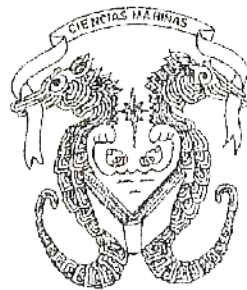
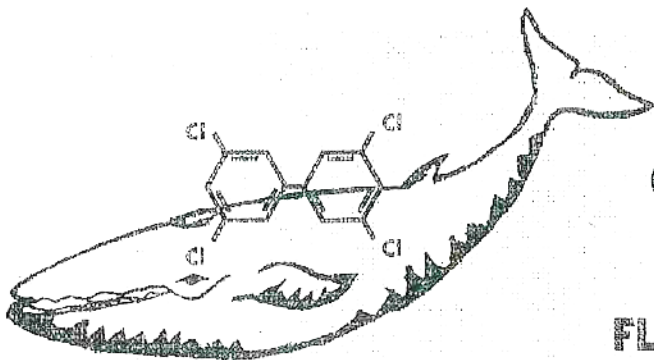


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**DETERMINACION DE HIDROCARBUROS CLORADOS
EN TEJIDO ADIPOSO SUBCUTANEO DE CETACEOS
PRESERVADO EN DIMETIL SULFOXIDO**



TESIS
que para obtener
el Titulo de
OCEANOLOGO
presenta

**FLOR ELISA DEL ROSARIO
ARCEGA CABRERA**

Ensenada, B.C., Diciembre de 1996

RESUMEN:

Los estudios realizados sobre la concentración de compuestos organoclorados (HCs), entre los que se encuentran los bifenilos policlorados (BPCs) y pesticidas, en tejido adiposo subcutáneo de cetáceos (TAS), hasta el presente, han sido llevados a cabo en muestras de animales encontrados muertos, preservadas por congelación. El presente trabajo determina la posibilidad del uso de muestras de TAS preservadas en dimetil sulfóxido (DMSO), para la identificación y cuantificación de HCs, con el fin de obtener información sobre las condiciones de las poblaciones vivas de estos organismos.

Se hizo un diseño experimental en el cual se utilizó TAS de *Phocoena sinus*, para simular el TAS de ballena, mediante la fortificación con estándares de BPCs y pesticidas.

Este tejido "contaminado", fué preservado en DMSO y submuestreado a diferentes tiempos para observar la variaciones de la concentración de los analitos presentes, y con esto poder determinar si existía algún tipo de interacción entre los compuestos y el medio de preservación.

Con los resultados obtenidos se comprobó que la concentración de los BPCs y pesticidas permaneció estable a través del tiempo, y las variaciones observadas se atribuyen a errores analíticos.

También para comprobar la utilidad de este método, se analizaron muestras de *Phocoena sinus*, *Balaenoptera physallus*, *B. musculus* y *B. edeni*. Los intervalos de concentración encontrados para el p-p' DDT y sus metabolitos varían entre 0.84 µg/g y 13.89 µg/g. No se encontraron BPCs en ninguna de las muestras analizadas.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

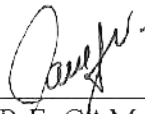
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

DETERMINACION DE HIDROCARBUROS CLORADOS EN TEJIDO ADIPOSEO
SUBCUTANEO DE CETACEOS PRESERVADO EN DIMETIL SULFOXIDO.

TESIS DE LICENCIATURA

PRESENTA

FLOR ELISA ARCEGA CABRERA



DR. VICTOR F. CAMACHO IBAR
DIRECTOR DE TESIS



M.C. IRMA SORIA MERCADO
SINODAL



DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ
SINODAL

ENSENADA, B. C., DICIEMBRE DE 1996.

DEDICATORIAS:

A la persona que me enseñó a amar la vida tomando tanto lo bueno como lo malo, haciendo de todos esos pequeños momentos de felicidad grandes recuerdos llenos de amor, a ti mi abuelita, descanza en paz que ninguno de tus nietos te va a defraudar.

A ti mami, por tu increíble fortaleza y constancia, por tu infinita paciencia y amor, pero sobre todo por creer en mí y enseñarme que todo en esta vida es posible si se tiene el valor y la fuerza para intentarlo.

A ti papá por tu alegría y tu amistad, y por darme la lección más valiosa de todas, los errores que uno comete así como las decisiones que uno toma deben enfrentarse sabiendo sobrellevar las consecuencias que traigan, o el inmenso dolor que pudieran ocasionar. Golpe que no mata fortalece, no?.

A ti manito por toda esa ternura que cargas contigo, por tu bondad y por tu lealtad hacia los tuyos. Por enseñarme que todo es del color del cristal con que se mira, y que no importa que nuestros cristales casi nunca coincidan de todas maneras siempre me querrás.

A ti madrina por tu incondicional amor, por tus constantes cuidados y por enseñarme el inmenso valor del sacrificio.

A toda mi familia que durante mi estancia aquí me apoyó y que siempre ha estado conmigo en todas mis locuras.

Y a tí Sammy ... por siempre.

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Autónoma de Baja California por la formación impartida durante éstos años.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitir llevar a cabo el presente trabajo en sus instalaciones.

Al M.C. Jorge Urban de la la Universidad Autónoma de Baja California Sur y a la M.C. Diane Gendron del CICIMAR-IPN por las muestras de ballena donadas.

Al Dr. Lorenzo Rojas por su ayuda en la obtención de las muestras de *Phocoena sinus* y su apoyo durante el desarrollo del trabajo.

A mi queridísimo jefe Dr. Victor Camacho-Ibar, gracias por tu paciencia y tu tiempo, y por permitirme formar parte del selectísimo “ Dream team ” del I.I.O.

A mis sinodales M.C. Irma Soria y Dr. Jorge de la Rosa por su apoyo y consejos para la realización de éste trabajo.

Al M.C. Julio Villaescusa por tu inapreciable amistad y apoyo, por todos tus consejos, pero sobre todo por tu cariño y tu comprensión.

Al Dr. Vinicio Macías Zamora por todas sus enseñanzas, y por todos los momentos de carrilla sana en el equipo de Química.

A la M.C. Lorena Ríos y al M.C. Martín Hernández por sus consejos, jaladas de oreja, coffe breaks, etc., pero sobre todo por su amistad y precioso tiempo.

A la M.C. Chelo Valle por su apoyo, consejos, ayuda, tiempo y amistad.

Al M.C. Salvador Galindo por su amistad y todo el tiempo robado en su computadora, muchísimas gracias.

A todos los integrantes del “Dream team” de Geoquímica, Isabel, Jorge P., Angel, Mamey, Pedro, Lalo, Sergio, Capi, Beto, Leslie, Jorge, y especial y objetivamente al Dr. José Carriquiry.

A todos esos amigos que han enriquecido mi existencia con la suya propia, Banano, Claudia, Tiara, Citlali, Juan Carlos, Leo, Raúl, Memo, César, Aidé, Nayeli y fam., Karla y fam., Melyssa y fam., Edmundo, Cynthia, Dalila, Carlos (Lulú), Octavio (Cherry), Tomás, Gabriel, Miguel, Rodolfo y fam., Fernando, Jorge, Ricardo, Alejandra, Ivón, Carmen (donde estés), Horacio, Baiza, Jesús, Lolita, Cristian, Yoyo, Carlos G., Carlos C., Victor, Francisca, Carlos (Chiquilín), Ruly, Tex, Enrique I., Héctor L., Nariz, Toño, Walter, Chofa,

Lupilla, Yan, Yunuen, Jaime, Ana, Natalie, Gaby, Vaca, Hugo, Maricel, Rana, Charro, Güera, Kuanti, Adrian y Claudia.

Así también agradezco a los profesores: Dieguez, Dora, Canino, Bustos, Ballesteros, B.C., Graciela y Ana Maria, los mejores de la Facultad.

Un agradecimiento muy especial a la familia Samaniego, a los Bochitos y Soco, al Sr. Cipriano y fam., Loncho, Felipe, Chiquitica e Irma. Gracias por su apoyo.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	14
HIPOTESIS	15
OBJETIVO	16
MATERIALES Y METODO	17
RESULTADOS	23
DISCUSIONES	37
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Estructura de un bifenilo policlorado.	2
2	Numeración de los átomos de carbono de un BPC.	2
2	Posición de los átomos de carbono de un BPC.	2
4	Estructuras del a)p-p' DDT y sus metabolitos b)p-p' DDE y c)p-p' DDD; del d) lindano y del e)heptacloro.	5
5	Estructura del DMSO.	6
6	Diagrama de flujo del protocolo analítico del experimento.	22
7	Cromatograma típico obtenido de: a)blanco de muestra, b)estándar de BPCs y c)estándar de pesticidas.	24
8	Concentración promedio vs.tiempo en el homogenado preservado en DMSO de: a)BPCs y b)pesticidas.	31
9	Concentración vs.tiempo en el homogenado congelado de: a)BPCs y b)pesticidas.	32
10	Concentración vs.tiempo del homogenado preservado en DMSO y del congelado de: a) γ -BHC, b)BPC 28, c)heptacloro, d)BPC 52, e)BPC 103, f)BPC 101, g)p-p' DDE y h)BPC 77.	33
11	Concentración vs.tiempo del homogenado preservado en DMSO y el congelado de: a)BPC 118, b)p-p' DDD, c)BPC 153, d)p-p' DDT, e)BPC 138, f)BPC 180 y g)BPC 198.	34
12	Concentración en $\mu\text{g/g}$ de: a) <i>Phocoena sinus</i> y b)especímenes #2, 4, 5, 32, 20, 30, 66, 67 y 69 de ballena.	35
13	Cromatogramas típicos obtenidos de: a) <i>Phocoena sinus</i> y b)especimen #32.	36
14	Concentraciones normalizadas vs.triplicados en el tiempo del homogenado preservado en DMSO para: a)BPCs y b)pesticidas.	42
15	Concentraciones normalizadas del homogenado congelado de: a)BPCs y b)pesticidas.	44

LISTA DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1	Fórmula, número de posibles congéneres, porcentajes de cloración, numeración de acuerdo a la IUPAC y peso molecular para las 10 clases isoméricas de bifenilos policlorados.	3
2	Concentración final de los compuestos en la solución fortificadora (pg/ μ l) y en el homogenado del TAS de <i>Phocoena sinus</i> (μ g/g).	18
3	Número clave, descripción y tiempo de análisis de las muestras de <i>Phocoena sinus</i> .	19
4	Temperatura, pausa isotérmica, velocidad y tiempo de las rampas utilizadas para el análisis cromatográfico.	21
5	Curva de calibración de los compuestos de la solución fortificadora.	21
6	Concentraciones, promedios (X) y desviación estándar (δ) de los BPCs en el homogenado preservado en DMSO.	25
7	Concentraciones, promedios (X) y desviación estándar (δ) de los pesticidas en el homogenado preservado en DMSO.	26
8	Coefficientes de variación, porcentajes de recuperación y desviación estándar del homogenado preservado en DMSO.	26
9	Concentraciones y desviaciones estándar (δ) del homogenado congelado.	27
10	Coefficientes de variación y porcentajes de recuperación de los HCs en el homogenado congelado.	28
11	Concentraciones promedio vs. tiempo del homogenado preservado en DMSO y el congelado.	29
12	Concentraciones de los compuestos encontrados en TAS de ballena preservado en DMSO.	30
13	Resultados de los análisis estadísticos con las pruebas de homogeneidad de varianza, ANOVA y Tuckey (D.S.H.) con los datos de T21 y T28, y sin ellos.	37
14	Concentraciones normalizadas de los pesticidas en el homogenado preservado en DMSO.	40
15	Concentraciones normalizadas de BPCs en el homogenado preservado en DMSO.	41
16	Concentración normalizada del homogenado congelado para BPCs y pesticidas.	43

INTRODUCCION:

Existe una gran cantidad de compuestos que por sus características fisicoquímicas presentan grandes ventajas para usos industriales, siendo estas mismas las que los hacen peligrosos para la biota.

Estos compuestos antropogénicos han cobrado gran relevancia en los últimos años debido a sus efectos biológicos (Tanabe y Tatsukawa, 1984; Tanabe *et al.*, 1987; Tanabe, 1988; Ballschmitter *et al.*, 1989; Hooper *et al.*, 1989; Gilbertson, 1989; Aguilar y Borrel, 1991; Tanabe *et al.*, 1993). Entre éstos compuestos se encuentran los hidrocarburos clorados cuyos efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos, y su comprobada bioacumulación los convierte en un problema mundial. Este problema exige un mayor estudio para poder prevenir los efectos que se pudiesen ocasionar a futuro, o bien, solucionar los problemas actuales (Tanabe, 1988; Hooper *et al.*, 1989; Oliver *et al.*, 1989; Gilbertson 1989).

Los hidrocarburos clorados (HCs) son compuestos orgánicos sintéticos que se pueden clasificar en dos grupos principales, los organoclorados industriales y los pesticidas, ambos con un uso a nivel mundial importante (Oliver *et al.*, 1989; Hooper *et al.*, 1989).

Entre los organoclorados industriales se encuentran los bifenilos policlorados (BPCs), cuya molécula esta constituida por anillos bifenilicos con 10 posibles sitios de sustitución (Fig. 1). Las moléculas de bifenilo específicamente cloradas se describen usando el numero de la posición en el anillo, por ejemplo, 2,3-diclorobifenil, o con la posición meta, orto y para (Fig. 2) (Ghirelli *et al.*, 1983). Existen diferentes bifenilos que van del mono al deca clorado, con un total de 209 posibles congéneres (Ghirelli *et al.*, 1983). Para mayor facilidad, los congéneres individuales son indicados por su número sistemático de la IUPAC (Tabla 1) (Voogt y Brinkman, 1989).

Los BPCs fueron sintetizados por vez primera en 1881 por Schmidt y Schulz, pero su comercialización se dió a partir de 1921 (Ghirelli *et al.*, 1983; Boon y Duinker, 1986; Tanabe, 1988; Oliver *et al.*, 1989).

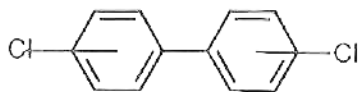


Fig. 1

Fig. 1 Estructura de un bifenilo policlorado.

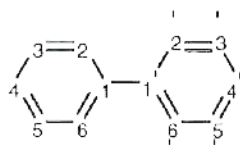


Fig. 2a

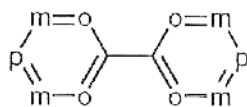


Fig. 2b

Fig. 2 a) Numeración de los átomos de carbono de un BPC y
 b) Posición de los átomos de carbono de un BPC.

Tabla 1. Fórmula, número de posibles congéneres, porcentaje de cloración, numeración de acuerdo a la IUPAC y peso molecular para las 10 clases isoméricas de bifenilos policlorados (Tomada de Ghirelli *et al.*, 1983; y Voogt y Brinkman, 1989).

