

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN PLUMAS

Development of an analytical method for extracting organochlorine pesticides from feathers.

Espín S.¹, Martínez-López E.¹, María-Mojica P.^{1,2}, García-Fernández A.J.^{1*}

¹Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia. ²Centro de Recuperación de Fauna Silvestre "Santa Faz, Comunidad Valenciana, Alicante.

***Autor para correspondencia:** Antonio Juan García-Fernández. Tel. 34-868-887021, Fax. 34-868-884147, E-mail. ajgf@um.es

RESUMEN

Debido a los efectos adversos de los plaguicidas organoclorados (OC), estos compuestos han sido monitorizados en diferentes especies de seres vivos. En estos estudios de biomonitorización ambiental, las aves han jugado un importante papel debido a su sensibilidad a los cambios ambientales y a su elevada posición en la cadena trófica. En los últimos años existe un interés creciente en utilizar muestras no destructivas como alternativa a los tejidos internos. En este sentido, las plumas han sido ampliamente utilizadas en la monitorización de la contaminación ambiental por metales pesados y podrían proporcionar información de la concentración de OC en la sangre durante su desarrollo. Sin embargo, la información sobre su uso en la monitorización de OC es escasa. El objetivo general del presente estudio es comprobar la utilidad de la pluma como unidad de biomonitorización de la exposición a plaguicidas organoclorados. Para ello se desarrolla un método de extracción de 16 OC en plumas, incluyendo α -, β - y δ -HCH, lindano, aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endosulfán I y II, endosulfán sulfato, p,p'-DDT, DDD, DDE, heptacloro y su epóxido. Además se evalúa la interferencia por contaminación externa en los niveles encontrados en plumas y se estudia la distribución de los compuestos entre partes de la pluma (barbas y ejes).

La contaminación externa parece tener influencia en los niveles encontrados en plumas para determinados compuestos, sin embargo, no parece ser la única causa de los mayores niveles observados en barbas en comparación con los ejes.

La pluma parece ser una prometedora herramienta no destructiva de plaguicidas organoclorados en aves. Futuros estudios deben ir encaminados en determinar correlaciones entre concentraciones en plumas y tejidos internos de aves. Además, se deben evaluar factores adicionales como la edad, sexo y estado nutricional de las aves para comprobar su efecto sobre los niveles de contaminantes en plumas.

Palabras clave: plaguicidas organoclorados, plumas, biomonitorización.

ABSTRACT

Due to the adverse effects of organochlorine pesticides (OC), these compounds have been widely monitored in several species of living beings. Birds have played an important role in monitoring environmental pollution due to their sensitivity to environmental changes and their position in the upper of the food chain. In recent years, many efforts have been attempted to look for useful samples obtained in a non-destructive way as alternative to the collection of internal tissues. Feathers can provide information of OC concentrations in the circulating blood at the time of their development. They have been widely used in monitoring of metal environmental pollution. However, information about their use in OC monitoring is scarce. The general aim of this study is the validation of the feather as OC biomonitoring tool. In this sense, we develop a method of extraction for 16 OC in feathers, including α -, β - and δ -HCH, lindane, aldrin, dieldrin, endrin, endrin aldehyde, endosulfan I and II, endosulfan sulfate, p,p'-DDT, DDD, DDE, heptachlor and its epoxide. Moreover, we assess the influence of external contamination and the distribution of compounds between parts of the feather (barbs and shaft).

External contamination seems to have influence on the levels found in feathers for some compounds. However, it does not seem to be the only cause of the high levels observed in barbs in comparison with those detected in shaft.

Feather could be considered as a promising non-destructive tool for organochlorine pesticides in birds. Future studies should be carried out to obtain correlations between concentrations in feathers and internal tissues of birds. Moreover, it is necessary to evaluate additional factors such as age, sex and nutritional status of the birds in order to check its effect on the OC levels in feathers.

Key words: organochlorine pesticides, feathers, biomonitoring.

INTRODUCCIÓN

La biomonitorización, es decir, la medición de concentraciones de un contaminante en tejidos o de los efectos relacionados con su exposición en seres vivos, puede revelar la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos (Beeby, 2001). El grado de impregnación de los contaminantes ambientales en tejidos, fluidos o productos de cualquier especie animal, incluido el hombre, refleja el estado de salud del ecosistema o ambiente en el que se desenvuelven, además de servir como parámetro de evaluación de la supervivencia de la especie (García-Fernández, 1994).

Debido a los efectos perjudiciales de los plaguicidas organoclorados, estos compuestos orgánicos se han monitoreado tanto en muestras ambientales como en la biota y continúan encontrándose en la actualidad (Espín et al., 2010). En este sentido, las aves han desempeñado un papel importante en la evaluación de la contaminación ambiental por su sensibilidad a los cambios ambientales y su elevada posición

en la cadena alimentaria, acumulando altos niveles de contaminantes en sus tejidos.

A pesar de que la medida directa de los contaminantes en tejidos internos y sangre de aves es el mejor indicador del grado y tipo de exposición a determinados compuestos como metales pesados y plaguicidas organoclorados (García-Fernández et al., 1997, María-Mojica et al., 2000), razones prácticas, éticas y de conservación, abogan por la búsqueda de otro tipo de muestras de obtención poco o nada cruenta para el animal. De esta forma, numerosos estudios se han centrado en técnicas no destructivas para la biomonitorización de contaminantes utilizando muestras como la sangre (García-Fernández et al., 1996, Martínez-López et al., 2005, 2009), los excrementos (Sun et al., 2006), alimento regurgitado (Mateo et al., 1999), los huevos (Martínez-López et al., 2007; Malik et al., 2010), aceite de la glándula uropigial (Johnston, 1976; Yamashita et al., 2007), el cabello (Covaci et al., 2008; d'Havé et al., 2005) y las plumas (Dauwe et al., 2005; Jaspers et al., 2006; Van den Steen et al., 2007; Jaspers et al., 2009).

