

## Contaminantes orgánicos persistentes en plasma de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias

Camacho M<sup>1,3</sup>, Luzardo OP<sup>1\*</sup>, Orós J<sup>2</sup>, Calabuig P<sup>3</sup>, Zumbado M<sup>1</sup>, Pinós J<sup>3</sup>, Almeida González M<sup>1</sup>, Ruiz-Suárez N<sup>1</sup>, Rodríguez-Hernández A<sup>1</sup>, Sangil-Monroy M<sup>1</sup>, Henríquez-Hernández LA<sup>1</sup> y Boada LD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Toxicología. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Veterinaria/Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. <sup>2</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35416 Arucas. <sup>3</sup>Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira (Gran Canaria)

Recibido 2 de mayo de 2012 / Aceptado 29 de noviembre de 2012

**Resumen:** En el presente estudio se ha evaluado el grado de contaminación por contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011. La cuantificación en plasma de los niveles de pesticidas organoclorados (POCs), bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) se realizó mediante GC-MS. Todas las muestras analizadas presentaron niveles cuantificables de alguno de los COPs incluidos en el estudio. El grupo de COPs que presentó mayores niveles fue el de los PAHs (alcanzando la carga total de PAHs 6,45 ng/ml), siendo el fenantreno el hidrocarburo más frecuentemente detectado y a concentraciones más altas, lo que indica el origen petrogénico de estos contaminantes. La contaminación por PCBs alcanzó niveles menores (3,84 ng/ml), predominando el grupo de los hexaclorobifenilos (PCB-153 y PCB-138 principalmente). Los niveles de contaminación por POCs fueron también bajos alcanzando valores de 1,67 ng/ml, siendo el principal metabolito del DDT, *p*, *p'*-DDE el compuesto más frecuentemente detectado (89,6%) y a más altas concentraciones (0,68 ng/ml). Fue evidente una asociación inversa entre el tamaño de las tortugas y la carga de PCBs y PAHs. Asimismo existieron niveles más altos de contaminación por COPs en los años 2009 y 2010. Este trabajo evalúa por vez primera la presencia de PAHs en sangre de tortugas varadas y nuestros resultados parecen indicar que esta metodología y esta especie animal pueden ser muy útiles para monitorizar la presencia de contaminación por derivados del petróleo en el medio acuático.

**Palabras clave:** Tortuga boba, *Caretta caretta*, Islas Canarias, contaminantes orgánicos persistentes, pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos.

**Abstract:** Plasma levels of persistent organic pollutants in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands. This study assessed the degree of contamination by persistent organic pollutants (POPs) present in 193 specimens of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands between 2007-2011. Quantification of plasma levels of organochlorine pesticides (POCs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were performed by GC-MS. All samples tested showed measurable levels of several of the POPs included in the study. PAHs was the group that showed the highest levels (total burden of PAHs = 6.45 ng/ml), being phenanthrene the compound most frequently detected and at higher concentrations, indicating the petrogenic origin of these contaminants. PCBs contamination reached lower levels (3.84 ng/ml), dominating the group of hexachlorobiphenyls (PCB-153 and PCB-138 in particular). The pollution levels were also low in the subgroup of POCs, reaching values of 1.67 ng/ml, and being the main

metabolite of DDT, *p*, *p'*-DDE the compound most frequently detected (89.6%) and at highest concentrations (0.68 ng/ml). There was a clear inverse association between the size of the turtles and the burden of PCBs and PAHs. There were also higher levels of POPs in 2009 and 2010 than in the other years. This study evaluates for the first time the presence of PAHs in stranded turtles blood and our results suggest that this methodology and this animal species can be very useful for monitoring the presence of petroleum derivatives contamination in the aquatic environment.

**Keywords:** Loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, Canary Islands, persistent organic pollutants, organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons.

### Introducción

En la actualidad, las poblaciones de las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo se encuentran amenazadas o en peligro de extinción debido principalmente a causas antropogénicas: la pesca incidental, destrucción de hábitats y explotación directa sobre tortugas o huevos para consumo humano [1]. En este sentido, estudios realizados en las Islas Canarias [2,3], han puesto de manifiesto que casi un 70% de las tortugas varadas en estas islas murieron debido a lesiones asociadas con la actividad humana. Se ha de resaltar que, aunque en diferentes proporciones, cinco especies de tortugas marinas visitan el Archipiélago Canario, de las cuales, la tortuga boba (*Caretta caretta*) es la más abundante. Según los estudios genéticos de Monzón-Argüello y cols. [4], los ejemplares juveniles de tortuga boba presentes en aguas de las Islas Canarias proceden en su mayoría de la población del Sur de Florida (44-78%), procediendo el resto del Noreste de Florida – Carolina del Norte (7-26%), Cabo Verde (6-17%) y México (2-9%).

