificultad de su detección han hecho de este método de adulteración el más frecuente (Naila, et al., 2018).

Una práctica relativamente expandida entre los apicultores de Uruguay es la incentivación de las abejas. La incentivación consiste en suministrar carbohidratos a las abejas cerca del final del invierno para que estén en óptimas condiciones al comienzo de la floración (Bazzurro, 2000). Si esta práctica

no se lleva a cabo de manera controlada, presupone un riesgo inminente de contaminación de la miel con azúcares C-4 (Bazzurro, 2000) y que, por lo tanto, pueda ser catalogada como miel adulterada por azúcares exógenos.

Para la detección de azúcares C-4 en la miel se realiza un análisis de la composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  o valor  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras de miel (White y Winters, 1989). Para determinar si una miel fue adulterada es necesario tener en cuenta que los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de las mieles son un reflejo del valor isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  de las plantas de las cuales se originó. Se puede afirmar entonces que en general las mieles provienen de plantas con ciclo fotosintético C-3, mientras que los adulterantes derivan de plantas con ciclo fotosintético C-4 (White y Winters, 1989). Debido a las diferencias bioquímicas entre plantas con distintos ciclos fotosintéticos, los valores  $\delta^{13}\text{C}$  se ubican en distintos rangos numéricos. Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de las plantas C-4 (adulterantes) son significativamente mayores que los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de plantas C-3 (De Niro y Epstein, 1978).

El método oficial actual se basa en la utilización del valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la proteína de la miel como un estándar interno (White y Winters, 1989). Este criterio se fundamenta en que en una muestra genuina los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de la miel y de su proteína deben ser muy similares, ya que el agregado de azúcares solo altera el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la miel pero no el de sus proteínas (White y Winters, 1989; Padovan, et al., 2007).

El criterio internacional actual establece que una miel está adulterada cuando la diferencia entre el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de las proteínas extraídas y la miel (índice isotópico) es inferior a -1,0 ‰ (Berriel y Perdomo, 2016). El método del estándar interno permite además calcular la proporción de adulterante C-4 agregado, ya que existe una relación directa entre la diferencia isotópica proteína-miel y la proporción de adulterante agregado (-1,0‰ equivale a 7% de azúcar C-4 agregado, asumiendo un valor de composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  del jarabe de -9,7‰).

El objetivo de este estudio es determinar si las prácticas locales de incentivación de las abejas impactan en estos valores isotópicos de  $^{13}\text{C}$  de las mieles.

## Materiales y Métodos

De una colección de muestras de mieles de pradera de Uruguay, cosechadas entre los años 2008 y 2012, se eligieron 20 al azar. Los apiarios de los cuales provenían las mieles estaban distribuidos a lo largo del país. Los apicultores, inscriptos ante el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay (MGAP), declararon el origen genuino de sus muestras. De ellos, seis declararon que no alimentaron a las abejas en ningún momento del año, 13 indicaron que incentivaron a las abejas con azúcares C-4 antes del inicio de la floración, y un apicultor declaró haber incentivado luego de iniciado el flujo de néctar, próximo al período de la cosecha de la miel. La incentivación consistió en mezclar partes iguales de azúcar de caña y agua (masa: volumen) o partes iguales de jarabe de alta fructosa y agua (volumen: volumen).

Las muestras de miel fueron filtradas por un tamiz de 0,10-0,15 mm. Las proteínas fueron aisladas de acuerdo al método del estándar interno AOAC 991.41 (AOAC International, 1995). Las muestras fueron extraídas de la siguiente forma: 10 g de miel se disolvieron en 4 mL de agua destilada. Luego, 2 mL de tungstato de sodio al 10% (m/v) y 2 mL de ácido sulfúrico 0,67 N se mezclaron y agregaron a la solución de miel. La mezcla de reacción se homogeneizó y calentó a 80 °C

hasta la completa floculación de las proteínas; en el caso de no ocurrir floculación, se agregaron alícuotas de 2 mL de ácido sulfúrico 0,67 N hasta la observación de floculación. La mezcla fue centrifugada por 5 minutos a 1500xg. Luego se eliminó el sobrenadante, y el *pellet* fue lavado y centrifugado tres veces con 50 mL de agua destilada. Las proteínas purificadas fueron secadas durante 3 horas en estufa a 75 °C.

Tanto las muestras de miel como de proteína fueron posteriormente analizadas por triplicado mediante EA-IR-MS, de acuerdo al método oficial AOAC 978.17 (AOAC International, 1995). Las muestras de miel y proteína se colocaron en cápsulas de estaño antes de ser introducidas en un analizador elemental (Flash EA, 1112 series) acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (Thermo Finnigan Delta Plus) mediante la interfase CONFLO III. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se estimaron de:

$$\delta (\text{‰}) = \frac{(R \text{ muestra} - R \text{ estándar}) \times 1000}{R \text{ estándar}} \quad [1]$$

donde R es la relación entre los valores de  $^{45}\text{CO}_2/^{46}\text{CO}_2$  para la muestra y el estándar (Viena *Pee Dee Belemnite*).

Para la normalización de los datos isotópicos se utilizaron los estándares IAEA CH-6 y USGS-40, con valores  $\delta^{13}\text{C}$  certificados de -10,449 ‰ y -26,39 ‰, respectivamente.

La proporción aparente de azúcares C-4 fue calculada de acuerdo a:

$$\text{Azúcares C-4 (\%)} = \frac{\delta^{13}\text{C}_P - \delta^{13}\text{C}_M}{\delta^{13}\text{C}_P - (-9,7)} \times 100 \quad [2]$$

donde  $\delta^{13}\text{C}_P$  y  $\delta^{13}\text{C}_M$  son los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la proteína y la miel, respectivamente, y -9,7 es el valor estándar internacional de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) del jarabe de alta fructosa, tomado del valor promedio encontrado por White y Winters (1989).

Para controlar el buen desempeño del método a una muestra genuina, producida dentro de un predio experimental de la Facultad de Agronomía, se le agregó cantidades crecientes de jarabe de maíz de alta fructosa entre 5 y 82% (m/m). Sobre las mezclas miel-jarabe se determinaron los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y las proteínas extraídas. La función que correlacionó el % (m/m) de jarabe determinado mediante el método de análisis (y) con el % (m/m) de la mezcla preparada (x) fue:  $y = 1,0024x + 0,7509$  y presentó un  $R^2 = 0,9991$ .

Los análisis estadísticos se realizaron con las rutinas incluidas en el programa XLStat, Addinsoft, 2018.

## Resultados y Discusión

### Valores $\delta^{13}\text{C}$ de composición isotópica

Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de las mieles oscilaron entre -26,23 y -22,75‰, mientras que los valores de las proteínas variaron entre -25,95 y -24,85‰ (Tabla 1). Del total de las muestras, 19 presentaron índices isotópicos de entre -0,24 y 0‰, por lo tanto, fueron clasificadas como mieles genuinas sin agregado de azúcares C-4, de acuerdo a los estándares internacionales.

Una excepción en el conjunto de muestras fue la #20, cuyo índice isotópico (-2,1 ‰) excedió el límite de corte (-1,0 ‰). Por tal razón esta muestra fue catalogada como no genuina



o adulterada por agregado de azúcares C-4. La información asociada a esta muestra indicaba que las abejas habían sido incentivadas en un período próximo a la cosecha. En función de los valores isotópicos obtenidos se evidenció el impacto negativo de la práctica de incentivación luego del inicio de la floración sobre la calidad de la miel.

Para los análisis estadísticos siguientes, la muestra #20 se eliminó del conjunto de datos por tratarse claramente de un resultado adverso.

Para este conjunto de las mieles genuinas los valores máximos  $\delta^{13}\text{C}$  de las mieles y sus proteínas extraídas fueron -25,08 y -25,17‰, respectivamente (Tabla 1).

El rango de variación de los valores isotópicos en las mieles genuinas fue un indicador de que todas ellas tuvieron un origen botánico C-3 (De Niro y Epstein, 1978; White y Winters, 1989).

Además, la distribución de estos valores de composición isotópica tanto de las mieles como los de las proteínas extraídas fueron normales de acuerdo al test Shapiro-Wilk ( $p > 0,5$ ).

Cabe resaltar que entre los tratamientos con y sin incentivación los valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  de la miel y  $\delta^{13}\text{C}$  de las proteínas extraídas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, resulta evidente que la práctica de incentivación de las abejas realizada de manera adecuada no tiene incidencia en los valores de composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  de las mieles.

Las incertidumbres de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de la miel y sus proteínas (Tabla 1) se distribuyeron de manera similar entre ambos tratamientos y en concordancia con estudios previos de estimaciones de la incertidumbre reportados por Berriel y Constantino (inédito).

Muestra	Tratamiento <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}_p \pm U_{\delta^{13}\text{C}_p}$ <sup>2</sup>	$\delta^{13}\text{C}_M \pm U_{\delta^{13}\text{C}_M}$ <sup>3</sup>	Clasificación de la miel <sup>4</sup>	Porcentaje de adulteración calculado	Porcentaje de adulteración informado $\pm U_{\%C4}$ <sup>5</sup>
		‰			%	
1	Sin	-25,66 ± 0,15	-25,76 ± 0,18	P	0	ND <sup>6</sup>
2	Sin	-25,70 ± 0,12	-25,82 ± 0,17	P	0	ND
3	Sin	-25,65 ± 0,16	-25,70 ± 0,15	P	0	ND
4	Sin	-25,71 ± 0,13	-26,10 ± 0,11	P	0	ND
5	Sin	-25,71 ± 0,13	-25,69 ± 0,16	P	0,11	ND
6	Sin	-25,54 ± 0,16	-25,51 ± 0,16	P	0,18	ND
7	Con	-25,87 ± 0,16	-25,88 ± 0,14	P	0	ND
8	Con	-25,63 ± 0,16	-25,76 ± 0,19	P	0	ND
9	Con	-25,28 ± 0,11	-25,52 ± 0,15	P	0	ND
10	Con	-25,32 ± 0,14	-25,62 ± 0,12	P	0	ND
11	Con	-25,73 ± 0,16	-26,16 ± 0,19	P	0	ND
12	Con	-25,76 ± 0,12	-26,23 ± 0,11	P	0	ND
13	Con	-25,60 ± 0,14	-25,60 ± 0,18	P	0,01	ND
14	Con	-25,95 ± 0,15	-25,93 ± 0,16	P	0,14	ND
15	Con	-25,44 ± 0,13	-25,39 ± 0,15	P	0,32	ND
16	Con	-25,36 ± 0,16	-25,31 ± 0,14	P	0,37	ND
17	Con	-25,17 ± 0,15	-25,08 ± 0,10	P	0,53	ND
18	Con	-25,76 ± 0,15	-25,55 ± 0,11	P	1,29	ND
19	Con	-25,87 ± 0,12	-25,63 ± 0,16	P	1,46	ND
20	Con	-24,85 ± 0,17	-22,75 ± 0,15	A	13,87	13,9 ± 1,1

**Tabla 1.** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de miel y sus proteínas de diferentes apiarios de Uruguay, clasificación de la miel en pura (P) o adulterada (A) según valor de rechazo internacional, y proporción estimada de adulterante C4 agregado a la miel.

