



**Master Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos  
Cinegéticos.**

Trabajo de fin de master. Curso 2012-2013

Tema: Toxicología en Fauna Silvestre

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS  
ORGANOCOLORADOS Y PORFIRINAS EN  
HUEVOS DE PAGAZA PICONEGRA**



Alumno: **Ana Pérez de Vargas de Mesa**

Tutor: Rafael Mateo Soria

# **Determinación de compuestos organoclorados y porfirinas en huevos de pagaza piconegra**

Trabajo presentado por

**Ana Pérez de Vargas de Mesa**

para la obtención del grado de Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada  
en Recursos Cinegéticos

VºBº Tutor

Dr. Rafael Mateo Soria

Ciudad Real, a 22 de Noviembre de 2013

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS  
(IREC) CSIC-UCLM-JCCM**

## Resumen

En el presente estudio se ha definido la presencia y concentración de compuestos organoclorados y PCBs en 97 huevos sin eclosionar de pagaza piconegra (*Gelochelidon/Sterna nilotica*), recogidos tras el abandono de la colonia por parte de los parentales en el sur de España (provincia de Cádiz). El objetivo principal de este trabajo es determinar una posible relación entre la presencia y cantidad de compuestos organoclorados con diferentes datos biométricos y del desarrollo embrionario. También se ha determinado y cuantificado la presencia de porfirinas y biliverdina en la cáscara de huevo con el fin detectar efectos de los contaminantes organoclorados en la coloración de los mismos.

Un 77% de los huevos estudiados se encuentran embrionados y el estadio embrionario se correlacionó positivamente con el peso del contenido y negativamente con el grosor e índices de cáscara. El compuesto organoclorado detectado en mayor concentración fue el p,p'-DDE, siendo comparativamente mayores las concentraciones encontradas que las descritas previamente para esta especie o especies similares en diferentes áreas geográficas. También relevantes son las concentraciones determinadas para el sumatorio de PCBs y otros plaguicidas como hexaclorobenceno (HCB). Resulta interesante el hecho de que los niveles de  $\Sigma$ Ciclodienos han sido significativamente más altos en huevos embrionados que en los no embrionados, una tendencia en general observada para varios de los compuestos analizados.

El principal pigmento detectado en la cáscara ha sido la protoporfirina IX seguida de la biliverdina, un producto de degradación del grupo hemo. También se ha observado que la biliverdina está en mayor concentración en las cáscaras de huevos

embrionados y que además está negativamente correlacionada con la concentración de p,p'-DDE en el contenido. Este resultado nos indica que la concentración de biliverdina en la cáscara de los huevos podría ser usado como un biomarcador no invasivo de efecto de los contaminantes organoclorados.

Palabras clave: contaminación, biomarcadores, muestreo no invasivo, plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes

## 1. Introducción

Los pesticidas organoclorados son compuestos químicos que se caracterizan por tener una elevada persistencia en el medio ambiente; son altamente lipofílicos y consecuentemente poseen una gran capacidad de bioacumulación (Risebrough et al., 1967; Watanabe et al., 2005; McIntyre et al., 2007; Skarphedinsdottir et al., 2010). Fueron utilizados masivamente a partir de los años 40 y, aunque actualmente se encuentran prohibidos en la mayoría de los países, siguen ejerciendo su efecto nocivo en el medio ambiente (Abb et al., 2010; Pestana et al., 2013; Miglioranza et al., 2013). En España el DDT fue prohibido en 1977 y aun hoy persiste en la fauna silvestre (Hernández et al. 1988; Negro et al., 1993; Mateo et al., 2000; Pique et al., 2006). Los efectos nocivos de este tipo de plaguicidas están ampliamente documentados, pudiendo causar entre otros efectos, alteraciones genéticas (Bickham et al., 2000). Algunos estudios destacan el hecho de que este tipo de compuestos tiene una influencia nociva sobre la reproducción de las aves (Cooke, 1970; Blus et al., 1972; Stickel, 1973; Ohlendohrf et al., 1979), y en concreto relacionando la concentración de p,p'-DDE (metabolito del p,p'-DDT) con una disminución del grosor de la cáscara del huevo (Ratcliffe, 1970). Otros compuestos organoclorados que han causado una problemática similar al DDT son los bifenilos policlorados (PCBs), compuestos con diferentes aplicaciones industriales (p.e. aceites aislantes en transformadores eléctricos) durante el siglo XX y que también están prohibidos en la actualidad (Suvorov et al., 2008; Parent et al., 2011; Schwacke et al., 2012; DeLeon et al., 2013; Gioia et al., 2013).

La determinación de la cantidad de contaminantes químicos ambientales (en este caso los organoclorados) en diferentes especies asociadas a un ecosistema puede darnos una idea del grado de contaminación ambiental de un área determinada y a su vez, servirnos como un parámetro que nos permita evaluar el estatus sanitario de dichos organismos (Furness, 1993). Las aves acuáticas son buenos bioindicadores, puesto que se alimentan mayoritariamente de organismos acuáticos en los que compuestos lipófilos como los organoclorados se bioacumulan (Frederick, 2002; Fernández, 2005). Por otra parte, el uso de biomarcadores en el campo de la toxicología ambiental aplicada a la conservación y monitorización del estado sanitario de animales silvestres ha experimentado un gran avance en las últimas décadas (Lionetto et al., 2012; Martínez-Haro et al., 2013; Marigómez et al., 2013). El concepto de biomarcador en toxicología ambiental define cualquier cambio medible, ya sea bioquímico, fisiológico o morfológico que un organismo presenta cuando es expuesto a un tóxico (Van der oost et al., 2003). Uno de los biomarcadores usados para valorar el efecto de la contaminación en las aves son las porfirinas, que son pigmentos cíclicos tetrapirrólicos formados como intermediarios en la síntesis del grupo hemo y que junto a la biliverdina (metabolito de degradación del hemo) pueden ser detectados en heces (origen biliar y renal) (Mateo et al., 2004a, 2006; Martínez-Haro et al., 2013), en plumas (Negro et al., 2009) y en la cáscara de los huevos (Moreno et al., 2006; Hargitai et al., 2011). Los compuestos organoclorados afectan a la síntesis de porfirinas e isoenzimas de citocromo P450 (Simon et al., 1978; Miranda et al., 1987; Attia et al., 1995; Casini et al., 2003)

En nuestro estudio, hemos definido la presencia y concentración de compuestos organoclorados y PCBs en huevos abandonados durante la incubación en una colonia de pagaza piconegra (*Gelochelidon/Sterna nilotica*), una especie de charrán de la familia Laridae (subfamilia Sterninae). Existen publicados numerosos estudios en huevos de láridos en Norteamérica y Europa (Niemi et al., 1986; Fasola et al., 1987), así como concretamente en España (González et al., 1991; Pastor, et al., 1995; Mateo et al., 2004b; Morales et al., 2012), pero no tenemos conocimiento de que existan estudios en pagaza piconegra realizados previamente en el área geográfica delimitada por nuestro estudio (provincia de Cádiz). En el presente trabajo hemos analizado la posible relación entre la concentración de los compuestos organoclorados detectados en el contenido de los huevos y diferentes datos biométricos del huevo (peso, longitud, diámetro, grosor de cáscara) y del desarrollo embrionario (presencia/ausencia de embrión y estadio del desarrollo embrionario) para determinar en qué medida la presencia de compuestos organoclorados y PCBs podría afectar a la reproducción de esta especie. Este estudio a su vez, nos permite tener una idea de la abundancia de pesticidas en la zona de Cádiz pudiendo utilizar estos datos como parte de un estudio de monitorización de la salud ambiental de esta área. También hemos utilizado el método desarrollado por Mateo et al. (2004a) para la detección de porfirinas y biliverdina en heces, adaptándolo para su uso en cáscara de huevo con el fin detectar efectos de los contaminantes organoclorados en la coloración de los huevos partiendo de la hipótesis de que los compuestos organoclorados como el DDT producen cambios fisiológicos que afectan a la síntesis de porfirinas e isoenzimas del citocromo P450 en el hígado y su posterior excreción.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Especie y zona de estudio

La pagaza piconegra pertenece a la subfamilia Sterninae, representada en España por seis especies nidificantes de charranes y fumareles. Su distribución mundial es localizada, siendo una especie politípica y observándose distintas subespecies en diferentes regiones del planeta, incluyendo América y Asia. La subespecie más amenazada es la paleártica *nilotica*, que parece haber abandonado un 75% de las áreas donde anidaba hasta principios del siglo XX, observándose un fuerte retroceso en el norte y este de Europa, mientras que en los países de la cuenca mediterránea la población es más estable. En los países africanos las poblaciones son inestables y están sufriendo un fuerte retroceso. En España su distribución está restringida a la mitad meridional y a zonas de la cuenca mediterránea. Se encuentra clasificada en la categoría de Vulnerable (VU).