Clorobifenilo	Fórmula empírica	#congéneres	% de cloro	Numeración IUPAC	Peso molecular
Bifenilo	$C_{12}H_{10}$	1	0		
Monoclorobifenilo	$C_{12}H_9Cl$	3	18.79	1-3	188.65
Diclorobifenilo	$C_{12}H_8Cl_2$	12	31.77	4-15	233.10
Triclorobifenilo	$C_{12}H_7Cl_3$	24	41.30	16-39	257.54
Tetraclorobifenilo	$C_{12}H_6Cl_4$	42	48.56	40-81	291.99
Pentaclorobifenilo	$C_{12}H_5Cl_5$	46	54.30	82-127	326.43
Hexaclorobifenilo	$C_{12}H_4Cl_6$	42	58.93	128-169	360.88
Heptaclorobifenilo	$C_{12}H_3Cl_7$	24	62.77	170-193	395.32
Octaclorobifenilo	$C_{12}H_2Cl_8$	12	65.98	194-205	429.77
Nonaclorobifenilo	$C_{12}HCl_9$	3	68.73	206-208	464.21
Decaclorobifenilo	$C_{12}Cl_{10}$	1	71.18	209	498.66

Estos se produjeron en varios países industrializados como Estados Unidos, Francia, Inglaterra, etc., bajo diferentes nombres como Aroclor, Clophen, Kanechlor, Askarel, etc. (Ghirelli *et al.*, 1983; Voogt y Brinkman, 1989). Entre los BPCs comerciales mas conocidos se encuentran los Aroclor, estos han sido designados para facilitar su manejo con cuatro cifras, donde las dos primeras son 12 e indican el número de carbonos en el esqueleto del bifenilo, y las dos restantes indican el grado de cloración de la mezcla. En general la toxicidad de éstos aumenta con su grado de cloración. La producción, desde 1929, en Estados Unidos, y en países de la Comunidad Europea como España, Inglaterra y Francia, entre otros, ha sido de aproximadamente un millón de toneladas métricas, pero esta fué prohibida y su uso designado únicamente a sistemas cerrados, en 1973 por Estados Unidos y en 1976 por la CE, así también, se dictaron normas para su desecho y destrucción (Voogt y Brinkman, 1989).

Muchos pesticidas son hidrocarburos de alto peso molecular que tienen como característica principal una toxicidad exclusiva, es decir, son tóxicos específicos que atacan al organismo objetivo, y teóricamente no presentan efectos importantes en otros organismos (Metcalf, 1990; Clark, 1992). Debido a esto son clasificados como insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc.

Los insecticidas, a su vez, se clasifican en organofosforados, carbamatos y organoclorados. Dentro de estos últimos se incluye al DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) que consta de dos isómeros de difícil separación el o-p DDT y el p-p' DDT; y dos metabolitos, el p-p'DDE (dicloro-difenil-etano) y el p-p'DDD (dicloro-difenil-dicloroetano); también se encuentran dentro de esta clasificación el HCB (hexacloruro benceno), el heptacloro y los ciclodienos aldrín, dieldrín y endrín. (Metcalf, 1990; Clark, 1992; Rios, 1994).

El DDT (Fig. 3a), fue sintetizado por Zeidler en 1874, pero sus propiedades insecticidas no fueron descubiertas hasta 1939 por Müller (Metcalf, 1990; Clark, 1992). Fue llamado el pesticida ideal ya que es extremadamente tóxico para los insectos que lo absorben a través de la cutícula, pero muy poco tóxico para otros animales. Es muy persistente, con un tiempo de vida medio en el suelo de 10 años.

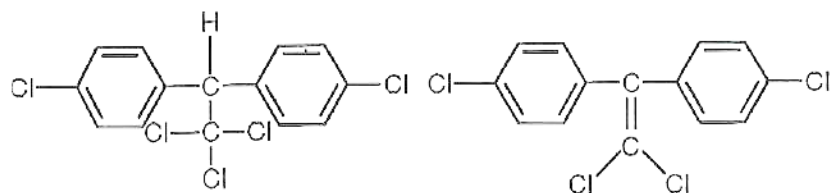


Fig. 3a

Fig. 3b

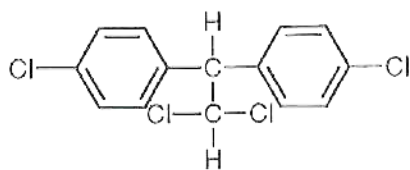


Fig. 3c

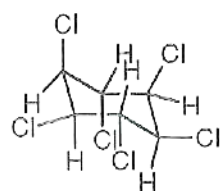


Fig. 3d

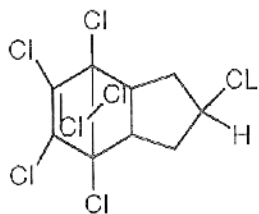


Fig. 3e

Fig. 3 Estructuras del a) p-p' DDT b) p-p' DDE c) p-p' DDD d) Lindano y e) heptacloro

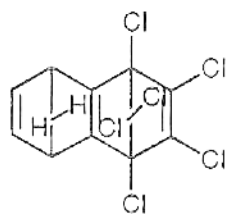


Fig. 4a

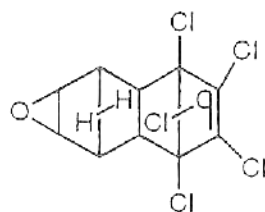


Fig. 4b

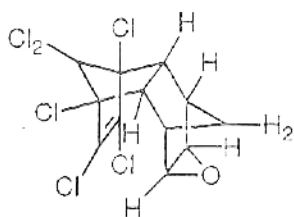


Fig. 4c

Fig. 4 Estructuras del a) aldrín, b) dieldrín, c) endrín

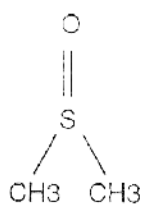


Fig. 5 Estructura del DMSO.

Sus propiedades insecticidas se mantienen por un largo período, siendo el más perdurable de los insecticidas de contacto. El DDE (Fig. 3b) es un metabolito del DDT y se produce cuando un átomo de cloro del grupo CCl_3 se pierde, es decir es dehidroclorado. Se considera que el DDE presente en la biota es resultado de la degradación del DDT y no de producción humana (Metcalf, 1990; Clark, 1992;). El DDD (Fig. 3c) también es producido por la dehidrocloración del grupo CCl_3 de la molécula del DDT (Metcalf, 1990).

El 1,2,3,4,5,6-hexaclorobenceno, fué sintetizado por primera vez en 1825 por Faraday, pero sus propiedades insecticidas no fueron descubiertas hasta 1940. El heptacloro (Fig. 3e) ó 1,4,5,6,7,8,8'-heptacloro-3',4,7,7'-tetrahidro-4,7 metanoindeno es otro pesticida altamente tóxico. El aldrín (Fig. 4a) ó 1,2,3,4,10,10'-hexacloro-6,7-epoxy-1,4,4',5,6,7,8,8'-octahidro-1,4-endo exo-5,8 dimetanonaftaleno es la molécula padre del dieldrín (Fig. 4b), el uso de ambos se dió a partir de 1948. El endrín (4c) ó 1,2,3,4,10,10'-hexacloro-6,7-epoxy 1,4,4',5,6,7,8,8'-octahidro-1,4-endo endo-5,8 dimetanonaftaleno es el endo-endo isómero del dieldrín y difiere en el arreglo espacial de sus dos anillos (Metcalf, 1990).

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS HCs:

Los BPCs poseen una naturaleza no polar, baja constante dieléctrica, baja inflamabilidad, punto de ebullición alto, baja presión de vapor a temperatura ambiente, una relación viscosidad-temperatura alta, alta lipofiliidad, hidrofobicidad y potencial de bioacumulación. Su fuerte electronegatividad, debida a los cloros, suprime la reactividad normal del esqueleto de carbonos con lo cual se estabiliza la molécula, dando como resultado un fluido resistente al calor y de estabilidad duradera (Ghirelli *et al.*, 1983; Boon y Duinker, 1986; Voogt y Brinkman, 1989; Hooper *et al.*, 1989). Por su estructura, son altamente hidrofóbicos con constantes de solubilidad que van de 7×10^{-3} a $.02 \mu\text{g/l}$, las cuales disminuyen con el incremento del número de cloros en la molécula, por lo que son lipofílicos, y se disuelven en sustancias no polares, grasas y aceites.

Para estimar su hidrofobicidad/lipoficiidad se utiliza el coeficiente de distribución n-octanol/agua o $\log_{10} K_{ow}$ (Boon y Duinker, 1986; Hooper *et al.*, 1989; Ballschmiter *et al.*, 1989) y sus valores van de 4.5 para los monoclorados a 8.1 para heptaclorados. Estos

valores tan altos indican la preferencia de los BPCs por los lípidos y las superficies e interfases (Hooper *et al.*, 1989). Los BPCs son casi inertes a la mayoría de las reacciones químicas excepto bajo condiciones extremas, no sufren oxidación, reducción, adición, eliminación o sustitución electrofílica (Ghirelli *et al.*, 1983), también son estables a la hidrólisis, pero algunos congéneres son fácilmente fotodegradados bajo condiciones de laboratorio (Hutzinger *et al.*, 1974 en Ballschmiter *et al.*, 1989).

Al igual que los BPCs, los insecticidas organoclorados son moléculas no polares virtualmente insolubles en agua (0.00001% de solubilidad), por lo tanto altamente hidrofóbicas. Son altamente lipofílicos y se adsorben fuertemente a las partículas. Son solubles en solventes orgánicos, poseen baja presión de vapor, y son resistentes a la fotodegradación y a la oxidación, pero son degradados por álcalis y ácidos fuertes (Metcalf, 1990; Clark, 1992); su concentración de saturación es de 1 ppb (Clark, 1992).

USOS DE LOS HCs:

Los BPCs fueron utilizados en dos tipos de sistemas, los abiertos, prohibidos desde 1973 por Estados Unidos y la CE, y los cerrados permitidos actualmente. En sistemas abiertos se usaron en: plastificadores, papel termosensitivo, lubricantes, tintas, agentes laminantes, impregnantes, pinturas, adhesivos, ceras, aditivos en cementos y pastas, líquidos sellantes, retardantes de flama, barnices, preservadores y protectores de plásticos, cubrimientos contra agua, estuco, tintas y aceites de inmersión. En los sistemas cerrados se incluyen: refrigerantes en transformadores, líquidos dieléctricos en capacitores grandes y pequeños, fluidos conductores de calor en intercambiadores caloríficos, líquidos hidráulicos resistentes al fuego, calor o corrosión en equipo minero, bombas de vacío, y electromagnetos (Ghirelli *et al.*, 1983; Oliver *et al.*, 1989; Voogt y Brinkman, 1989; Hooper *et al.*, 1989).

Los insecticidas organoclorados como su nombre lo indica han sido utilizados en el control sistemático de plagas para obtener mayores beneficios económicos (Rios, 1994). En países como Estados Unidos y Europa fueron utilizados ampliamente, hasta que su

toxicidad para otros organismos fue descubierta en 1960. En general, los insecticidas organoclorados actúan sobre organismos específicos para cada tipo de insecticida.

TOXICOLOGIA Y FARMACOCINETICA:

Los BPCs y los insecticidas organoclorados son los químicos más estudiados a nivel mundial en cuanto a contaminación ambiental y toxicología (Tanabe, 1988). Ya que tienen como cualidad principal ser altamente lipofílicos, tienden a adsorberse a las partículas, las interfases, superficies y tejidos lipídicos de los animales (Ghirelli *et al.*, 1983). Su acumulación por bacterias y fitoplancton da como resultado su introducción a la cadena alimenticia, biomagnificándose a la par de su ascenso (Hooper *et al.*, 1989). Aunque durante los últimos 23 años ha habido un decremento dramático en el uso de estos compuestos, actualmente los podemos encontrar en el ambiente a nivel mundial (Tanabe y Tatsukawa, 1984; Tanabe, 1988, Borrel y Aguilar, 1993). La primera indicación de la persistencia de estos compuestos fué dada por Sorén Jensen en 1960 (Oliver *et al.*, 1989). Los niveles no tóxicos de los compuestos organoclorados de acuerdo con el State Water Resources Control Board de Estados Unidos son: tejido de pez 0.5 ppm, sedimento 1 ppm, efluentes 1 ppb, y agua ambiental 15 ppt. (Ghirelli *et al.*, 1983)

Los niveles no tóxicos para mamíferos marinos no han sido dados debido a la poca viabilidad de realizar pruebas de toxicidad en ellos, pero se ha detectado que niveles de 100 µg/g o menos en algunos casos pueden producir condiciones patológicas (UNEP, 1991).

Existen cuatro rutas principales de transferencia de los organoclorados al ambiente, la volatilización seguida por la adsorción en partículas, transporte aéreo y eventual depositación; fugas en los depósitos de almacenamiento o desecho; adsorción en sedimentos y transporte a los ríos y sedimentación en el mar (Oliver *et al.*, 1989). Los organismos absorben a los compuestos organoclorados debido a sus cualidades hidrofóbicas y lipofílicas. Estas varían significativamente dependiendo del órgano o tejido del organismo que los almacene, así como de la especie (Ghirelli *et al.*, 1983). La bioacumulación es afectada por el coeficiente de distribución del compuesto, el nivel trófico, los mecanismos

de alimentación del organismo, el área de superficie y tamaño del organismo así como el contenido lipídico del mismo (Ghirelli *et al.*, 1983).

El grado en que un isómero es acumulado o excretado depende de su susceptibilidad al metabolismo, el cual disminuye con su grado de cloración. El mayor lugar de oxidación metabólica es el hígado, y las rutas de excreción principales son la bilis (en heces) y la orina. La eliminación puede ocurrir en forma del compuesto padre o de su metabolito; en la mayoría de los casos los metabolitos son menos hidrofóbicos pero también pueden ser más tóxicos (Boon y Duinker, 1986). La farmacocinética del isómero es afectada no solo por el grado de cloración del anillo, sino también por la localización de los átomos de cloro en el mismo (Ghirelli *et al.*, 1983). Los compuestos organoclorados se concentran inicialmente en la sangre, el hígado y el músculo, sin embargo, el almacenamiento a largo plazo en el caso de los mamíferos marinos se da en el tejido adiposo subcutáneo (TAS) y la piel. Esto representa un serio problema para los organismos ya que éstos tienen muy poca capacidad para metabolizarlos, y ninguna para aquellos congéneres de BPCs sustituidos en las posiciones meta y para, por lo que los compuestos permanecen en el organismo y pueden ser transmitidos a las nuevas generaciones a través de la placenta y la leche (Calambokidis, 1988; Tanabe *et al.*, 1993)

Niveles altos de estos compuestos (>100mg/kg) han sido detectados en el TAS de diversos mamíferos marinos, siendo asociados con anomalías reproductivas y síndromes de enfermedades complejas (UNEP, 1991), entre las cuales se encuentran: enfermedades dermales, cambios mutagénicos, teratogénicos, alteraciones en las hormonas sexuales, fetotoxicidad, alteración de los ciclos reproductivos, fallo en la implantación, absorción espontánea del producto, bajo peso en el recién nacido, poca supervivencia post-natal, y son considerados como precursores de formaciones cancerígenas (Ghirelli *et al.*, 1983; Calambokidis, 1988; Gilbertson, 1989; Hall *et al.*, 1992). También interfieren con el sistema de inmunización ya que inducen la actividad de la enzima microsomal en el hígado, lo cual interrumpe la estero-idogénesis o el catabolismo de los esteroides (UNEP, 1991).

DESCRIPCION DEL TEJIDO ADIPOSEO SUBCUTANEO DE CETACEOS:

El TAS de los cetáceos es un tejido heterogéneo que cubre el cuerpo del cetáceo y sirve como depósito de energía de reserva y cubierta aislante. Tiene un contenido de 8.9 a 77.4% de lípidos totales, 3.1 a 33.8% de proteínas y 0.07 a 0.73% de cenizas en peso húmedo. La distribución diferencial de lípidos, proteínas y agua contribuyen a la boyancia y estabilidad, variando la gravedad específica en el tejido. El mayor contenido de lípidos en el organismo se encuentra en la parte dorsal posterior (Lockyer *et al.*, 1984).