<sup>1</sup>Tratamiento: Sin= sin incentivación de la colmena, Con= con incentivación de la colmena.

<sup>2</sup> $U_{\delta^{13}\text{C}_p}$ : incertidumbre expandida estimada para el valor  $\delta^{13}\text{C}$  de la proteína extraída de la miel.

<sup>3</sup> $U_{\delta^{13}\text{C}_M}$ : incertidumbre expandida estimada para el valor  $\delta^{13}\text{C}$  de la miel.

<sup>4</sup>Clasificación de la miel: P: miel pura o auténtica; A: miel adulterada con azúcares C-4.

<sup>5</sup> $U_{\%C4}$ : incertidumbre expandida estimada para el porcentaje de adulteración con azúcares C-4.

<sup>6</sup>ND= no detectado.

## Estimación del porcentaje de azúcares C-4 en miel

Los porcentajes estimados de adulteración de las mieles con azúcares C-4 variaron entre 0 y 1,5% (m/m). A pesar de que la media en este parámetro fue superior para el grupo de mieles que provenían de apiarios que habían recibido incentivación (0,31%), no fue significativamente distinta de la media del grupo sin incentivar (0,09%), de acuerdo al análisis ANOVA y Test de LSD-Fischer ( $p > 0,05$ ). También es importante mencionar que los valores de porcentaje de adulteración obtenidos mediante el cálculo de la Ecuación 2 están por debajo del límite de detección del método, por lo tanto, el resultado a informar fue “no detectado”.

Además, el porcentaje de adulteración estimado para la miel #20 fue 13,9 % (m/m), que indicaría que por cada 100 g de miel casi 14 g correspondían a azúcares exógenos derivados de plantas C-4 (como la caña de azúcar o el maíz). La normativa internacional indica que toda miel con porcentajes de adulteración de azúcares C-4 superiores al 7% (m/m) sea considerada no genuina. En este caso, probablemente debido a que los carbohidratos fueron suministrados luego del inicio del flujo de néctar en el ambiente, estos fueron acumulados en los panales al no ser consumidos en su totalidad por las abejas (Bazzurro, 2000). A la luz de este resultado es interesante desarrollar ensayos experimentales que estudien la dinámica de consumo de los azúcares C-4 por las abejas y conocer la variabilidad de la composición isotópica de carbono de dichas mieles. El factor momento de la incentivación en esos ensayos resulta ser clave, por lo tanto deberían considerarse al menos dos épocas de incentivación: una fuera de periodos de mielada y otra en el periodo de mielada.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos revelaron que en líneas generales la práctica de incentivación llevada a cabo en Uruguay no repercute negativamente en los valores de composición isotópica de las mieles, ni afecta su condición de alimento genuino. Sin embargo, de acuerdo a los estándares internacionales una muestra se clasificó como adulterada con azúcares C-4. Probablemente este resultado adverso se debió a que la incentivación de las abejas fue llevada a cabo luego de que comenzaran los flujos de néctar.

Dada la importancia de la apicultura a nivel productivo en Uruguay, es importante que las prácticas de incentivación sean realizadas fuera de los periodos de fuerte flujo de néctar hacia la colmena, de manera de alcanzar los estándares de calidad exigidos en el mercado internacional.

## Reconocimientos

Agradezco a los apicultores que gentilmente proporcionaron muestras de miel e información de manejo asociado a la práctica apícola para este estudio. También destaco la colaboración del Ing. Agr. Pablo Cracco (FAGro) por sus interesantes aportes a la interpretación de la información de

campo. Agradezco muy especialmente a Pablo Constantino (LATU) por el desarrollo de los modelos y planillas de cálculo para estimar la incertidumbre de las composiciones isotópicas de carbono y del porcentaje de adulteración. Por último, también quiero destacar el aporte realizado por revisores anónimos quienes mediante sus comentarios constructivos permitieron mejorar el manuscrito original.

## Referencias

- AOAC International, 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 978.17, first action 1978-final action 1979.
- Bazzurro, D., 2000. *Manejo del apiario para incrementar la cosecha de miel y obtener un producto de alta calidad* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta 24 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.abejasprepireneo.com/archivos/ManejoApiario.pdf>
- Berriel, C. y Constantino, P. Uncertainty estimation of the percentage of high-fructose corn syrup added to honey by EA-IRMS. Inédito.
- Berriel, V. y Perdomo, C., 2016. Determination of high fructose corn syrup concentration in Uruguayan honey by  $^{13}\text{C}$  analyses. En: *LWT - Food Science and Technology*, 73, pp.649-653.
- Bogdanov, S. y Martin P., 2002. Honey authenticity: a review, Mitteilungen En: *Aus Dem Gebiete Der Lebensmittel*, 93, pp.232-254.
- Borovšak, K., Ogrinc, N., Lilek, N. y Korošec, M., 2017. Feeding honey-bee colonies (*Apis mellifera carnica* Poll.) and detection of honey adulteration A. En: *Acta Alimentaria*, 46(2), pp.127-136.
- De Niro, M.J. y Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes. En: *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 12, pp.133-149.
- Guler, A., Kocaokutgen, H., Garipoglu A. V., Onder, H., Ekinci, D. y Biyik, S., 2014. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. En: *Food Chemistry*, 155, pp.155-160.
- Naïla, A., Flint, S. H., Sulaiman, A.Z. y Zuben Weeds, A-A., 2018. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. En: *Food Control*, 90, pp.152-165.
- Padovan, G. J., Rodrigues, L. P., Leme, I. A., De Jong, D. y Marchini, J. S., 2007. Presence of C-4 sugars in honey samples detected by the carbon isotope ratio measured by IRMS. En: *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 2(3), pp.134-141.
- White, J.W. y Doner, L.W., 1978. The  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio in honey. En: *Journal of Apicultural Research*, 17, pp.94-99.
- White, J.W. y Robinson, F.A., 1983.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of citrus honeys and their regulatory implications ratio. En: *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 66, pp.1-3.
- White, J.W. y Winters, K., 1989. Honey protein as internal standard for stable isotope ratio detection of adulteration of honey. En: *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, pp.907-911.

# Color and electrical conductivity of honeys produced by *Apis mellifera* in Uruguay

## Color y conductividad eléctrica de las mieles producidas por *Apis mellifera* en Uruguay

Santos, Estela (1); Meerhoff, Erika (2); García Da Rosa, Eloísa (1); Ferreira, José (2); Raucher, Mario (3); Quintana, Walter (3); Martínez, Ariel (4); González, Carlos (5); Mancebo, Yanina (6)

(1) Sección etología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(2) Unidad de Ciencias del Mar, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(3) Cooperativa Agraria Limitada Apícola de Soriano, Soriano, Uruguay.

(4) MELIKA S.A., Montevideo, Uruguay.

(5) Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU (1973-2017), Montevideo, Uruguay.

(6) Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU (1993-2014), Montevideo, Uruguay.

Contacto: [estelsantos@gmail.com](mailto:estelsantos@gmail.com)

RECIBIDO: 26/10/2018 APROBADO: 12/12/2018

### Resumen

La apicultura está en desarrollo en Uruguay, donde más del 90% de la producción es vendida para exportación. El objetivo de este trabajo fue investigar la relación entre el origen botánico de la miel y la conductividad. La conductividad es una medida indirecta del contenido de cenizas y desde un punto de vista nutricional es un indicador de la composición mineral de la miel, importante suplemento de la dieta del hombre. Se estudiaron cuadros de colmenas de diferentes áreas geográficas de Uruguay. La miel se extrajo mediante prensa en laboratorio y filtrado con tejido sintético. Se analizaron el color, la humedad, la conductividad eléctrica y la melisopolinología. Las mieles más oscuras presentaron mayores valores de conductividad. La mayor conductividad fue de bosque nativo, bosque de *Eucalyptus* spp. y de mielada. La miel de monte nativo uruguayo es única en el mundo y tiene un sabor típico y altos niveles de conductividad, lo que la hace una buena fuente de minerales.

**Palabras clave:** miel, conductividad eléctrica, color.

### Abstract

Beekeeping is in development in Uruguay, where more than 90% of the production is sold for export. The aim of this work was to investigate the relation between the botanical origin and honey conductivity. Conductivity is an indirect measurement of the ash, and from the nutritional point of view, it is an indicator of the mineral composition of the honey, which is an important supplement of human diet. Honeycombs frames were studied from different geographic areas from Uruguay. The honey was extracted by a press at laboratory and filtered by a synthetic cloth. Colour, moisture, electrical conductivity, and pollen content were analysed. The darker honeys presented higher conductivity values. The higher electrical conductivity observed was from native bush, *Eucalyptus* spp. forest and Honeydew. Uruguayan native bush honey is unique in the world and has typical flavour. Moreover, this type of honey has higher levels of conductivity that makes it a good source of minerals.

**Keywords:** honey, electric conductivity, color.

## Introduction

In Uruguay honey is produced since 1834 (Cordara, 2005) and at the moment it is the second product from farms, after citrus, that sells with exportation aims more than 90% of its production (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2016). International markets are becoming more demanding regarding food quality; hence, it is more frequently required that physical and chemical parameters are determined so the honeys can be selected. There are a few studies in the country that determined some botanical, physical or chemical properties of the honey

(Bazurro, et al., 1996; Daners and Telleria, 1998; Cozzolino and Corbella, 2003; Corbella, et al., 2005; Corbella and Cozzolino, 2006; Gámbaro, et al., 2007; Tejera, et al., 2013).