Aunque todavía son pocos los trabajos que han investigado la acumulación de contaminantes orgánicos persistentes en las plumas, los últimos hallazgos crean perspectivas valiosas para futuros estudios de seguimiento de estos contaminantes en las comunidades de aves, como se ha hecho con éxito para los metales pesados (Martínez-López et al., 2002, 2005; Garitano-Zavala et al., 2009; Malik y Zeb, 2009). Los compuestos organoclorados analizados en otros estudios han sido PCBs, DDTs y HCHs, siendo de importancia validar la pluma como método de biomonitorización de otros compuestos que fueron ampliamente utilizados como aldrín, dieldrín, endrín, heptacloro y endosulfán.

Las plumas tienen una serie de ventajas respecto al resto de tejidos de obtención no cruenta, ya que pueden ser recolectadas independientemente de la temporada, la edad o el sexo. Además son fácilmente recogidas, transportadas y almacenadas a temperatura ambiente y se pueden recoger en pequeño número sin causar daño permanente al ave.

Al contrario que el pelo, que crece continuamente, las plumas sólo crecen durante un cierto periodo de tiempo, conectadas al torrente sanguíneo (Jaspers et al., 2004). Los contaminantes orgánicos pueden llegar a las plumas durante su crecimiento a través de la sangre, produciéndose de esta forma una contaminación interna. Después de la maduración de la pluma, el suministro de sangre se atrofia y se convierten en plumas aisladas del resto del cuerpo (Burger, 1993). Por lo tanto, las plumas pueden contener información sobre las concentraciones circulantes en la sangre en el momento de su desarrollo. Sin embargo, la correlación con los niveles en los tejidos puede ser confusa debido a la contaminación externa de los contaminantes orgánicos en la superficie de las plumas (Jaspers et al., 2007a). Esta contaminación externa puede producirse tanto por fuentes exógenas, como la deposición atmosférica ya sea en seco o húmedo, como endógenas, es decir, por el

acicalamiento de las plumas con aceite de la glándula uropigial.

La contaminación externa por metales pesados en las plumas ha sido ampliamente investigada (Burger, 1993; Pilastro et al., 1993; Dauwe et al., 2003; Jaspers et al., 2004), y ha demostrado tener una influencia importante en las concentraciones medidas en las plumas. El grado de contaminación externa varía según el metal que se examina y proviene principalmente de fuentes exógenas (Jaspers et al., 2004). Sin embargo, las propiedades químicas de los metales pesados y contaminantes orgánicos difieren considerablemente, por lo que la contaminación externa por compuestos orgánicos puede influir de distinta manera sobre los niveles encontrados en plumas.

Recientemente se llevó a cabo un estudio para investigar el grado de contaminación externa de contaminantes orgánicos a través del aire, y resultó ser de pequeña importancia (Jaspers et al., 2007b). Sin embargo, según Vorhees et al. (1997) la deposición atmosférica de contaminantes orgánicos podría ser importante en la modificación del perfil en plumas, esperándose que los compuestos más volátiles contribuyan más a este tipo de contaminación externa. Según Greichus y Greichus (1974), habría que tener en cuenta, además, las fuentes endógenas en la contaminación externa de las plumas, es decir, la contaminación con aceite de la glándula uropigial, ya que los contaminantes orgánicos son productos químicos lipofílicos y tienen la capacidad de acumularse en altas concentraciones en las secreciones aceitosas (Van den Brink, 1997; Yamashita et al., 2007).

A priori, para obtener información útil acerca del grado de exposición de los individuos y la distribución interna de los plaguicidas organoclorados, con una correcta interpretación de los resultados, sería necesario llevar a cabo un proceso de lavado que consiga eliminar los compuestos de la superficie de la pluma.

El objetivo general del presente trabajo es comprobar la utilidad de la pluma como unidad

de biomonitorización de plaguicidas organoclorados. Para ello se plantearon como objetivos específicos la puesta a punto de una técnica de extracción de plaguicidas organoclorados en plumas y la evaluación de la posible interferencia por contaminación externa en los niveles encontrados en las plumas, estudiando además las posibles diferencias entre partes de la pluma (barbas y ejes) en la distribución interna de los compuestos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras utilizadas

En el presente estudio se utilizaron plumas de ánade real (*Anas platyrhynchos*). Se realizó una mezcla de plumas troceadas y se tomaron 25 alícuotas para la puesta a punto de la metodología analítica. A la hora de evaluar la contaminación externa y estudiar la distribución de los compuestos en el interior de la pluma se realizaron cuatro grupos de muestras, correspondientes a la mezcla troceada de barbas lavadas, barbas sin lavar, ejes lavados, y ejes sin lavar, tomándose 10 alícuotas de cada grupo para su procesado y análisis.

Las muestras fueron facilitadas por el personal del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Santa Faz (Alicante, Generalitat Valenciana).

Plaguicidas organoclorados estudiados

Los 16 plaguicidas y metabolitos organoclorados objeto de estudio fueron α -HCH, β -HCH, δ -HCH y γ -HCH (Lindano), heptacloro y su epóxido, endosulfán (isómeros I y II) y su metabolito endosulfán sulfato, aldrín, dieldrín, endrín y endrín aldehído, p,p'-DDT y metabolitos p,p'-DDD y p,p'-DDE.