El TAS está compuesto de varias capas o estratos con diferentes funciones y composición bioquímica; las capas internas son para el almacenamiento de grasa y su contenido lipídico varía de acuerdo al ciclo migratorio y reproductivo de cada animal. Las capas externas sirven como aislante y son poco afectadas por los cambios en las condiciones nutritivas. El contenido lipídico decrece de la capa externa hacia la interna.

Los lípidos del TAS contienen *ca.* 60% triacilglicerol, y *ca.* 25-30% de ácidos grasos libres (Lockyer *et al.*, 1984; Aguilar y Borrel 1991). En las capas internas predominan los ácidos grasos de cadena corta, y en la capa externa los de cadena larga (Lockyer *et al.*, 1984).

La afinidad de los BPC's y pesticidas no es idéntica para todas las formas lipídicas, ambos son más afines a las cadenas cortas, por lo que los compuestos inicialmente depositados en el TAS son transferidos de y hacia la sangre en mecanismos de depositación/movilización (Aguilar y Borrel 1991).

DIMETIL SULFOXIDO, TECNICA Y USO:

El dimetil sulfóxido (DMSO) (Fig. 5), es utilizado para preservar tejidos en ausencia de refrigeración, ya que es un compuesto que incrementa la permeabilidad celular permitiendo la penetración del preservador en la muestra. Ha sido utilizado en el análisis de ADN en la piel de ballena, ya que el método requiere de muy poco tejido y éste es obtenido mediante dardos de biopsia que no penetran todo el TAS, pero colectan pequeñas piezas de

la capa superficial, entre ellas la piel, que es uno de los tejidos menos susceptibles a la autólisis, de fácil acceso y relativamente rica en ADN (Amos y Hoezel 1991; Aguilar y Borrel 1991).

El TAS colectado junto con la piel, generalmente no es utilizado para otros estudios, sin embargo, éste puede ser utilizado en el análisis de hidrocarburos clorados si se comprueba que éstos permanecen en el tejido, y que no presentan interacción alguna con la solución. Esto permitiría poseer un stock de muestras que proporcionara información acerca de las condiciones actuales de las poblaciones de mamíferos marinos con respecto a éstos tóxicos en una forma cuantitativa. Así también, se podría realizar un análisis sobre cual ha sido el comportamiento de los BPCs e insecticidas organoclorados en el tiempo, ya que se podrían analizar muestras preservadas tiempo atrás obteniendo sus concentraciones y sus variaciones hasta el momento actual y así observando si éstas han disminuido o si ha habido nuevos aportes de estos compuestos.

Hasta ahora, la solución en agua de DMSO saturada al 20% con NaCl no ha sido investigada para su uso en la detección de HCs, es decir, es necesario el presente estudio para saber si los BPCs e insecticidas pueden ser identificados y cuantificados en el TAS de cetáceos. Esto se lograría al comprobarse que no existe interacción alguna de los HCs con el medio de preservación, es decir, que no existe escape de los compuestos hacia el medio y/o destrucción de las moléculas por el mismo, y que las concentraciones encontradas son reales.

CROMATOGRAFIA DE GASES DE ALTA RESOLUCION:

La cromatografía de gases ha permitido desde hace 40 años la medición de diversos compuestos contaminantes en el medio ambiente, tales como los HCs.

La cromatografía de gases tiene como objetivo la separación de compuestos a partir de una matriz compleja la cual puede ser sedimento, tejido, etc.; esto se logra mediante una pre-limpieza de la muestra hasta la obtención de un concentrado puro, el cual es inyectado al sistema cromatográfico. Este sistema es en esencia muy sencillo y consta de: a)inyector, b)horno, c)columna, d)detector y e)procesador de señal o integrador.

De manera general, los inyectores pueden ser: splitless (inyección directa o sin separación), split-splitless (inyección sin y con separación), on-column (en la columna o en frío), y de desadsorción térmica. En el horno el control de la temperatura es lo más importante, e incluso existen hornos que poseen baños maría con agua o aceite para un control más fino de la temperatura. La columna es donde se efectúa la separación de los compuestos, entre ellas tenemos empacadas, PLOT, WCOT y SCOT. El detector es el que recibe la señal de la molécula al emerger de la columna siendo selectivos y universales, y finalmente el integrador captura y almacena la señal (Guichon y Guillemi, 1988).

El uso de el cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (CG-DCE), de acuerdo con Vidal *et al.* (1992) es un método adecuado para la determinación de BPCs y pesticidas con un mínimo de interferencia, utilizando los tiempos relativos de retención, con lo que se puede identificar un pico individual. Esto es importante ya que la composición de las mezclas ambientales entre los tipos de muestras, y las de productos comerciales con diferentes grados de cloración, difieren entre sí, por lo que la información de congéneres individuales es necesaria (Schulz *et al.*, 1989).

ANTECEDENTES:

Los estudios realizados sobre las concentraciones y el potencial tóxico de los hidrocarburos clorados en mamíferos marinos, especialmente cetáceos, se han incrementado en los últimos años. Algunas revisiones sobre el tema se encuentran en Tanabe y Tatsukawa (1984), Tanabe *et al.* (1987), Tanabe (1988), Gilbertson (1989), Tanabe *et al.* (1991); Aguilar y Borrel (1991); y Kannan *et al.* (1993). En general las concentraciones reportadas en cetáceos de otras partes del mundo tienen intervalos de concentración de 0.05µg/g a 833 µg/g para BPCs y de 0.19µg/g a 335µg/g de DDT total (Tanabe y Tatsukawa, 1984; Tanabe, 1988; Kannan *et al.*, 1993 y Kleivane *et al.*, 1995).

A pesar de que en los últimos años ha habido un decremento dramático en el uso de los HCs, éstos siguen siendo detectados en animales de todo el mundo, incluyendo las zonas polares (Tanabe y Tatsukawa, 1984; Tanabe, 1988; Becker y Muir, 1995; Gilbertson, 1989).

Típicamente, en los estudios de contaminación por HCs se han preservado los tejidos en congelación, siendo el riesgo de contaminación de la muestra significativo así como su degradación, al no ser conservadas más que por la acción de la baja temperatura (Boon y Duinker, 1986). La técnica de preservación del DMSO sólo ha sido utilizada para la preservación de la piel en estudios genéticos del ADN en mamíferos, entre ellos cetáceos (Amos y Hoetzl, 1991). El potencial de información que se obtendría del stock de muestras acumulado sería enorme y contribuiría al conocimiento de la situación actual y del comportamiento a través de los años de los BPCs e insecticidas organoclorados.

Los estudios realizados hasta ahora en organismos de las especies utilizadas en el presente trabajo son los siguientes: en *Phocoena sinus* Calambokidis (1988); reportó concentraciones de BPCs de 200 ppb, de p-p' DDT de 50 a 1000 ppb, de p-p' DDE de 530 a 7500 ppb siendo éste el único compuesto hallado en los ocho animales que analizó.

En *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera musculus* y *Balaenoptera edeni* del Golfo de California no existen datos reportados de hidrocarburos clorados.

HIPOTESIS:

1) Debido a la hidrofobicidad y estabilidad química de los hidrocarburos clorados, éstos deben permanecer en el tejido adiposo subcutáneo de cetáceo preservado en dimetil sulfóxido (DMSO). La transferencia de hidrocarburos clorados del tejido adiposo hacia la solución polar de DMSO debe ser mínima o nula.

2) Ya que la presencia de los hidrocarburos clorados es mundial y debido a su gran lipofilia se espera detectar algunos de ellos en las muestras de tejido adiposo subcutáneo de *Phocoena sinus*, y en las muestras preservadas en DMSO de *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera musculus*, y *Balaenoptera edeni*.

OBJETIVO GENERAL:

Identificación y cuantificación de hidrocarburos clorados en tejido adiposo subcutáneo de cetáceos preservado en dimetil sulfóxido.

OBJETIVO PARTICULAR:

Determinar si las muestras de tejido adiposo subcutáneo de cetáceos preservado en DMSO sirven para la identificación y cuantificación de hidrocarburos clorados, mediante la estandarización del método con tejido adiposo subcutáneo de *Phocoena sinus*, y comparándolo con el método tradicional de preservado por congelación.

Identificar y cuantificar el contenido de bifenilos policlorados e insecticidas organoclorados presentes en el tejido adiposo subcutáneo de *Phocoena sinus*, y en muestras preservadas en DMSO de *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera musculus* y *Balaenoptera edeni*.

MATERIALES Y METODO:

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Para probar la hipótesis 1, se diseñó un experimento en el cual, para simular el TAS de ballena, se utilizó TAS de *Phocoena sinus* obtenido de un organismo donado al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) conservado en congelación a -20° C. El tejido de *Phocoena sinus* se utilizó ya que se contaba con una cantidad suficiente del mismo para realizar los ensayos de estandarización del método. Las muestras fueron disectadas de la parte dorsal superior cercana a la aleta mediante pequeños cortes con bisturí de ca. 2 cm de largo por 2 cm de ancho por 1 cm de profundidad con un peso total, incluyendo piel, de 4 g. Estas fueron almacenadas en papel aluminio previamente limpiado con acetona y hexano (B&J Baxter alta pureza grado pesticida) y mantenidas en congelación a -20° C. La piel de las muestras de *Phocoena sinus* fue separada, el tejido adiposo fue homogenizado y extraído en Soxhlet con acetona:hexano 1:1 con un volumen total de 120 ml por 12 hrs con 6 ciclos/hr. El extracto fue concentrado con columnas Snyder, en baño maría a $40-50^{\circ}$ C, hasta ca. 10 ml, transferido a un tubo graduado y concentrado con flujo de nitrógeno UAP (ultra alta pureza) a $40-50^{\circ}$ C hasta sequedad. El concentrado obtenido fue almacenado en viales de 2 ml y congelado a -20° C. El extracto lipídico se fortificó con una mezcla de HC's (Tabla 2) para obtener un homogenado contaminado con una concentración conocida. Los estándares de BPC's utilizados para dicha fortificación fueron los congéneres puros (Ultra Scientific RPC), recomendados por el International Council for the Exploration of the Seas (ICES). Estos congéneres son: 28, 52, 101, 118, 138, 153, y 180, y el congéner individual del BPC 77 (Ultra Scientific RPC). Para pesticidas se utilizó una matriz (Pesticide matrix Spiking solution Ultra Scientific CLP-206) con los siguientes compuestos p-p' DDT, γ -BHC, heptacloro, endrín, aldrín y dieldrín. Se agregaron también los isómeros individuales de p-p' DDE (Reference Standard EPA) y p-p' DDD (Reference Standard EPA), y como estándar de recuperación los congéneres de BPC's 103 (2,2',4,5',6-pentaclorobifenilo ULTRA Scientific RPC-040S) y 198 (2,2',3,3',4,5,5',6-octaclorobifenilo Ultra Scientific SPC-

075S). Al concentrado de *Phocoena sinus* (3g) se le agregaron: 720 µl de la mezcla de ICES, 200 µl del isómero p-p' DDD, 180 µl del isómero p-p'DDE y 180 µl de la matriz de pesticidas, quedando las concentraciones finales indicadas en la Tabla 2.

Se adicionó DMSO a un total de 21 submuestras del homogenado, de *ca.* 50 mg cada una, para simular la preservación durante diferentes periodos. Para cada período se incluyó una muestra fortificada pero no preservada en DMSO, sino congelada, esto para poder observar si las variaciones eran debidas a alguna posible reacción de los HCs con el DMSO. También se analizó una muestra no fortificada ni preservada con el fin de conocer los HCs presentes naturalmente en la muestra y su concentración (Tabla 3).

Para probar la hipótesis 2, se utilizaron muestras de *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera musculus* y *Balaenoptera edeni*, donadas por la M.C Diane Gendron, Investigadora del CICIMAR-IPN, y por el M.C. Jorge Urban de la U.A.B.C.S. Estas fueron obtenidas mediante dardos de biopsia y almacenadas en viales de 30 ml en una solución de DMSO en agua saturada con NaCl al 20%.

METODO ANALITICO:

La extracción, identificación y cuantificación de los hidrocarburos clorados se hizo de acuerdo al método de Wade y Cantillo (1994), con algunas modificaciones.

Todo el material de vidrio utilizado fué lavado con jabón Micro al 2% y agua desionizada y calentado por 4 hrs a 30⁰ C., enjuagado con agua desionizada y quemado a 400⁰ C por 4 hrs en la mufla. El material antes de ser utilizado es lavado con acetona y hexano.

Purificación y análisis de las muestras:

El método utilizado para la purificación de las muestras se resume en la Fig. 6. Para cada una de las submuestras se tomaron *ca.* 50 mg. del extracto y se colocaron en un vial de 30 ml a los cuales se les agregó 25 ml de la mezcla de DMSO previamente

Tabla 2. Concentración final de los compuestos en la solución fortificadora (ng/μl) y en el homogenado del TAS de *Phocoena sinus* (μg/g)

COMPUESTO	CONCENTRACION [ng/μl]	CONCENTRACION (μg/g)
γ- BHC	50	3
BPC 28	12.6	3.04
HEPTACLORO	50	3
BPC 52	17.4	4.18
BPC 103 *	200	4
BPC 101	13.2	3.18
p-p' DDE	148	8.88
BPC 77	11.08	2.66
BPC 118	13.3	3.21
p-p' DDD	108	7.20
BPC 153	12.7	3.06
p-p' DDT	100	6
BPC 138	17.7	4.27
BPC 180	14.3	3.44
BPC 198 *	120	2.4

* Estándar de recuperación.

Tabla 3. Número clave, descripción y tiempo de análisis de las muestras de *Phocoena sinus*.

NUMERO CLAVE	DESCRIPCION	TIEMPO
1. 1,2,3,	No fortificada+E.R.	
2. 0,1,2,3,4,5,6,7	Fortificada+E.R.sin DMSO	Uno en cada corrida
0. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	0 hrs
3. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	24 hrs
4. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	1 semana
5. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	2 semanas
6. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	3 semanas
7. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	4 semanas
8. 1,2,3	Fortificada+E.R.+DMSO	8 semanas
9. 0,1,2,3,4,5,6,7,8	E.R.+DMSO (BLANCO)	Uno en cada corrida

E.R= estándar de recuperación.

preparada, con excepción de la muestra 1. Cada corrida constó de un vial de homogenado no preservado, un vial blanco y los triplicados de cada muestra.

La extracción de las muestras se realizó mediante una separación líquido-líquido con hexano. Al extracto orgánico se le adicionó H_2SO_4 concentrado (Malinkrodt A.R.), y la fase orgánica resultante se purificó en una columna cromatográfica de 3 g. de alúmina (neutra de 60 mallas grado Super I, ICN Biomedicals), desactivada al 5%. Los HCs se eluyeron con 15 ml de hexano. Cabe aclarar que el tratamiento ácido altera la estructura de los ciclodienos, por lo tanto, el aldrín, el dieldrín y el endrín no son recuperados mediante este tratamiento de los tejidos.

El hexano se sustituyó con *ca.* 1 ml de isooctano (alta pureza, grado pesticida B&J Baxter) y se transfirió a un vial de 2 ml para su inyección en el cromatógrafo.