The color is an appreciated characteristic of the honey when establishing commercial contracts, and it is variable depending on factors such as botanical origin, the management of the beekeepers of the wax frames in the apiary, temperature and time of honey storage (Terrab, et al., 2004; Turkmen, et al., 2006; Bogdanov, 2007). On the other hand, the electric conductivity is a parameter related to the mineral content in the honey, therefore a measure that gives knowledge of the nutritional value of

the honey, regarding trace elements (Acquarone, et al., 2007; Bogdanov, et al., 2004, 2007), and it has been used in several studies to corroborate the botanical origin of the honeys (Mateo and Bosch-Reig, 1998; Nanda, et al., 2003; Bogdanov, 2007). The aim of this work was to obtain information for determining the botanical origin, the color and electric conductivity of honeys produced in Uruguay, looking for a predictive relationship between these parameters. The hypothesis of this work was that at higher values of honey color, higher values of electric conductivity of the honey would be observed.

## Material and Methods

### Sampling

With the objective of knowing the kind of honey produced in Uruguay, periodical meetings with beekeeping groups from different areas of the country were performed. Sixty samples of honey were obtained from apiaries located in states of higher production: Artigas, Rivera, Salto, Paysandú, Río Negro, Soriano, Colonia, San José, Canelones and Florida (Figure 1).



Figure 1. Study area. Sampling sites are represented by dots.

The vegetation of interest for beekeeping in these zones are: Eucalyptus forestation, prairies cultivated for cattle industry (*Lotus* spp., *Medicago sativa*, *Trifolium pratense* y *Trifolium repens*), natural forest, fruit trees (*Citrus* spp., *Malus domestica*) and natural prairies (*Baccharis* spp., *Senecio* spp., *Eryngium* spp.).

For obtaining mono-floral honey the honeycombs were collected directly from apiary and were extracted at the laboratory with plastic press. The honeycombs arrived at the laboratory in a box specially designed for this purpose, with the aim of avoiding contamination with metals in the transport or extraction. Once the honey samples arrived at the laboratory, the extraction of the honey was done through pressing from small pieces of honeycomb discarding zones with pollen reserves. After this, the honey was filtered to separate the wax pieces (mesh of 1 mm size) and was stored in glass jars until analysis. Honey samples from private honey

extraction factories, authorized by the MGAP (Livestock, Agriculture and Fisheries Ministry from Uruguay) were also received. The samples were identified by the name of the beekeeper, locality, date of the harvest, partner vegetation in the apiary and botanical origin of honey proposed by beekeepers.

### Reference collection

A pollen collection was produced for reference in the botanical characterization of honeys, with botanical material collected in several sampling fields around apiaries that provided honey for this study. For pollen processing, the technique of pollen mounting from the microscopical analysis of sediment, from the Spanish Food Legislation, was used with some modifications. The flower antenna were extracted and washed with ethylic ether for degreasing the pollen removed. The ether was evaporated in the gas extraction chimney and once dried 10 mL of distilled water was added, removing the surplus parts of the flowers. It was centrifuged for 10 m at 2500 rpm and the surplus was moved away for making the mounting of the pollen residue in the hot glycerin over a microscope slide. It was covered with a slide cover and sealed with paraffin over a hot iron for conservation.

### Botanical origin

For the botanical determination, 20 g of honey were processed with distilled water according to Louveaux et al. (1978). After the final centrifugation, the residual was mounted over a microscope slide to be analyzed under a microscope (400X augment) and the counting of 600 pollen grains was done according to Von der Ohe et al. (2004) for determining the relative abundances of each pollen type.

Honeys that presented dominance of a particular kind of pollen with a percentage of pollen higher or equal than 45% were considered mono-floral. When there was no dominance of a floral type, the honey was considered to be poly-floral (Louveaux, et al., 1978; Bogdanov, et al., 1997). Exceptions were considered for the mono-floral honey of citrus and Eucalyptus, being of 18% and 75% respectively.

### Electric conductivity and color

The electric conductivity ( $\mu\text{sm}/\text{cm}$ ) was determined in a solution of honey, the equivalent of 20 g of dry matte, in 100 mL of deionized water and using a conductimeter. (Orion Model 105) (Bogdanov, 1999). For determining the honey color, the sample was placed in a manual colorimeter cell, in its liquid state at environmental temperature. The sample color was visually compared with the color scale installed at the colorimeter (Pfund scale, Fell, 1978).

## Results and Discussion

### Reference collection

It was possible to collect 198 botanical samples that were used for the pollen extraction. Samples of repeated species, feminine specimens, flower buttons immature or too mature (without pollen) were discarded. A collection of pollen of 99 botanical species was conformed. This collection may be used in future studies and is stored at the Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

35% of the species present in the collection corresponded to the category natural prairies, 31% to natural forest, 19% to species of agriculture interest (harvested), 12% corresponded to the ornamental category and 2% corresponded to forestry species.

In the palynological analysis, 26 botanical species were registered in the total of the samples, and 6 pollen types were not identified. In 41,7% of the cases, the pollen result determined at the laboratory did not coincide with the botanical origin proposed by the beekeeper that sent the samples.

The majority of the honeys were mono-floral (78,3%). The kind of mono-floral honey most common was from *Lotus* spp. (Lotus), from the 47 mono-floral samples 34 corresponded to this kind (72%) and from all the honey samples, Lotus occurred in 49 (81,7%). The second most represented mono-floral honey (13,3%) corresponded to *Eucalyptus* spp. The rest of the mono-floral honeys corresponded to *Brassica napus* (Colza), *Baccharis* spp. (“Chirca”) and *Citrus* sp. (Citrus). These results highlight the importance of the floral fodder species to produce honey in Uruguay. Results coincide with Díaz and Raudovinche (2010), who signal that the extensive cattering progress that is occurring at present (plantations of *Glycine max*, soybean) has decreased the area destined to fodder grass affecting the apiary performance (Table 1).

	Extracted at the laboratory	Extracted at the Beekeeper Factory	Total
Monofloral	23	24	47
Multi-floral	3	9	12
Honeydew	1	0	1
Total	28	33	60

Table 1. Samples analyzed in this study.

From the natural forest honeys (multi-floral) the botanic species more represented were *Blepharocalyx salicifolius* (Arayán) and *Myrcianthes cispalatensis* (red Guava tree), grouped in the table as native Mirtaceas.

It was also verified that the botanical origin of one of the honeys was not floral. In this sample that was sent by a

beekeeper there were no pollen grains that allowed to identify it, but there were abundant elements of honeydew that would indicate an extrafloral origin.

## Conductivity and color

Conductivity values ranged between 184 and 1306  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Darker honeys came from Eucaliptus forests and natural forest, and these also present high values of electric conductivity, higher than 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Table 2).

The majority of the honeys that were analyzed came from the west of the country (Figure 1), area characterized by prairies, hence the honeys were not dark in this study.

Taking into consideration only honeys extracted directly from honeycombs at laboratory, under proper conditions that did not affect the composition of the honey (n=28), the conductivity values ranged between 184 and 889  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Honeys with values over 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  came from *Eucalyptus* spp., honeydew, multifloral (with high content of *Eucalyptus* spp.) and *Lotus* spp. (with high content of *Eryngium* spp.) (Table 2).

Considering only honeys extracted at the laboratory, it was observed that the color values oscillated between 12,8 and 88,9 mm Pfund (Extra White and Ambar respectively), with a mean value of 54 mm Pfund, that corresponds to Light Amber. This color category was the most represented between the honeys (Figure 2).

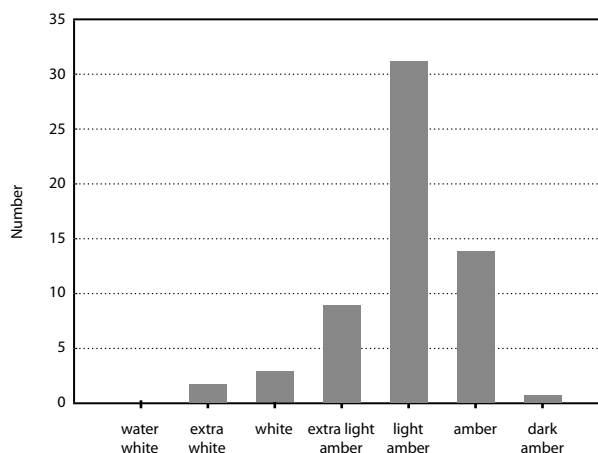


Figure 2. Quantity of honeys for color category.

Origin	K $\mu\text{S}/\text{cm}$	Colour mm Pfund	Pollen (%)																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Prairy	805	88,9	46,2	0,4	0,7	1,4	-	-	5,1	31,1	10	-	-	2	-	3,1	-	-	
Eucaliptus forest	889	78,5	-	-	-	-	96	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	
Honeydew	818	79,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Multifloral	867	76,4	-	-	-	4,7	54,5	1,1	8,3	-	1,3	2,3	1,2	0,7	1,3	2,3	-	11	10,9
Natural forest	814	80,3	14	-	-	-	78	-	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

1-*Lotus* spp., 2-*Medicago sativa*, 3-*Trifolium pratense*, 4-*Trifolium repens*, 5-*Eucalyptus* spp., 6-*Senecio* spp., 7-*Echium plantagineum*, 8-*Eryngium* spp., 9-*Blepharocalyx salicifolius*, 10-*Schinus longifolius*, 11-*Baccharis* sp., 12-*Ammi biznaga*, 13-*Acacia* sp., 14-*Salix* sp., 15-*Prosopis alba*, 16-*Brassicaceae*, 17-*Malus domestica*.

Table 2. Pollen content from honeys extracted at the laboratory, with electric conductivity values higher than 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

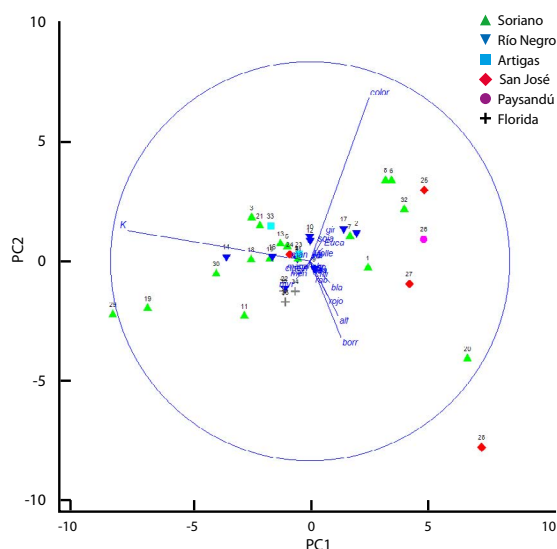
Dominant pollen	Secondary pollen	Minor pollen	Color (mm Pfund)	Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{m}$ )
93% <i>Brassica napus</i>	6% <i>Eucalyptus</i> spp.	1% <i>Lotus</i> spp.	35,4	257
51% <i>Brassica napus</i>	39,7% <i>Eucalyptus</i> spp.	3,6% <i>Echium plantagineum</i>	61,7	314

**Table 3.** *Brassica napus* honey.

Regarding the botanical origin, the results showed that honey of *Lotus* sp. present some color variation, but always in the lower colours in the Pfund scale. Only one sample was from the Amber category (89 mm Pfund) and its darker color (more than the other *Lotus* sp.) was explained because of the partner flora registered in the pollinic analysis: *Eryngium* sp and *Blepharocalyx salicifolius* with important proportions (Table 2). It was verified that at higher purity in the percentage of pollen, the lighter the honey classified in the categories Extra White and White.