Disolventes y reactivos

Los disolventes orgánicos hexano, acetona, éter de petróleo y éter etílico son calidad de

residuos Pestiscan de la marca comercial Lab-Scan®, y el sulfato sódico anhidro granulado es calidad de residuos para análisis orgánico de trazas de Merck®. Las columnas de Florisil® (SEP-PAK, Classic) son de la marca comercial Waters®. El patrón de los 16 plaguicidas organoclorados objeto de análisis es de la firma comercial Supelco®, disuelto en 1 ml de metanol:diclorometano 98:2. Dicho patrón original se disolvió en hexano (1:25) a las siguientes concentraciones: 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, heptacloro, heptacloro epóxido y aldrín; 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para endosulfán I, endosulfán II, DDE, dieldrín y endrín; y 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para DDD, DDT, endrín aldehído y endosulfán sulfato.

Se utilizó metoxicloro (PolyScience®) para la preparación de un patrón interno de concentración 1 mg/ml.

Evaluación de los métodos analíticos

El gran número de plaguicidas organoclorados a identificar y las variaciones en su polaridad plantean problemas en el proceso de recuperabilidad. Con el fin de resolver dichos problemas, se prepararon distintas cantidades y mezclas de disolventes orgánicos para averiguar cuál de ellas era la más adecuada. De esta forma, se plantearon cuatro métodos de extracción de plaguicidas organoclorados en plumas (A, B, C y D), cuyas características generales se presentan en la tabla 1. Sobre cada método propuesto se realizaron pruebas de recuperabilidad que permitieron elegir el método más idóneo sobre el cual llevar a cabo las pruebas de exactitud, linealidad y precisión, cuyas características se describen a continuación.

Exactitud del método:

Con el fin de comprobar la exactitud del método, se realizó un estudio de recuperación de los plaguicidas en muestras iguales de pluma de ánade real. Se realizaron los correspondientes

Tabla 1. Métodos de extracción de plaguicidas organoclorados evaluados en plumas

DISOLVENTES				
MÉTODO	Incubación	Extracción	Redilución	Elución
Método A	3 ml de hexano:diclorometano (4:1)	4 ml de hexano: diclorometano (4:1)	5 ml hexano	25 ml de éter de petróleo:éter etílico (21:4)
Método B			5 ml hexano: diclorometano (4:1)	15 ml de hexano
Método C	15 ml de acetona:hexano (1:2)	20 ml de acetona:hexano (1:3)	5 ml hexano	15 ml de hexano
Método D				25 ml de éter de petróleo:éter etílico (21:4)

ensayos en blanco o control, para comprobar los niveles de residuos de los compuestos de interés en las plumas utilizadas. Para obtener los porcentajes de recuperación, las muestras fueron fortificadas a tres niveles, añadiendo 1, 2 y 3 ml de disolución patrón 1:25 (dicho patrón se preparó disolviendo el original en hexano) antes de realizar la técnica. Tanto para los controles como para los tres niveles de enriquecimiento se realizaron muestras por quintuplicado. Posteriormente se extrajeron con el procedimiento descrito a continuación, y se inyectaron en el cromatógrafo para su determinación.

Una vez realizada la determinación analítica, los valores obtenidos fueron comparados con los de las disoluciones patrón utilizadas para la fortificación, que también fueron analizadas en la misma secuencia.

Finalmente se seleccionó el método con el que se obtenían mejores porcentajes de recuperación. Para el cálculo de dicho porcentaje se utilizó la fórmula: $Recuperación (\%) = (C_m / C_p) \times 100$, donde C_m es la concentración de cada uno de los compuestos en la muestra, y C_p la

concentración de cada compuesto en la disolución patrón.

Linealidad del método:

La linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta. La selección del rango y del número de puntos experimentales para obtener la linealidad está estrictamente relacionada con la aplicación del método. En el presente estudio se decidió tomar un punto control de plumas sin fortificar, y tres niveles de fortificación con concentraciones de 0,4-2,4 mg/g, 0,8-4,8 mg/g y 1,2-7,2 mg/g, según el compuesto. Para cada uno de los puntos de calibración se realizaron cinco repeticiones.

El ajuste lineal de los datos a una curva de regresión se evaluó mediante el método de mínimos cuadrados, aceptando la linealidad de respuesta entre las concentraciones inyectadas siempre que el coeficiente de correlación lineal fuera superior a 0,95 para los factores de respuesta. La recta de regresión no fue forzada a pasar por el origen.

Precisión del método:

En cuanto a la precisión del método, la repetibilidad se estudia para comprobar que un método es capaz de dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio, al realizar el proceso de extracción de forma repetida para un mismo tipo de muestra. Permite determinar la concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo unas mismas condiciones experimentales, y por un mismo operador. Se evalúa mediante la obtención del coeficiente de variación (CV). Para el cálculo de este parámetro se utilizó el mismo lote empleado en la linealidad, es decir, se calculó el CV de las cinco repeticiones para cada uno de los niveles de fortificación y para cada compuesto. El criterio de aceptación fue que el CV obtenido entre las repeticiones a cada nivel de fortificación fuese $\leq 20\%$.

La fórmula utilizada para su cálculo es: $C.V.(%) = (S/Xm) \times 100$, donde S es la desviación típica de la serie de mediciones (5 repeticiones), cuya media es Xm .

La reproducibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo las mismas condiciones experimentales pero a distinto tiempo o por distintos operadores, ya que puede suponerse que, a lo largo del tiempo, ha podido haber cambios en material o instrumentación que afectarán al resultado de los análisis. Para este cálculo, se analizaron en diferentes tiempos cinco muestras de plumas iguales fortificadas con 1 ml de disolución patrón 1:25. Se aceptó la reproducibilidad intra-laboratorio como válida cuando el CV fue $\leq 20\%$.

Para el estudio de dichos parámetros se utilizaron plumas de ánade real previamente lavadas con agua del grifo, agua destilada y agua milli-Q, para evitar posibles interferencias por contaminación externa.