Las colonias, habitualmente muy densas, pueden ser monoespecíficas o mixtas con láridos o limícolas. Esta especie nidifica en islas, rara vez en orillas, de lagunas naturales o artificiales, dulces o salobres, prefiriendo islas con baja cobertura vegetal. La pagaza piconegra llega a la península en abril y en colonias tempranas puede empezar la puesta a finales de este mes; en algunos casos, las puestas de reposición pueden prolongarse hasta junio-julio. La puesta media es de 2 huevos. Presenta un amplio rango de hábitats de alimentación y se alimenta en zonas más secas que otras especies similares, aunque es habitual también observarla en agua dulce y marismas. Su dieta básica la constituyen coleópteros y ortópteros pero es capaz de aprovechar abundancias locales/estacionales de otros recursos (crustáceos, peces y pequeños reptiles).

La zona muestreada en la realización de este estudio han sido las Marismas de Mesas de Asta, en la provincia de Cádiz. Estas marismas están formadas por varios lucios y se trata de un espacio natural controvertido, pues estas aguas han sido usadas por algunas industrias para vertido de residuos. Debido a éste y otros problemas medioambientales, en esta área geográfica se han registrado varias mortandades masivas de aves acuáticas (Gestión de mortandades de la fauna acuática de la comunidad autónoma de Andalucía. Informe regional. Consejería Medio Ambiente Abril 2010). Tras realizar allí un proyecto de restauración ambiental, esta laguna alberga actualmente una de las colonias de pagaza piconegra más grandes de España, aunque es difícil conocer el tamaño preciso de su población y la tendencia debido a la falta de coordinación en los censos.

La población peninsular puede estimarse en 3.000-3.500 pp., y supone el 80-85% de la población de la ruta occidental, por lo que los datos recogidos en este estudio y su posible trascendencia para poder profundizar en los problemas a los que se enfrenta esta especie son de especial relevancia científica y de conservación (Marti et al., 2003; Sánchez-Guzmán, 2004).

## *2.2. Toma de muestras*

Se muestrearon 97 huevos sin eclosionar de pagaza piconegra provenientes de una colonia situada las Marismas de Mesas de Asta en la provincia de Cádiz. Dicha colonia fue abandonada por las aves adultas, posiblemente a causa de la desecación estival del humedal, quedando numerosos huevos en sus respectivos nidos sin llegar a eclosionar. Los huevos fueron recogidos por personal de la Junta de Andalucía y

conservados congelados en el Parque Zoobotánico de Jerez. Debido al tipo de recogida, antes de contactar con nosotros, los huevos fueron almacenados todos juntos, sin anotar cuáles de ellos pertenecían a un mismo nido. Después del traslado al IREC, de cada uno de los huevos se tomaron datos biométricos de peso, longitud, diámetro y se anotaron los posibles defectos existentes en la cáscara. Posteriormente, el huevo fue cuidadosamente abierto por la línea media y se midió el grosor de la cáscara en tres puntos del ecuador de la línea media transversal del huevo. Además se calculó el índice de la cáscara (shell index) con la fórmula: peso de cáscara / (longitud x ancho); de forma que el índice de cáscara está expresado como en  $\text{mg}/\text{mm}^2$ ; y sirve como indicador de la calidad de la cáscara (Ratcliffe, 1970). A continuación se inspeccionó el contenido del huevo anotando si presentaba embrión no, y en caso afirmativo estimando su grado de desarrollo. La determinación del grado de desarrollo embrionario se hizo aplicando la clasificación descrita para la gallina doméstica por Hamilton y Hamburguer (1951). Es posible que existan variaciones en los parámetros considerados para hacer esta valoración del grado de desarrollo entre familias de aves, pero no se conocen estudios concretos sobre este tema en nuestra especie de estudio hasta el momento. Fueron tomadas fotografías de todos los embriones.

### *2.3. Análisis de compuestos organoclorados en el contenido del huevo*

Los solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico o sus equivalentes en alta pureza de Merk (Darmstadt, Alemania) y Panreac (Montcada i Reixac, España). Los patrones de pesticidas (Pesticide-Mix 13), PCBs (PCB-Mix 20) y el patrón interno (PCB #209) fueron adquiridos a Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). El Pesticide-Mix 13 incluye aldrin, cis-clordano, trans-clordano, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-

DDT, p,p'-DDT, dieldrin,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, endrin, HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH,  $\epsilon$ -HCH, heptachlor, heptachlor-exo-epoxido, isodrin, metoxicloro, mirex y PCBs #28, #52, #101, #138, #153 and #180. El PCB-Mix 20 incluye los siguientes PCBs: PCBs #28, #31, #52, #77, #101, #105, #118, #126, #128, #138, #153, #156, #169, #170 y #180.

La concentración de organoclorados en el contenido de los huevos fue analizada mediante el método descrito por Mateo et al. (2004b). Brevemente, el contenido del huevo fue homogeneizado con un molino de cuchillas y 0,5 g de dicha muestra fueron traspasados a un mortero de cerámica en el que previamente se habían añadido 4,5 g de sulfato sódico anhidro para ser homogenizados y desecados totalmente. Posteriormente, el homogenizado seco fue traspasado a un tubo de vidrio en el que se añadieron 10  $\mu$ l de patron interno (2 ng/ $\mu$ l PCB #209) y 15 ml de diclorometano-hexano (1:4), para después ser agitado 10 min, sonicado 5 min y centrifugado a 1000 g durante 5 min para recuperar el sobrenadante. Este proceso de extracción fue realizado 2 veces, añadiendo solo 5 ml del disolvente la 2<sup>o</sup> y la 3<sup>o</sup> extracción. El sobrenadante de las 3 extracciones fue mezclado y evaporado bajo flujo de N<sub>2</sub>. En este momento se calculó el peso de lípido extraído, ya que el tubo en el que se evaporó el extracto había sido previamente tarado. A continuación se resuspendió el residuo seco en 6 ml de hexano y se procedió a la purificación del extracto con 2 ml de ácido sulfúrico, agitación 5 min y centrifugación a 1000 g durante 10 min. El extracto fue transferido a otro tubo y se repitió este proceso de purificación con ácido sulfúrico hasta que el ácido usado quedaba transparente tras la partición (3-4 veces). El extracto finalmente purificado fue evaporado a sequedad y resuspendido en un volumen final de 0,5 ml de hexano para ser inyectado en un cromatógrafo de gases de alta resolución acoplado a un detector de captura de electrones (GC-ECD) la

temperatura inicial del horno fue de 145 °C, incrementándose hasta 275 °C a una tasa de 2.5 °C/min. El inyector y el detector estuvieron a 290 °C y 310 °C, respectivamente. El gas portador (carrier) fue helio (He) a una velocidad media de 52 cm/s y el gas de relleno (make-up) del ECD fue nitrógeno (N<sub>2</sub>) a un caudal de 30 ml/min.

Diferentes blancos fueron procesados entre las muestras para asegurar la calidad de los análisis. Los pesticidas organoclorados y congéneres de PCB fueron identificados en base a su tiempo de retención y usando el estándar interno (PCB#209) para localizar y cuantificar los picos. La cuantificación de los pesticidas fue realizada con curvas preparadas con el Pesticide-Mix 13. La cuantificación de los PCBs se realizó con curvas de calibración de los congéneres presentes en el PCB-Mix 20. La suma de PCBs fue calculada para aquellos presentes en el PCB-Mix 20 ( $\Sigma\text{PCB}_{20}$ ). El recovery del método calculado a partir de huevos de gallina comerciales tratados con Pesticide-Mix 13 y PCB-Mix 20 a cuatro concentraciones diferentes. La carga total de organoclorados del huevo fue calculada en base a la concentración en peso fresco y el peso fresco del contenido del huevo.

#### *2.4. Análisis de porfirinas y biliverdina en la cáscara*

Los solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico o sus equivalentes en alta pureza de Merk (Darmstad, Alemania). La cáscara seca de cada uno de los huevos fue homogeneizada con un molino de bolas antes de ser analizada. Para la determinación de porfirinas y biliverdina se ha utilizado el método descrito por Mateo et al. (2004a) para el análisis de heces, modificado después para el análisis de cáscaras de huevo (Moreno et al. 2006, Hargitai et a. 2011). Brevemente, 0,1 g de cáscara homogeneizada fueron transferidos a un tubo eppendorf, al que después fueron

añadidos 500 µl de acetonitrilo y 250 µl de ácido clorhídrico. Después de dejar reaccionar durante 15 min los tubos fueron cerrados y agitados en vórtex 15 s y sonicados 10 s en un baño de ultrasonidos (Ultrasons-H). A continuación las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 12,000 g y el sobrenadante fue recuperado y transferido a un vial para su posterior análisis por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). La extracción fue repetida dos veces más añadiendo 400 µl de acetonitrilo a la muestra. Las fases de acetonitrilo fueron combinadas y analizadas mediante HPLC con el equipo Agilent 1100 y las columnas Waters Spherisorb 5 µm ODS2 (4.6 mm × 100 mm) con un caudal de 1.5 ml/min. La composición de la fase móvil inicial fue acetato de amonio (1 M, pH: 5.16) al 75% y metanol al 25% durante 2 min antes de la inyección de la muestra, y después se aplicó un gradiente de cambio lineal en 8 minutos de metanol al 95% y acetato de amonio al 5%, seguido de otros 2 minutos en estas condiciones. En este punto, la composición de la fase volvió a las condiciones iniciales en 3 minutos y fue estabilizada durante otros 3 minutos antes de la siguiente inyección de muestra. La columna se mantuvo a 70°C y la detección realizada a 400 nm de longitud de onda. La cuantificación de las muestras se realizó utilizando curvas de calibración de porfirinas y biliverdina estándar previamente calculadas a partir de huevos de gallina (Morales et al. 2006). Las concentraciones de porfirinas y biliverdina han sido expresadas como nmol/g de peso seco de la cáscara.