Entre los contaminantes ambientales más ubicuos y con mayores efectos perjudiciales para el medio ambiente, la fauna y las poblaciones humanas se encuentran los contaminantes orgánicos persistentes (COPs), que se caracterizan por su escasa degradación, capacidad para bioacumularse y por sus conocidos efectos carcinogénicos y como disruptores endocrinos y metabólicos [5,6]. De hecho, a pesar de que el uso y fabricación de la mayoría de los pesticidas organoclorados (POCs) y bifenilos policlorados (PCBs) fue prohibido en los años 1970-80, todavía hoy se siguen detectando en muestras humanas, animales o medioambientales [7,8]. Específicamente, las tortugas marinas, debido a su longevidad, movimientos migratorios y su posición en la cadena alimenticia, han sido sugeridas como buenos bioindicadores de la contaminación de los ecosistemas marinos [9,10]. En este contexto hemos de reseñar que los contaminantes organoclorados (POCs y PCBs) han sido detectados en tejidos de tortugas marinas de todo el mundo [9,11] y

\*e-mail: operez/dcc.ulpgc.es

que la contaminación química se postula como un gran factor de riesgo para la conservación de las diferentes especies de tortugas marinas. Es por ello que los estudios de monitorización de los niveles de contaminación de sustancias químicas se encuentran entre las 20 cuestiones prioritarias para la conservación de las tortugas marinas a nivel mundial [12].

Pese a la relevancia de las aguas de Canarias como hábitat de tortugas marinas y la necesidad de evaluar los niveles de contaminación en los ecosistemas marinos para preservar estas especies, los datos de los niveles de contaminación en tortugas de estas islas son muy escasos y estos proceden únicamente, de ejemplares de tortugas marinas varadas muertas [13-15]. Recientes estudios han demostrado la utilidad de la muestra sanguínea como muestra biológica no letal para el monitoreo de contaminantes ambientales en estos reptiles [9,17-19]. Además, se ha demostrado una buena correlación entre los niveles cuantificados en sangre y tejidos para la mayoría de los contaminantes medioambientales, sugiriéndose que las muestras sanguíneas permiten establecer buenas estimaciones del nivel de contaminación por contaminantes en tortugas marinas [9,19].

Con el fin de evaluar con exactitud los niveles de contaminación existentes en tortugas marinas que habitan las aguas canarias, hemos desarrollado el presente trabajo en el que cuantificamos los niveles de COPs en muestras de sangre procedentes de 193 ejemplares de tortugas juveniles (*Caretta caretta*) varadas vivas en las costas de nuestro Archipiélago.

## Material y métodos

### Toma de datos y muestreo

En el presente estudio se han empleado muestras procedentes de 193 ejemplares de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las costas de Islas Canarias durante los años 2007-2011 (2007, n = 41; 2008, n = 45; 2009, n = 46; 2010, n = 30; 2011, n = 31). Todos los animales muestreados ingresaron previamente en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira (Gran Canaria). La mayor parte de las tortugas ingresaron por razones de enmallamiento en redes de pesca (n = 130). En al menos ocho de los casos no se pudo determinar la causa de varamiento y en el resto de las tortugas las razones fueron variadas: anzuelo (n = 16), fractura de caparazón (n = 8), petróleo (n = 4), caquexia (n = 11), alteración de la flotabilidad (n = 7), problemas de piel (n = 6), ingestión de plásticos (n = 2) y mordida de tiburón (n = 1).

A todas las tortugas se les tomaron medidas de longitud curva del caparazón (LCC) y del peso. La media y desviación estándar de LCC y peso fue  $38,9 \pm 11,88$  cm y  $8,62 \pm 8,01$  kg, respectivamente. Todas las tortugas fueron clasificadas como juveniles o sub-adultas ya que la talla fue inferior a la determinada para adultas, según la clasificación de Bjondal y cols., que establece el punto de corte en 64 cms [16].

En este estudio, se tomó una muestra de sangre (6 ml) del seno venoso cervical que se conservó en tubos de heparina de litio, obteniéndose posteriormente plasma mediante centrifugación, que fue inmediatamente separado y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria.

### Contaminantes analizados

Un total de 52 COPs fueron analizados en este estudio, incluyendo:

- POCs: *p,p'*-DDT y sus metabolitos (*p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD); hexaclorobenceno (HCB); los cuatro isómeros de hexaclorociclohexano ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -HCH); ciclodienos (aldrina, endrina, dieldrina y heptacloro epóxido); isómeros -cis y -trans del clordano; endosulfán (isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - y endosulfan-sulfato); y mirex.