The same occurred with two samples obtained of colza (*Brassica napus*). Among them, there was high variability of the color, instead of coming from the same region and dates, approximately. However, it was observed that the companion flora in the pollinic analysis presented a high proportion of *Eucalyptus* spp. that makes natural color and the conductivity of the Colza honey varied (Table 3).

From the ordination analysis performed with samples of *Lotus* sp. it was possible to observe that the samples from Soriano presented higher dispersion than samples from Río Negro. The variables that contributed to the Principal Component Analysis (PCA) were color and conductivity. The cumulated variance in the first axis was 47,1% and in the second axis 67,4%. Samples with higher content of *Echium plantagineum*, *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*, as companion flora, presented minor color and conductivity. Samples with higher values of color presented higher content of *Eucalyptus* sp., sunflower and soybean (Figure 3).



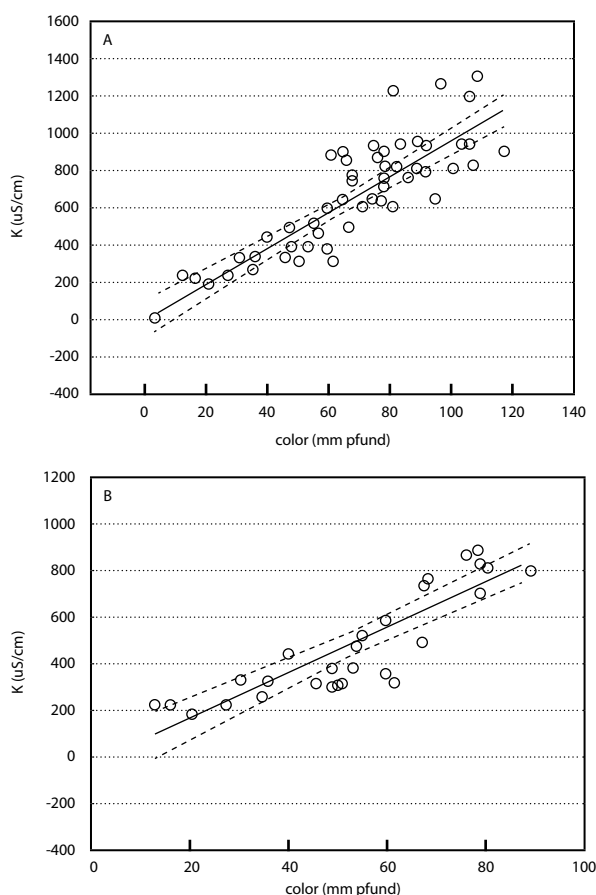
**Figure 3.** Principal component analysis of the honey samples from Uruguay (k: conductivity, Euca: *Eucalyptus* spp., borr: *Echium plantagineum*, gir: sunflower, alf: *Medicago sativa*, rojo: *Trifolium pratense*).

On the other hand, *Eucalyptus* sp. honeys presented light amber color, similar to a sample of natural forest and *Baccharis*

*trimera* sample. Despite the low number of these floral type samples, we might propose that the color do not vary from what we obtained, since samples were monofloral.

Honey color and electric conductivity presented a positive relationship (Figure 4).

The darker the color of the honey, the higher the electric conductivity it presented, independently of the locality or botanical origin.



**Figure 4.** Linear regression and confidence interval between electric conductivity (K) and color value of all the samples (A) and from samples from honeycombs (B).

## Conclusion

Uruguay is a honey exporter since last century, and honey represents one of the most exported farm products. In this work, we obtained an important number of monofloral honey. Monofloral honey was obtained without implementing special management strategies, which indicates the possibility of producing this kind of honey for differential sale, such as prairie honey (*Lotus* spp.) and *Eucalyptus* spp.

The conductivity and color values that characterize each type of honey were determined. Each kind of honey was different in a sensorial way (color, smell) (Gámbaro, et al., 2007), but also from a physico-chemical point of view.

The botanical analysis allowed us to understand which is the flora that conforms different colors of the honey. In almost half of the cases, the pollen result determined at the laboratory did not coincide with the botanical origin proposed by the beekeeper that sent the samples. This shows that in many cases the Uruguayan beekeepers do not know the flowering origin of their honey. Thanks to studies like this, the beekeepers can decide where to place the apiaries. The fact that beekeepers do not know the botanical origin of the honey limits its production potential, because they do not move the apiaries to blooms with higher honey productivity.

Honeys with high conductivity indicate that they present high mineral content and, from a nutritional point of view, more trace elements. This is an important aspect to take into consideration for characterizing dark honeys produced in Uruguay (*Eucalyptus* spp., natural forest and honeydew). The color is indicative of the conductivity of honey, hence it is possible to use this parameter as predictive of honey conductivity.

*Eucalyptus* spp. honey and honeydew are considered by international regulations as honey with higher values than the maximum standard of 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , because of their high mineral content.

In Uruguay it is common that natural forest and *Eucalyptus* forest honey surpass 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Corbella and Cozzolino, 2006), but the natural forest honey produced in Uruguay is not considered at this moment. It would be interesting to conduct more research with this kind of honey to characterize and enter them to international regulations as typical honey from Uruguay.

## Acknowledgements

We would like to thank Cooperativa Agraria Limitada Apícola de Soriano (CALAS), MELIKA S.A and Ariel Martínez for providing the apiaries for honey sampling. This work was supported by the Technological Laboratory of Uruguay (Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU) and the National Direction of Small and Mid-business from Uruguay (Dirección Nacional de Pequeñas y Medianas Empresas, DINAPYME). We want to recognize specially to Ing. Quím. Rodolfo Montañez (LATU), who passed away in december 2018, for the design of special boxes for the transport of honeycombs.

## References

Acquarone, C., Buera, P. and Elizalde, B., 2007. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. In: *Food Chemistry*, 101, pp.695–703.

Bazurro, D., Díaz, R. and Sánchez, M., 1996. *Tipificación de miel de palma butiá (Butiacapitata) durante la floración de 1995-1996 en el Departamento de Rocha*. Rocha: PROBIDES. (Documento de trabajo, 12).

Bogdanov, S., Martin, P. and Lullman, C., 1997. Harmonized methods of the European Honey Commission. In: *Apidologie*, extra issue, pp.1–59.

Bogdanov, S., 1999. Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey Commission. In: *Bee World*, 90, pp.61–69.

Bogdanov, S., Ruoff, K. and Persano Oddo, L., 2004. Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. In: *Apidologie*, 35, pp.S4–S17.

Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W. and Gallmann P., 2007. Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. In: *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46, pp.269–275.

Corbella, E. and Cozzolino, D., 2006. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with Chemometrics. In: *LWT- Food Science and Technology*, 39, pp.534.

Corbella, E., Tejera, L. and Cernuschi, F., 2005. Calidad y origen botánico de mieles del noreste de Uruguay. In: *Revista INIA*, 3, pp.6-7.

Cordara, J., 2005. *La historia de la apicultura en Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de la Empresa.

Cozzolino, D. and Corbella, E., 2003. Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. In: *Journal of Apicultural Research*, 42(1-2), pp.16-20.

Daners, G. and Tellería, C., 1998. Native vs. introduced bee flora: a palynological survey of honeys from Uruguay. In: *Journal of Apicultural Research*, 37, pp.221- 229

Díaz R. and Raudovinche, L., 2010. Apicultura uruguaya trazabilizada y capacitada para el mundo. In: *Boletín MGAP-DIGEGRA*. 14p

Fell, R., 1978. The color grading of honey. In: *American Bee Journal*, 18, pp.782–789.

Gambaro, A., Ares, G., Giménez, A.N.A. and Pahor, S., 2007. Preference mapping of color of Uruguayan honeys. In: *Journal of Sensory Studies*, 22, pp.507-519.

Louveaux, J., Maurizio, A. and Vorwohl, G., 1978. Methods of melissopalynology. In: *Bee World*, 59, pp.139–157.

Mateo, R. and Bosch-Reig, F., 1998. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. In: *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, pp.393-400.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2016. *Anuario estadístico agropecuario* [On line]. Montevideo: MGAP. [Accessed: 15/10/2018]. Available at: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/exportaciones\\_e\\_importaciones\\_pesqueras\\_por\\_ano\\_-\\_anuario\\_diea\\_2016.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/exportaciones_e_importaciones_pesqueras_por_ano_-_anuario_diea_2016.pdf)

Nanda, V., Sarkar, B.C., Sharma, H.K. and Bawa, A.S., 2003. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. In: *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, pp.613-619.

Tejera, L., Invernizzi, C. and Daners, G., 2013. Población y recursos alimenticios en colonias de *Apis mellifera* L. en Uruguay. In: *Archivos de zootecnia*, 62, pp.607-610.

Terrab, A., Escudero, M.L., Gonzalez-Miret, M.L. and Heredia, F.J., 2004. Colour characteristics of honey as influenced by pollen grain content: a multivariate study. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, pp.380-386.

Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S. and Velioglu, Y.S., 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. In: *Food Chemistry*, 95, pp.653-657.

Von Der Ohe, W., Oddo, L.P., Piana, M.L., Morlot, M. and Martin, P., 2004. Harmonized methods of melissopalynology. In: *Apidologie*, 35(Suppl. 1), pp.S18-S25.

# Cuatro experiencias de automatización en Metrología y su impacto en el riesgo de calidad y la eficiencia operativa

## Four automation experiences in Metrology and their impact on quality risk and operational efficiency

Constantino, Pablo (1); Acquarone, Alejandro (1); Mazini, Marcos (3); Robatto, Ofelia (1); Ponticorbo, Verónica (1); Fajardo, Simone (2)

(1) Departamento de Metrología Física, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Montevideo, Uruguay.

(2) Departamento de Metrología Química, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Montevideo, Uruguay.