### *2.5. Análisis estadístico*

La media, error tipo, mediana, mínimo y máximo fueron calculados para todos los parámetros estudiados de la biometría del huevo, de las concentraciones de compuestos organoclorados y de pigmentos de la cáscara del huevo. La normalidad de

los datos fue estudiada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov ( $p > 0.05$ ). Las concentraciones de organoclorados fueron transformadas logarítmicamente ( $\log_{10}$ ) para ajustar los datos a una distribución normal para después ser analizados estadísticamente. Los parámetros biométricos del huevo, las concentraciones de organoclorados y las de pigmentos en la cáscara del huevo fueron comparadas entre huevos embrionados y no embrionados con el test de la t de Student. También se estudió la correlación lineal de Pearson entre el estadio embrionario, los parámetros biométricos, las concentraciones de organoclorados y la de pigmentos de la cáscara. Como estos parámetros (como es el caso del grosor e índice de cáscara) pueden verse afectados por el estadio del desarrollo embrionario debido a la utilización del calcio por el embrión, estas relaciones entre parámetros de la cáscara y del contenido fueron estudiadas mediante modelos lineales generales incluyendo el estadio embrionario como covariable. Los análisis estadísticos fueron realizados con IBM SPSS Statistics v. 19.0.0.

### **3. Resultados**

#### *3.1. Datos biométricos y desarrollo embrionario*

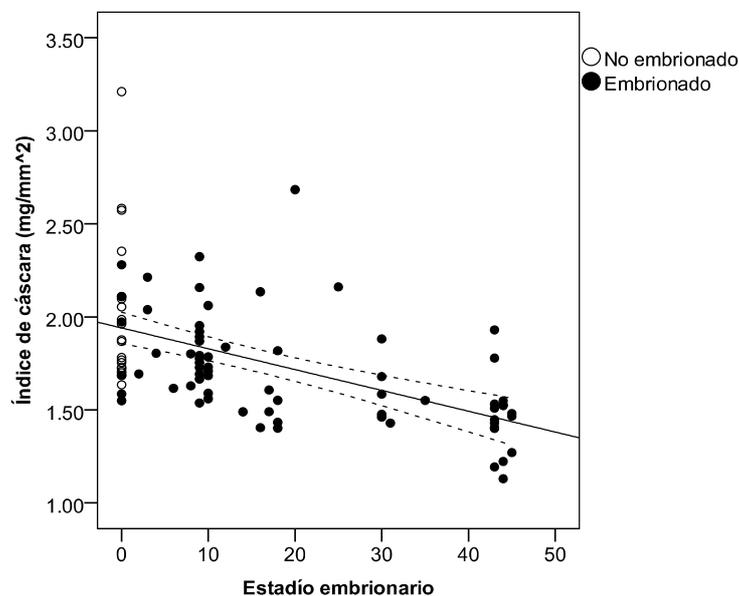
De los 97 huevos estudiados, 75 (77%) mostraban indicios de estar embrionados, siendo los grados de desarrollo más repetidos los de estadios finales (#43-44), en los que se aprecian uñas cornificadas y el saco vitelino aun es externo, y el #9, equivalente a tener vesículas ópticas ya formadas. Los datos biométricos de los huevos estudiados aparecen en la Tabla 1, sin bien hay que tener en cuenta que los embrionados presentaron mayor peso total y de contenido y menor peso e índice de cáscara que los no embrionados (datos no mostrados). De esta forma, el estadio

embrionario se correlacionó positivamente con el peso del contenido ( $r=0.272$ ,  $p=0.007$ ) y negativamente con el grosor ( $r=-0.515$ ,  $p<0.001$ ) e índices de cáscara ( $r=-0.540$ ,  $p<0.001$ ) (Figura 1).

**Tabla 1.** Datos biométricos de los huevos analizados.

Parámetro	N*	Media	ET	Mediana	Mín.	Máx.
Peso total (g)	97	23.5	0.39	23.9	6.7	30.5
Longitud (mm)	91	47.4	0.2	47.6	43.2	51.5
Diámetro (mm)	94	34.0	0.1	33.9	31.2	37.8
Estadio embrionario	97	16	2	9	0	45
Peso del contenido (g)	96	18.9	0.4	19.0	8.1	25.4
Lípidos (%)	97	16.4	0.8	14.6	7.1	61.6
Peso de cáscara (g)	97	2.86	0.06	2.73	1.8	5.02
Grosor de cáscara (mm)	97	0.301	0.010	0.271	0.207	0.742
Índice de cáscara ( $\text{mg}/\text{mm}^2$ )	90	1.77	0.04	1.72	1.13	3.21

\*Algunos huevos estaban rotos y no fue posible medir algunos parámetros.

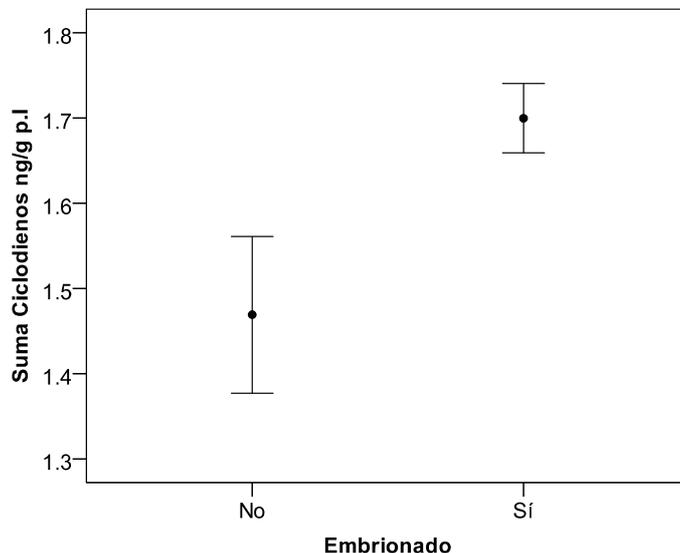


**Figura 1.** Correlación entre el estadio embrionario y el índice de grosor de cáscara (peso / (longitud x ancho)) de huevos de pagaza piconegra.

### 3.2. Niveles de compuestos organoclorados encontrados

El organoclorado detectado en mayor concentración ha sido es el p,p'-DDE, seguido del sumatorio de PCBs y otros plaguicidas como hexaclorobenceno (HCB),  $\beta$ -heptacloro epóxido y metoxicloro (Tabla 2).

Los niveles de  $\Sigma$ ciclodienos han sido significativamente más altos en los embrionados que en los no embrionados ( $t_{94}=2.57$ ,  $p=0.012$ ; Figura 2). Esta misma tendencia se ha observado en  $\Sigma$ HCHs ( $p=0.079$ ), p,p'-DDE ( $p=0.074$ ) y  $\Sigma$ PCBs ( $p=0.091$ ). No obstante, la correlación entre estadio embrionario y concentración de los diferentes organoclorados no llega a ser significativa. Si consideramos la carga total del huevo, aquellos que estaba embrionados presentaban niveles más altos de los diferentes grupos de plaguicidas y de  $\Sigma$ PCBs que los no embrionados (valores de  $p \leq 0,013$ ).



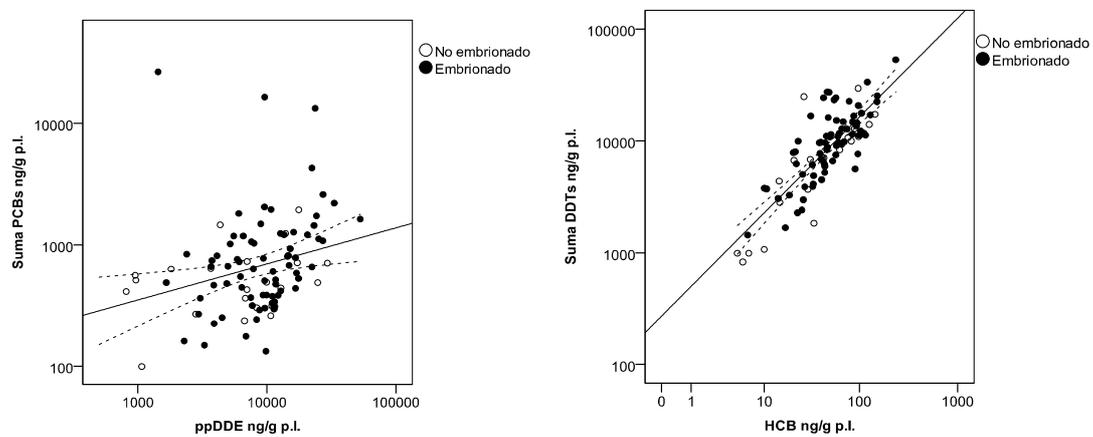
**Figura 2.** Diferencias en las concentraciones (media $\pm$ ET) de ciclodienos (datos transformados logarítmicamente,  $\log_{10}$ ) entre huevos no embrionados y embrionados de pagaza piconegra.