- PCBs: incluyendo aquellos considerados marcadores de contaminación ambiental por PCBs (*Markers-PCBs*; M-PCBs; congéneres #28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180) y los de efectos similares a las dioxinas (*dioxin-like PCBs*; DL-PCBs congéneres #77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189).

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), incluyendo aquellos considerados como prioritarios por la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de EEUU (U. S. EPA): naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo [a] antraceno, criseno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno, indeno [1,2,3,-c,d] pireno, dibenzo [a,h] antraceno y benzo [g,h] perileno.

### Preparación de las muestras y análisis cromatográfico

Las alícuotas de plasma fueron sometidas a una extracción en fase sólida y analizadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas usando los estándares internos (IS) adecuados. Se hizo la extracción de un mililitro de plasma que fue añadido a una columna de 200 mg (3 ml) Chromabond® C18ec, (Macherey-Nagel, Alemania) acoplada a un sistema de vacío (vacuum manifold, Waters Corporation, USA). La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: antes de la aplicación de la muestra, las columnas fueron acondicionadas con 3 ml de metanol y 3 ml de agua Milli-Q bajo vacío a un flujo de 1,5 ml/min. A continuación, las muestras pasaron a través de la columna mediante gravedad y tras esto, la columna fue lavada con 3 ml de agua al 5% de metanol. Después la columna fue secada mediante vacío durante 15 minutos. Los analitos de interés fueron recuperados de la columna con 2 eluidos de 2 ml de diclorometano cada uno. El disolvente fue evaporado bajo corriente de nitrógeno y los analitos recuperados se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de ciclohexano. Los extractos así obtenidos fueron utilizados para los análisis cromatográficos. Los porcentajes de recuperación de los analitos por este método fueron calculados a partir de muestras de plasma libre de contaminantes, a los que se añadió la mezcla de COPs incluidos en el estudio a 3 concentraciones 40, 10 y 0,25 ng/ml. La recuperación para todos los analitos osciló en el rango 89-107%.

Para los análisis cromatográficos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Thermo Trace GC Ultra – Thermo Quantum XLS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Como fase estacionaria se utilizó una columna capilar de sílice BPX5 (SGE Inc., USA) de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y un diámetro de partícula de 0,25  $\mu\text{m}$ . Como fase móvil se utilizó Helio (99,999%) a un flujo constante de 1.0 ml/min. Se desarrolló un método probando diferentes rampas de temperatura con el fin de lograr la mejor separación de los analitos. Usamos un programa de temperaturas y condiciones cromatográficas previamente optimizado en nuestro laboratorio para estos analitos [20]. El programa de temperaturas que mejor separación permitió fue el siguiente: Temperatura inicial del horno de  $60^{\circ}\text{C}$  mantenida durante 1 min, aumentando a  $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $210^{\circ}\text{C}$  y entonces, a  $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$  mantenida durante 5 minutos. El tiempo total del cromatograma fue de 54 min. Tanto el inyector como la línea de transferencia fueron fijados a  $270^{\circ}\text{C}$  y  $310^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

Los estándares y las muestras fueron inyectados (1µl) en modo de válvulas cerradas.

Para la detección por espectrometría de masas de los 52 COPs se modificó un método en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) desarrollado previamente en nuestro laboratorio [21]. Los tiempos de retención de cada analito se determinaron cromatografiando por separado el espectro completo (rango  $m/z$  45-650). A partir de este cromatograma se seleccionaron los iones precursores de cada uno de ellos y en experimentos independientes se determinó su patrón de fragmentación ( $m/z$  de los fragmentos, energías de colisión y abundancia relativa). Se construyó una recta de calibración externa de 0,05 a 100 ng/ml con todos los compuestos en cada punto de la recta. Como gas de colisión se utilizó argón (99,99%) con una presión de 1,5 mTorr en la celda de colisión. Las condiciones de trabajo del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) fueron las siguientes: la ionización se llevó a cabo con una energía de impacto electrónico de 70 eV en MRM con una corriente de emisión de 50 µA y a una temperatura en la fuente de ionización de 220°C. Para prevenir dañar el filamento, se fijó un retraso de 5 minutos en el encendido del mismo. El voltaje del multiplicador se fijó en 1500 V y el intervalo de reposo entre reacciones se fijó automáticamente mediante el algoritmo SRM del software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La precisión de los cuadrupolos 1 y 3 se fijó en  $m/z$  0,7 Da (Q1 y Q3).