Las muestras de *B. physalus*, *B. musculus* y *B. edeni* fueron extraídas en soxhlet bajo las mismas condiciones. En ellas se incluyó tanto la piel como el tejido adiposo subcutáneo. Estas muestras de ballena fueron analizadas con el mismo método, agregándoseles 20 μ l de estándar de recuperación. El porcentaje de lípidos de las muestras tanto de *Phocoena sinus* como de *Balaenoptera physalus*, *B. edeni*, y *B. musculus* fué obtenido por diferencia de peso tomando 1 ml del extracto y quemándolo a 80⁰ C por 12 hrs.

Cuantificación:

La cuantificación de los HCs se realizó mediante cromatografía de gases de alta resolución. El cromatógrafo utilizado fue un Hewlett Packard HP-5890 con detector de captura de electrones ⁶³Ni (DCE) con un automuestreador HP-7673A y un integrador 3392A Hewlett Packard.

Se utilizó una columna capilar J&W DB-5 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y con una película de 0.25 μ m. Las condiciones de trabajo del CG-DCE son las siguientes: el inyector tipo split/splitless a una 280⁰ C , el detector a 325 y el horno a 85. El automuestreador tomó 1 μ l de muestra. Los gases utilizados fueron helio

(ultra alta pureza) como gas acarreador y nitrógeno (ultra alta pureza) como gas compensador. Las rampas utilizadas se dan en la tabla 4, y el tiempo de corrida total es de 94 min.

Tabla 4. Temperatura, pausa isotérmica, velocidad y tiempo de las rampas utilizadas para el análisis cromatográfico.

	Rampa 1	Rampa 2	Rampa 3
Temperatura 1(°C)	85	150	210
Pausa isotérmica	2	5	20
Velocidad (°C/min)	10	3	10
Temperatura 2(°C)	150	210	300
Tiempo final			31.50

Las concentraciones de los analitos en la muestra fueron determinadas a partir de una curva de calibración (Tabla 5), con 5 diferentes concentraciones (r^2 0.995) para cada uno de los analitos de las mezclas.

Los tiempos de retención de cada uno de los analitos fueron verificados contra los tiempos de retención de los analitos en los estándares conocidos.

Tabla 5. Curva de calibración de los compuestos de la solución de fortificación.

Compuestos de la solución fortificadora.	Concentración a 30 µl	Concentración 15 µl	Concentración a 10 µl	Concentración a 5 µl	Concentración a 1 µl
COMPUESTOS CON 5.0mg/ml	150 pg/µl	72.8 pg/µl	48.5 pg/µl	24.2 pg/µl	4.8 pg/µl
COMPUESTOS CON 10.0mg/ml	300 pg/µl	145 pg/µl	97.0 pg/µl	48.5 pg/µl	9.7 pg/µl
p-p' DDE	444 pg/µl	215 pg/µl	143 pg/µl	71.8 pg/µl	14.3 pg/µl
p-p' DDD	360 pg/µl	174 pg/µl	116 pg/µl	58.2 pg/µl	11.6 pg/µl

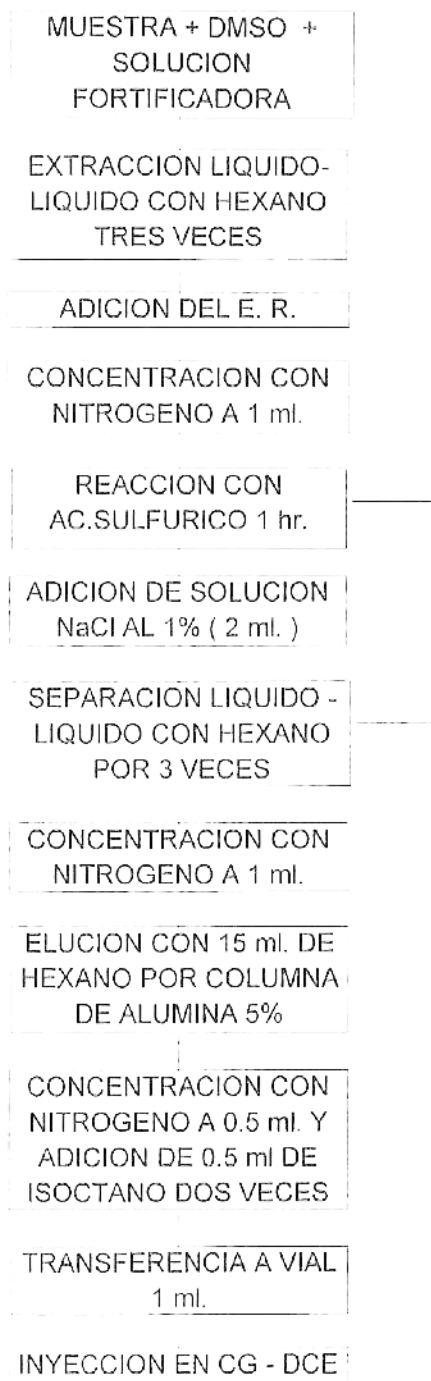


Fig. 6 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA ANALITICA EMPLEADA EN EL ANALISIS DE HIDROCARBUROS CLORADOS EN TEJIDO DE CETACEOS

RESULTADOS:

Los blancos obtenidos muestran una alta pureza en cuanto a calidad analítica se refiere. No existe contaminación durante el protocolo analítico. Esto puede observarse claramente en el cromatograma típico obtenido (Fig. 7) el cual no muestra picos con excepción de los del estándar de recuperación. También podemos observar los cromatogramas de los estándares utilizados, el de BPCs (Fig 7) y el de los pesticidas (Fig. 7) ambos con la misma calidad analítica que el blanco. En el experimento con el homogenado de tejido adiposo subcutáneo de *Phocoena sinus*, fueron recuperados los BPCs 28, 52, 103, 101, 77, 118, 153, 135, 180, y 198; y los pesticidas γ -BHC, heptacloro, p-p' DDT y sus metabolitos el p-p' DDD y el p-p' DDE. Fueron detectados y cuantificados en todos los tiempos de muestreo del experimento (Tablas 6 y 7). La variación de la concentración de los HCs vs. tiempo se muestra gráficamente en la Fig. 8. Durante los primeros tiempos de muestreo y el último, es decir, a T0, T1, T7, T14, y T56, la variación de las concentraciones no es marcada, pero en T21 y T28 se observa, en el primero un incremento significativo en la concentración de todos los compuestos, y en el segundo un decremento. También se observa que existe una misma tendencia en el comportamiento de la concentración de los compuestos en el tiempo para la mayoría de los mismos con excepción del BPC 77 y el p-p' DDE. El BPC 77 presentó un comportamiento irregular a través de todo el experimento, y aunque el p-p' DDE se comportó estable su concentración, en el tiempo final del experimento incrementó. También se puede observar que todos los compuestos, con excepción del p-p' DDE y el p-p' DDD, presentan concentraciones finales menores a las concentraciones de inicio. En los coeficientes de variación (Tabla 8), se nota que con respecto a los pesticidas el único compuesto que rebasa el valor de 10 es el p-p' DDD en T28, y en el caso de los BPCs el 77 excede el valor de 10 en T1 y T14. Los porcentajes de recuperación medios y la desviación estándar de los compuestos del homogenado preservado en DMSO se muestran en la tabla 8.

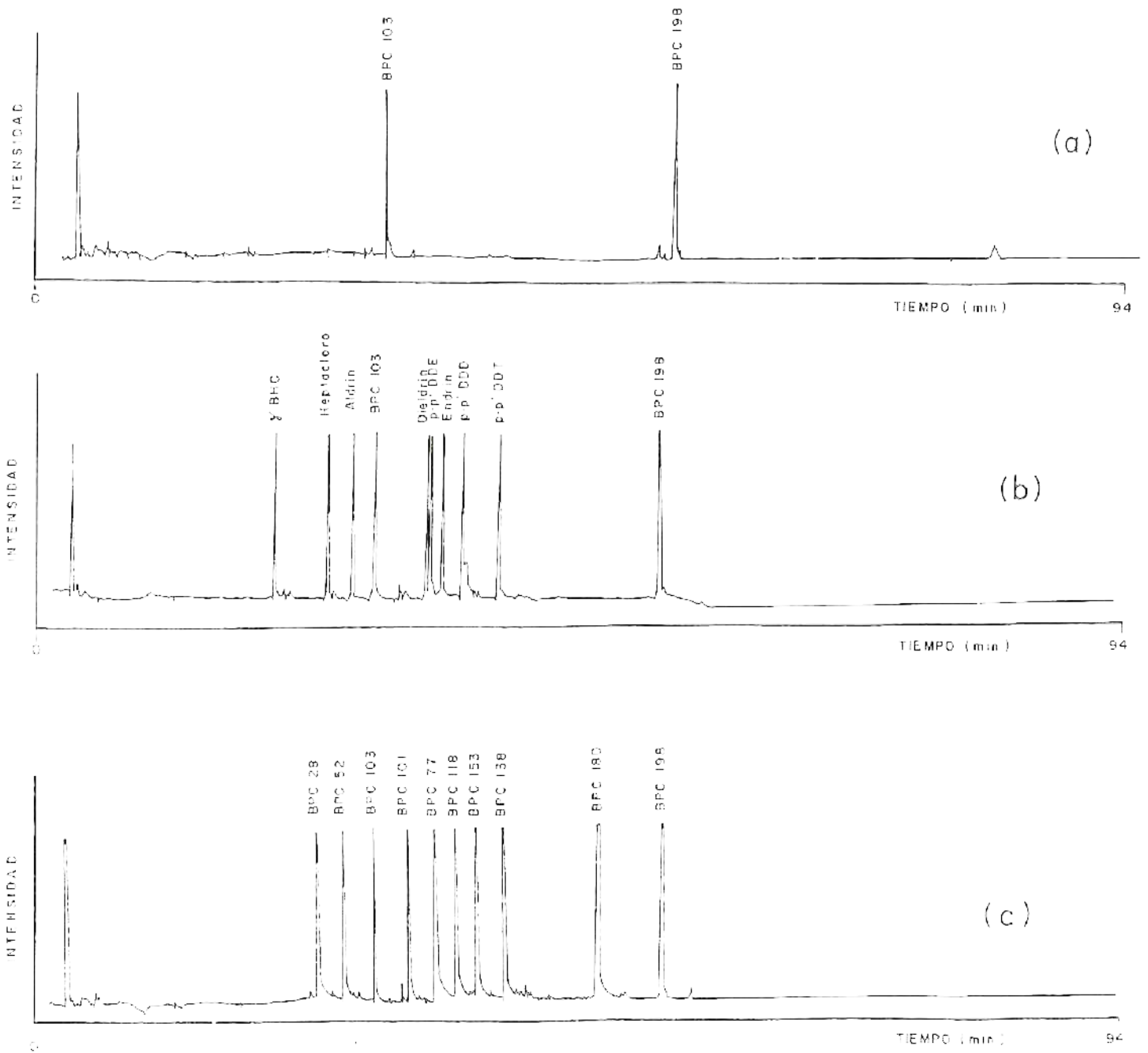


Fig. 7 Cromatograma típico de: a) blanco de muestra, b) estándar de pesticidas y c) estándar de BPCs.

Tabla 6. Concentraciones de los triplicados, promedios (X) y desviación estándar (δ) de los BPCs en el homogenado preservado en DMSO.

Compuesto	0	1	7	14	21	28	56
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
BPC 28	3.18	3.85	3.19	3.44	7.47	1.78	2.44
	3.23	3.08	4.21	4.82	4.60	2.56	2.21
	3.28	4.15	4.77	5.11	5.97	1.94	2.43
X	3.23	3.69	4.06	4.46	6.01	2.09	2.36
$\pm\delta$.050	.551	.801	.891	1.43	.41	.12
BPC 52	4.48	3.86	4.27	4.45	7.84	2.67	3.75
	4.53	3.50	4.04	4.62	5.72	4.09	3.46
	4.62	4.48	4.39	4.78	4.76	3.01	3.49
X	4.54	3.95	4.23	4.62	6.11	3.26	3.57
$\pm\delta$.071	.497	.180	.163	1.57	.744	.161
BPC 103 *	3.26	3.12	3.17	2.99	4.98	2.16	3.49
	3.40	2.59	3.14	3.39	3.64	3.14	3.32
	3.33	3.46	3.23	3.30	4.17	2.53	3.29
X	3.33	3.05	3.18	3.23	4.26	2.61	3.37
$\pm\delta$.074	.438	.043	.209	.675	.493	.110
BPC 101	3.59	3.24	3.40	3.38	5.93	2.09	2.85
	3.69	2.96	3.28	3.87	3.41	3.14	2.56
	3.77	3.62	3.81	3.98	4.67	2.59	2.78
X	3.66	3.27	3.50	3.74	4.67	2.61	2.73
$\pm\delta$.090	.333	.275	.317	1.25	.526	.154
BPC 77	2.96	5.11	6.41	4.86	11.1	1.91	2.00
	3.02	2.87	8.54	10.0	7.80	2.63	1.83
	3.13	5.01	9.66	8.16	7.88	2.25	2.01
X	3.03	4.33	8.21	7.67	8.93	2.26	1.95
$\pm\delta$.086	1.26	1.65	2.60	1.88	.359	.101
BPC 118	3.68	2.94	3.32	3.45	5.70	2.08	3.16
	3.76	2.68	1.04	3.87	3.87	3.22	2.74
	3.90	3.43	3.72	3.95	4.40	2.61	3.01
X	3.78	3.02	2.70	3.76	4.66	2.64	2.97
$\pm\delta$.109	.384	1.44	.269	.936	.571	.212
BPC 153	3.61	3.18	3.78	3.28	5.98	2.16	2.79
	3.65	2.80	3.67	4.25	3.33	3.26	2.45
	3.81	3.79	4.01	4.24	4.64	2.70	2.69
X	3.69	3.26	3.82	3.92	4.65	2.71	2.64
$\pm\delta$.103	.502	.172	.556	1.32	.551	.176
BPC 138	5.33	4.64	5.40	4.84	8.94	2.88	4.05
	5.15	4.12	5.30	6.16	5.99	4.57	3.49
	5.45	5.28	6.06	6.15	6.66	3.49	4.01
X	5.31	4.68	5.58	5.72	7.20	3.65	3.85
$\pm\delta$.149	.579	.414	.759	1.54	.858	.310
BPC 180	4.47	4.44	5.30	3.71	8.88	2.45	3.19
	4.48	3.86	5.10	6.03	6.17	3.74	2.75
	4.70	5.19	5.73	5.96	4.32	2.96	3.06
X	4.55	4.50	5.38	5.24	6.46	3.05	3.00
$\pm\delta$.128	.665	.323	1.32	2.29	.645	.223
BPC 198 +	1.92	2.04	2.33	2.09	3.24	1.27	2.05
	1.95	1.62	2.33	2.56	2.32	2.01	1.95
	2.02	2.31	2.50	2.41	2.62	1.53	1.97
X	1.96	1.99	2.39	2.35	2.73	1.61	1.98
$\pm\delta$.051	.346	.098	.239	.467	.375	.043

* Estándar de recuperación.

La media de los porcentajes de recuperación de los BPCs, se encuentra alrededor del 100%, con excepción del BPC 77 cuya variación es notoria. En el caso de los pesticidas, los valores van del 71 al 94% siendo el compuesto con mayor variación el p-p DDE.

En el homogenado congelado los BPCs y pesticidas recuperados fueron los mismos y sus concentraciones medias y desviaciones estándar se presentan en la tabla 9.

Tabla 7. Concentraciones de los triplicados, promedios (X) y desviaciones estándar (δ) de los pesticidas en el homogenado preservado en DMSO.