**Tabla 2.** Concentraciones (ng/g sobre peso de lípidos) de compuestos organoclorados y PCBs encontrados en huevos (n=97) de pagaza piconegra (*Gelochidon nilotica*).

Compuestos	Media	ET	Mediana	Mín.	Máx.
HCB	58.7	4.0	47.9	4.9	235.1
$\alpha$ -HCH	<LD	-	<LD	<LD	1.2
$\beta$ -HCH	12.7	1.4	9.0	1.2	83.1
$\delta$ -HCH	0.1	-	<LD	<LD	1.4
$\Sigma$ HCHs	12.9	1.4	9.0	2.2	84.5
Heptacloro	<LD	-	<LD	<LD	1.7
Aldrin	<LD	-	<LD	<LD	0.6
$\beta$ -Heptacloro epóxido	55.0	4.5	40.9	2.1	218.4
$\alpha$ -Heptacloro epóxido	1.1	0.2	0.8	<LD	8.9
<i>trans</i> -Clordano c	0.2	0.1	<LD	<LD	7.9
<i>cis</i> -Clordano a	2.2	0.3	1.6	<LD	15.0
$\beta$ -Endosulfán	<LD	-	<LD	<LD	0.9
$\Sigma$ Ciclodienos	60.7	4.9	44.8	2.7	239
Mirex	2.8	0.2	2.6	<LD	13.2
<i>p,p'</i> -DDE	10942	846	9585	81	53016
<i>o,p'</i> -DDE	0.2	0.1	<LD	<LD	4.3
<i>p,p'</i> -DDD	1.5	0.3	<LD	<LD	19.8
<i>o,p'</i> -DDT	5.3	0.7	3.2	<LD	57.0
<i>p,p'</i> -DDT	1.3	0.3	<LD	<LD	15.8
Metoxicloro	39.1	6.1	25.3	<LD	544
$\Sigma$ DDTs	10989	849	9617	829	53068
%DDT	0.1	-	0.1	<LD	0.5
$\Sigma$ Plaguicidas	11124	855	9715	846	53523
$\Sigma$ PCBs20	1336	339	607	99.3	26458

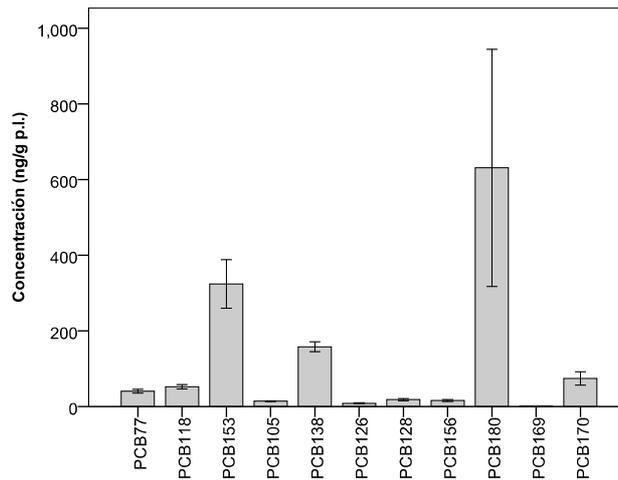
<LD: Valores por debajo del límite de detección.

Los dos principales grupos de contaminantes, el p,p'-DDE y  $\Sigma$ PCBs están correlacionados aunque no de forma muy fuerte ( $r=0.255$ ,  $p=0.12$ ). Destaca la presencia de tres muestras con niveles más elevados de PCBs que el resto en relación al p,p'-DDE, lo que puede indicar el paso de algunos individuos por zonas con una mayor contaminación de tipo industrial (Fig. 3a). En general, los diferentes grupos de organoclorados se encuentran correlacionados, pero destaca la correlación observada entre el HCB y  $\Sigma$ DDTs ( $r=0.803$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 3b).



**Figura 3.** Correlación entre los niveles de diferentes organoclorados en huevos de pagazas piconegras (escala logarítmica de los ejes).

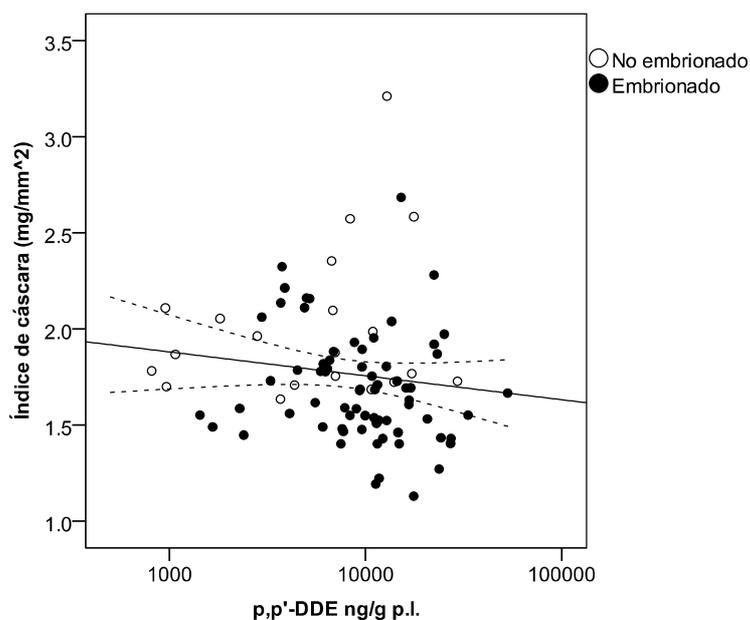
La composición de los diferentes congéneres de PCBs muestra una predominancia de PCB 180, seguido de PCB 135, PCB 138 y PCB 170 (Fig. 4).



**Figura 4.** Patrón de las concentraciones (media±ET) de congéneres de PCBs en los huevos de pagaza piconegra.

### 3.3. Relación entre el grosor de cáscara y los contaminantes organoclorados

Los niveles de p-p'-DDE estuvieron solo marginalmente relacionados de forma negativa con el índice de la cáscara ( $r=-0.151$ ,  $p=0.157$ ; Fig. 5), y esta relación no llegó a ser significativa incluyendo el estadio embrionario como covariable en el GLM o seleccionando solo los huevos embrionados en los análisis.



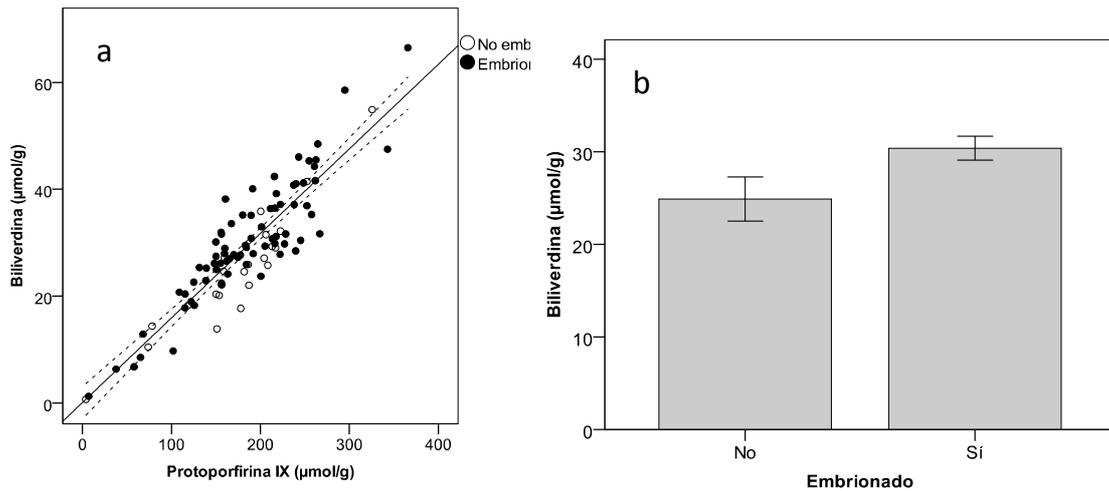
**Figura 5.** Correlación entre el índice de cáscara y la concentración de p,p'-DDE en los huevos de pagaza piconegra.

### 3.4. Pigmentación de la cáscara y relación con la contaminación

El principal pigmento detectado en la cáscara ha sido la protoporfirina IX (PP IX), que confiere el moteado marrón característico de estos huevos. También se detecta biliverdina (BVD) que debe dar una tonalidad de fondo verdeazulada que queda enmascarado por el color pardo de la PP IX. La concentraciones de ambos pigmentos mayoritarios están altamente correlacionadas ( $r=0.901$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 6a). También se ha detectado otra porfirina menos apolar que la PP IX, pero que no se corresponde con la mesoporfirina (Tabla 3). Por otra parte, los huevos embrionados mostraron unos niveles mayores de biliverdina que los no embrionados ( $t_{94}=2.030$ ,  $p=0.045$ ; Fig. 6b), pero no hubo una correlación significativa entre el estadio embrionario y la BVD. La concentración de los pigmentos de la cáscara tampoco estuvo correlacionada con los parámetros de la biometría del huevo.