El límite de cuantificación (LC) del método fue determinado como la concentración del analito que produjo una señal diez veces superior a la señal ruido de fondo del cromatograma. La cuantificación se basó en el área del pico generado por el analito.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (PASW Statistics v 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Debido a que las variables POCs, PCBs y PAHs no seguían una distribución normal, en los resultados se muestran la mediana y el rango (valores máximo y mínimo) además de la media y la desviación estándar de todas las muestras analizadas. Asimismo se muestra el porcentaje de muestras en que se detectó cada contaminante o grupo de contaminantes. Las diferencias entre la concentración de contaminantes y los diferentes grupos (años y causas de ingreso) fueron analizadas con el test no paramétrico Kruskal-Wallis. La correlación de las concentraciones de contaminantes con variables continuas se analizó mediante el test de correlación de Spearman. Valores de  $P$  menores de 0,05 (dos colas) se consideraron como estadísticamente significativos.

## Resultados y discusión

Tal y como se expone en las tablas 1, 2 y 3, la práctica totalidad de las muestras analizadas presentaron residuos de PCBs y PAHs, y la mayoría también presentaron residuos de POCs (95%).

Con respecto a los POCs, se ha de reseñar que el 94,8% de las muestras analizadas mostraron niveles de algún tipo de pesticida clorado. En cualquier caso, de los 18 POCs incluidos en el estudio sólo cinco presentaron concentraciones superiores al límite de detección (HCB, HCH-β,  $p,p'$ -DDD,  $p,p'$ -DDE y dieldrin). De entre ellos el  $p,p'$ -DDE fue el más frecuentemente detectado (89,6%) y el que alcanzó los mayores niveles ( $0,68 \pm 1,15$  ng/ml). Estos resultados coinciden con lo previamente publicado, ya que otros autores

también han descrito al  $p,p'$ -DDE como el pesticida que se encuentra en mayores concentraciones en tortugas marinas, con independencia de la especie y de la zona geográfica estudiada [9,22-25].

**Tabla 1.** Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de pesticidas organoclorados (POCs) en 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011

Variable	Media $\pm$ SD	Mediana (rango)	% Detección
HCB	0,35 $\pm$ 0,46	0,18 (0,00-3,51)	68,9
HCH-β	0,01 $\pm$ 0,049	0,00 (0,00-0,32)	13,5
DDE	0,68 $\pm$ 1,15	0,28 (0,00-8,94)	89,6
DDD	0,002 $\pm$ 0,01	0,00 (0,00-0,06)	6,7
Dieldrin	0,65 $\pm$ 1,60	0,00 (0,00-8,14)	23,8
ΣDDTs	0,67 $\pm$ 1,15	0,30 (0,00-8,94)	89,6
ΣPesticidas	1,67 $\pm$ 2,46	0,77 (0,00-15,10)	94,8

Los siguientes pesticidas se encontraron por debajo del límite de detección:  $p,p'$ -DDT,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -HCH, aldrina, endrina, heptacloro epóxido, clordano (isómeros -cis y -trans), endosulfán (isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ ), endosulfan-sulfato y mirex.

**Tabla 2.** Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de bifenilos policlorados (PCBs)

Variable	Media $\pm$ SD	Mediana (rango)	% Detección
PCB-28	0,34 $\pm$ 0,29	0,22 (0,00-1,24)	88,6
PCB-52	0,04 $\pm$ 0,05	0,01 (0,00-0,27)	46,6
PCB-77	0,001 $\pm$ 0,005	0,00 (0,00-0,05)	6,7
PCB-81	0,003 $\pm$ 0,011	0,00 (0,00-0,08)	10,9
PCB-101	0,003 $\pm$ 0,014	0,00 (0,00-0,12)	10,9
PCB-105	0,002 $\pm$ 0,01	0,00 (0,00-0,09)	4,1
PCB-114	0,004 $\pm$ 0,03	0,00 (0,00-0,34)	4,7
PCB-118	0,13 $\pm$ 0,27	0,05 (0,00-3,10)	65,8
PCB-123	0,005 $\pm$ 0,02	0,00 (0,00-0,2)	11,9
PCB-126	0,006 $\pm$ 0,02	0,00 (0,00-0,22)	10,9
PCB-138	1,74 $\pm$ 2,43	0,83 (0,00-14,01)	93,8
PCB-153	1,01 $\pm$ 2,04	0,40 (0,00-22,55)	93,8
PCB-156	0,01 $\pm$ 0,04	0,00 (0,00-0,38)	11,9
PCB-157	0,02 $\pm$ 0,04	0,00 (0,00-0,20)	30,6
PCB-167	0,006 $\pm$ 0,02	0,00 (0,00-0,14)	17,6
PCB-169	0,001 $\pm$ 0,006	0,00 (0,00-0,06)	3,6
PCB-180	0,57 $\pm$ 1,12	0,20 (0,00-12,01)	88,6
PCB-189	ND	ND	-
ΣM-PCBs	3,30 $\pm$ 4,64	1,78 (0,05-40,70)	100
ΣDL-PCBs	0,18 $\pm$ 0,32	0,09 (0,00-3,61)	81,9
ΣPCBs	3,84 $\pm$ 5,65	2,03 (0,05-53,23)	100