(3) Instituto de Física, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Udelar, Montevideo, Uruguay.

Contacto: [pconstan@latu.org.uy](mailto:pconstan@latu.org.uy)

RECIBIDO: 25/4/2018 – APROBADO: 25/8/2018

### Resumen

El desarrollo de aplicaciones de software para la automatización de mediciones no tiene necesariamente un fin modernizador de los procesos, sino que se focaliza, en la mayoría de los casos, en reducir el riesgo asociado a errores humanos por transcripción o lectura de datos, así como en la disminución del tiempo de operación frente a la demanda creciente de servicios. Este trabajo describe cuatro desarrollos de software a medida para la automatización de mediciones en laboratorios de temperatura, longitud y pH, realizados en el Laboratorio Nacional de Metrología de Uruguay (LATU). Se presentan los requisitos generales de las aplicaciones e instrumentos involucrados, las necesidades particulares de cada proceso estudiado, las dificultades encontradas durante las etapas de desarrollo con sus diferentes soluciones y las características del producto final más relevantes en cada aplicación. Se propone, además, una medida del impacto en reducción del tiempo de ensayo y la disminución de riesgo en cada proceso automatizado.

**Palabras clave:** Automatización, instrumentación, software, Millitron, Mahr, ASL, SPRT.

### Abstract

Software development aiming measurement automation does not necessarily have a process modernizing purpose but, in most cases, focuses on reducing the risk associated with human errors by transcribing or reading data, as well as reducing the operating time to face the growing demand for services. This paper describes four custom software developments for the automation of measurements in temperature, length and pH laboratories, conducted at the National Metrology Laboratory of Uruguay (LATU). The general requirements of involved applications and instruments, the particular needs of each process studied, the difficulties confronted during development stages with their different solutions, and most relevant features of final product for each application are presented here. A method to measure the impact on the reduction of time and risk in each automated process is also suggested.

**Keywords:** Automation, instrumentation, software, Millitron, Mahr, ASL, SPRT.

## Introducción

El incremento del volumen de trabajo, así como la complejidad creciente del equipamiento utilizado en los procesos de calibración, alienta frecuentemente a la búsqueda de soluciones innovadoras que reduzcan tanto la permanencia de los técnicos en operaciones de rutina durante el proceso como el riesgo de errores humanos debidos a la transcripción manual de datos de visores digitales a planillas en papel y de allí a hojas de cálculo para su procesamiento y obtención de resultados.

La noción de riesgo asociado al diseño, programación y uso en hojas de cálculo es una preocupación permanente

del personal técnico en laboratorios. Ya a partir de la década de 1980 existen estudios basados en grandes colecciones de datos en industrias que refieren al error humano relacionado con acciones cognitivas puntualmente sencillas, como por ejemplo el llenado de una celda de hoja de cálculos con un número o una fórmula o la escritura de una línea de código fuente en el desarrollo de un software. Panko (2015) resume estudios de varios autores realizados sobre alrededor de 10.000 inspecciones de código en la industria, con una tasa de error humano de entre 1,9% y 3,7%, mientras que en el producto final, luego de revisiones y correcciones de módulo, esta tasa se reduce al 0,3% en software, y permanece en 2% la tasa de



error promedio en hojas de cálculo. Más allá del porcentaje específico, estos datos demuestran que la reducción de intervenciones del operador en una planilla de cálculo con un software de automatización es, en buena medida, una forma de disminuir drásticamente ese riesgo de error, además de reducir, generalmente en forma también significativa, el tiempo invertido por el técnico en los ensayos.

Con foco en estos aspectos, en los últimos años el instituto nacional de metrología de Uruguay (Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU) ha realizado exitosamente varias experiencias de desarrollo, sobre todo en los procesos donde el impacto de la automatización se entendió más relevante.

## Software de fábrica vs. software a medida

Hoy en día, la gran mayoría de los instrumentos de medición modernos disponibles en el mercado incluyen soluciones de software propietario, generalmente adecuado para laboratorios secundarios donde se realizan calibraciones por comparación o en procesos que implican pocas variantes. Sin embargo, en ocasiones estas soluciones son demasiado rígidas y no se ajustan totalmente al trabajo requerido en un laboratorio de metrología primario. Por ejemplo, la calibración de un medidor de presión con un calibrador (o monitor) digital en un laboratorio secundario implica la comparación de estos dos equipos, el certificado de calibración del patrón y condiciones ambientales durante el ensayo. Por otra parte, la calibración de este patrón con una balanza de presión requerirá, además, integrar en el tratamiento de datos el valor de la gravedad local, densidad del pistón, densidad de las masas, certificado de calibración en masa de cada uno de los pesos y pistón utilizados, el área efectiva del pistón-cilindro y coeficiente de deformación del propio certificado de calibración, cálculo de densidad del aire a partir de condiciones ambientales, densidad del fluido en el equipo, nivel de referencia, etcétera.

Un software de automatización para procesos de medición complejos requiere especificaciones particulares que no suelen estar disponibles en el software de fábrica de los patrones: mayor acceso a los datos de entrada en el proceso de medición o a las características metroológicas de los equipos, mayor flexibilidad en la realización de experimentos y mediciones, integración de mediciones de varios equipos en paralelo, condiciones ambientales en el modelo de cálculo, etcétera. Por otra parte, el tratamiento de datos debe integrar usualmente nuevas características (o modificación de las existentes) en

la obtención de resultados y/o estimación de incertidumbre, en la medida que se actualizan eventualmente sus normas de referencia. En estos casos se hace imprescindible acceder al código del tratamiento de datos para efectuar modificaciones, ya que el software debe adaptarse a los procesos y no viceversa (Batagelj, et al., 2008). En estos casos las soluciones de software a medida suelen ser una mejor opción.

## Plataforma de programación

Existen en el mercado varios entornos de programación con interfaz visual que facilitan la creación de aplicaciones SCADA (acrónimo en inglés para: Supervisory Control and Data Acquisition) o HMI (por Human Machine Interface), como LabView, Wonderware Intouch, WinCC, o ProTools Pro, entre otros, que permiten soluciones integrales óptimas, aunque el costo de estas soluciones suele ser alto. Sin embargo, para aplicaciones puntuales el uso de entornos de propósito general como Visual Studio, Java, Delphi, etcétera, permite obtener resultados muy eficaces en la automatización de procesos puntuales, tiene un costo mucho menor y puede ser realizado por desarrolladores de software no específico, o incluso por personal del mismo laboratorio con conocimientos medios de programación.

En este trabajo se describe la planificación, dificultades y el producto final en cuatro experiencias de software de automatización a medida realizadas por personal del departamento de metrología del LATU para ensayos propios de su laboratorio. Todas las aplicaciones fueron realizadas con un lenguaje no específico a la instrumentación. El objetivo es evaluar el impacto en la disminución del riesgo del proceso y el tiempo de ensayo, así como en el incremento de la precisión que tienen estas aplicaciones una vez validadas y puestas en operación.

## Materiales y Métodos

Este trabajo presenta cuatro casos. Cada uno trata los requisitos, las dificultades encontradas y el desarrollo general del software de automatización realizado. Los casos estudiados son: la calibración de bloques patrón ISO 3650 (International Organization for Standardization, 1998) con comparador mecánico, la calibración de tamices utilizando un proyector de perfiles, la medición de temperatura de SPRTs (Standard Platinum Resistance Thermometer) y la medición de pH por Celda de Baucke (Baucke, 1994) en secciones subsiguientes.

Caso	Proceso	Patrones	Bus
1	Calibración de bloques patrón ISO 3650 (International Organization for Standardization, 1998) por comparación mecánica	Comparador Mahr modelo 826 con display Millitron modelo 1240	Serie (RS232)
2	Calibración de tamices con proyector de perfiles	Proyector de perfiles Carmar modelo PV-3025AE	Serie (RS232)
3	Temperatura de SPRT	Puente ASL 700 y Switchbox ASL F148/158	NI GPIB
4	Determinación de pH por Celda de Baucke (Baucke, 2015)	Multímetro HP 3458A Termómetro digital (SPRT) Guildline 9540	NI GPIB y RS232

Tabla 1. Características de los procesos a estudiar.

La Tabla 1 indica las características de los procesos que se estudian aquí.

## Caso 1. Calibración de bloques patrón ISO 3650 por comparación mecánica

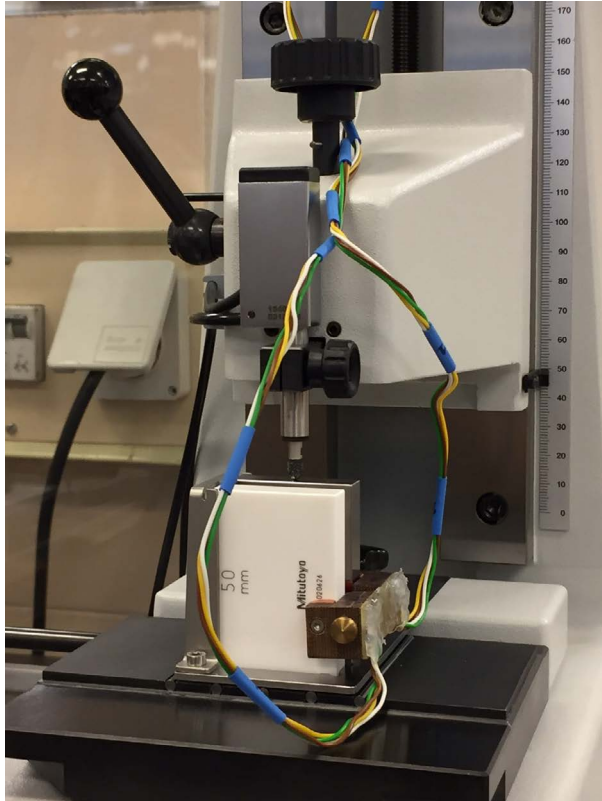


Figura 1. Calibración de bloques patrón de longitud.