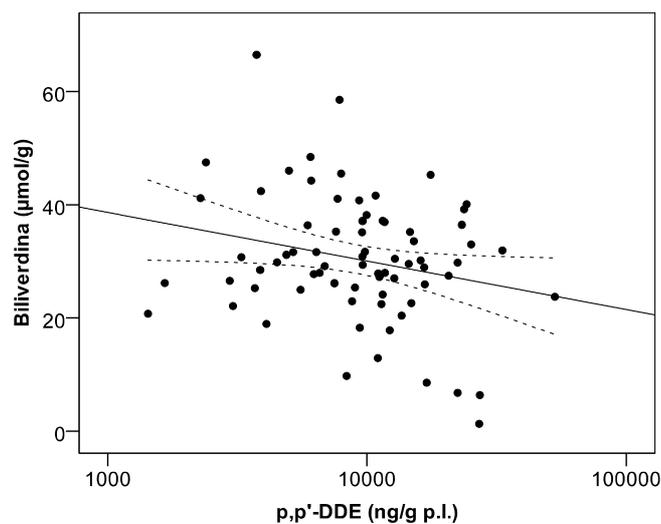
**Tabla 3.** Concentraciones ( $\mu\text{mol/g}$ ) de pigmentos detectados en la cáscara de huevos de pagaza piconegra y proporciones entre ellos.

<b>Pigmentos y sus proporciones</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>ET</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
Biliverdina (BVD)	97	29.1	1.1	30.0	0.7	66.5
Porfirina desconocida (PD)	97	1.46	0.08	1.29	0	5.59
Protoporfirina IX (PP IX)	97	183.6	6.5	184.2	3.76	365.7



**Figura 6.** Correlaciones entre coproporfirina IX y biliverdina en la cáscara de los huevos (a). Diferencias en la concentración (media±ET) de biliverdina en cáscara de huevos de pagaza piconegra en función de si están embrionados o no (b).

En relación con la carga de contaminantes, tan solo se ha observado una relación negativa en los huevos embrionados entre los niveles de BVD y el p,p'-DDE ( $r=-0.238$ ,  $p=0.041$ ; Fig. 7). Además este efecto se mantiene si también consideramos el estadio embrionario como covariable en el GLM con la BVD como variable dependiente y la concentración de p,p'-DDE como independiente ( $F_{1, 71}=5.398$ ,  $p=0.023$ ).



**Figura 7.** Relación entre la concentración de p,p'-DDE (escala logarítmica) en el contenido de los huevos de pagaza piconegra y la concentración de biliverdina en sus cáscaras.

#### 4. Discusión

Un 77% de los huevos estudiados se encuentran embrionados y el estadio embrionario se correlacionó positivamente con el peso del contenido y negativamente con el grosor e índices de cáscara. El compuesto organoclorado detectado en mayor concentración fue el p,p'-DDE, seguido del sumatorio de PCBs y otros plaguicidas como hexaclorobenceno (HCB). Cabe destacar que los niveles de  $\Sigma$ Ciclodienos han sido significativamente más altos en huevos embrionados que en los no embrionados, una tendencia en general observada para varios de los compuestos analizados. El principal pigmento detectado en la cáscara ha sido la protoporfirina IX, un precursor del grupo hemo, seguido de la biliverdina, un producto de degradación del mismo grupo hemo. También se ha observado que la biliverdina esta en mayor concentración en las cáscaras de huevos embrionados y que además está negativamente correlacionada con la concentración de p,p'-DDE en el contenido.

El compuesto tóxico hallado en una mayor concentración en el presente estudio es el p,p'-DDE. Haciendo un estudio retrospectivo, la concentración de compuestos organoclorados en el contenido de huevos de esta especie ha sido descrita únicamente en dos trabajos previos realizados en áreas geográficas diferentes de Italia y España, siendo las concentraciones observadas en Cádiz unas 5 veces superiores a las descritas en dichos estudios. En nuestro caso, habiendo estudiado un total (n) de 97 huevos de pagaza piconegra, la concentración media de p,p'-DDE en la cascara es de 3836,73 ng/g sobre peso fresco y los valores mínimo y máximo fueron 284,01 ng/g p.f y 18590 ng/g p.f. respectivamente. Estos datos contrastan con los estudios mencionados anteriormente en los cuales, teniendo en cuenta que el tamaño muestral es menor, las concentraciones reportadas son significativamente mas bajas

que las nuestras. En el artículo publicado en 1991 por González et al, estudiaron varias especies en diferentes áreas geográficas dentro de España, incluyeron en ese estudio 9 huevos de pagaza piconegra procedentes de Cuenca y la concentración media de DDE resultante fue de 750 ng/g p.f siendo en este caso las concentraciones 40 ng/g p.f y 658 ng/g p.f las concentraciones mínima y máxima halladas respectivamente. Algo parecido ocurre en el estudio publicado por Fassola et al en 1987, en el cual incluyeron 14 huevos de pagaza piconegra recogidos en Italia, y cuya concentración media de DDE fue de 730 ng/g p.f (siendo 30 ng/g y 404 ng/g las concentraciones mínima y máxima respectivamente). Para realizar esta y otras comparaciones con datos de la bibliografía hemos tenido que transformar las concentraciones en peso lípido (p.l.) a peso fresco (p.f.).

En esta misma línea, si comparamos las concentraciones detectadas en las pagazas piconegras de Cádiz con las de otras especies de esta misma familia o de otras familias de aves acuáticas observamos que los niveles detectados en el presente estudio son también los mayores observados con una amplia diferencia, siendo los resultados mas próximos los reportados para huevos de flamenco del P.N. de Doñana (Tabla 8).

**Tabla 8.** Concentraciones de p,p'-DDE (ng/g p.f.) detectadas en huevos de pagaza piconegra y otras especies de aves acuáticas . a) Mateo et al, 2004. Delta del Ebro (a: Punta de la Banya, 1998; a' : Punta del fangar, 1999) b) Niemi et al, 1986. Michigan, Estados Unidos; c) Guitart et al, 2005. P.N. de Doñana, España (NA: Datos no publicados)

	N	Media (ng/g p.f)	Min (ng/g p.f)	Max (ng/g p.f)
Nuestro estudio: Pagaza piconegra	97	<b>3836,73</b>	284,01	18590
Charran común (a)	13	1184	337	5749
Charran común (a')	34	684	134	5063
Charran común (b)	10	250	80	680
Flamenco (c)	53	1503	NA	NA

La valoración del impacto sobre la reproducción a largo plazo de la exposición a pesticidas en aves no es una cuestión fácil, y en numerosas ocasiones, los resultados de laboratorio no son fácilmente extrapolables a una situación de campo (Mineau, 2005). Existe un amplio abanico de estudios al respecto en aves en España, determinando concentraciones de p,p'-DDE y otros plaguicidas persistentes en diversos tejidos como plumas (Espín et al., 2010), hígado (Gutiérrez et al., 1995) o huevos (Mateo et al., 2000), como es nuestro caso. Estos y otros estudios, repartidos por todo el mundo, evidencian la presencia de este tipo de compuestos en todos los continentes muchos años después de su prohibición. Existen incluso algunos estudios que avalan la utilización de determinados tipos de aves muy ubicuas como los estorninos (presentes en Europa, Norteamérica, Asia y Australia) como herramienta de monitorización ambiental, determinando la concentración de elementos tóxicos en ellos y comparando diferentes regiones (Eens et al., 2013). Los posibles efectos

adversos sobre la reproducción de las aves producidos por la acumulación de compuestos organoclorados en aves están ampliamente documentados en numerosos textos científicos, e incluyen el fracaso reproductivo, la mortalidad embrionaria y las malformaciones del embrión (Gómara et al., 2008) o niveles bajos de hormonas esteroideas y sus efectos negativos en las crías (Cortinovis et al., 2008).