ND = no detectado

**Tabla 3.** Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

Variable	Media ± SD	Mediana (rango)	% Detección
Naftaleno	1,6 ± 2,00	1,63 (0,00-10,29)	53,9
Acenafteno	0,02 ± 0,11	0,00 (0,00-0,92)	6,7
Fluoreno	0,11 ± 0,32	0,00 (0,00-1,73)	17,1
Antraceno	0,01 ± 0,15	0,00 (0,00- 2,10)	3,1
Fenantreno	3,65 ± 3,57	3,10 (0,00-23,45)	93,3
Fluorantreno	0,03 ± 0,17	0,00 (0,00-1,61)	6,7
Pireno	0,05 ± 0,21	0,00 (0,00-1,52)	16,1
Benzo [a] antraceno	0,004 ± 0,01	0,00 (0,00-0,07)	18,7
Criseno	0,003 ± 0,008	0,00 (0,00-0,05)	10,9
Indeno [1,2,3-c,d] pireno	0,0001 ± 0,0007	0,00 (0,00-0,01)	0,5
Dibenz [a,h] antraceno	0,0007 ± 0,004	0,00 (0,00-0,04)	3,1
ΣPAHs	6,45 ± 4,97	5,5 (0,01-29,46)	99,5

Los siguientes PAHs se encontraron por debajo del límite de detección: acenaftileno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno y benzo [g,h] perileno.

En relación a los PCBs, es de destacar que todos los animales incluidos en el estudio mostraron niveles detectables de este grupo de contaminantes. Mientras que el PCB-189 no fue detectado en ninguna de las muestras estudiadas, los congéneres 153 y 138 fueron detectados en más del 90% de las muestras. La frecuencia de detección de los distintos congéneres fue la siguiente (ordenada de mayor a menor): PCB-153 y PCB-138 > PCB-180 y PCB-28 > PCB-118 > PCB-52 > PCB-157 > PCB-167. El resto de congéneres incluidos en el estudio fueron detectados en menos del 15% de las muestras. Por lo tanto, y de la misma manera que estudios anteriores en tejidos de tortuga bobas [14,26,27], las muestras sanguíneas estuvieron claramente dominadas por el grupo de los hexaclorobifenilos (97,9%). Es de recalcar, por la relevancia que tienen los M-PCBs como “marcadores” de contaminación ambiental por PCBs que estos se detectaron en el 100% de las muestras, mientras que los DL-PCBs, aunque fueron detectados en un porcentaje alto de las muestras (81,9%), no estuvieron presentes en todas las muestras analizadas.