### Proceso

Consiste en la determinación de dos características metro-lógicas del bloque:

a) La longitud central, determinada en ambas caras de medida por diferencia respecto a la de un patrón de referencia calibrado. Para esto se realizan cinco medidas de longitud de patrón de referencia ( $C_p$ ) y longitud de muestra ( $C_x$ ) para cada una de las posiciones de la muestra; es decir, se gira el bloque de muestra  $180^\circ$  luego de la primera serie de medidas para posicionar la cara 2 hacia arriba, y se repite la determinación.

$$L_x = L_p + \delta L_p + (\bar{C}_x - \bar{C}_p) + \delta L_c - L(\bar{\alpha} \cdot \delta t + \delta \alpha \cdot \Delta \bar{t}) - \delta L_v \quad [\text{Ec. 1}]$$

Con:  $L_x$  = longitud central del bloque muestra;  $L_p$  = longitud del bloque referencia calibrado;  $\delta L_p$  = deriva del patrón;  $\delta L_c$  = contribución a la incertidumbre referida a desajustes del comparador;  $L$  = longitud nominal;  $\bar{\alpha}$  = promedio de coeficiente de dilatación térmico;  $\delta t$  = diferencia de temperatura entre bloques;  $\delta \alpha$  = diferencia de coeficientes entre bloques;  $\Delta \bar{t}$  = desviación del promedio de temperatura;  $\delta L_v$  = corrección debida al desvío geométrico de la longitud central.

b) La variación en longitud, que corresponde a la máxima diferencia de longitudes medidas en cinco distintos puntos de

la cara de medida del bloque bajo ensayo, el centro ( $X$ ) y las cuatro esquinas ( $E_1, E_2, E_3$  y  $E_4$ ), a aproximadamente 1,5 mm de la cara lateral. El ensayo se realiza tomando cinco series de lecturas en secuencia  $C_x E_1 E_2 E_3 E_4 C_x$  en el bloque muestra, para cada una de las caras de medida. Para esto se utiliza un comparador mecánico con movimientos limitados por un dispositivo posicionador.  $\Delta L_{E_i}$  es la diferencia entre cada esquina y el promedio de la medida de centros y se informan en este caso  $f_o = \max(\Delta L_{E_i})$  y  $f_u = \min(\Delta L_{E_i})$ .

### Objetivos de la automatización

- Automatizar el período de estabilización de los palpadores previo a la toma de lecturas a un tiempo establecido por el operador de acuerdo a las características del equipo. Al homogeneizar estos períodos de espera a partir del momento en que los palpadores entran en contacto con el bloque hasta la captura automática de la lectura, es posible eliminar la dispersión debida a los efectos de deriva y de decisión del operador, por ejemplo, cuando cambia la lectura muy cerca del límite de espera.
- Disponer de una base de datos de patrones que permita mantener actualizadas las características metro-lógicas de los patrones de referencia sin necesidad de transcribir los datos de calibración a la hoja de cálculo cada vez que se realiza el ensayo.
- Realizar la captura de los datos en forma directa a través del software con el fin de eliminar el uso de planillas de toma de datos en papel.
- Establecer que la aplicación haga un seguimiento del flujo de trabajo del ensayo indicando en todo momento la siguiente acción del operador en forma gráfica (esperas, pedido de condiciones, punto a medir, cambios de posición, etcétera). Este objetivo parte de una característica del ensayo, que implica un gran período de atención del operador, quien repite medidas en los mismos puntos de la muestra, por lo que es frecuente la consulta a la planilla de datos para verificar la siguiente posición o, en algunos casos, repetir alguna serie por errores de posición.
- Evaluar a través del software el cumplimiento de los requisitos de condiciones ambientales y metro-lógicas que deben cumplirse para considerar válido el ensayo y enviar una notificación en el caso de no conformidad con estos. En particular, la diferencia de resultados para longitud central y variación en longitud para ambas caras debe ser menor a  $0,04 \mu\text{m}$ , de lo contrario debe repetirse el ensayo.

### Dificultades y soluciones encontradas

La mayor dificultad en la realización de este software es que no se cuenta con el protocolo de comunicaciones en el manual del equipo Millitron, ni tampoco fue posible obtenerlo en consulta al fabricante. La estrategia propuesta para la comunicación fue configurar el equipo manualmente para que realizara impresiones de datos cada 1 segundo a través de su puerto serie (RS232). Estas cadenas de texto, que incluyen no solo la lectura sino también caracteres separadores y texto adicional, deben ser capturadas e interpretadas por el software en tiempo real para obtener el valor de lectura del equipo, que es mostrado en pantalla.

## Aplicación realizada

El controlador desarrollado contiene cuatro módulos básicos. El primero realiza la gestión de una base de datos local con las características metroológicas de todos los patrones del laboratorio, sus correcciones y sus incertidumbres. El segundo permite configurar el ensayo, datos de la muestra, patrón utilizado y número de series de medida, y permite realizar ensayos de longitud central, variación en longitud o ambos. Otro módulo realiza el seguimiento en tiempo real del proceso de calibración indicando gráficamente en pantalla el punto a medir o la acción a realizar y tiempos transcurridos, y, cuando es necesario, presenta campos para el ingreso manual de condiciones ambientales. Las lecturas son tomadas en forma automática por el software. El cuarto módulo realiza el tratamiento de datos y cálculo de resultados. Además, evalúa la validez del ensayo y realiza la estimación de incertidumbres de acuerdo al método JCGM 100 (BIPM, 2008). También emite un informe impreso con datos de entrada y resultados. La aplicación alcanza todos los objetivos buscados para el proceso.

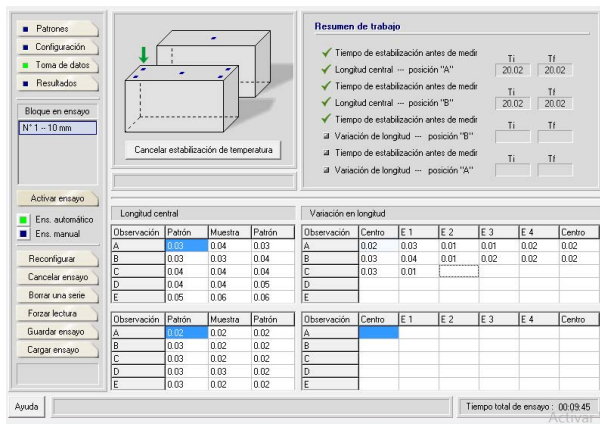


Figura 2. Interfaz del software desarrollado para el Caso 1.

## Caso 2. Calibración de tamices con proyector de perfiles

### Proceso

Implica realizar las mediciones necesarias para determinar si el tamiz ensayado cumple con los requisitos metroológicos de la norma ASTM E11 Internacional (ASTM, 2004), correspondientes a las características nominales de su malla. Esta norma exige para cada una de las designaciones del instrumento ciertas características como el diámetro de alambre, máxima abertura individual, dimensión máxima para el 95% de las aberturas y variación permitida del promedio de aberturas. Para determinar estas características se miden 10 aberturas y sus correspondientes alambres, en tres zonas aleatoriamente seleccionadas de la malla.

### Objetivos de la automatización

- Utilizar el detector de bordes configurable para recorrer la malla capturando en forma automática los puntos que

se utilizarán para determinar los resultados, reduciendo significativamente el tiempo del ensayo. Este dispositivo determina dinámicamente los puntos de contraste (o perfiles) sin necesidad de posicionar la platina.

- Realizar los cálculos para la determinación de las características metroológicas requeridas en la norma, así como el conteo de aberturas que cumplen o no con cada requisito de la norma de referencia, a nivel de código en el software, con el fin de eliminar el riesgo de error humano en este proceso.
- Desarrollar algún dispositivo del software que permita reubicar las coordenadas en cualquier momento del ensayo, para evitar que el operador pierda la referencia del siguiente punto a medir, sobre todo en mallas de aberturas pequeñas, y deba recurrir a la planilla de toma de datos para ubicar nuevamente el flujo del ensayo.
- Lograr un grado de automatización que permita al operador mantener la atención permanentemente en la malla sin necesidad de interactuar con el computador durante el ensayo. Para esto se requiere diseñar un flujo de trabajo secuencial de medida, al que deberá responder el software en forma automática, clasificando las lecturas obtenidas en los puntos a medir.

## Dificultades y soluciones encontradas

En este caso, los mayores inconvenientes se encontraron en la estrategia de medida automática ya que, si bien el detector de bordes limita los valores emitidos por el equipo a los puntos de contraste, es inevitable que en esta secuencia de trabajo se atraviesen puntos de contraste que no forman parte de las lecturas a tomar. Para solucionar este problema sin participación del operador se diseñó un algoritmo que pronostica el resto de las lecturas a partir de los tres primeros puntos tomados en la zona elegida. Luego se establece en estas coordenadas un margen de sensibilidad igual al semiespesor del alambre para todos los puntos donde se toma el perfil de contraste como coincidencia positiva. Otros puntos de contraste atravesados por el detector son ignorados. La Figura 2 representa gráficamente una abertura donde las áreas de coincidencia positivas estarían indicadas con los seis cuadrados pequeños. En otras zonas de contraste no se toman como lectura válida.

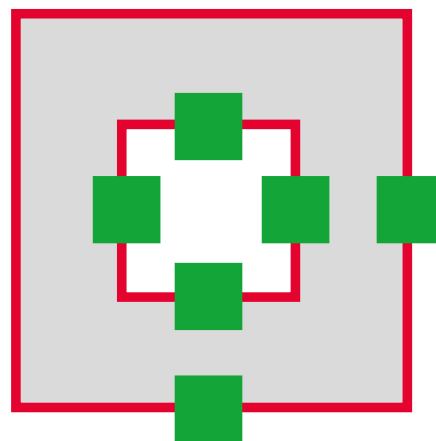


Figura 3. Vista de una abertura con áreas predeterminadas de medida.

## Aplicación realizada

Esta aplicación de interfaz simple consta de un visor digital en la ventana que reproduce los valores tomados en el detector de perfiles. Luego de iniciado el ensayo, el operador recorre la secuencia de puntos, que son selectivamente tomados por la aplicación, descartando zonas de contraste no previstas. En todo momento, el operador puede pulsar un botón en la aplicación donde se le indica el próximo punto a medir, así como el detalle gráfico de la posición del punto en la secuencia de trabajo. En este caso se alcanzaron también todos los objetivos planteados.

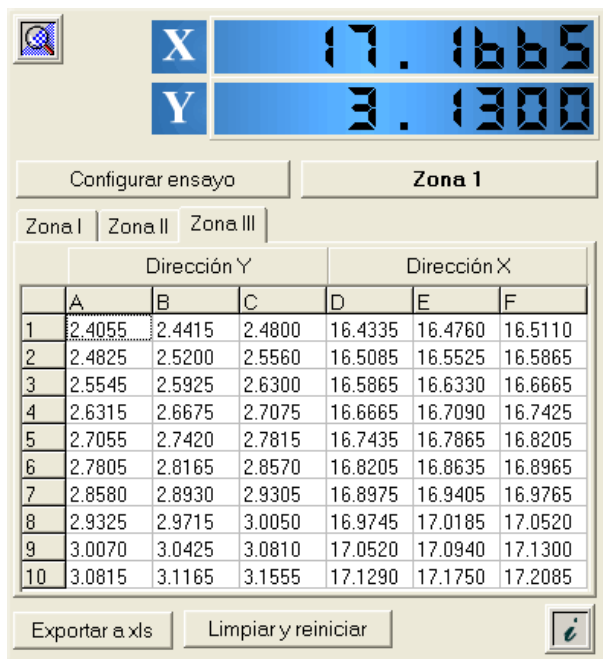


Figura 4. Interfaz de la aplicación para el Caso 2.