El efecto más frecuentemente descrito de la acumulación de plaguicidas organoclorados en aves, en concreto p,p'-DDE, ha sido la disminución del grosor de la cascara del huevo. Este efecto ha sido observado en numerosos estudios realizados en huevos de distintas especies de aves, especialmente en aves rapaces (Bignert et al., 2002; Scharemborg et al., 2004) y aves acuáticas o aquellas que incluyen pescado en su dieta, puesto que estos compuestos son altamente bioacumulables y los organismos acuáticos son considerados grandes reservorios (King et al., 2003). El efecto de los contaminantes organoclorados en la reproducción de las aves ha sido especialmente estudiado en aves rapaces, observándose por ejemplo que  $>6 \mu\text{g/g}$  p.f de p,p'-DDE y  $>20 \mu\text{g/g}$  p.f de PCBs en huevos se asocian con fracaso reproductor, malformaciones y mortalidad embrionaria en pigargo americano (*Haliaeetus leucocephalus*). Extrapolando estos niveles a nuestro estudio, un 14,4% de los huevos de nuestra colonia podría sufrir algún tipo de alteración que provocase su fracaso en la eclosión. puesto que los niveles de p,p'-DDE que hemos hallado en estos huevos son  $>6 \mu\text{g/g}$  p.f de p,p'-DDE. Sin embargo, los niveles de p,p'-DDE no han afectado al índice de la cáscara de las pagazas piconegras de forma significativa, aunque sí se observa una cierta tendencia a una relación negativa. Existen otros ejemplos en la bibliografía en los cuales tampoco se observa una relación entre las concentraciones de p,p'-DDE no están relacionadas con el grosor de la cascara, como por ejemplo somormujo lavanco

(*Podiceps cristatus*) (Galassi et al., 2002), pigargo americano (Nisbet et al., 2010), flamenco común (*Phoenicopterus ruber*) (Guitart et al., 2005) o charrán común (*Sterna hirundo*) (Switzer et al., 1971). Este último caso en concreto, sería comparable al nuestro, puesto que se trata de especies de la misma familia, muy cercanas y relacionadas entre sí. De hecho, Nisbet et al. (2009) consideran que los compuestos organoclorados tiene un efecto negativo sobre la reproducción de las aves acuáticas, pero no a través de una reducción del grosor de la cascara del huevo. Además es necesario tener en cuenta otros problemas medioambientales y contaminantes que pueden estar relacionados con este fracaso en combinación con los compuestos organoclorados (Bustnes et al., 2008; Korsman et al., 2012).

El uso de biomarcadores es un recurso muy eficaz a la hora de monitorizar los contaminantes tóxicos y sus efectos en las especies de fauna silvestre, particularmente aquellas de difícil acceso. Una de las grandes ventajas del uso de biomarcadores no invasivos es la capacidad de conseguir muestras sin captura y sin provocar ningún tipo de estrés en el animal. Existen varios trabajos sobre el uso de diferentes tipos de biomarcadores poco o nada invasivos como huevos, plumas, heces, pelo o biopsias de piel en diferentes especies de fauna silvestre (Fossi et al., 1997, 1999). La cáscara del huevo es un ejemplo excelente de este tipo de muestreo, teniendo en cuenta que no es necesario capturar al ave para obtener la muestra evitando así posibles situaciones de estrés para el animal. Existen numerosos estudios sobre la coloración y los diferentes pigmentos que constituyen la cáscara de los huevos de las aves, siendo las porfirinas y la biliverdina los principales pigmentos responsables de los colores pardos y verdeazulados de las cáscaras (Kennedy y Vevers, 1973, 1976). Estas porfirinas

pueden también ser responsables de las variaciones del color del plumaje (Negro et al., 2009).

En el presente trabajo hemos utilizado la cáscara del huevo como muestra no invasiva en la que estudiar la relación entre la coloración, la cantidad de pigmentos encontrados y los compuestos tóxicos detectados en el contenido. Fisiológicamente, la coloración de la cascara del huevo parece estar relacionada con el estado físico del ave en el momento de la puesta (Moreno et al., 2006) y existen estudios que relacionan la coloración de la cascara con la capacidad de resistencia antimicrobiana del huevo (Ishikawa et al., 2010). Además, la intensidad de la pigmentación de la cáscara disminuye conforme avanza la puesta, existiendo una menor concentración de porfirinas en el último huevo puesto (Miksik I et al., 1996). En los huevos de pagaza piconegra el principal pigmento que hemos detectado en la cáscara ha sido la protoporfirina IX, que confiere el moteado marrón característico de estos huevos. También se ha detectado biliverdina, que aportaría una tonalidad de fondo verdeazulada no visible pues, queda enmascarada por el color pardo de la protoporfirina IX. Las concentraciones de estos pigmentos estaban altamente correlacionadas. Estos hallazgos concuerdan con los publicados para otras especies con huevos también moteados como los de escribano cerillo (*Emberiza citrinella*) o mirlo (*Turdus merula*), en los cuales el pigmento mayoritario de la cascara es la protoporfirina IX (Miksik et al., 1994).

En relación con la carga de contaminantes, en nuestro trabajo se ha observado una relación negativa en los huevos embrionados entre los niveles de biliverdina en la cáscara y el p,p'-DDE del contenido. Este resultado contrasta con lo descrito por Jagannan et al. (2008), quienes observaron cómo la pigmentación verdosa debido a la

biliverdina de la cascara del huevo en gavián (*Accipiter nisus*) aumentaba con el nivel de DDT del huevo. Estos mismos autores además observaron que los huevos de gavián con más moteado debido a la presencia de protoporfirina mostraban una relación negativa entre DDT y grosor de cáscara que no mostraban los huevos sin el moteado. No obstante, esta relación entre coloración y grosor de la cáscara no es un hecho generalizable a todas las especies, o al menos no a la pigmentación por biliverdina (Jagannath et al., 2007; Hargitai et al., 2011). Las porfirinas han sido utilizadas como biomarcadores en diversos tipos de muestras para el estudio de diferentes compuestos tóxicos en especies silvestres. Por ejemplo, la exposición al DDT se ha asociado con un aumento de las porfirinas en el hígado de codorniz japonesa (Miranda et al., 1987; Fox et al., 1988; Elliot et al., 1990), la exposición a niveles elevados de HCB con la aparición de porfiria (Carpenter et al., 1985) y la inhibición de la enzima uroporfirinogeno decarboxilasa en embriones de pollo se ha asociado con exposición a PCBs (Kawanishi et al., 1981). La menor coloración por biliverdina en los huevos se ha asociado con una menor inmunocompetencia de la hembra (Moreno et al. 2006). La bilivedina además puede aumentar la resistencia del huevo a algunos tipos de microorganismos (Ishikawa et al., 2010). Este resultado nos indica que la concentración de biliverdina en la cáscara de los huevos podría ser usado como un biomarcador no invasivo de efecto de los contaminantes organoclorados en el sistema inmune de la hembra.

## Conclusiones

1. El compuesto organoclorado detectado en mayor concentración fue el p,p'-DDE, siendo comparativamente mayores las concentraciones encontradas que las descritas previamente para esta especie o especies similares en diferentes áreas geográficas. Este resultado pone de relevancia la necesidad de realizar un estudio mas en profundidad de esta zona, que además, se caracteriza por ser una zona tradicionalmente usada como lugar para el vertido de residuos de diferentes industrias.

2. En este caso, los niveles de DDE encontrados no se correlacionaron de forma significativa con los índices de cascara, apoyando otros estudios realizados en los que se pone de manifiesto que la influencia de este tipo de contaminantes sobre la reproducción de las aves es un tema complejo y es necesario tener en cuenta otros posibles factores medioambientales y otras vías por las cuales estos compuestos influyen negativamente en la reproducción de las diferentes especies.

3. Se ha observado que la biliverdina esta en mayor concentración en las cáscaras de huevos embrionados y que además está negativamente correlacionada con la concentración de p,p'-DDE en el contenido. Este resultado nos indica que la concentración de biliverdina en la cáscara de los huevos podría ser usado como un biomarcador no invasivo de efecto de los contaminantes organoclorados, lo que supone una herramienta novedosa mas para el estudio y monitorización de contaminantes orgánicos persistentes en el medio.

## **Agradecimientos**

Queremos agradecer al Dr. Mariano Cuadrado, biólogo conservador del Parque Zoobotánico de Jerez de la Frontera la cesión de las muestras utilizadas en este estudio, así como a los miembros de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía que han participado en la recogida de las muestras. Así mismo, quiero agradecer a Pablo Camarero su ayuda en el trabajo de laboratorio.

## **Bibliografía**

- M. Abb, J. V Breuer, C. Zeitz, and W. Lorenz, "Analysis of pesticides and PCBs in waste wood and house dust.," *Chemosphere*, vol. 81, no. 4, pp. 488–93, Sep. 2010.
- A. M. Attia, M. K. Vaughan, C. Rodriguez, and R. J. Reiter, "Lindane and DDT-Induced changes in rat harderian N-acetyltransferase activity, melatonin levels, and porphyrin concentration," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 55, no. 1, pp. 14–21, Jul. 1995.
- J. Bickham, "Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 463, no. 1, pp. 33–51, Jun. 2000.
- L. J. Blus, C. D. Gish, A. A. Belisle, and R. M. Prouty, "Further analysis of the logarithmic relationship of DDE residues to eggshell thinning.," *Nature*, vol. 235, no. 5338, pp. 164–6, Nov. 1972.
- J. O. Bustnes, P. Fauchald, T. Tveraa, M. Helberg, and J. U. Skaare, "The potential impact of environmental variation on the concentrations and ecological effects of pollutants in a marine avian top predator.," *Environ. Int.*, vol. 34, no. 2, pp. 193–201, Feb. 2008.