Influencia de la contaminación externa:

Una vez puesto a punto el método, se evaluó la influencia de la contaminación externa y se estudiaron las posibles diferencias de acumulación dentro de la estructura de la pluma. Para ello se tomaron plumas de vuelo de ánade real y se separaron en barbas y ejes, realizando una mezcla de barbas sin lavar ($n=10$) y barbas lavadas ($n=10$), y una mezcla de ejes sin lavar ($n=10$) y ejes lavados ($n=10$). Estas muestras se procesaron y analizaron independientemente.

Metodología analítica

Una vez estudiados los resultados, se optó por la metodología que se describe a continuación.

Se cortan 0,2 g de plumas al menor tamaño posible, aproximadamente 1 mm, previamente lavadas con agua del grifo, agua destilada y agua Milli-Q, para evitar posibles interferencias por contaminación externa. Una vez secadas a temperatura ambiente, se llevan a un tubo tipo Falcon con 4 ml de HCl (37%) y 15 ml de acetona:hexano (1:2). La mezcla se mantiene en baño térmico a 37°C durante 13 horas. Posteriormente se realiza la extracción con 20 ml de acetona:hexano (1:3) y se homogeneiza la mezcla. El extracto se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos, haciendo pasar el sobrenadante por un embudo de placa porosa con sulfato sódico anhidro a un matraz de 100 ml. Se concentra a vacío en el rotavapor y el extracto seco se redissuelve en 5 ml de n-hexano. La purificación se realiza a través de una microcolumna de Florisil® (SEP-PAK, Waters®), que debe ser activada previamente con 2 ml de n-hexano. Se pasan los 5 ml del extracto de hexano que se dejan caer por gravedad y posteriormente se prepara una elución con la mezcla éter de petróleo-éter etílico (21:4), recogiendo todo el solvente en el mismo matraz de 100 ml, que volverá a ser desecado a vacío

en el rotavapor. Este último extracto seco se redissuelve en 5 ml de n-hexano, y se pasa a un tubo de vidrio con tapón de corcho, conservándolo en la cámara frigorífica hasta su análisis cromatográfico.

Finalmente, para el análisis de las muestras, el contenido de los tubos de vidrio se evapora a sequedad con nitrógeno y se redissuelve en 1 ml de hexano, haciéndose pasar a viales de los cuales se pinchará 1 μ l en el cromatógrafo de gases (Shimadzu® GC 17A), con detector de captura de electrones (ECD). La columna usada es de tipo capilar SPB (SPB-608, Supelco®) con un grosor de 0.25 μ m, longitud de 30 m y diámetro interno de 0.25 mm, específicamente recomendada por la EPA para el análisis de los 16 plaguicidas organoclorados objeto de estudio.

El tratamiento de los datos cromatográficos se realizó mediante el software Shimadzu GC Solution. Se utilizó helio como gas portador y nitrógeno en el *make-up*. El inyector se configuró en modo splitless, y las temperaturas del inyector y detector fueron 290°C y 330°C respectivamente. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: 2 min 50°C, de 50 a 150°C a 40°C/min, 2 min 150°C, de 150 a 290°C a 8°C/min, 10 min 290°C.

La identificación y cuantificación se realizó mediante el patrón externo de 16 OCs de Supelco® diluido en hexano al 1:25.

El límite de detección para cada materia activa se calculó como la menor concentración de disolución patrón detectada en las condiciones experimentales del instrumento utilizado, teniendo en cuenta que la respuesta presentara una relación señal/ruido mayor de 3. Los límites de detección se encuentran en el intervalo 0,03-0,54 ng g⁻¹. Se utilizó metoxicloro (PolyScience®) (1 mg ml⁻¹) como patrón interno. Se añadió un volumen de 10 μ l a las muestras y los patrones con el fin de comparar resultados y comprobar la repetibilidad de los cromatogramas. Las concentraciones de OC se expresan en ng g⁻¹.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS v.15.0 y la hoja de cálculo Excel 2007. Se realizaron análisis de estadística descriptiva, representándose los valores obtenidos como media \pm desviación típica, mediana y rango (mínimo-máximo). Puesto que los datos de concentraciones de plaguicidas no se ajustan a una distribución normal, para determinar las posibles diferencias entre las variables estudiadas (plumas lavadas y sin lavar, y barbas y ejes) se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los resultados se consideraron significativos a $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesta a punto de la metodología analítica

La puesta a punto de un método analítico tiene como objetivo caracterizar su rendimiento en cuanto a su alcance, especificidad, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad (SANCO, 2007).

La exactitud o porcentaje de recuperación de los analitos de la matriz estudiada mediante el método de extracción, se evalúa mediante la realización de fortificaciones. En la tabla 2 se presentan los porcentajes de recuperación medios para cada uno de los métodos evaluados. El método D presenta los mayores porcentajes de recuperación. Finalmente se seleccionó dicho método como el más adecuado para la extracción de plaguicidas organoclorados en plumas, con un rango de valores medios de recuperación para los 16 compuestos objeto de estudio entre 46,13 y 146,05%, a excepción del endrín aldehído (347,11%).