## Caso 3. SCADA para termometría

### Proceso

El objetivo de esta aplicación no es automatizar el ensayo completo de calibración en temperatura, sino unificar todas las tareas de control de equipos, adquisición de datos y determinación de la lectura en unidades de temperatura de los patrones SPRT (Standard Platinum Resistance Thermometers) del área de temperatura del LATU. El proceso bajo estudio implica el uso de un puente ASL F700 conectado a Switch box ASL F148/158 de cinco canales donde se selecciona el correspondiente patrón de trabajo.

El puente ASL F700 es un equipo que mide la relación entre una determinada resistencia de un termómetro de resistencia de platino estándar SPRT, sometido a un valor de temperatura  $T$  y un resistor Tinsley Wilkins que se encuentra sumergido en un baño con aceite mineral a un valor de temperatura conocido. A su vez, los patrones de resistencia de platino se calibran mediante celdas de puntos fijos ITS-90. Con los valores de resistencia que se miden en los distintos puntos fijos y el correspondiente a la resistencia en el punto triple de agua se determinan los coeficientes  $W_{t90}$  según la Ecuación 2:

$$W_{t90} = R_{PF} / R_{PTA} \quad [\text{Ec. 2}]$$

donde  $R_{PF}$  corresponde a la resistencia del termómetro medida en un punto fijo y  $R_{PTA}$  es la resistencia del termómetro medida en el punto triple de agua. Con estos valores medidos se construye un sistema de ecuaciones que permite obtener la función de aproximación a la escala ITS-90 (Preston Thomas, H., 1990) de acuerdo a la Ecuación 3:

$$W_{ref} = W_{PFi} - a \cdot (W_{PFi} - 1) - b \cdot (W_{PFi} - 1)^2 - c \cdot (W_{PFi} - 1)^3 \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde el  $W_{PFi}$  representa el coeficiente  $W_{t90}$  observado en la realización de cada celda de punto fijo (el LATU posee puntos fijos de In, Ga, Sn, Zn, Al y Hg), en tanto  $a$ ,  $b$  y  $c$  son coeficientes calculados del polinomio.

A partir de estos valores de  $W_{ref}$  es posible obtener el valor de temperatura a la que está sometido el patrón por medio de dos ecuaciones de referencia, definidas respectivamente para los intervalos de 14 K a 273 K y de 273 K a 1235 K de acuerdo a las Ecuaciones 4 y 5:

$$T = \left[ B_0 + \sum_{i=1}^{15} B_i \cdot \left[ \left( W_r(T)^{\frac{1}{6}} - 0,65 \right) / 0,35 \right]^i \right] * 273,16 \quad [\text{Ec. 4}]$$

$$T = D_0 + \sum_{i=1}^9 D_i \cdot \left[ \left( W_r(T - 2,64) / 1,64 \right)^i \right] \quad [\text{Ec. 5}]$$

Donde  $T$  es la temperatura en K, en tanto los valores de  $B$  y  $D$  son constantes definidas.

## Objetivos de la automatización

Desde la adquisición del equipo, el LATU contaba con el software de fábrica del equipo ASL, que operaba en sistema operativo MS DOS, lo que motivó el desarrollo de una aplicación que, además de funcionar en plataforma Windows, mejorara las características del software de fábrica. En caso de no contar con software DAQ (Data acquisition) alguno, la obtención de cada valor de temperatura del ensayo requiere la medición de varias lecturas a lo largo del tiempo para establecer estabilidad, y en cada una de los cuales debe calcularse el valor de temperatura a partir de las ecuaciones de referencia. En concreto, los objetivos son:

- Seleccionar automáticamente el canal a medir a través del programa. De acuerdo a lo que establezca el técnico, debe ser posible alternar entre más de un canal según el período establecido u obtener lecturas de un solo canal en forma continua. Por otra parte, se busca una flexibilidad que permita cualquier combinación de patrones y canales a medir.
- Lograr la capacidad para graficar, en tiempo real y al mismo tiempo, las mediciones de uno a tres patrones, debido a que el trabajo frecuentemente implica la calibración en paralelo de varios termómetros de diferentes intervalos.
- Simplificar al máximo las acciones e ingresos de parámetros por teclado al software para la realización de los cálculos necesarios.
- Obtener un alto grado de personalización de los parámetros del proceso, como el período de estabilización, bucle entre canales, información de salida, gráficos, registro automático de mediciones en un período, etcétera.

## Dificultades y soluciones encontradas

Los equipos utilizan conexión mediante tarjeta GPIB 488 de National Instruments, por tanto, al usar un lenguaje de propósito general (Delphi) fue necesario previamente desarrollar e instalar en la interfaz de desarrollo un componente específico que permitiera traducir las operaciones de comunicación de la aplicación a comandos específicos en lenguaje 488 que interactuaran con la tarjeta GPIB de forma adecuada. En caso de usar LabView como lenguaje de desarrollo, esto no es necesario.

## Aplicación desarrollada

El software contiene una base de datos propietaria para guardar características metrológicas de los patrones que permitan el cálculo en tiempo real de la temperatura. Permite asignar los distintos patrones alojados en la base de datos a cualquier canal, así como cualquier combinación de canales en las ventanas de gráficos. Los resultados se muestran tanto en formato tabla como en formato gráfico y están disponibles en temperatura, resistencia y relación  $R_t/R_s$ , donde  $R_t$  es la resistencia del termómetro y  $R_s$  es la resistencia del resistor de referencia. Además, es posible alternar secuencialmente entre tres canales, y los resultados son exhibidos simultáneamente en gráficos y tablas independientes.

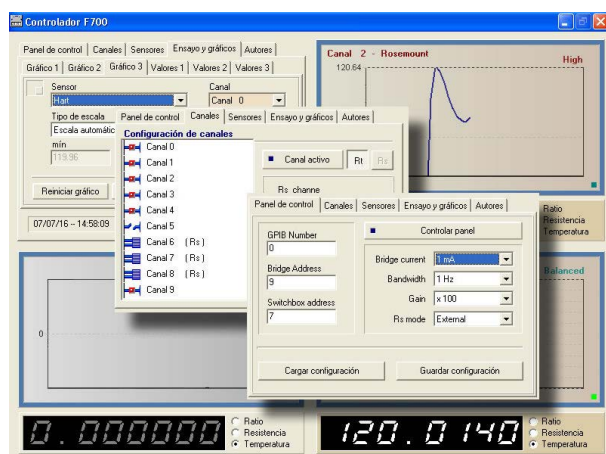


Figura 5. Interfaz del software para el Caso 3.

## CASO 4. Determinación de pH mediante Celda de Baucke (Baucke, 1994)

La determinación del valor de pH de Materiales de Referencia por medio de una Celda de Baucke se realiza mediante un sistema de medición de potencial electromotriz, el cual se obtiene por re-estandarización con un Material de Referencia Certificado (MRC) primario. Los MRC (soluciones buffer) cuyos valores de pH son asignados a través de éste método son trazables al MRC primario y tienen un alto grado de exactitud, por lo cual son utilizados para el ajuste y/o calibración de medidores de pH.

La Ecuación 6 representa la determinación del valor de pH mediante el método de Baucke (1994):

$$pH(M) = pH(P) - \frac{E(M) - E(P)}{\left(\frac{R * T}{F}\right) * Ln 10} \quad [Ec. 6]$$

Donde la solución  $M$  tiene un valor desconocido de pH para la fuerza electromotriz  $E(M)$  y el Material de Referencia Certificado primario  $P$  tiene un valor de pH asignado.  $R$  es la constante de los gases,  $F$  la constante de Faraday y  $T$  la temperatura del baño.

La diferencia de potencial  $E(M)-E(P)$  es medida a través de un multímetro y la temperatura a través de un sensor Pt100 con una frecuencia de una lectura por minuto. La diferencia de potencial y la temperatura son graficadas en función del tiempo para visualizar el punto final del ensayo. Éste se alcanza cuando la diferencia de potencial es menor a  $+ 6 \mu V$  ó  $+ 10 \mu V$ , dependiendo del valor de pH de las soluciones, en forma continua y durante un periodo de 30 minutos. Las condiciones de ensayo implican que la diferencia de potencial y la temperatura sean calculadas promediando estos últimos 30 valores leídos (Baucke,1994).

## Objetivos de la automatización

- Desarrollar una aplicación que capture y procese en tiempo real la información de los distintos equipos que integran el sistema, dado que no existe un equipo automatizado para la realización de este proceso ni un software comercial disponible.
- Tomar datos entregados por el multímetro y por el termómetro cada 1 minuto por un periodo que puede durar hasta 6 horas.
- Lograr que la aplicación se detenga en forma autónoma cuando se cumplan las condiciones establecidas para el ensayo, lo que permite obtener los resultados sin participación del operador y, por ende, liberar el tiempo de operador y optimizar el tiempo de ensayo.
- Visualizar el perfil del gráfico según transcurre el ensayo.
- Permitir la exportación de resultados en formato hoja de cálculo para continuar el tratamiento a partir de los datos obtenidos sin transcripción.

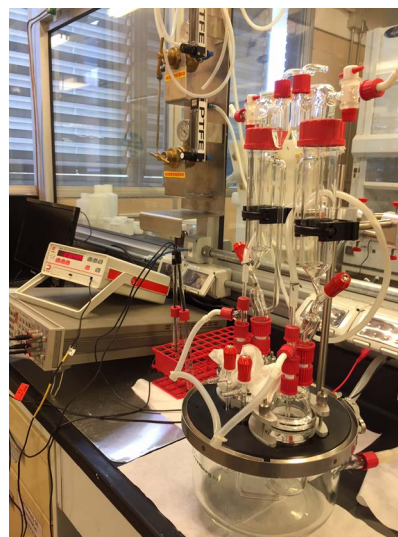


Figura 6. Sistema de medición de pH.