- H. M. Carpenter, D. E. Williams, and D. R. Buhler, "Hexachlorobenzene-induced porphyria in Japanese quail: an in vitro study of changes in cytochrome P-450 and monooxygenases.," *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. 16, no. 2, pp. 207–17, Jan. 1985.
- S. Casini, M. C. Fossi, C. Leonzio, and A. Renzoni, "Review: Porphyrins as Biomarkers for Hazard Assessment of Bird Populations: Destructive and Non-destructive Use," *Ecotoxicology*, vol. 12, no. 1–4, pp. 297–305, Feb. 2003.
- A. S. Cooke, "Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants," *Environ. Pollut.*, vol. 4, no. 2, pp. 85–152, 1973.
- S. Cortinovis, S. Galassi, G. Melone, N. Saino, C. Porte, and R. Bettinetti, "Organochlorine contamination in the Great Crested Grebe (*Podiceps cristatus*): effects on eggshell thickness and egg steroid levels.," *Chemosphere*, vol. 73, no. 3, pp. 320–5, Sep. 2008.
- S. Deleon, R. Halitschke, R. S. Hames, A. Kessler, T. J. Devoogd, and A. A. Dhondt, "The effect of polychlorinated biphenyls on the song of two passerine species.," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73471, Jan. 2013.
- M. Doss, Ed., *Diagnosis and Therapy of Porphyrrias and Lead Intoxication*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1978.
- M. Eens, V. L. B. B. Jaspers, E. Van den Steen, M. Bateson, C. Carere, P. Clergeau, D. Costantini, Z. Dolenc, J. E. Elliott, J. Flux, H. Gwinner, R. S. Halbrook, P. Heeb, T. D. Mazgajski, A. Moksnes, V. Polo, J. J. Soler, R. Sinclair, J. P. Veiga, T. D. Williams, A. Covaci, and R. Pinxten, "Can starling eggs be useful as a biomonitoring tool to study organohalogenated contaminants on a worldwide scale?," *Environ. Int.*, vol. 51, pp. 141–9, Jan. 2013.

- J. E. Elliott, S. W. Kennedy, D. Jeffrey, and L. Shutt, "Polychlorinated biphenyl (PCB) effects on hepatic mixed function oxidases and porphyria in birds—II. American kestrel," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.*, vol. 99, no. 1, pp. 141–145, 1991.
- J. E. Elliott, S. W. Kennedy, D. B. Peakall, and H. Won, "Polychlorinated biphenyl (PCB) effects on hepatic mixed function oxidases and porphyria in birds. I. Japanese quail," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.*, vol. 96, no. 1, pp. 205–210, 1990.
- S. Espín, E. Martínez-López, P. Gómez-Ramírez, P. María-Mojica, and A. J. García-Fernández, "Assessment of organochlorine pesticide exposure in a wintering population of razorbills (*Alca torda*) from the southwestern Mediterranean.," *Chemosphere*, vol. 80, no. 10, pp. 1190–8, Aug. 2010.
- S. Espín, E. Martínez-López, P. María-Mojica, and A. J. García-Fernández, "Razorbill (*Alca torda*) feathers as an alternative tool for evaluating exposure to organochlorine pesticides.," *Ecotoxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 183–90, Jan. 2012.
- M. Fasola, I. Vecchio, G. Caccialanza, C. Gandini, and M. Kitsos, "Trends of organochlorine residues in eggs of birds from Italy, 1977 to 1985," *Environ. Pollut.*, vol. 48, no. 1, pp. 25–36, Jan. 1987.
- J. M. Fernández, M. A. E. Selma, F. R. Aymerich, M. T. P. Sáez, and M. F. C. Fructuoso, "Aquatic birds as bioindicators of trophic changes and ecosystem deterioration in the Mar Menor lagoon (SE Spain)," *Hydrobiologia*, vol. 550, no. 1, pp. 221–235, Nov. 2005.
- M. C. Fossi, L. Marsili, M. Junint, H. Castellot, J. A. Lorenzani, S. Casini, and C. Savelli, "Use of Nondestructive Biomarkers and Residue Analysis to Assess the Health

Status of Endangered Species of Pinnipeds in the South-West Atlantic," vol. 34, no. 3, pp. 157–162, 1997.

M. C. C. Fossi, S. Casini, and L. Marsili, "Non destructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemical in endangered species of wildlife," *Chemosphere*, vol. 39, no. 8, pp. 1273–1285, 1999.

G. A. Fox, R. J. Norstrom, D. C. Wigfield, and S. W. Kennedy, "Porphyria in herring gulls: A biochemical response to chemical contamination of great lakes food chains," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 7, no. 10, pp. 831–839, Oct. 1988.

P. C. Frederick, M. G. Spalding, and R. Dusek, "Wading birds as bioindicators of mercury contamination in Florida, USA: Annual and geographic variation," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 163–167, Jan. 2002.

R. W. Furness and J. J. D. Greenwood, Eds., *Birds as Monitors of Environmental Change*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993.

R. Gioia, A. J. Akindele, S. A. Adebusoye, K. A. Asante, S. Tanabe, A. Buekens, and A. J. Sasco, "Polychlorinated biphenyls (PCBs) in Africa: a review of environmental levels," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, May 2013.

B. Gómara, M. J. González, R. Baos, F. Hiraldo, E. Abad, J. Rivera, and B. Jiménez, "Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain.," *Environ. Int.*, vol. 34, no. 1, pp. 73–8, Jan. 2008.

M. J. Gonzalez, M. A. Fernandez, and L. M. Hernandez, "Levels of chlorinated insecticides, total PCBs and PCB congeners in Spanish Gull eggs," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 20, no. 3, pp. 343–348, Apr. 1991.

- R. Guitart, R. Clavero, R. Mateo, and M. Manez, "Levels of persistent organochlorine residues in eggs of greater flamingos from the Guadalquivir marshes (Doana), Spain.," *J. Environ. Sci. Health. B.*, vol. 40, no. 5, pp. 753–60, Jan. 2005.
- J. M. Gutierrez, R. Mateo, C. Prats, and R. Guitart, "Organochlorine residues in normal and lead poisoned greater flamingos: Relationships with the fatty acid composition," *J. Environ. Sci. Heal. . Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.*, vol. 32, no. 4, pp. 853–863, Apr. 1997.
- R. Hargitai, R. Mateo, and J. Torok, "Shell thickness and pore density in relation to shell colouration, female characteristics, and environmental factors in the Collared Flycatcher *Ficedula albicollis*," *J. Ornithol.*, vol. 152, no. 3, pp. 579–588, Dec. 2010.
- R. Hargitai, C. Moskat, M. Ban, D. Gil, I. Lopez-Rull, and E. Solymos, "Eggshell characteristics and yolk composition in the common cuckoo *Cuculus canorus*: are they adapted to brood parasitism?," *J. Avian Biol.*, vol. 41, no. 2, pp. 177–185, Mar. 2010.
- B. Helander, A. Olsson, A. Bignert, L. Asplund, and K. Litzen, "The role of DDE, PCB, coplanar PCB and eggshell parameters for reproduction in the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Sweden.," *Ambio*, vol. 31, no. 5, pp. 386–403, Aug. 2002.
- S. Ishikawa, K. Suzuki, E. Fukuda, K. Arihara, Y. Yamamoto, T. Mukai, and M. Itoh, "Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments.," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 4, pp. 770–4, Feb. 2010.

- A. Jagannath, R. F. Shore, L. A. Walker, P. N. Ferns, and A. G. Gosler, "Eggshell pigmentation indicates pesticide contamination," *J. Appl. Ecol.*, vol. 45, no. 1, pp. 133–140, Jul. 2007.
- S. Kawanishi, Y. Seki, and S. Sano, "Polychlorobiphenyls that induce delta-aminolevulinic acid synthetase inhibit uroporphyrinogen decarboxylase in cultured chick embryo liver cells.," *FEBS Lett.*, 1981.
- G. Y. Keneddy and H. G. Vevers, "Eggshell pigments of the araucano fowl," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 44, no. 1, pp. 11–25, 1973.
- G. Y. Kennedy and H. G. Vevers, "A survey of avian eggshell pigments.," *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 55, no. 1, pp. 117–23, Jan. 1976.
- K. A. King, B. J. Zaun, H. M. Schotborgh, and C. Hurt, "DDE-induced eggshell thinning in white-faced ibis: a continuing problem in the western united states," *Southwest. Nat.*, vol. 48, no. 3, pp. 356–364, Sep. 2003.
- J. C. Korsman, A. M. Schipper, H. J. R. Lenders, R. P. B. Foppen, and A. J. Hendriks, "Modelling the impact of toxic and disturbance stress on white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) populations.," *Ecotoxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2012.
- M. G. Lionetto, R. Caricato, M. E. Giordano, E. Erroi, and T. Schettino, "Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use.," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 9, no. 11, pp. 3965–77, Nov. 2012.
- I. Marigómez, L. Garmendia, M. Soto, A. Orbea, U. Izagirre, and M. P. Cajaraville, "Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill 'Mussel Watch'.," *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 3, pp. 486–505, Apr. 2013.