Se debe tener en cuenta que al tratarse de un método analítico laborioso, con varias etapas, como extracción y purificación, y al ser una técnica para un gran número de plaguicidas con variaciones de polaridad, determinados compuestos pueden presentar problemas en la

Tabla 2. Validación del método de extracción de plaguicidas organoclorados en plumas

COMPUESTO	VALORES MEDIOS DE RECUPERACIÓN (%)*				PARÁMETROS VALIDACIÓN MÉTODO D		
	Método A	Método B	Método C	Método D	Linealidad (R)	CV Repetibilidad(%)*	CV Reproducibilidad(%)**
α -HCH	28,67	9,14	5,85	57,67	0,981	7,79	12,15
Lindano	14,10	7,68	9,69	57,50	0,976	8,75	13,33
β -HCH	51,22	13,47	7,29	52,98	0,979	14,14	12,43
Heptacloro	24,63	6,77	7,95	46,74	0,977	8,91	12,03
δ -HCH	43,67	10,66	10,21	53,62	0,960	11,40	18,22
Aldrín	28,97	7,05	4,55	46,13	0,973	15,81	18,55
Heptacloro Epóxido	26,95	9,13	13,27	81,60	0,987	9,12	16,84
Endosulfán I	9,09	1,06	3,13	68,47	0,968	11,74	24,15
DDE	23,08	14,42	19,12	122,23	0,989	14,17	13,29
Dieldrín	13,44	4,52	12,56	98,53	0,974	16,17	17,77
Endrín	10,08	0,00	0,49	48,87	0,964	8,70	17,59
DDD	15,05	18,68	28,20	138,15	0,974	17,86	9,19
Endosulfán II	2,99	0,00	0,10	146,05	0,969	15,56	14,45
DDT	18,75	12,03	29,77	135,56	0,989	17,22	12,79
Endrín aldehído	45,40	31,97	84,25	347,11	0,965	29,91	20,64
Endosulfán Sulfato	9,11	0,00	12,16	118,72	0,980	17,73	17,64

R=Coficiente de correlación de la linealidad, CV=Coficiente de variabilidad, *Media de los tres niveles de fortificación, **Media de 5 determinaciones a un nivel de fortificación.

recuperabilidad, con menores porcentajes de recuperación, ya que los disolventes orgánicos no son capaces de extraer de la misma manera a todos los compuestos. Sin embargo, con el método D se obtienen recuperaciones bastante aceptables para los compuestos objeto de estudio.

La linealidad se utiliza para estimar la concentración de cada uno de los plaguicidas y el área resultante del análisis cromatográfico, demostrando la capacidad del método de obtener resultados lineales. Los valores obtenidos

muestran una buena correlación concentración del plaguicida/área del pico cromatográfico, para cada uno de los compuestos, con valores del coeficiente de regresión (R) mayores a 0,96 (Tabla 2).

Finalmente, en relación a la precisión del método, los coeficientes de variabilidad medios obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad son indicativos de la buena precisión del método, con valores por debajo del 20% en todos los casos, umbral que hemos establecido en la validación del método analítico, con la

Tabla 3. Niveles de plaguicidas organoclorados en barbas y ejes lavados y sin lavar

Niveles de plaguicidas organoclorados (ng/g) en plumas				
Compuesto	Barbas lavadas (N=10)	Ejes lavados (N=10)	Barbas sin lavar (N=10)	Ejes sin lavar (N=10)
α -HCH	1,2 \pm 2,02**	2,25 \pm 0,99	0,42 \pm 1,34**	5,05 \pm 3,64
	0,04 (0-4,97)	2,08 (0,48-3,56)	0 (0-4,26)	6,65 (0-9,21)
Lindano	23,59 \pm 15,32** ^a	7,49 \pm 2,95 ^a	79,91 \pm 52,39*	27,85 \pm 6,71
	29,72 (3,77-43,48)	7,73 (2,45-11,61)	59,22 (25,98-155,55)	27,23 (18,30-37,41)
β -HCH	2,15 \pm 2,79**	0,32 \pm 1,03	2,83 \pm 3,73	1,17 \pm 2,51
	0,55 (0-7,24)	0 (0-3,26)	0 (0-7,88)	0 (0-6,71)
δ -HCH	2,01 \pm 2,26	1,49 \pm 1,24	3,27 \pm 3,21	3,01 \pm 2,34
	1,19 (0-5,80)	1,5 (0-3,36)	3,55 (0-8,68)	3,67 (0-5,41)
Heptacloro	3,84 \pm 5,15	5,44 \pm 2,66	nd	5,71 \pm 6,29
	0,72 (0-12,87)	5,36 (1,15-9,23)		4,10 (0-15,17)
Heptacloro Epóxido	7,39 \pm 7,63	2,80 \pm 3,08 ^a	23,37 \pm 20,67	13,31 \pm 7,60
	5,11 (0-18,82)	2,07 (0-7,52)	23,13 (0-59,66)	14,57 (0-21,10)
Aldrín	25,03 \pm 15,66**	6,59 \pm 3,91	34,07 \pm 32,44	15,64 \pm 17,05
	30,52 (0-45,95)	5,99 (1,45-12,36)	34,91 (0-98,56)	10,95 (0-38,12)
Dieldrín	3,49 \pm 5,18	1,61 \pm 1,41	nd	nd
	0,26 (0-14,16)	1,42 (0-4,35)		
Endrín	27,64 \pm 29,78** ^a	52,92 \pm 19,83 ^a	138,89 \pm 57,85	90,41 \pm 25,66
	21,48 (0-85,13)	52,10 (26,90-88,88)	140,31 (43,37-208,54)	91,93 (52,73-128,59)
Endrín aldehído	270,06 \pm 233,96** ^a	116,02 \pm 64,69 ^a	1152,94 \pm 262,49*	527,15 \pm 152,05
	225,96 (0-784,02)	137,26 (2,40-196,49)	1202,78 (683,86-1547,18)	504,64 (345,46-817,93)
Endosulfán I	1,13 \pm 3,59 ^b	nd	12,36 \pm 16,05	nd
	0 (0-11,37)		4,7 (0-47,83)	
Endosulfán II	nd	0,54 \pm 1,29	nd	nd
		0 (0-3,99)		
Endosulfán Sulfato	195,87 \pm 101,39*	52,38 \pm 26,74	184,20 \pm 47,91*	79,66 \pm 35,66
	217,69 (0-316,28)	50,9 (12,54-106,16)	172,48 (119,75-276,99)	81,69 (32,69-137,66)
DDE	16,86 \pm 18,31** ^a	2,03 \pm 2,10 ^a	38,41 \pm 11,86	29,85 \pm 12,92
	15,43 (0-61,72)	1,33(0-6,28)	40,37(15,99-58,34)	30,13(13,64-58,60)
DDD	nd	0,65 \pm 2,08	nd	nd
		0 (0-6,58)		
DDT	36,10 \pm 77,33	24,62 \pm 29,70	28,08 \pm 50,42	36,82 \pm 77,62
	0 (0-248,45)	6,34 (0-67,22)	0 (0-148,22)	0 (0-184,53)