Compuesto	0	1	7	14	21	28	56
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
γ -BHC	2.06	1.92	1.95	1.80	3.95	0.93	2.13
	2.25	1.75	1.92	2.25	2.77	1.87	1.80
	2.08	2.15	2.27	2.26	2.91	1.08	2.18
X	2.13	1.94	2.05	2.10	3.21	1.29	2.04
$\pm\delta$.103	.203	1.94	.262	.645	.505	.207
Heptacloro	1.85	2.16	2.16	2.18	4.16	0.95	2.11
	1.78	1.87	2.09	2.83	2.77	1.76	1.67
	1.91	2.61	2.44	2.59	3.02	0.92	2.13
X	1.85	2.21	2.23	2.53	3.32	1.18	1.97
$\pm\delta$.065	.373	.186	.329	.741	.504	.258
p-p' DDE	8.00	6.00	6.99	6.93	11.6	4.52	16.3
	8.20	5.18	6.77	7.58	8.66	6.98	14.0
	8.61	7.08	7.56	7.88	8.61	5.49	15.6
X	8.27	6.09	7.11	7.46	9.64	5.64	15.3
$\pm\delta$.309	.951	.403	.483	1.73	1.19	1.19
p-p' DDD	6.15	5.29	6.59	6.41	11.6	2.96	8.10
	6.27	4.64	6.39	8.72	8.12	5.28	7.15
	6.70	6.37	7.31	7.81	8.35	3.79	8.06
X	6.37	5.43	6.76	5.03	9.38	4.01	7.77
$\pm\delta$.290	.875	.479	3.67	1.99	1.17	.537
p-p' DDT	4.77	4.72	5.78	5.71	10.1	2.46	5.04
	4.85	4.01	5.56	6.66	6.64	4.29	4.24
	5.23	5.52	6.41	6.70	7.29	3.16	4.88
X	4.95	4.75	5.92	6.35	8.03	3.31	4.72
$\pm\delta$.245	.754	.442	.561	1.87	.923	.427

Gráficamente estas concentraciones se pueden observar para BPCs y pesticidas en la figura 9. El único BPC que presentó una desviación estándar muy grande es el 77 lo que nos indica un comportamiento irregular es decir que su concentración varió a través del muestreo.

Tabla 8. Coeficientes de variación, porcentajes de recuperación y desviación estándar del homogenado preservado en DMSO.

Compuesto	Coef. de Variación	% de recuperación	Desv. std. (δ)
γ -BHC	5.39	71.78	9.79
BPC 28	4.72	100.80	13.90
Heptacloro	6.04	73.85	11.82
BPC 52	4.09	101.65	8.29
BPC 103 *	3.02	82.50	5.22
BPC 101	4.50	104.04	7.77
p-p' DDE	3.84	94.18	19.76
BPC 77	7.96	158.35	82.26
BPC 118	4.19	103.34	13.03
p-p' DDD	6.22	91.63	14.88
BPC 153	3.56	108.22	9.38
p-p' DDT	5.40	88.88	13.31
BPC 138	4.54	112.47	18.32
BPC 180	4.05	114.99	21.15
BPC 198 *	4.07	89.87	7.98

* Estándar de recuperación.

Con respecto a los coeficientes de variación en el caso de los BPCs, el 77 es el único que excede el valor de 10%, mientras que el valor máximo para pesticidas fué de 9.38

Los coeficientes de variación y los porcentajes de recuperación de los compuestos en el homogenado congelado se muestran en la Tabla 10.

La media de los BPCs se encuentra alrededor del 110% siendo el BPC con la mayor desviación estándar el 77, pero se observa una mayor variación que para el homogenado preservado en DMSO. En el caso de los pesticidas, los valores van del 72 al 103% siendo el p-p' DDE el pesticida con mayor desviación estándar.

Como se puede observar en las figuras 10 y 11 las concentraciones y sus variaciones temporales para ambos homogenados, el preservado en DMSO y el congelado, son muy similares, es decir, que ambas técnicas, tanto la de congelación como la de preservación en DMSO conservaron de manera muy similar a los compuestos, estos valores los podemos observar en la Tabla 11.

Tabla 9. Concentraciones y desviaciones estándar ($\pm\delta$) del homogenado congelado.

Compuesto	0	1	7	14	21	28	56	$\pm\delta$
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	
γ -BHC	2.05	1.87	2.27	2.70	2.37	1.98	2.49	.29
BPC 28	3.52	3.31	4.28	5.24	4.73	3.45	2.70	.89
Heptacloro	1.84	2.12	2.24	2.80	2.47	1.72	1.94	.37
BPC 52	4.63	3.86	4.56	5.66	4.87	4.73	3.74	.64
BPC 103 *	3.29	2.98	3.17	3.36	3.17	3.54	3.99	.32
BPC 101	3.53	3.20	3.51	4.20	3.84	3.58	2.94	.41
p-p' DDE	8.52	5.89	7.50	8.81	7.92	8.57	17.06	3.61
BPC 77	2.83	1.97	6.02	7.96	7.01	2.89	2.30	2.48
BPC 118	3.81	2.69	3.34	4.08	3.71	3.79	3.23	.46
p-p' DDD	6.72	4.89	6.59	8.32	7.40	7.01	9.281	1.39
BPC 153	3.89	3.35	4.01	4.69	4.37	3.98	3.32	.49
p-p' DDT	5.38	4.58	6.07	7.66	6.77	5.65	5.88	.98
BPC 138	5.57	4.53	5.70	6.75	6.31	5.79	4.70	.80
BPC 180	4.91	4.29	5.54	6.68	6.13	5.19	3.26	1.14
BPC 198 *	2.24	1.92	2.38	2.47	2.25	2.41	2.01	.20

Análisis de tejidos de ballena y *Phocoena sinus*:

El análisis llevado a cabo en el tejido adiposo subcutáneo de *Phocoena sinus* "limpio", es decir, sin la adición de solución fortificadora, solamente estándar de recuperación, reveló la presencia de p-p' DDE en el organismo a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 12). Esto también puede observarse en el cromatograma obtenido (Fig. 13).

Con respecto a las muestras de ballenas, los compuestos encontrados fueron el p-p' DDT y su metabolitos p-p' DDD y p-p' DDE, las concentraciones y el organismo en los que fueron detectados se presentan en la tabla 12, y gráficamente pueden observarse en la Fig. 12. También se muestra el cromatograma típico (Fig. 13) de un análisis en este tejido, utilizando el cromatograma del espécimen #32 el cual fué el más contaminado de los 9. Como puede observarse la señal de interferencia incrementó, originando incluso un incremento en la línea de base, pero los picos de los respectivos compuestos se identificaron fácilmente. Es importante hacer notar la ausencia de BPCs tanto en la muestra de *Phocoena sinus* como en las de las ballenas.

Tabla 10. Coeficientes de variación y porcentajes de recuperación de los HCs en el homogenado congelado.

Compuesto	Coef. de variación	% de recuperación	Desv. estándar (δ)
γ -BHC	9.38	75.05	9.95
BPC 28	4.43	127.79	19.24
Heptacloro	7.22	72.18	12.66
BPC 52	7.73	109.56	15.41
BPC 103*	3.75	84.04	8.21
BPC 101	2.52	111.50	12.90
p-p' DDE	6.74	103.44	37.56
BPC 77	11.18	166.10	93.30
BPC 118	5.61	109.78	14.49
p-p' DDD	4.15	99.69	19.31
BPC 153	5.85	128.74	16.24
p-p' DDT	6.02	100.04	16.47
BPC 138	4.82	131.54	18.70
BPC 180	3.86	149.40	33.17
BPC 198 *	4.59	93.58	8.64

* Estándar de recuperación.

Tabla 11. Concentraciones promedio vs. tiempo del homogenado preservado en DMSO y el congelado.

Comp.	Concentración del homogenado preservado($\mu\text{g/g}$)							Concentración del homogenado congelado ($\mu\text{g/g}$)						
	0	1	7	14	21	28	56	0	1	7	14	21	28	56
T.Dias														
γ -BHC	2.13	1.94	2.05	2.10	3.21	1.29	2.04	2.05	1.87	2.27	2.70	2.37	1.98	2.49
BPC28	3.23	3.69	4.06	4.46	6.01	2.09	2.36	3.52	3.31	4.28	5.24	4.73	3.45	2.70
Hepta.	1.85	2.21	2.23	2.53	3.32	1.18	1.97	1.84	2.12	2.24	2.80	2.47	1.72	1.94
BPC52	4.54	3.95	4.23	4.62	6.11	3.26	3.57	4.63	3.86	4.56	5.66	4.87	4.73	3.74
BPC103	3.33	3.05	3.18	3.23	4.26	2.61	3.37	3.29	2.98	3.17	3.36	3.17	3.54	3.99
BPC101	3.68	3.27	3.50	3.74	4.67	2.61	2.73	3.53	3.20	3.51	4.20	3.84	3.58	2.94
p-pDDE	8.27	6.09	7.11	7.46	9.64	5.64	15.3	8.52	5.89	7.50	8.81	7.92	8.57	17.0
BPC77	3.03	4.33	8.21	7.67	8.93	2.26	1.95	2.83	1.97	6.02	7.96	7.01	2.89	2.30
BPC118	3.78	3.02	2.70	3.76	4.66	2.64	2.97	3.81	2.69	3.34	4.08	3.71	3.79	3.23
p-pDDD	6.37	5.43	6.76	5.03	9.38	4.01	7.77	6.72	4.89	6.59	8.32	7.40	7.01	9.28
BPC153	3.69	3.26	3.82	3.92	4.65	2.71	2.64	3.89	3.35	4.01	4.69	4.37	3.98	3.32
p-pDDT	4.95	4.75	5.92	6.35	8.03	3.31	4.72	5.38	4.58	6.07	7.66	6.77	5.65	5.88
BPC138	5.31	4.68	5.58	5.72	7.20	3.65	2.85	5.57	4.53	5.70	6.75	6.31	5.79	4.70
BPC180	4.55	4.50	5.38	5.24	6.46	3.05	3.00	4.91	4.29	5.54	6.68	6.13	5.19	3.26
BPC198	1.96	1.99	2.39	2.35	2.73	1.61	1.98	2.24	1.92	2.38	2.47	2.25	2.41	2.01

Tabla 12. Concentraciones de los compuestos encontrados en TAS de ballena preservado en DMSO.

Especimen	p-p' DDT ($\mu\text{g/g}$)	p-p' DDE ($\mu\text{g/g}$)	p-p' DDD ($\mu\text{g/g}$)
#2	n.d.	0.92	n.d.
#5	n.d.	n.d.	0.84
#4	n.d.	1.10	n.d.
#32	1.54	13.89	2.04
#20	n.d.	.455	n.d.
#30	.089	1.83	.093
#66	n.d.	.182	n.d.
#67	n.d.	.522	n.d.
#69	n.d.	.502	n.d.

n.d. = no detectado

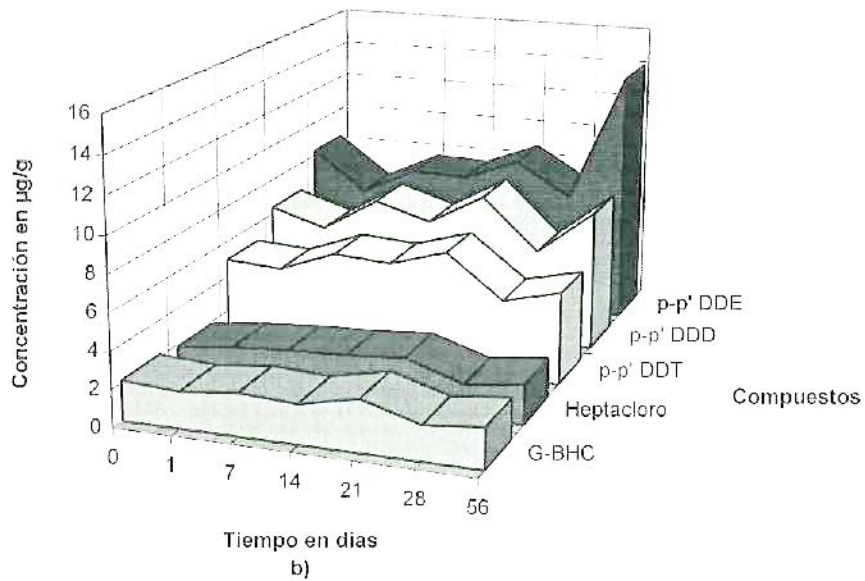
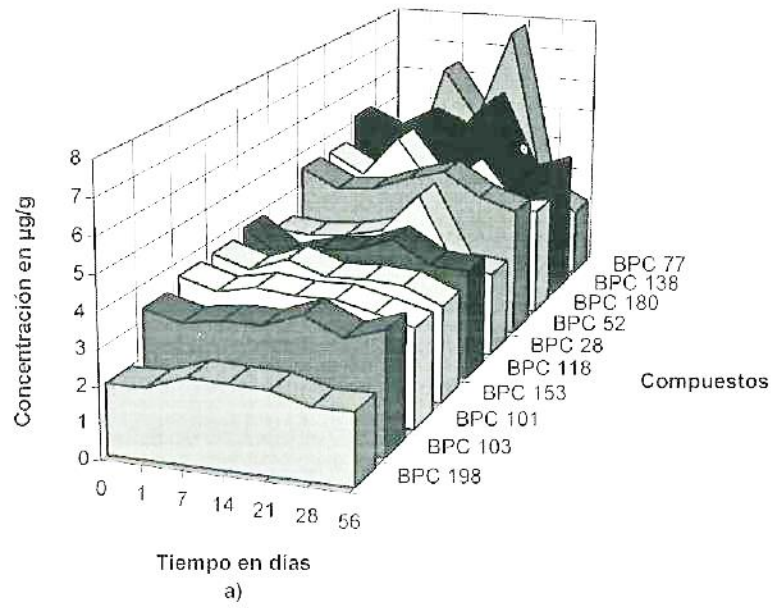


Fig. 8 Concentración promedio vs. tiempo en el homogenado preservado en DMSO de a) BPCs y b) pesticidas.