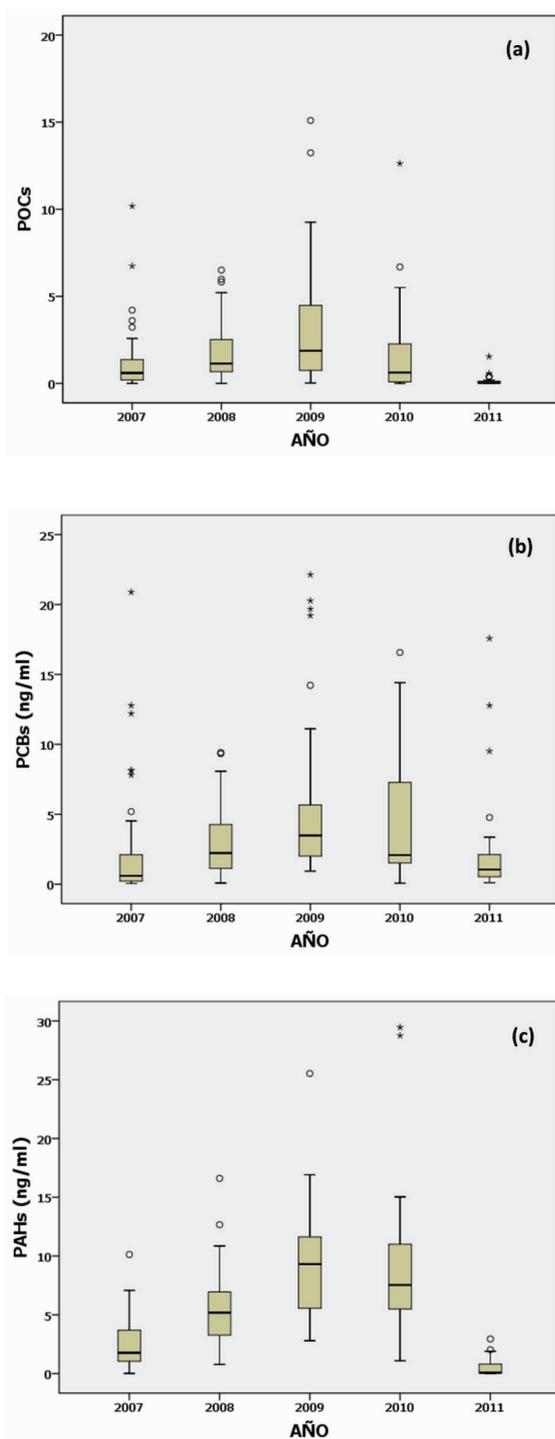
Se ha de reseñar que entre todos los COPs analizados, fueron los PAHs los que presentaron mayores concentraciones (6,45 ± 4,97 ng/ml) y que este estudio es el primero en describir datos de contaminación por PAHs en tortugas marinas vivas a partir de muestras de sangre. Las escasas publicaciones que han evaluado los niveles de PAHs en tortugas, lo han hecho a través del análisis de tejidos [28]. De las 193 muestras de tortugas analizadas en el presente estudio, 192 presentaron niveles detectables de PAHs. El fenantreno fue el contaminante más frecuentemente detectado y en concentraciones más altas que el resto de hidrocarburos. Sin embargo, acenaftileno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno y benzo [g, h, i] perileno no fueron detectados en ninguna de las muestras. Debido a que el fenantreno es uno de los principales componentes del petróleo y que nuestros resultados confirman que en las tortugas estudiadas predominan los PAHs con tres y dos anillos (94,8 y 53,9%) sobre los PAHs con cuatro y cinco anillos (39,9 y 0%), podemos sugerir el origen petrogénico de estos contaminantes. Aunque el fenantreno es considerado relativamente menos tóxico que el benzo [a] pireno (no detectable en ninguna muestra), se ha de hacer constar los potenciales efectos perjudiciales del mismo (debido a la ubicua distribución de este compuesto en

ambientes acuáticos y a su tendencia a acumularse en los organismos).

Ha de señalarse la existencia de asociaciones negativas entre el tamaño de los animales varados (LCC) y las concentraciones de PCBs. Así, los congéneres 28 ( $r = -0,17, p < 0,05$ ), 118 ( $r = -0,18, p < 0,05$ ), 138 ( $r = -0,17, p < 0,05$ ), 153 ( $r = -0,30, p < 0,001$ ) y 180 ( $r = -0,24, p < 0,01$ ) y, como consecuencia, la carga de PCBs marcadores (ΣM-PCBs;  $r = -0,24, p < 0,01$ ), de dioxin-like-PCBs (ΣDL-PCBs;  $r = -0,25, p < 0,01$ ) y la carga total de PCBs (ΣPCBs;  $r = -0,23, p < 0,01$ ), mostraron una relación inversa con el tamaño del animal. Por lo tanto, las tortugas de pequeño tamaño presentaron mayores niveles de contaminación por PCBs que las grandes. Este llamativo resultado, también previamente observado por otros autores [9,22], es de difícil explicación. Una posibilidad es que estos menores niveles en tortugas grandes sean debidos al efecto diluyente del crecimiento debido al mayor acumulo de estas sustancias en estadios tempranos del desarrollo y a exposiciones menores después en la fase nerítica. Sin embargo, otros estudios han observado una correlación positiva entre la talla y concentraciones de contaminantes clorados [29], sugiriendo que el crecimiento juega un importante papel en la concentración de contaminantes orgánicos persistentes a lo largo de su ciclo de vida. Por tanto, nuestro hallazgo es difícil de explicar y ha de ser investigado en profundidad en futuros trabajos.

Por otra parte, también se observaron asociaciones inversas entre la talla y concentraciones de PAHs: acenafteno ( $r = -0,19, p < 0,01$ ), fenantreno ( $r = -0,19, p < 0,01$ ), benzo [a] antraceno ( $r = 0,22, p < 0,01$ ) y ΣPAHs ( $r = -0,17, p < 0,05$ ). Mientras que otros contaminantes orgánicos sufren procesos de bioacumulación conforme mayor es el nivel en el que se encuentran en la cadena alimenticia (siendo los mamíferos los que presentan mayores niveles), los PAHs pueden ser metabolizados y, por lo tanto, es generalmente asumido que la biomagnificación en organismos acuáticos y en la cadena alimenticia marina es insignificante [30,31].