Media \pm Desviación estándar, mediana (mínimo-máximo). N=número de muestras, nd=no detectado. Diferencias significativas entre barbas y ejes: *p<0,01, **p<0,05. Diferencias significativas entre mismo tipo de muestras lavadas y sin lavar: ^ap<0,01, ^bp<0,05.

única excepción del endrín aldehído, con un porcentaje de variabilidad medio del 29,91% para la repetibilidad, y el endosulfán I con un valor de variabilidad medio de 24,15% para la reproducibilidad.

Por tanto, consideramos que la técnica puesta a punto en el presente trabajo es aceptable como metodología de extracción de plaguicidas organoclorados en plumas.

Influencia de la contaminación externa de la pluma

A la hora de evaluar la influencia de la contaminación externa de la pluma se compararon las medias de plaguicidas organoclorados en barbas y ejes de plumas lavadas y sin lavar de ánade real. Todos los compuestos se detectaron, al menos, una vez, aunque el endrín aldehído y el endosulfán sulfato fueron los que alcanzaron mayores concentraciones (Tabla 3). Los niveles de organoclorados fueron significativamente mayores en las muestras sin lavar que en las muestras lavadas para algunos compuestos, tanto en barbas como en ejes (endrín aldehído, endrín, lindano, DDE).

El hecho de que las concentraciones de organoclorados fueran mayores en muestras sin lavar que en lavadas para determinados compuestos sugiere una posible interferencia de la contaminación externa por deposición atmosférica o aceite secretado por la glándula uropigial. Si bien es cierto que en algunos casos los niveles son mayores en muestras lavadas que en muestras sin lavar, no existen diferencias significativas, y podría estar relacionado con los bajos niveles detectados en dichos casos, con valores de mediana próximos e incluso iguales a 0 (Tabla 3).

Por tanto, se recomienda un proceso de lavado previo a la técnica de extracción de los compuestos estudiados, evitando así que los residuos procedentes del exterior modifiquen los niveles procedentes del torrente sanguíneo. Sin embargo, dicha contaminación externa no

parece tener tanta importancia como el caso de los metales pesados, donde el 50-98% de las concentraciones de plomo pueden deberse a la contaminación externa (Weyers y Glück, 1988; Dauwe et al., 2002).

Distribución de compuestos organoclorados en el interior de la pluma

Algunos trabajos han encontrado diferencias en la acumulación de contaminantes según la parte de la pluma analizada. En estudios con metales pesados se han observado concentraciones en las barbas hasta 51 veces superiores a las del eje en cárabo común (*Strix aluco*) y hasta 120 veces mayor en gavilanes (*Accipiter nisus*) (Dauwe et al., 2003). Dichos autores atribuyen estos resultados a la contaminación externa, la cual puede variar dependiendo del metal, desde prácticamente ausente en el caso del Hg hasta 120 veces los niveles internos para el Pb (Weyers y Glück, 1988; Ek et al., 2004; Dauwe et al., 2003). Jensen et al. (2002) encontraron niveles significativamente mayores de Pt y Pd en barbas en comparación con los ejes de aves rapaces, lo que también atribuían a la influencia de la contaminación externa. Jaspers et al. (2007b) encontraron niveles significativamente mayores de HCB, DDE, PCBs y PBDEs en barbas en comparación con eje en busardo ratonero (*Buteo buteo*), sugiriendo que la contaminación externa podría ser importante. Puesto que las barbas cubren la mayor parte de la superficie de la pluma, se espera que la influencia de la contaminación externa sea mayor en estas en comparación con el eje.

Para conocer las posibles diferencias de acumulación en la estructura de la pluma se compararon las medias de plaguicidas organoclorados entre ejes y barbas de plumas de ánade real. Estas pruebas se realizaron con plumas sin lavar, para comprobar la influencia de la contaminación externa, y con plumas lavadas para evitar precisamente dicha influencia y comprobar el patrón de distribución de

los plaguicidas organoclorados en el interior de las mismas.

En la tabla 3 se recogen las concentraciones de plaguicidas organoclorados detectados en barbas y ejes de plumas lavadas y no lavadas. Se observaron mayores niveles de endrín aldehído, endosulfán sulfato y lindano en barbas sin lavar comparados con ejes sin lavar. En cuanto a las plumas lavadas, cinco de los compuestos también presentaron los mayores niveles en barbas.

Los mayores niveles de determinados compuestos en barbas sin lavar comparados con ejes sin lavar pueden explicarse por la mayor probabilidad de que se depositen partículas con contaminantes orgánicos asociados en barbas que en eje, ya que la vaina de la pluma tiene mayor superficie de contacto con el exterior y, por lo tanto, se encuentra más expuesta. Además, las aves acuáticas acicalan sus plumas con aceite de la glándula uropigial de manera intensa, contribuyendo a una mayor impregnación de las barbas. Por tanto, estos resultados muestran que la contaminación externa por estos compuestos ha de tenerse en cuenta. Dauwe et al. (2005) y Jaspers et al. (2007b) encontraron resultados similares para otros contaminantes orgánicos.