## Dificultades y soluciones encontradas

Para los equipos que utilizan conexión mediante tarjeta GPIB 488 se utilizó el componente desarrollado para la aplicación anterior. Otra dificultad que se evidenció es que el multímetro HP entrega ocasionalmente resultados truncados o sin signo, los que alteraban la valoración de las condiciones de estabilidad, extendiendo el tiempo de ensayo si se incluyen en el tratamiento. Para evitar resultados erróneos se desarrolló un algoritmo que evalúa la validez de estas lecturas a partir de la tendencia encontrada en lecturas anteriores, antes de su inclusión en la lista de resultados.

## Aplicación desarrollada

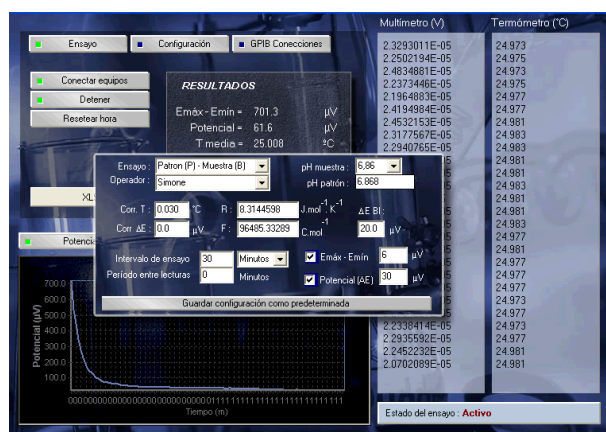


Figura 7. Interfaz del software para el Caso 4.

Para este ensayo se desarrolló un software que permite la toma automática de datos exhibiendo las lecturas en una tabla y un gráfico asociado. Estos valores son registrados en una base de datos temporal, de donde se calculan los resultados en base a las últimas 30 lecturas. Hasta que el software determine que se cumplieron las condiciones pre-determinadas para las últimas 30 lecturas, estos valores se actualizan cada 1 minuto, mostrando los resultados intermedios de Potencial vs Tiempo y Temperatura vs Tiempo en tiempo real en gráficos y tablas asociadas. Se dispuso un panel de configuración donde pueden editarse todos los parámetros de ensayo y otro para administración de la tarjeta GPIB del equipo. La aplicación detiene la toma de datos en forma automática, calculando los resultados de ensayo y permitiendo la exportación de datos y resultados en formato XLS.

## Discusión

Es pertinente aclarar que el desarrollo requiere en todos los casos una validación adecuada de las aplicaciones desarrolladas. Esta validación se realiza no solamente en todas las etapas del ciclo de vida del desarrollo, sino también en los resultados obtenidos a partir de los ensayos automatizados en procesos reales. Esto supone considerar el software y los instrumentos de medición como parte de un mismo proceso, de acuerdo a los requisitos de la mayoría de los documentos de referencia en validación de aplicaciones técnicas (Tasić, et al., 2006). Sin embargo, este aspecto no

se aborda aquí, sino que se evaluará el impacto de estas aplicaciones luego de que sean puestas en servicio, de acuerdo con los objetivos de este trabajo, en el entendido de que antes fueron debidamente validadas.

## Riesgo del tratamiento de datos

Se propone medir el riesgo por medio del número objetivo de acciones cognitivas realizadas por el operador (escribir valores a mano, transcribirlas a una hoja de cálculo, etcétera). Con la asistencia de la aplicación desarrollada se comparará este número para el proceso realizado con el número resultante del ensayo no automatizado. En este último caso se obtienen los resultados a partir de una hoja de cálculo previamente elaborada y validada. No se tienen en cuenta la elaboración de fórmulas, acciones lógicas ni el riesgo asociado al desarrollo, que puede considerarse equivalente en ambos casos.

Caso	Proceso	Riesgo (acciones cognitivas)		Mejora
		Ensayo manual	Software	
1	Caso 1. Bloques	156	8	95%
2	Caso 2. Tamices	360	0	100%
3	Caso 3. SPRT	>100	20	>80%
4	Caso 4. pH	>120	0	100%

Tabla 2. Evaluación de la reducción de riesgo en la toma de datos por ensayo.

## Tiempo de ensayo

Por tiempo se intenta representar el promedio de tiempo insumido presencialmente por el operador en la toma y tratamiento de datos hasta la obtención de los resultados, utilizando el mismo equipamiento, en los mismos períodos de estabilización, preparación de muestras y equipos, etcétera.

Caso	Proceso	Reducción de tiempo
1	Caso 1. Bloques	0%
2	Caso 2. Tamices	80%
3	Caso 3. SPRT	60% (vs software DOS) / >90% (vs op. manual)
4	Caso 4. pH	>90%

Tabla 3. Evaluación de la reducción de tiempo dedicado por el operador a la toma de datos.

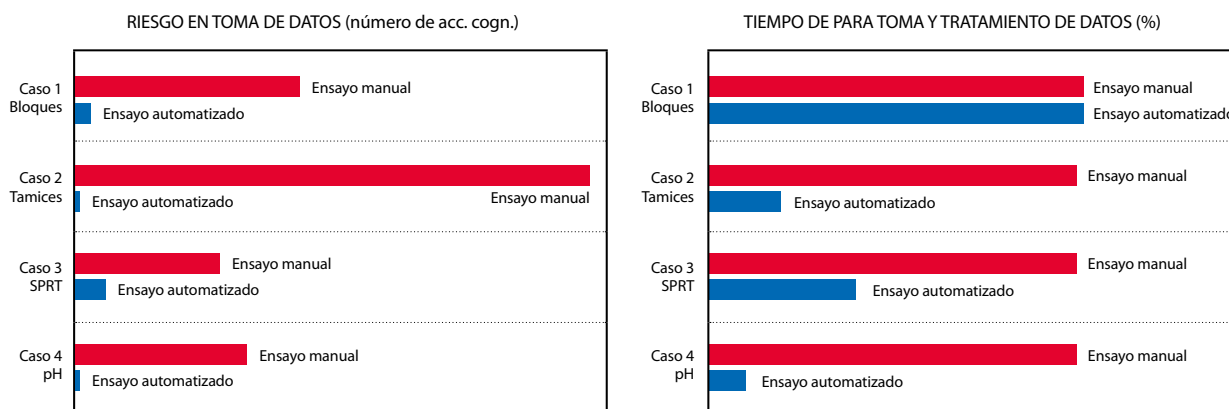


Figura 8. Reducción de riesgo y tiempo de toma de datos.

## Impacto en la precisión

El impacto en la precisión, de existir, refiere a mejoras objetivas respecto a la eliminación de aleatoriedad debida al operador. El único caso en que se encuentra una mejora objetiva en la precisión es en el de homogeneizar los períodos de estabilización en la calibración de bloques. Sin embargo, esta mejora presentó una influencia significativa en los resultados, ya que en la mayoría de los ensayos la estabilización se alcanza varios segundos antes del límite de tiempo. En los demás casos la automatización no evidenció mejoras en la precisión.

## Conclusiones

**Riesgo.** El trabajo técnico de rutina realizado en laboratorios no evalúa el número de acciones cognitivas inherentes a la toma de datos, sino solamente la calidad de ensayo, de modo que el concepto de riesgo asociado a la toma de datos no suele ser tenido en cuenta. En todos los casos estudiados el número de acciones cognitivas por ensayo manual es superior a 100. Este alto número de acciones de notación y transcripción por ensayo se ve multiplicado, además, por la demanda. Solo en el caso de termometría (Caso 3), se realizan anualmente más de 400 calibraciones en el LATU utilizando el software desarrollado. Teniendo en cuenta estos datos y a la luz de los estudios de Panko (2015), el número de errores esperado en ensayos manuales debe considerarse inadmisibles, más allá de costos y tiempo invertido en acciones correctivas por trabajo no conforme. Como se ve en la Tabla 2, la reducción del riesgo fue, en todos los casos, mayor que el 80%, por lo que, de acuerdo a los porcentajes de error humano manejados por Panko (2015), el riesgo de error humano para estos procesos podría considerarse nulo si se utiliza un software de automatización.

**Tiempo.** En el caso de la calibración de bloques el operador permanece operando los palpadores durante el ensayo, aunque no tome los datos manualmente, por lo que no se logró reducción alguna en el tiempo de operación. En este ensayo es posible extender este trabajo de automatización asociando la operación a actuadores electromecánicos programables, lo que reduciría casi totalmente la permanencia del operador frente al equipo. Exceptuando este primer caso, la reducción del tiempo dedicado por el operador en la toma de datos se reduce en más de 80%, por lo que también según este pa-

rámetro, la inversión en automatización debe considerarse como una solución de valor.

**Precisión.** El desarrollo de software de automatización no evidenció mejoras objetivas en cuanto a la precisión de los resultados para los casos estudiados.

**Plataforma.** El uso de un lenguaje de propósito general para el desarrollo de estos sistemas se encontró adecuado en todos los casos y permitió alcanzar todos los objetivos planteados por los responsables de los ensayos durante el desarrollo. Por otra parte, estas aplicaciones fueron desarrolladas trabajando conjuntamente con los responsables de los ensayos en todas las etapas, lo que permitió optimizar las aplicaciones con varias especificaciones puntuales a solicitud de los usuarios potenciales.

## Referencias

- ASTM International, 2004. ASTM E11: *Standard specification for woven wire test sieve cloth and test sieves*. Filadelfia: ASTM.
- Batagelj, V., Bojkovski, J. y Drnovšek, J., 2008. Software integration in national measurement-standards laboratories. En: *IET Sci. Meas. Technol.*, 2(2), pp.100-106.
- Baucke, F.G.K., 1994. Differential-potentiometric cell for the restandardization of pH reference materials. En: *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (368), pp. 67-75.
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP y OIML, 2008. *JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. s.l.: JCGM.
- International Organization for Standardization, 1998. *ISO 3650: Geometrical Product Specifications (GPS) -- Length standards -- Gauge blocks*. Ginebra: ISO.
- Panko, R., 2015. What we don't know about spreadsheet errors today: the facts, why we don't believe them, and what we need to do. En: *EuSpRIG. Proceedings of the EuSpRIG 2015 conference*. ISBN: 978-1-905404-52-0.
- Preston Thomas, H., 1990. The international temperature scale of 1990 (ITS-90). En: *Metrologia*, 27, pp.3-10.
- Tasić, T. y Grottkerb, U., 2006. An overview of guidance documents for software in metrological applications. En: *Journal Computer Standards & Interfaces Archive*, 28(3), pp.256-269.