Un llamativo resultado de este trabajo lo constituye la similar tendencia temporal en los tres grupos de contaminantes estudiados, observándose diferencias significativas entre los años de estudio y los diferentes grupos de contaminantes (KW-test,  $p < 0,001$ ). Así, las muestras de tortugas marinas varadas en los años 2007 y 2011 fueron las que menor concentración de contaminantes mostraron, mientras que los niveles en sangre de ΣPOCs, ΣPCBs y ΣPAHs fueron mayores en las tortugas varadas en el 2009 y 2010. Esta tendencia temporal queda claramente puesta de manifiesto en las figuras (1a-c), donde se muestra la mediana de la distribución y su variabilidad (representados con círculos y asteriscos). Hemos omitido un valor muy extremo en la figura 1b (año 2009) coincidente con el valor máximo de la carga total de PCBs (53,23 ng/ml). Aunque existen escasos estudios que hayan analizado la tendencia temporal de POCs y PCBs [27], diferencias temporales entre los niveles de PAHs han sido más profundamente estudiados en ecosistemas marinos después de descargas accidentales de petróleo [32-34]. No obstante, es importante hacer notar que, aunque recientemente no ha habido accidentes petrolíferos en aguas del Archipiélago, existe, debido a la situación geográfica de las islas, un importante tráfico marítimo de buques petroleros lo que podría explicar tanto la variabilidad temporal como los elevados niveles de contaminación por PAHs (fenantreno, especialmente).



**Figura 1.** Tendencia temporal de la presencia de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en plasma de 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011 (a) ΣPOCs; (b) ΣPCBs; (c) ΣPAHs

En cualquier caso, debido al hecho de que los niveles de COPs en sangre pueden sufrir fluctuaciones durante la movilización grasa [9], debiera tenerse cuidado con la interpretación de los resultados obtenidos a partir de muestras sanguíneas y el estudio entre los distintos años y los niveles de contaminación, ya que una pérdida de peso por enfermedad o trauma (como puede ocurrir en tortugas

varadas) lleva a movilización de la grasa y el consecuente incremento de los niveles sanguíneos de contaminantes liposolubles (como es el caso de POCs y PCBs). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre los niveles totales de contaminación y las distintas causas de ingreso.

En conclusión, podemos afirmar que este estudio demuestra que la muestra de sangre tomada a tortugas marinas vivas es una muestra adecuada para llevar a cabo estudios de monitorización por COPs (incluyendo PAHs) por lo que puede emplearse en estudios de control de ecosistemas marinos en caso de vertido de petróleo.

## Agradecimientos

El presente estudio se ha realizado gracias a la colaboración del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Cabildo de Gran Canaria), a todo su equipo y a numerosos estudiantes en prácticas durante el período de muestreo. Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto PI2007/044, Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Gobierno de Canarias. El primer autor realiza su tesis doctoral con una beca de la Consejería de Educación, Cabildo de Gran Canaria (B.O.P. nº 168 de 31-12-08).

## Bibliografía

1. Lutcavage EM, Pamle P, Witherington CMF, Lutz PL (1996) Human impacts on sea turtle survival. En: PL L (ed) The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 387-408.
2. Orós J, Torrent A, Calabuig P, Deniz S (2005) Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Dis Aquat Org* 63:13-24.
3. Orós J, Arencibia A, Monagas P (2012) Anthropogenic causes of mortality of sea turtles in the Canary Islands: a multidisciplinary approach to the conservation of endangered sea turtles. En: Cosgrove MJ RS (ed) Turtles: anatomy, ecology and conservation. Nova Science Publishers, Nueva York, EE.UU.
4. Monzón-Argüello C, Rico C, Carreras C, Calabuig P, Marco A, López-Jurado LF (2009) Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 373:79-86.
5. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384.
6. Crain DA, Guillette LJ, Jr. (1998) Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim Reprod Sci* 53:77-86.
7. D'Ilio S, Mattei D, Blasi MF, Alimonti A, Bogianni S (2011) The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): an overview. *Mar Pollut Bull* 62:1606-1615
8. Peterle TJ (1991) *Wildlife Toxicology*. Van Nostrand Reinhold, New York, EE.UU.
9. Keller JM, Kucklick JR, McClellan-Green PD (2004) Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:254-264.
10. Lazar B, Maslov L, Romanic SH, Gracan R, Krauthacker B,