Del mismo modo, en el caso de las plumas lavadas algunos compuestos también presentaron mayores niveles en barbas, lo que sugiere que las diferencias no se deben solo a la contaminación externa, sino a una combinación de factores. En este sentido, Jaspers et al. (2007b) sugirieron que los mayores niveles en barbas podrían ser debidos a diferencias en la capacidad de unión a diferentes estructuras químicas presentes en las plumas. Dauwe et al. (2003) también plantearon esta posibilidad para explicar las diferencias en la acumulación de Hg en plumas. Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre la estructura química específica y las capacidades de unión de compuestos orgánicos en pelo o plumas. Otra posible hipótesis es que las barbas sean el final de

la ruta del compuesto, y que el eje sea un canal de transporte (Jaspers et al., 2007b).

En nuestro caso, estas diferencias sólo ocurren para determinados compuestos, precisamente aquellos que se detectan a mayores concentraciones. Ésta y otras razones técnicas nos llevan a considerar más adecuado el análisis de la pluma completa a la hora de su uso como unidad de biomonitorización.

En definitiva, la pluma parece ser una prometedora herramienta no destructiva de plaguicidas organoclorados en aves. Futuros estudios deben ir encaminados a determinar la existencia de correlaciones entre concentraciones en plumas y tejidos internos de aves con el fin de validarlas como muestras alternativas a los tejidos internos. Además, se deben evaluar factores adicionales como la edad, sexo y estado nutricional de las aves para comprobar su efecto sobre los niveles de contaminantes en plumas.

AGRADECIMIENTOS

Silvia Espín Luján ha disfrutado de una ayuda a jóvenes investigadores del Centro de Estudios e Investigación para la Gestión de Riesgos Agrarios y Medioambientales (CEIGRAM) para la realización de este trabajo. Al MICINN y a la Fundación Séneca por la financiación a través de los proyectos CGL2004-5959/BOS, CGL-2008-4318/BOS y 08758/PI/08. Al Centro de Recuperación de Fauna Silvestre "Sta. Faz" (Alicante) de la Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda de la Generalitat Valenciana por las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- BEEBY, A. 2001. What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 112:285-298.
- BURGER, J. 1993. Metals in avian feathers: bioindicators of environmental pollution. *Rev Environ Toxicol* 5: 203-311.
- COVACI, A., HURA, C., GHEORGHE, A., NEELS, H. y DIRTU, A.C. 2008. Organochlori-

- ne contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania. *Chemosphere* 72 (1): 16-20.
- D'HAVÉ, H., COVACI, A., SCHEIRS, J., SCHEPENS, P. AND DE COEN, W. 2005. Hair as an indicator of endogenous tissue levels of brominated flame retardants in mammals. *Environ Sci Technol* 39: 6016-6020.
- DAUWE, T., BERVOETS, L., BLUST, R., EENS, M. 2002. Tissue levels of lead in experimentally exposed zebra finches (*Taeniopygia guttata*) with particular attention on the use of feathers as biomonitors. *Arch Environ Contam Toxicol* 42 (1): 88-92.
- DAUWE, T., BERVOETS, L., PINXTEN, R., BLUST, R., EENS, M. 2003. Variation of heavy metals within and among feathers of birds of prey: effects of molt and external contamination. *Environ Pollut* 124: 429-436.
- DAUWE, T., JASPERS, V., COVACI, A., SCHEPENS, P., EENS, M. 2005. Feathers as a nondestructive biomonitor for persistent organic pollutants. *Environ Toxicol Chem* 24 (2): 442-9.
- EK, K.H., MORRISON, G.M., LINDBERG, P., RAUCH, S. 2004. Comparative tissue distribution of metal in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Arch Environ Contam Toxicol* 47: 259-269.
- ESPÍN, S., MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., GÓMEZ-RAMÍREZ, P., MARÍA-MOJICA, P., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 2010. Assessment of organochlorine pesticide exposure in a wintering population of razorbills (*Alca torda*) from the Southwestern Mediterranean. *Chemosphere*, 80: 1190-1198.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 1994. Impregnación por plomo y cadmio en aves silvestres de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J., SÁNCHEZ-GARCÍA, J.A., GÓMEZ-ZAPATA, M., LUNA, A. 1996. Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds. *Arch Environ Contam Toxicol* 30: 252-258.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J., MOTAS-GUZMÁN, M., NAVAS, I., MARÍA-MOJICA, P., LUNA, A., SÁNCHEZ-GARCÍA, J.A. 1997. Environmental exposure and distribution of lead in four species of raptor in Southeastern Spain. *Arch Environ Contam Toxicol* 33:76-82.
- GARITANO-ZAVALA, A., COTÍN, J., BORRÁS, M., NADAL, J. 2009. Trace metal concentrations in tissues of two tinamou species in mining areas of Bolivia and their potential as environmental sentinels. *Environ Monit Assess* 2009 Sep 16.
- GREICHUS, Y.A., GREICHUS, A. 1974. Dieldrin 14C residues on feathers of birds with surgically removed uropygial glands. *Bull Environ Contam Toxicol* 12(4):413-416.
- JASPERS, V.L.B., COVACI, A., DELEU, P. AND EENS, M. 2009. Concentrations in bird feathers reflect regional contamination with organic pollutants. *Sci Total Environ* 407 (4): 1447-51.
- JASPERS, V.L.B., COVACI, A., VAN DEN STEEN, E. AND EENS, M. 2007b. Is external contamination with organic pollutants important for concentrations measured in bird feathers? *Environ Int* 33 (6): 766-72.
- JASPERS, V.L.B., DAUWE, T., PINXTEN, R., BERVOETS, L., BLUST, R. AND EENS, M. 2004. The importance of exogenous contamination on heavy metal levels in bird feathers. A field experiment with free-living great tits, *Parus major*. *J Environ Monit* 6: 356-360.
- JASPERS, V.L.B., VOORSPOELS, S., COVACI, A. AND EENS, M. 2006. Can predatory bird feathers be used as a nondestructive biomonitoring tool of organic pollutants? *Biol Lett* 2: 283-285.
- JASPERS, V.L.B., VOORSPOELS, S., COVACI, A., LEPOINT, G. AND EENS, M. 2007a. Evaluation of the usefulness of bird feathers as a non-destructive biomonitoring tool for organic pollutants: A comparative and meta-analytical approach. *Environ Int* 33 (3): 328-37.