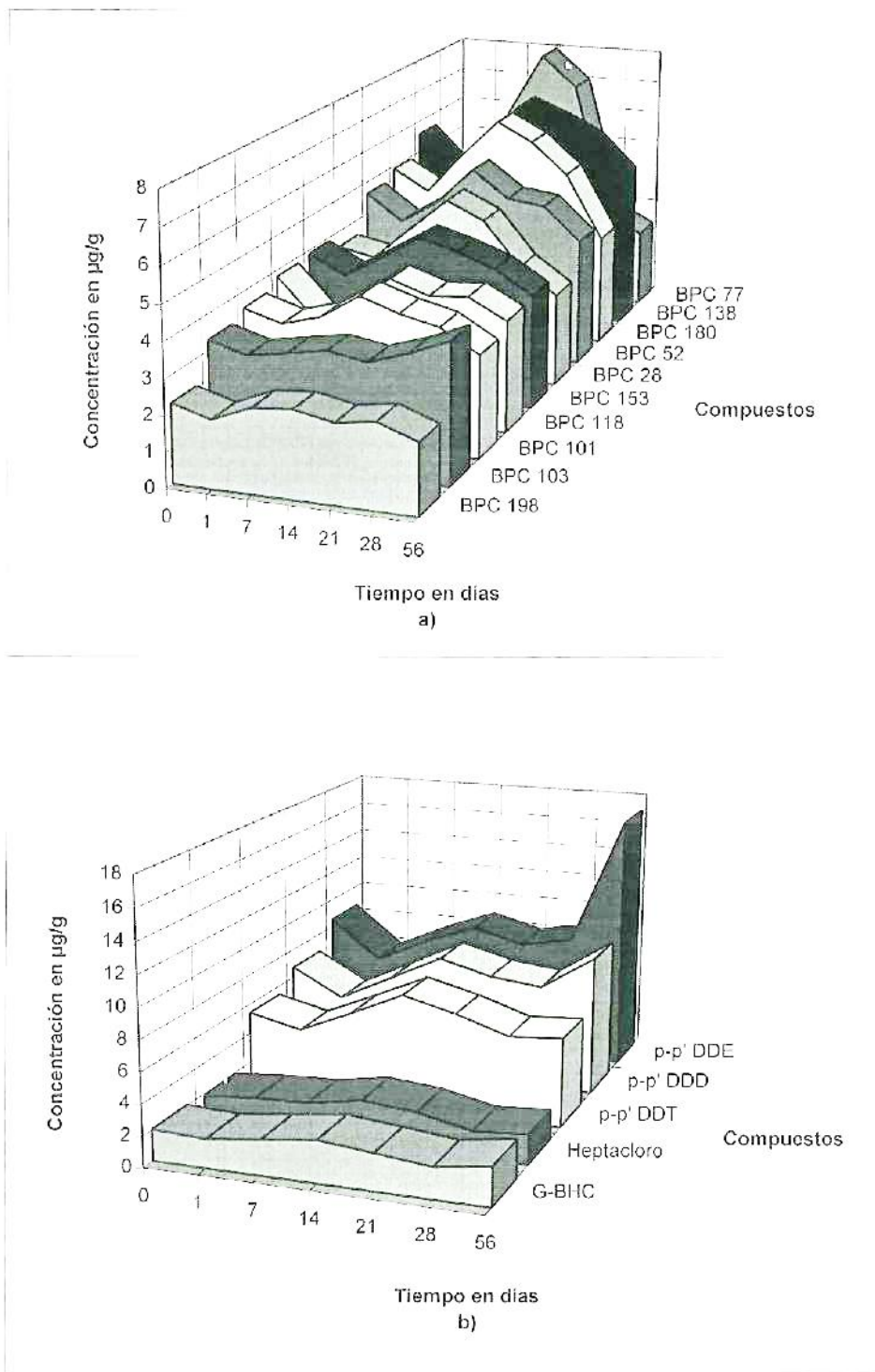


Fig. 9 Concentración vs. tiempo en el homogenado congelado de a) BPCs y b) pesticidas.

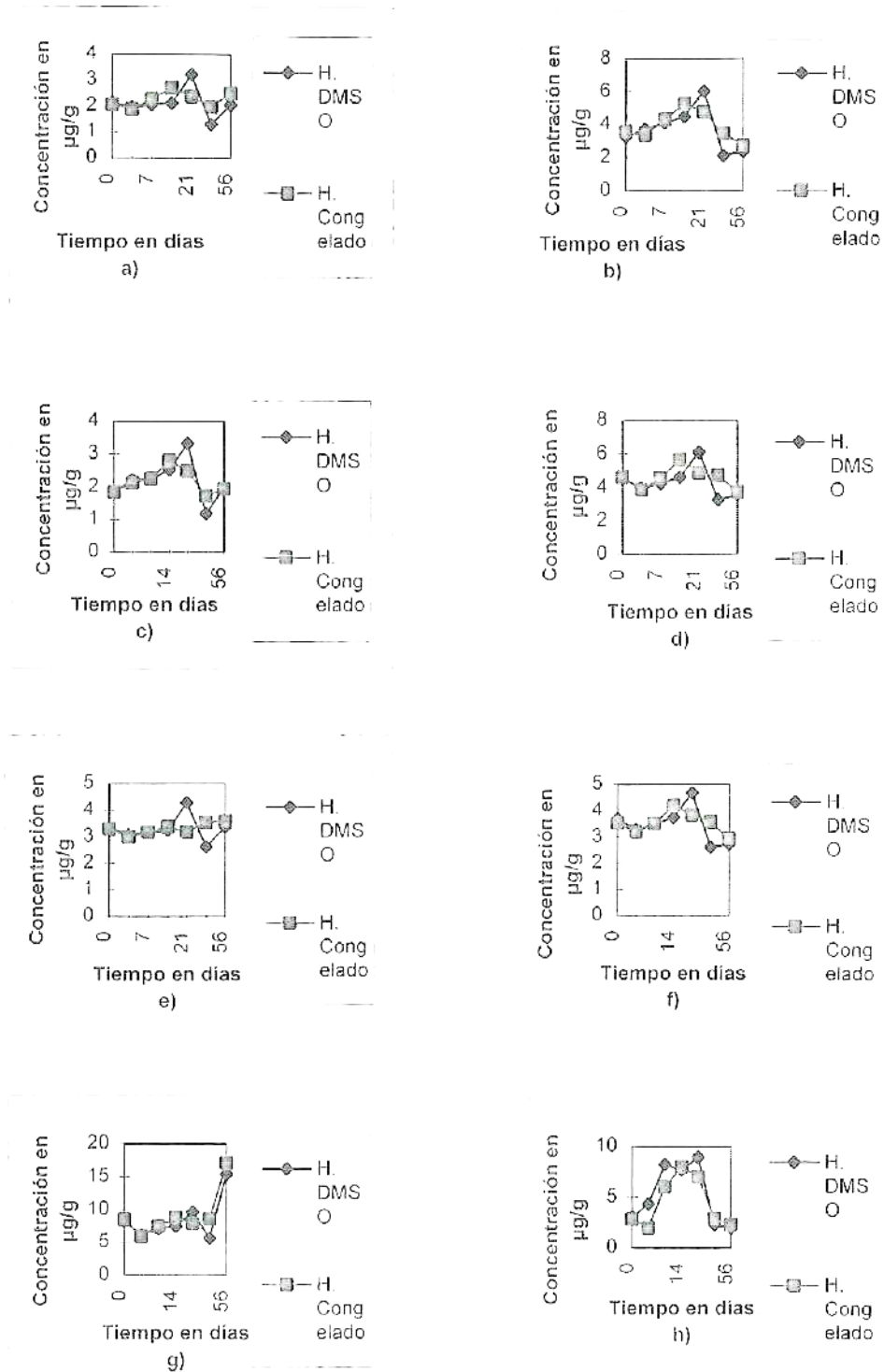


Fig. 10 Concentración vs. tiempo del H. DMSO y cong. de: a) γ -BHC b) BPC28 c) Heptacloro d) BPC52 e) BPC103 f) BPC101 g) p-p'DDE h) BPC77

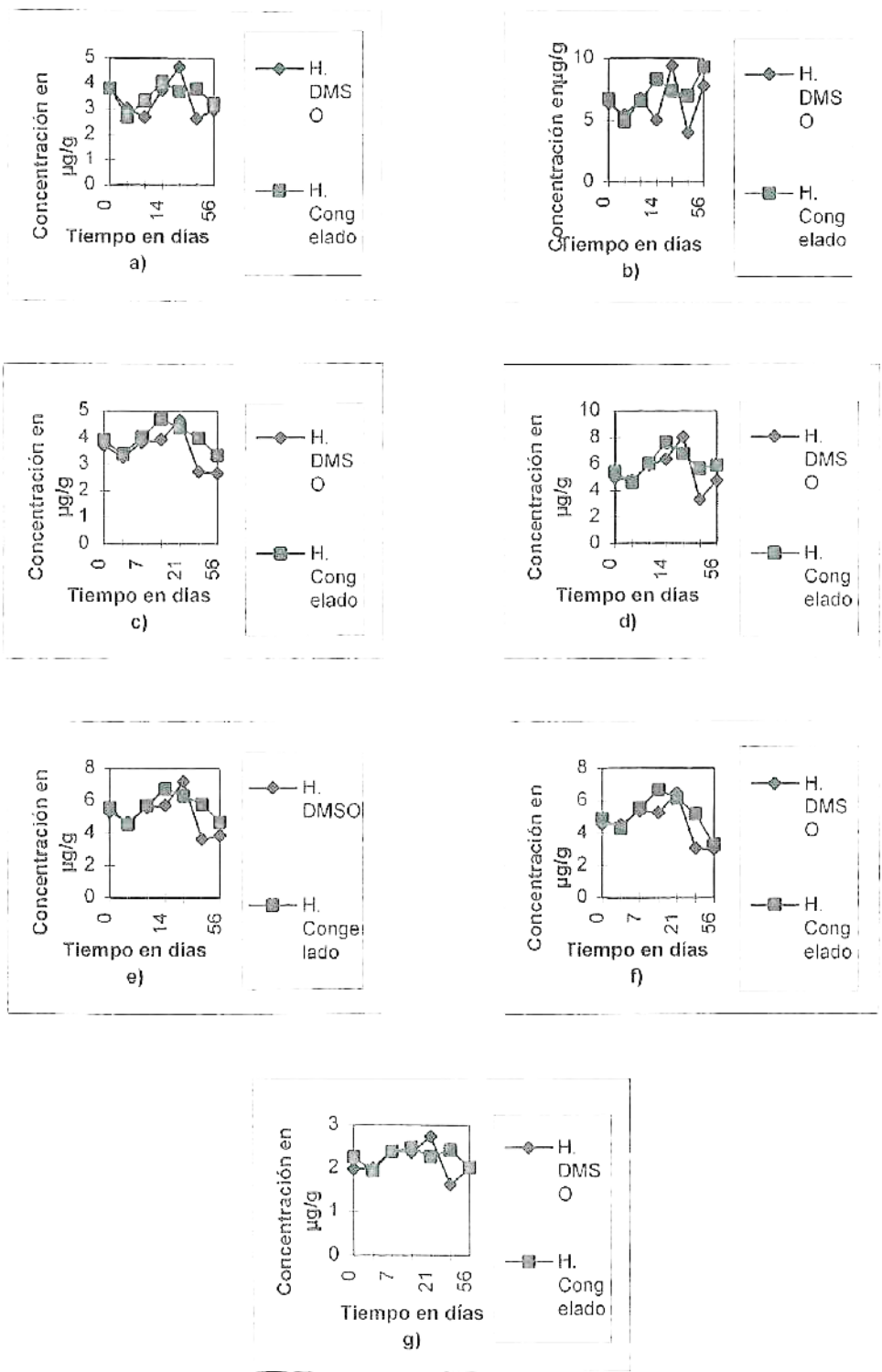


Fig. 11 Concentración vs. tiempo del H. DMSO y cong. de: a)BPC118 b)p-p' DDD c)BPC153 d)p-p' DDT e)BPC138 f)BPC180 g)BPC198

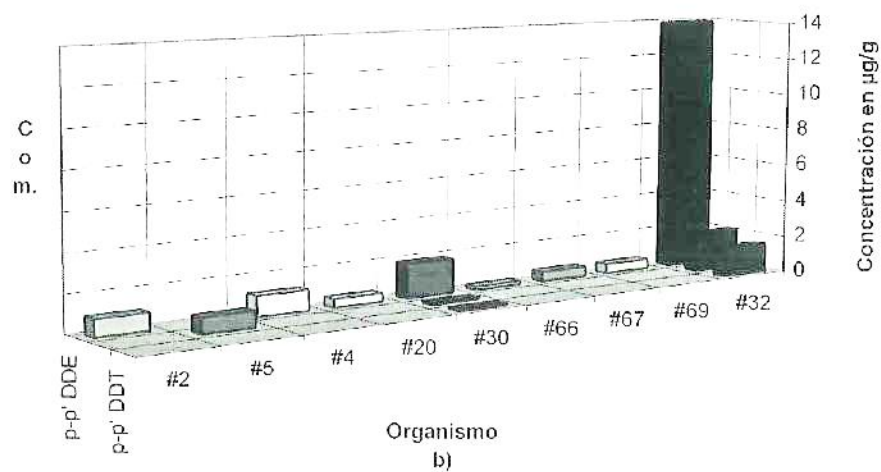
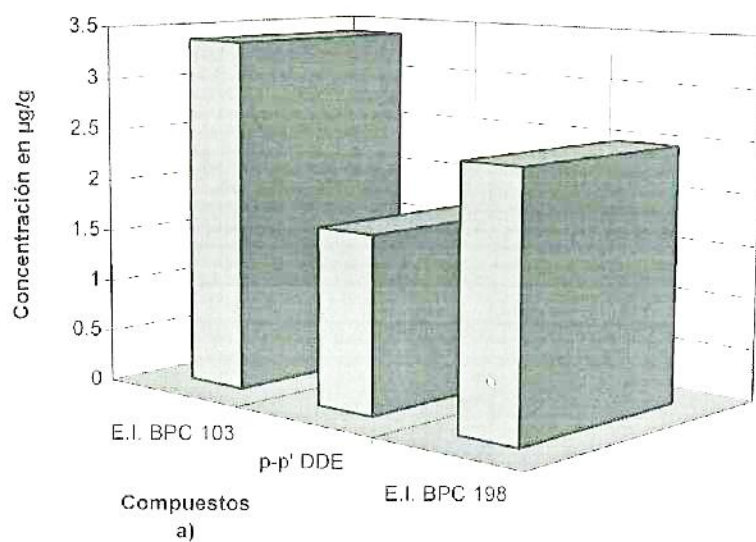


Fig. 12 Concentración en µg/g de: a) *Phocoena sinus* y b) Especímenes #2, 4, 5, 32, 20, 30, 66, 67 y 69 de ballena.