- R. Marti y J.C. Del Moral (Eds) 2003. Atlas de las aves reproductoras de Espana. Direccion general de la biodiversidad – SEO Birdlife.
- M. Martinez-Haro, M. A. Taggart, H. Lefranc, R. C. Martín-Doimeadiós, A. J. Green, and R. Mateo, “Monitoring of Pb exposure in waterfowl ten years after a mine spill through the use of noninvasive sampling,” PLoS One, vol. 8, no. 2, p. e57295, Jan. 2013.
- R. Mateo, J. Carrillo, R. Guitart, and R. Mateo, J. Carrillo, R. Guitart, “p,p'-DDE residues in eggs of European kestrel *Falco tinnunculus* from Tenerife, Canary Islands, Spain.,” Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 65, no. 6, pp. 780–5, Dec. 2000.
- R. Mateo, G. Castells, A. J. Green, C. Godoy, and C. Cristòfol, “Determination of porphyrins and biliverdin in bile and excreta of birds by a single liquid chromatography-ultraviolet detection analysis.,” J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., vol. 810, no. 2, pp. 305–11, Oct. 2004.
- R. Mateo, C. Gil, M. Badia-Vila, R. Guitart, A. Hernández-Matías, C. Sanpera, and X. Ruiz, “Use of fatty acids to explain variability of organochlorine concentrations in eggs and plasma of common terns (*Sterna hirundo*).,” Ecotoxicol. London Engl., vol. 13, no. 6, pp. 545–554, 2004.
- R. Mateo, M. a Taggart, A. J. Green, C. Cristófol, A. Ramis, H. Lefranc, J. Figuerola, and A. a Meharg, “Altered porphyrin excretion and histopathology of greylag geese (*Anser anser*) exposed to soil contaminated with lead and arsenic in the Guadalquivir Marshes, southwestern Spain.,” Environ. Toxicol. Chem., vol. 25, no. 1, pp. 203–212, 2006.

- J. K. McIntyre and D. A. Beauchamp, "Age and trophic position dominate bioaccumulation of mercury and organochlorines in the food web of Lake Washington.," *Sci. Total Environ.*, vol. 372, no. 2–3, pp. 571–84, Jan. 2007.
- K. S. B. Miglioranza, M. Gonzalez, P. M. Ondarza, V. M. Shimabukuro, F. I. Isla, G. Fillmann, J. E. Aizpún, and V. J. Moreno, "Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin.," *Sci. Total Environ.*, vol. 452–453, pp. 275–85, May 2013.
- I. Miksik and V. Ho, "Quantification content and variability of eggshell pigment," vol. M, no. 3, pp. 769–772, 1994.
- P. Mineau, "A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of 'long term' pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife.," *Ecotoxicology*, vol. 14, no. 8, pp. 775–99, Nov. 2005.
- C. L. Miranda, M. C. Henderson, J. L. Wang, H. S. Nakaue, and D. R. Buhler, "Effects of polychlorinated biphenyls on porphyrin synthesis and cytochrome P-450-dependent monooxygenases in small intestine and liver of Japanese quail.," *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. 20, no. 1–2, pp. 27–35, Jan. 1987.
- L. Morales, M. G. Martrat, J. Olmos, J. Parera, J. Vicente, A. Bertolero, M. Abalos, S. Lacorte, F. J. Santos, and E. Abad, "Persistent Organic Pollutants in gull eggs of two species (*Larus michahellis* and *Larus audouinii*) from the Ebro delta Natural Park.," *Chemosphere*, vol. 88, no. 11, pp. 1306–16, Sep. 2012.
- J. Moreno, E. Lobato, J. Morales, S. Merino, G. Tomás, J. Martínez-De La Puente, J. J. Sanz, R. Mateo, and J. J. Soler, "Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in a songbird," *Behav. Ecol.*, vol. 17, no. 4, pp. 651–655, Apr. 2006.

- J. J. Negro, G. R. Bortolotti, R. Mateo, and I. M. García, "Porphyrins and pheomelanins contribute to the reddish juvenal plumage of black-shouldered kites.," *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 153, no. 3, pp. 296–9, Jul. 2009.
- G. J. Niemi, T. E. Davis, G. D. Veith, and B. Vieux, "Organochlorine chemical residues in herring gulls, ring-billed gulls, and common terns of western lake superior," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 15, no. 3, pp. 313–320, May 1986.
- I. C. T. Nisbet and G. A. Fox, "DDE-Induced Hatching Failure in Common Terns was Not Mediated Through Changes in Eggshell Porosity," *Waterbirds*, vol. 32, no. 4, pp. 585–589, Dec. 2009.
- H. M. Ohlendorf, J. B. Elder, R. C. Stendell, G. L. Hensler, and R. W. Johnson, "Organochlorine residues in young herons from the upper Mississippi River-1976.," *Pestic. Monit. J.*, vol. 13, no. 3, pp. 115–9, Dec. 1979.
- A.-S. Parent, E. Naveau, A. Gerard, J.-P. Bourguignon, and G. L. Westbrook, "Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex.," *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.*, vol. 14, no. 5–7, pp. 328–45, Jan. 2011.
- D. Pastor, X. Ruiz, D. Barceló, and J. Albaigés, "Dioxins, furans and AHH-active PCB congeners in eggs of two gull species from the western Mediterranean.," *Chemosphere*, vol. 31, no. 6, pp. 3397–411, Sep. 1995.
- D. Pestana, D. Teixeira, A. Faria, V. Domingues, R. Monteiro, and C. Calhau, "Effects of environmental organochlorine pesticides on human breast cancer: Putative involvement on invasive cell ability.," *Environ. Toxicol.*, Aug. 2013.

- E. Piqué, R. Mateo, D. Fernández-Fernández, and R. Guitart, "Persistent organochlorine residues in livers of six species of Ciconiiformes (aves) from Spain.," *J. Environ. Sci. Health. B.*, vol. 41, no. 5, pp. 671–9, Jan. 2006.
- D. A. Ratcliffe, "Decrease in eggshell weight in certain birds of prey.," *Nature*, vol. 215, no. 5097, pp. 208–10, Jul. 1967.
- R. W. Risebrough, D. B. Menzel, D. J. Martin, And H. S. Olcott, "DDT Residues in Pacific Sea Birds: a Persistent Insecticide in Marine Food Chains," *Nature*, vol. 216, no. 5115, pp. 589–591, Nov. 1967.
- Sanchez Guzman, J.M, 2004. Pagaza piconegra (*Gelochidon nilotica*). En, Madroño, A, Gonzalez, C y Atienza, J.C. (Eds) 2004. Libro rojo de las aves de España. Direccion general de la biodiversidad – SEO Birdlife.
- W. Scharenberg and V. Looft, "Reduction of organochlorine residues in Goshawk eggs (*Accipiter gentilis*) from Northern Germany (1971-2002) and increasing eggshell index.," *Ambio*, vol. 33, no. 8, pp. 495–8, Dec. 2004.
- L. H. Schwacke, E. S. Zolman, B. C. Balmer, S. De Guise, R. C. George, J. Hoguet, A. A. Hohn, J. R. Kucklick, S. Lamb, M. Levin, J. A. Litz, W. E. McFee, N. J. Place, F. I. Townsend, R. S. Wells, and T. K. Rowles, "Anaemia, hypothyroidism and immune suppression associated with polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).," *Proc. Biol. Sci.*, vol. 279, no. 1726, pp. 48–57, Jan. 2012.
- H. Skarphedinsdottir, K. Gunnarsson, G. A. Gudmundsson, and E. Nfon, "Bioaccumulation and biomagnification of organochlorines in a marine food web at a pristine site in Iceland.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 58, no. 3, pp. 800–9, Apr. 2010.

- L. F. Stickel, S. M. Wiemeyer, and L. J. Blus, "Pesticide residues in eggs of wild birds: adjustment for loss of moisture and lipid.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 9, no. 4, pp. 193–6, Apr. 1973.
- L. Stickel and W. Stickel, "Distribution of DDT residues in tissues of birds in relation to mortality, body condition, and time.," *IMS. Ind. Med. Surg.*, vol. 38, no. 3, pp. 44–53, Mar. 1969.
- A. Suvorov and L. Takser, "Facing the challenge of data transfer from animal models to humans: the case of persistent organohalogen.," *Environ. Health*, vol. 7, p. 58, Jan. 2008.
- B. Switzer, V. Lewin, and F. H. Wolfe, "Shell thickness, DDE levels in eggs, and reproductive success in common terns ( *Sterna hirundo* ), in Alberta," *Can. J. Zool.*, vol. 49, no. 1, pp. 69–73, Jan. 1971.
- R. van der Oost, J. Beyer, and N. P. . Vermeulen, "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 13, no. 2, pp. 57–149, 2003.
- M. X. Watanabe, H. Iwata, M. Watanabe, S. Tanabe, A. Subramanian, K. Yoneda, and T. Hashimoto, "Bioaccumulation of organochlorines in crows from an indian open waste dumping site: evidence for direct transfer of dioxin-like congeners from the contaminated soil.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 12, pp. 4421–30, Jun. 2005.