- JENSEN, K.H., RAUCH, S., MORRISON, G.M., LINDBERG, P. 2002. Platinum group elements in the feathers of raptors and their prey. *Arch Environ Contam Toxicol* 42(3): 338-47.
- JOHNSTON, D.W. 1976. Organochlorine pesticide residues in uropygial glands and adipose tissue of wild birds. *Bull Environ Contam Toxicol* 16: 155.
- MALIK, R.N., RAUF, S., MOHAMMAD, A., EGANI, S.A., AHAD, K. 2010. Organochlorine residual concentrations in cattle egret from the Punjab Province, Pakistan. *Environ Monit Assess* 2010 Mar 7 (En prensa).
- MALIK, R.N., ZEB, N. 2009. Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. *Ecotoxicology* 18 (5): 522-36.
- MARÍA-MOJICA, P., JIMÉNEZ, P., BARBA, A., NAVAS, I., GARCÍA FERNÁNDEZ, A.J. 2000. Residuos de insecticidas organoclorados en cernícalo común (*Falco tinnunculus*) de la Región de Murcia. *AN VET* 16: 55-66
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., MARÍA-MOJICA, P., MARTÍNEZ, J.E., CALVO, J.F. y GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 2002. Pluma de águila calzada (*Hieraaetus pennatus*) como unidad biomonitora de la exposición ambiental a cadmio y plomo. *AN VET (MURCIA)* 18: 69-74.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., MARÍA-MOJICA, P., MARTÍNEZ, J.E., CALVO, J.F., ROMERO, D., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 2005. Cadmium in Feathers of Adults and Blood of Nestlings of Three Raptor Species from a Nonpolluted Mediterranean Forest, Southeastern Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 74: 477-484.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., MARÍA-MOJICA, P., MARTÍNEZ, J.E., CALVO, J.F., WRIGHT, J., SHORE, R.F., ROMERO, D., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 2007. Organochlorine Residues in Booted Eagle (*Hieraaetus pennatus*) and Goshawk (*Accipiter gentilis*) Eggs from Southeastern Spain. *Environ Toxicol Chem* 26 (11): 2373-8.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., ROMERO, D., MARÍA-MOJICA, P., MARTÍNEZ, J.E., CALVO, J.F., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.J. 2009. Changes in blood pesticide levels in booted Eagle (*Hieraaetus pennatus*) associated with agricultural land practices. *Ecotoxicol Environ Saf* 72 (1): 45-50.
- MATEO, R., ESTRADA, J., PAQUET, J-Y., RIERA, X., DOMÍNGUEZ, L., GUITART, R., MARTÍNEZ-VILALTA, A. 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. *Environ Pollut* 104: 435-440.
- PILASTRO, A., CONGIU, L., TALLANDINI, L. AND TURCHETTO, M. 1993. The use of bird feathers for the monitoring of cadmium pollution. *Arch Environ Contam Toxicol* 24: 355-358.
- SANCO, National Food Administration, Uppsala, Sweden. 2007. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in food and feed. Document No. SANCO/2007/3131.
- SUN, L.G., YIN, X.B., LIU, X.D., ZHU, R.B., PAN, C.P., ZHAO, Y.Z., LIU, F.M., JIANG, S.R. AND WANG, Y.H. 2006. Levels of hexachlorocyclohexanes and dichloro-diphenyl-trichloroethanes in penguin droppings collected from Ardley Island, the maritime Antarctic. *Hum Ecol Risk Assess* 12: 328-338.
- VAN DEN BRINK, N.W. 1997. Preen gland oil and blood samples: non-destructive methods for monitoring organochlorine levels in Antarctic top predators. In: B. Battaglia, J. Valencia y D.W.H. Walton, Editors. Antarctic communities, species structure and survival. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 413-416.
- VAN DEN STEEN, E., COVACI, A., JASPERS, V.L.B., DAUWE, T., VOORSPOELS, S.,

- EENS, M. AND PINXTEN, R. 2007. Experimental evaluation of the usefulness of feathers as a non-destructive biomonitor for polychlorinated biphenyls (PCBs) using silastic implants as a novel method of exposure. *Environment International* 33: 257-264.
- VORHEES, D.J., CULLEN, A.C., ALTSHUL, L.M. 1997. Exposure to polychlorinated biphenyls in residential indoor air and outdoor air near a Superfund site. *Environ Sci Technol* 31 (12): 3612-3618.
- WEYERS, B., GLÜCK, E. 1988. Investigation of the significance of heavy metal contents of blackbird feathers. *Sci Tot Environ* 77: 61-67.
- YAMASHITA, R., TAKADA, H., MURAKAMI, M., FUKUWAKA, M. AND WATANUKI, Y. 2007. Evaluation of Noninvasive Approach for Monitoring PCB Pollution of Seabirds Using Preen Gland Oil. *Environ Sci Technol* 41 (14): 4901-4906.