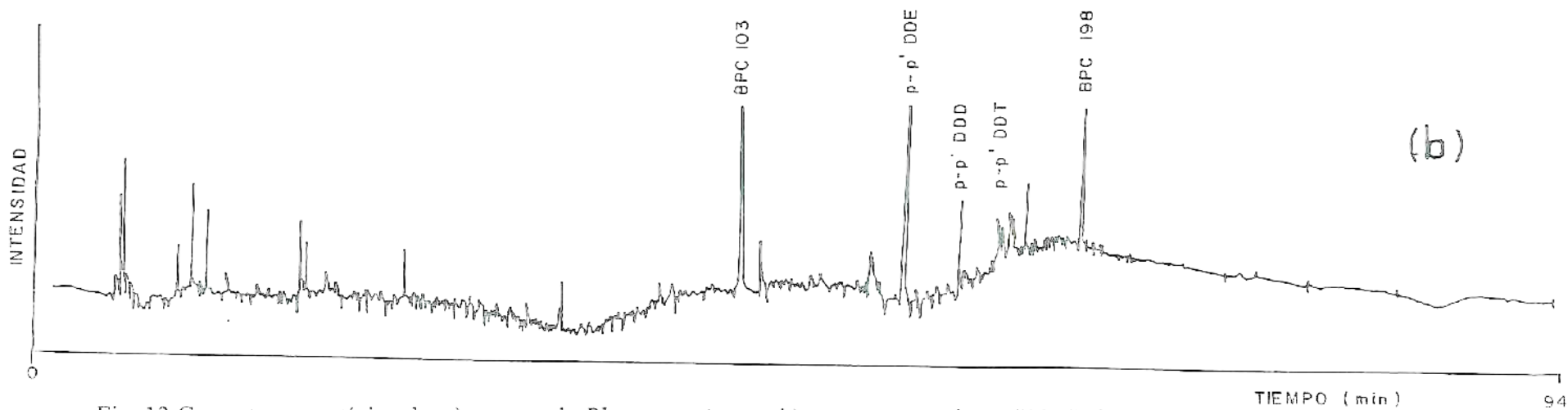
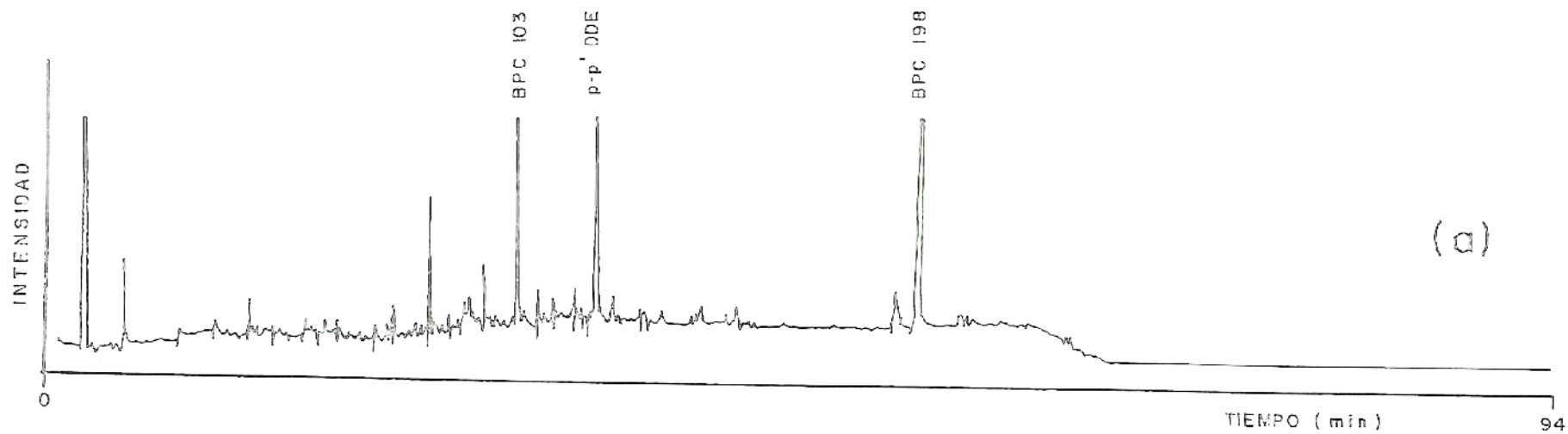


Fig. 13 Cromatograma típico de: a) muestra de *Phocoena sinus*, y b) muestra organismo #32 (*Balaenoptera physallus*).

DISCUSIONES:

Con el objetivo de determinar si las variaciones en el tiempo de la concentración de los analitos estudiados eran significativas se realizaron las siguientes pruebas estadísticas: Homogeneidad de varianza, ANOVA y prueba Tuckey (diferencia significativa honesta).

Los resultados de esta prueba se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de los análisis estadísticos con las pruebas de análisis de homogeneidad de varianza, ANOVA y Tuckey (D.S.II.) con los datos de T21 y T28 , y sin ellos.

Compuesto	A. de hom. de varianza		ANOVA	P. Tuckey (D.S.II.)	
	PconT21/28	PsinT21/28	PsinT21/28	PconT21/28	PsinT21/28
γ -BHC	.01266	.45440	.80010	.0003-.0280	.7658-1.000
BPC 28	.08780	.05499	.05257	.0004-.2230	1577-.9370
Heptacloro	.02750	.24916	.07470	.0003-.2836	.0621-.9999
BPC 52	.00572	.09025	.05311	.0028-.1894	.0542-.9962
BPC 103	.05548	.05356	.49030	.0013-.1073	.4770-.9996
BPC 101	.12168	.26952	.05394	.0068-.4391	.0545-.9982
p-p' DDE	.07181	.19430	.00500	.0002-.6566	.0100-.9748
BPC 77	.01475	.03539	.00130	.0007-.9999	.0116-.9912
BPC 118	.00750	.05344	.35990	.0454-.7386	.3602-.9999
p-p' DDD	.04240	.29040	.05685	.0005-.5461	.0505-.9995
BPC 153	.11980	.05291	.05746	.0187-.7757	.0511-.9898
p-p' DDT	.02070	.53920	.05881	.0003-.3183	.0522-.9999
BPC 138	.02580	.11740	.05480	.0012-.3099	.0503-.9966
BPC 180	.02439	.05130	.05046	.0182-.8662	.0504-.9999
BPC 198	.05831	.07204	.05451	.0032-.7525	.1301-1.000

En la tabla 13 P representa el valor de la probabilidad, el cual debe de ser mayor de 0.05 para que exista una probabilidad del 95% de que se cumpla la hipótesis de acuerdo con la prueba realizada.

La prueba de homogeneidad de varianza, es un requisito indispensable para la realización de la prueba ANOVA, esta prueba arrojó como resultado que no existía dicha homogeneidad. Con la prueba Tuckey, se obtuvo información sobre las concentraciones y los tiempos que eran significativamente diferentes. Las varianzas significativamente diferentes fueron valores para T21 y T28 para la mayoría de los analitos, los casos del p-p' DDE y el BPC 77 que presentaron otras diferencias significativas se discuten posteriormente. Al eliminar T21 y T28 se presentó la homogeneidad de varianza, lo cual permitió realizar la prueba ANOVA. La cual como se observa en la tabla 13, da como resultado una probabilidad mayor al 95% de que exista la igualdad de varianzas, por lo que se puede concluir que las concentraciones de los analitos en el tiempo son significativamente iguales. Sólo se presentaron dos compuestos que siguieron manteniendo diferencias en sus concentraciones vs. tiempo, el p-p' DDE el cual presentó diferencias significativas en T56 debido a un incremento en su concentración final, y el BPC 77, cuyas variaciones se dieron a través de todo el experimento.

Las variaciones en el tiempo de la concentración del p-p' DDE y del BPC 77 son difíciles de explicar. Los incrementos en sus concentraciones parecen sugerir contaminación durante el proceso analítico, sin embargo, los blancos analizados (uno por cada lote de muestra) no corroboran esta posibilidad.

Las variaciones presentadas en la concentración de los analitos posiblemente se deban a factores de concentración o dilución del extracto durante el proceso analítico, estos efectos se pueden eliminar normalizando los datos. En este caso se normalizó con respecto al BPC 153 ya que su pico cromatográfico se localiza a la mitad de la corrida. Los datos se resumen para el homogenado preservado en DMSO en las Tablas 14 y 15,

y para el congelado en la Tabla 16. Estos valores observados gráficamente, tanto para el homogenado preservado en DMSO y el congelado (Figs. 14 y 15) nos muestran que, al eliminar las variaciones por concentración o dilución se demuestra la presencia de otros factores que pudieron causar las variaciones de las concentraciones de los analitos en el tiempo. Estos factores son errores sistemáticos o aleatorios inherentes a la metodología analítica, ya que los valores tienden a la linealidad, con excepción de los tiempos 21 y 28 para todos los analitos, menos para el p-p' DDE y el BPC 77.

Los coeficientes de variación observados en este estudio (Tablas 14 y 15) indican que nuestros análisis fueron de buena calidad. Comparándolos con otros estudios de hidrocarburos clorados en biota (Hall *et al.*, 1992; Wade y Cantillo, 1994; Wells y De Boer, 1994; y Kleivane *et al.*, 1995) coeficientes de variación menores al 10% indican una buena precisión analítica. Exceptuando el BPC 77 en el homogenado congelado (Tabla 16), el coeficiente de variación de ningún analito excedió este valor.

Otro error que pudo haber afectado la concentración de los analitos es la línea de base ruidosa y la presencia de picos no identificados en nuestros cromatogramas debido a la inadecuada remoción de material lipídico y otras sustancias que interfieren. El método utilizado para dicho proceso involucró las técnicas descritas por Holden y Marsden (1969); Branon y Karn (1990); Kannan *et al.* (1993) y Wade y Cantillo (1994); adecuando las mismas a las posibilidades de nuestro laboratorio. El uso de H₂SO₄ concentrado debió dar como resultado la completa hidrólisis de las grasas presentes, y el posterior uso de una columna de alúmina desactivada al 5%, que de acuerdo con Oliver *et al.* (1989), es el porcentaje de desactivación ideal, permitiría una elución completa de los organoclorados libres. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron ideales en términos cualitativos, pero cuantitativamente sí, esto podemos basarlo en los porcentajes de recuperación obtenidos mayores que los de Aguilar y Borrel (1991) y similares a los de Holden y Marsden (1969) y Brannon y Karn (1990).

Aunque es difícil determinar su importancia, podemos indicar algunas de las posibles causas de variabilidad en los análisis. Existe la posibilidad de pérdida de muestra por una errónea desactivación de la alúmina y/o volatilización en la concentración con flujo de nitrógeno.

Los hidrocarburos clorados poseen estructuras altamente estables y de difícil degradación, pero en el proceso de limpieza de la muestra el uso del H₂SO₄ concentrado resultó en la degradación de las moléculas de los ciclodienes. El aldrín, dieldrín y endrín por poseer un grupo éter en su estructura son degradados por la acción del ácido.

Tabla 14. Concentraciones normalizadas de los pesticidas en el homogenado preservado en DMSO.

COMP.	G-BHC	Heptacloro	p-p' DDE	p-p' DDD	p-p' DDT
m1-0	0.57	0.51	2.21	1.69	1.31
m2-0	0.61	0.48	2.24	1.71	1.32
m3-0	0.54	0.50	2.25	1.75	1.37
m1-1	0.60	0.67	1.88	1.66	1.48
m2-1	0.62	0.66	1.85	1.65	1.43
m3-1	0.56	0.68	1.86	1.67	1.45
m1-7	0.51	0.57	1.84	1.74	1.52
m2-7	0.52	0.56	1.84	1.74	1.51
m3-7	0.56	0.60	1.88	1.82	1.59
m1-14	0.54	0.66	2.11	1.95	1.73
m2-14	0.53	0.66	1.78	2.05	1.56
m3-14	0.53	0.61	1.85	1.84	1.57
m1-21	0.66	0.69	1.94	1.95	1.69
m2-21	0.83	0.83	2.59	2.43	1.99
m3-21	0.62	0.65	1.85	1.79	1.57
m1-28	0.43	0.39	2.09	1.36	1.14
m2-28	0.57	0.53	2.11	1.61	1.31
m3-28	0.39	0.34	2.02	1.40	1.16
m1-56	0.76	0.75	5.84	2.89	1.80
m2-56	0.73	0.68	5.71	2.91	1.72
m3-56	0.81	0.79	5.80	2.99	1.81
C.V	5.28	4.97	6.86	4.09	5.99

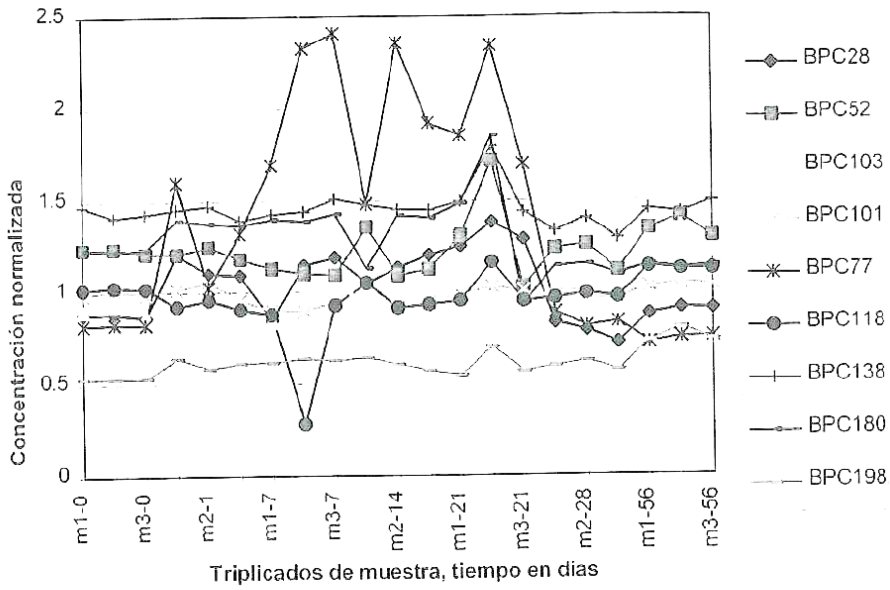
Tabla 15. Concentraciones normalizadas de BPCs en el homogenado preservado en DMSO.

COMP.	BPC28	BPC52	BPC103	BPC101	BPC77	BPC118	BPC138	BPC180	BPC198
m1-0	0.87	1.23	0.90	0.99	0.81	1.01	1.47	1.23	0.53
m2-0	0.88	1.24	0.93	1.01	0.82	1.03	1.41	1.22	0.53
m3-0	0.86	1.21	0.87	0.99	0.82	1.02	1.43	1.23	0.53
m1-1	1.20	1.21	0.97	1.01	1.60	0.92	1.45	1.39	0.63
m2-1	1.10	1.25	0.92	1.05	1.02	0.95	1.47	1.37	0.58
m3-1	1.09	1.18	0.91	0.95	1.32	0.90	1.39	1.36	0.61
m1-7	0.84	1.12	0.83	0.89	1.69	0.87	1.42	1.39	0.61
m2-7	1.14	1.09	0.85	0.89	2.32	0.28	1.44	1.38	0.63
m3-7	1.19	1.09	0.80	0.94	2.40	0.92	1.51	1.42	0.62
m1-14	1.04	1.35	0.91	1.03	1.47	1.05	1.47	1.13	0.63
m2-14	1.13	1.08	0.79	0.91	2.35	0.91	1.45	1.42	0.60
m3-14	1.20	1.12	0.77	0.93	1.92	0.93	1.45	1.40	0.56
m1-21	1.24	1.31	0.83	0.99	1.85	0.95	1.49	1.48	0.54
m2-21	1.37	1.71	1.09	1.02	2.34	1.16	1.79	1.84	0.69
m3-21	1.28	1.02	0.89	1.00	1.69	0.94	1.43	0.93	0.56
m1-28	0.82	1.23	1.00	0.96	0.88	0.96	1.33	1.13	0.59
m2-28	0.78	1.25	0.96	0.96	0.80	0.98	1.40	1.14	0.61
m3-28	0.71	1.11	0.93	0.95	0.83	0.96	1.28	1.09	0.56
m1-56	0.87	1.34	1.25	1.02	0.71	1.13	1.44	1.14	0.72
m2-56	0.90	1.41	1.35	1.04	0.74	1.12	1.42	1.12	0.79
m3-56	0.90	1.29	1.22	1.03	0.74	1.11	1.49	1.13	0.73
C.V.	5.40	8.28	6.20	6.08	9.23	5.49	5.44	6.58	8.6

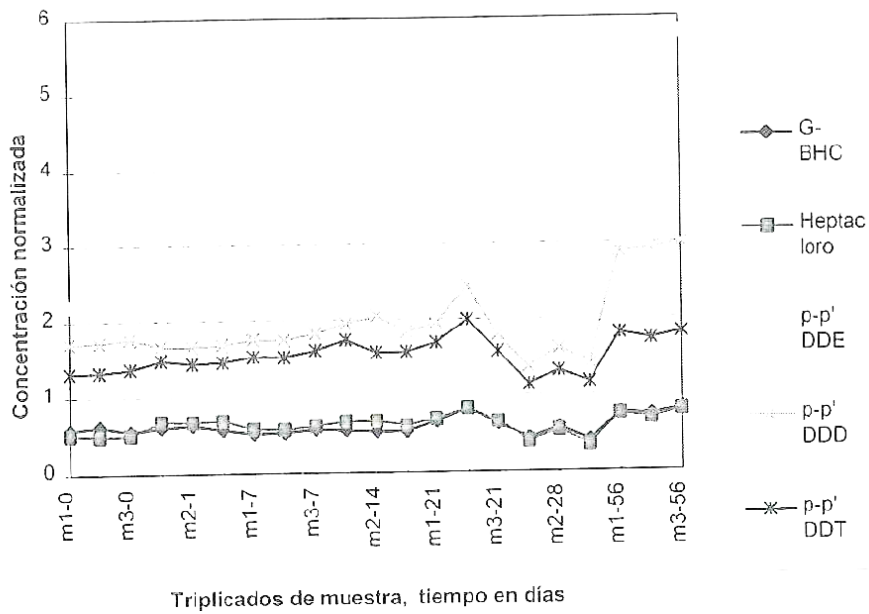
resultando moléculas polares que pueden ser “atrapadas” en la columna de alúmina.