- Holcer D, Tvrtkovic N (2011) Accumulation of organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere* 82:121-129.
11. Pugh RS, Becker PR (2001) *Sea Turtle Contaminants: A Review and Annotated Bibliography*. Diane Pub. Co., EE.UU.
  12. Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjorndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan SKF, Coyne MS, Crowder LB, Diez CE, Dutton PH, Epperly SP, FitzSimmons NN, Formia A, Girondot M, Hays GC, Cheng IJ, Kaska Y, Lewison R, Mortimer JA, Nichols WJ, Reina RD, Shanker K, Spotila JR, Tomás J, Wallace BP, Work TM, Zbinden J, Godley BJ (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endang Species Res* 11:245-269.
  13. Monagas P, Oros J, Arana J, Gonzalez-Diaz OM (2008) Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 56:1949-1952.
  14. Oros J, Gonzalez-Diaz OM, Monagas P (2009) High levels of polychlorinated biphenyls in tissues of Atlantic turtles stranded in the Canary Islands, Spain. *Chemosphere* 74:473-478.
  15. Torrent A, Gonzalez-Diaz OM, Monagas P, Oros J (2004) Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 49:854-860.
  16. Bjorndal KA, Bolten AB, Martins HR (2000) Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Mar Ecol Prog Ser* 202:265-272.
  17. Ley-Quinonez C, Zavala-Norzagaray AA, Espinosa-Carreón TL, Peckham H, Marquez-Herrera C, Campos-Villegas L, Aguirre AA (2011) Baseline heavy metals and metalloid values in blood of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. *Mar Pollut Bull* 62:1979-1983.
  18. Swarthout RF, Keller JM, Peden-Adams M, Landry AM, Fair PA, Kucklick JR (2010) Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere* 78:731-741.
  19. van de Merwe JP, Hodge M, Olszowy HA, Whittier JM, Lee SY (2010) Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Mar Pollut Bull* 60:579-588.
  20. Luzardo OP, Mahtani V, Troyano JM, Alvarez de la Rosa M, Padilla-Pérez A, Zumbado M, Almeida M, Burillo-Putze G, Boada C, Boada LD (2009) Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environ Res* 109:607-613.
  21. Camacho M, Boada LD, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Luzardo OP (2012) Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Mar Pollut Bull* 64:1974-1980.
  22. McKenzie C, Godley BJ, Furness RW, Wells DE (1999) Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. *Mar Environ Res* 47:117-135.
  23. Perugini M, Giammarino A, Olivieri V, Guccione S, Lai OR, Amorena M (2006) Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticide levels in tissues of *Caretta caretta* from the Adriatic Sea. *Dis Aquat Org* 71:155-161.
  24. Storelli MM, Barone G, Marcotrigiano GO (2007) Polychlorinated biphenyls and other chlorinated organic contaminants in the tissues of Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Sci Total Environ* 373:456-463.
  25. Storelli MM, Marcotrigiano GO (2000) Chlorobiphenyls, HCB, and organochlorine pesticides in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimens beached along the Adriatic Sea, Italy. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:481-488.
  26. Miao XS, Balazs GH, Murakawa SK, Li QX (2001) Congener-specific profile and toxicity assessment of PCBs in green turtles (*Chelonia mydas*) from the Hawaiian Islands. *Sci Total Environ* 281:247-253.
  27. Richardson KL, Lopez Castro M, Gardner SC, Schlenk D (2010) Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the Baja California Peninsula of Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:183-193.
  28. Godley BJ, Gaywood MJ, Law RJ, MacCarthy CJ, McKenzie C, Patterson IAP, Penrose RS, Reid J, Ross HM (1998) Patterns of marine turtle mortality in British waters (1992-1996) with reference to tissue contaminants levels. *J Mar Biol Ass UK* 78:973-984.
  29. Ragland JM, Arendt MD, Kucklick JR, Keller JM (2011) Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Environ Toxicol Chem* 30:1549-1556.
  30. Nakata H, Sakai Y, Miyawaki T, Takemura A (2003) Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake Sea, Japan. *Environ Sci Technol* 37:3513-3521.
  31. Perugini M, Visciano P, Manera M, Turno G, Lucisano A, Amorena M (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Gulf of Naples, Tyrrhenian Sea. *J Agric Food Chem* 55:2049-2054.
  32. Marsili L, Caruso A, Fossi MC, Zanardelli M, Politi E, Focardi S (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere* 44:147-154.
  33. Pérez C, Velando A, Munilla I, López-Alonso M, Oro D (2008) Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the marine environment after the Prestige oil spill by means of seabird blood analysis. *Environ Sci Technol* 42:707-713.
  34. Soriano JA, Vinas L, Franco MA, Gonzalez JJ, Ortiz L, Bayona JM, Albaiges J (2006) Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Sci Total Environ* 370:80-90.