Esta degradación de la moléculas “drines” concuerda con lo reportado por Rimkus *et al.*(1993); Brannon y Karn (1990) y Becker y Muir, 1995.

Es importante notar que los resultados obtenidos en el homogenado preservado con DMSO y el congelado son muy similares, esto puede observarse en las Figuras 10 y 11, a partir de esto se podría suponer que la técnica del DMSO de preservación de tejido adiposo subcutáneo de cetáceos conserva los compuestos organoclorados en el tejido al igual que la técnica de refrigeración.



a)



b)

Fig. 14 Concentraciones normalizadas vs. triplicados en el tiempo del homogenado preservado en DMSO para: a) BPCs y b) pesticidas.

Tabla 16. Concentración normalizada del homogenado congelado para BPCs y pesticidas.

COMP.	0	1	7	14	21	28	56	C.V.
G-BHC	0.52	0.55	0.56	0.57	0.54	0.49	0.75	7.63
Heptacloro	0.47	0.63	0.55	0.59	0.56	0.43	0.58	6.44
p-p' DDE	2.186	1.75	1.87	1.87	1.80	2.14	5.13	8.72
p-p' DDD	1.72	1.45	1.64	1.77	1.69	1.75	2.79	5.63
p-p DDT	1.38	1.36	1.51	1.63	1.54	1.41	1.77	6.13
BPC 28	0.90	0.98	1.06	1.11	1.08	0.86	0.81	5.26
BPC 52	1.18	1.15	1.13	1.20	1.11	1.18	1.12	7.19
BPC 103	0.84	0.89	0.78	0.71	0.72	0.88	1.20	4.05
BPC 101	0.90	0.95	0.87	0.89	0.87	0.89	0.88	5.41
BPC 77	0.72	0.58	1.50	1.69	1.60	0.72	0.69	11.4
BPC 118	0.97	0.80	0.83	0.86	0.84	0.95	0.97	6.67
BPC 138	1.43	1.35	1.42	1.44	1.44	1.45	1.41	6.23
BPC 180	1.26	1.27	1.38	1.42	1.40	1.30	0.98	5.98
BPC 198	0.57	0.57	0.59	0.52	0.51	0.60	0.60	5.84

De acuerdo con Amos y Hoebel (1991) y Aguilar y Borrel (1991), la técnica del DMSO es una buena opción cuando no existe la posibilidad de refrigerar las muestras para su conservación.

Con respecto a los organoclorados detectados en los tejidos no fortificados de *Phocoena sinus*, *Balaenoptera physalus*, *B. musculus* y *B. edeni* tenemos que en el primer caso los resultados obtenidos con respecto al p-p' DDE se encuentran en el rango detectado por Calambokidis (1988), aunque en nuestro caso no se detectaron BPCs ni ningún otro pesticida, lo cual sugiere que el p-p' DDE encontrado ha estado en el organismo desde su nacimiento al serle transmitido por la madre, o lo adquirió a través de alimento ya contaminado, y las concentraciones de .53 a 7.5 µg/g no representan una amenaza para estos organismos. Estudios recientes sobre organoclorados en peces del Río Colorado también indican la presencia únicamente de p-p' DDE (Camacho Ibar, com. pers.).

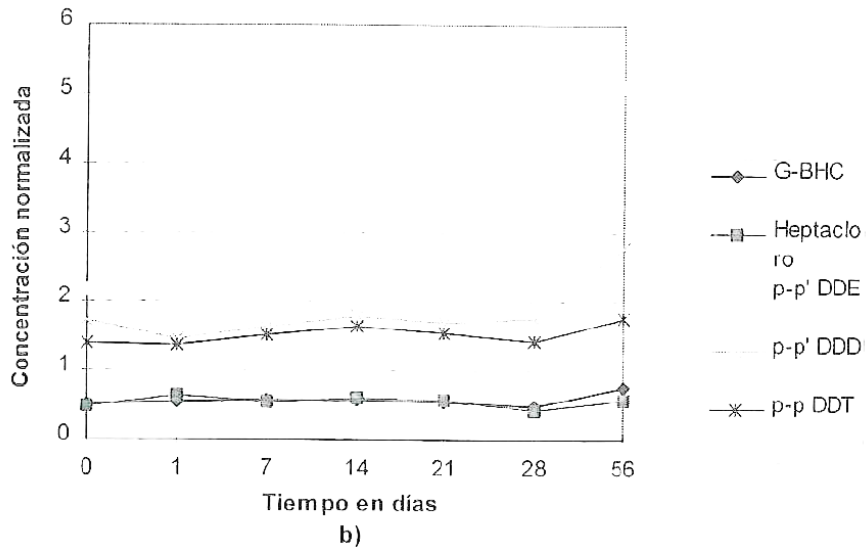
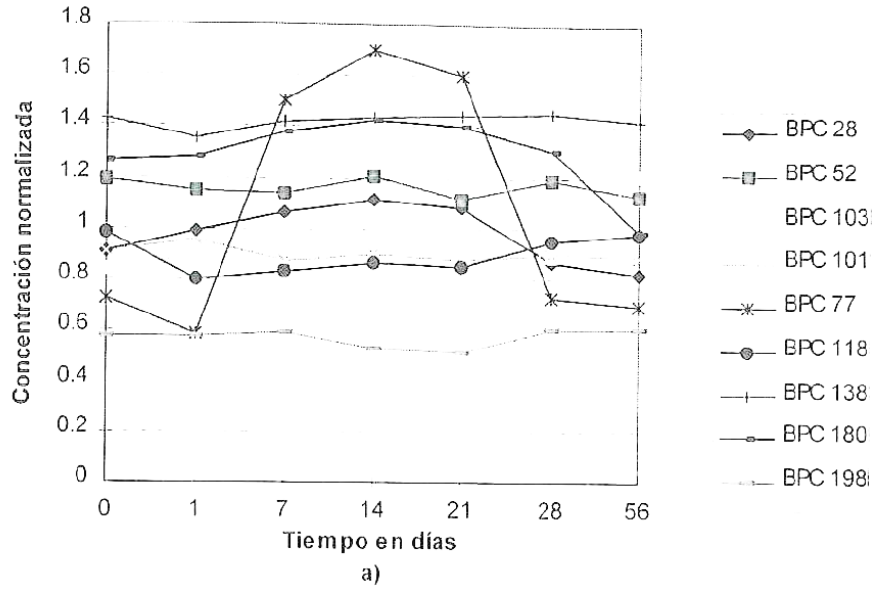


Fig. 15 Concentraciones normalizadas del homogenado congelado de: a) BPCs y b) pesticidas.

En cuanto a las ballenas, en el organismo 32 se obtuvo una concentración de p-p' DDE elevada en comparación con los organismos restantes. También existe la presencia de p-p' DDT y p-p' DDD en concentraciones menores. Tomando en cuenta que este organismo fué un macho adulto encontrado varado la presencia de estos compuestos no es rara.

En cuanto a los demás organismos las concentraciones que presentan son pequeñas y al igual que el #32 no representan una amenaza, esto de acuerdo con UNEP (1991) que señala que concentraciones mayores de 100 µg/g peso húmedo en cetáceos provocan condiciones patológicas, aunque dichas condiciones se han reportado por Gilbertson, 1989 y Tanabe *et al.*, 1993 en organismos con menor concentración y ya que la vías bioquímicas de acción de estos compuestos no están realmente identificadas no se sabe con certeza a que concentración comienzan a afectar al organismo.

CONCLUSIONES:

1) Las muestras de tejido adiposo subcutáneo de cetáceos preservado por el método del dimetil sulfóxido en agua al 20 % y saturado con sal, pueden ser utilizadas para la identificación y cuantificación del contenido de hidrocarburos clorados, ya que se probó estadísticamente que la concentración de dichos compuestos permanece estable a través del tiempo.

2) La técnica analítica empleada en el presente trabajo es adecuada para la identificación y cuantificación de los BPCs 28, 52, 77, 101, 103, 118, 138, 153 y 198; y para los pesticidas γ -BHC, heptacloro, p-p' DDT y sus metabolitos p-p' DDE, y p-p' DDD, pero no para la familia de los ciclodienos, es decir, el aldrín, dieldrín y endrín ya que debido al tratamiento ácido resulta ser una técnica destructiva para dichos compuestos.

3) Las concentraciones encontradas en *Phocoena sinus*, *Balaenoptera physallus*, *B. musculus* y *B. edeni* no son consideradas peligrosas para los organismos, pero comprueban la permanencia de los compuestos organoclorados en el medio.

BIBLIOGRAFIA:

Aguilar, A. and Borrel, A. (1991). Heterogeneous distribution of organochlorine contaminants in the blubber of ballen whales. Implications for sampling procedures. *Marine Environmental Research* 31: 275-286.

Amos, B. and Hoezel, A. (1991). Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. Report of the International Whaling Commission Special Issue 13: 99-103.

Ballschmiter, K., Rappe, C. and Buser, H. (1989). Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCB's, PCT's PCN's and PBB's. In: Kimbrough and Jensen (eds) Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division). pp. 47-69.

Becker, P. and Muir, D. (1995). Concentrations of Chlorinated Hydrocarbons, heavy metals and other elements in tissues banked by the Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project. U.S. Department of Commerce Technology Administration. National Institute of Standards and Technology pp. 1-58.

Boon, J. and Duinker, J. (1986). Monitoring of cyclic organochlorines in the marine environment. *Environmental Monitoring and Assessment* 7: 189-208.

Borrel, A. and Aguilar, A. (1993). DDT and PCB pollution in blubber and muscle of long-finned pilot whales from the Faroe Islands. Report of the International Whaling Commission Special Issue 14: 360-367.

Brannon, J. and Karn, R. (1990). Cleanup of sediment extracts prior to PCB analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 542-548.

Calambokidis, J. (1988). Chlorinated Hydrocarbon concentrations in the Gulf of California Harbor Porpoise (*Phocoena sinus*). Cascadia Research Collective. Final report for Marine Mammal Commission pp. 1-15.

Clark, R. (1992). *Marine Pollution*. Clarendon Press Oxford., 172 pp.

Ghirelli, R., Francis, H., Terry, L., Marvin, J., Robin, L., Gerald, W. and David, B. (1983). Polychlorinated Biphenyls. Environmental Protection Agency. The PCB Regulation Agency. The PCB regulations under TSCA.

Gilbertson, M. (1989). Effects on fish and wildlife populations. In: Kimbrough and Jensen (eds) Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 103-127 pp.

Guichon, G. and Guillemi, C. (1988). Quantitative gas chromatography. CRC Press Inc, 137 pp.

Hall, A., Law, R., Wells, D., Harwoods, J., Ross, H., Kennedy, S., Allchin, C., Campbell, L. and Pomeroy, P. (1992). Organochlorine levels in common seals (*Phoca vitulina*) which were victims and survivors of the 1988 phocine distemper epizootic. *The Science of the Total Environment*, 115: 145-162.

Holden, A. and Marsden, K. (1969). Single-stage clean-up of animal tissue extracts for organochlorine residue analysis. *Journal of Chromatography* 44: 481-492.

Hooper, S., Pettigrew, Ch. and Sayler, G. (1989). Ecological effects and prospects for the elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCB's). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 655-667.

Kaman, K., Falandysz, J., Tanabe, S. and Tatsukawa, R. (1993). Persistent organochlorines in harbour porpoises from Puck Bay, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (3): 162-165.

Kleivane, L., Skaare, J., Bjorge, A., Ruiter, E. and Reijnders, P. (1995). Organochlorine pesticide residue and PCB's in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) incidentally caught in Scandinavian waters. *Environmental Pollution*, 89 (2): 137-146.

Lockyer, C., McConnell, L. and Waters, T. (1984). The biochemical composition of fin whale blubber. *Canadian Journal of Zoology*, 62: 2553-2562.

Metcalf, R. (1990). Chemistry and Biology of pesticides. Freeman and Company. San Francisco, 72 pp.

Oliver, B., Baxter, R. and Lee, H. (1989). Polychlorinated Biphenyls. In: Afghan, B. and Chau, A.(eds.). Analysis of trace organics in the aquatic environment. CRC Press Inc, pp. 31-67.

Rimkus, G., Rexilius, L., Heidemann, G., Vagts, A. and Hedderich, J. (1993). Results of an interlaboratory study on organochlorine compounds (PCB, DDT, DDE) in seal blubber (*Phoca vitulina*). *Chemosphere*, 26 (6): 1099-1108.

Ríos, L. (1994). Hidrocarburos clorados en sedimentos superficiales de la costa noroccidental fronteriza México-EUA y Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 84 pp.

Schulz, D., Petrick, G. and Duinker, J. (1989). Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environment Science Technology*, 23 (7): 852-859.

Tanabe, S. and Tatsukawa R. (1984). Distribution, behavior, and load of PCB's in the oceans. In: Waid, J. (ed). PCB's and the environment. CRC Press Inc, pp.143-161.

Tanabe, S., Loganathan, B., Subramanian, A. and Tatsukawa, R. (1987). Organochlorine residues in short-finned pilot whale. Possible use as tracers of biological parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 18 (10): 561-563.

Tanabe, S. (1988). PCB problems in the future: foresight from current knowledge. *Environmental Pollution*, 50: 5-28.

Tanabe, S., Subramanian, An., Ramesh, A., Kumaran, P., Miyazaki, N. and Tatsukawa, R. (1993). Persistent organochlorine residues in dolphins from the Bay of Bengal South India. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (6): 311-316

United Nations Environment Programme Oceans and Coastal Areas Programme Activity Center. (1991). Review of Contaminants in Marine Mammals. ICES/IOC/UNEP. Technical Report (2) 16pp.

Vidal, L., Trevelin, W., Landgraf, M., Rezende, M. (1992). Gas chromatographic methods for discriminating between chlorinated pesticides and polychlorobiphenyls in mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 269: 205-210.

Voogt, P. and Brinkman, U. (1989). Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Kimbrouh and Jensen (eds) Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), pp. 3-45

Wade, T. and Cantillo, A. (1994). Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbon residues. NOAA Technical memorandum NOS ORCA 77.

Wells, D., Cowan, A. and Christie, A. (1985). Separation of organochlorine residues by adsorption chromatography prior to capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 328: 372-377.

Wells, D. and De Boer, J. (1994). The 1993 QUASIMEME laboratory performance study: chlorobiphenyls in fish oil and standard solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 29 (4): 174-184.