

## Movilidad de organoclorados en músculo de sardina (*Sardina pilchardus*) durante su desove en la costa portuguesa

### Mobility of organochlorines in muscle of sardine (*Sardina pilchardus*) during spawning in the Portuguese coast

J Amado, P Antunes, O Gil\*, C Vale

IPIMAR - Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal.

\* E-mail: ogil@ipimar.pt

#### Resumen

Se determinaron concentraciones de bifenilos policlorados (PCBs), *p,p'*-diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, y dieldrina en músculo de sardinas (*Sardina pilchardus*) hembras y machos obtenidas en ocho épocas, de febrero de 2000 a enero de 2001, por embarcaciones de cerco que faenan en Peniche, Portugal. Las gamas de concentraciones (ng g<sup>-1</sup> ps) en las hembras y en los machos fueron respectivamente: 5.9–29 y 16–38 para PCBs, 1.6–8.5 y 3.2–11 para DDTs, 0.09–2.4 y 0.18–2.9 para dieldrina. La fluctuación anual de organoclorados en el músculo se atribuyó al ciclo reproductivo de las sardinas y, consecuentemente, a la variación de contenido lipídico. Se verificó el mayor aumento del índice gonadosomático (GSI), en fase final del desarrollo de las gónadas y el inicio del desove (noviembre), cuando se encontraron las mayores concentraciones de organoclorados en el músculo. En la fase final del desove (de febrero a mayo), los GSI disminuyeron y las concentraciones de los organoclorados fueron menores. Este trabajo sugiere que la eliminación de los PCBs en el músculo es más rápida en las hembras que en los machos, eventualmente debido a la transferencia hacia las gónadas y eliminación de los huevos.

*Palabras clave:* *Sardina pilchardus*, PCBs, DDTs, dieldrina, ciclo reproductivo.

#### Abstract

Concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs), *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites, and dieldrin were determined in muscle tissues of female and male sardines (*Sardina pilchardus*) obtained between February 2000 and January 2001 from purse-seine vessels operating off the coast of Peniche, Portugal. The concentration ranges (ng g<sup>-1</sup> dw) in females and males were, respectively, 5.9–29 and 16–38 for PCBs, 1.6–8.5 and 3.2–11 for DDTs, and 0.09–2.4 and 0.18–2.9 for dieldrin. The annual fluctuation of organochlorines in muscle was attributed to the reproductive cycle of *S. pilchardus* and consequent variation of lipid content. Maximum organochlorine concentrations in muscle were found when the gonadosomatic index (GSI) increased during the final stages of gonad development and the beginning of spawning activity (November). During the final spawning period (February to May), the GSI decreased and concentrations were lower. This study suggests that elimination of PCBs in muscle is faster in females than in males because of transference to the gonad and the excretion of eggs.

*Key words:* *Sardina pilchardus*, PCBs, DDTs, dieldrin, sexual cycle.

#### Introducción

Los bifenilos policlorados, y pesticidas organoclorados tales como DDTs y dieldrina, son persistentes en los ecosistemas costeros (Falandysz *et al.* 2004), a pesar de que su producción y utilización fue restringida o prohibida hace algunas décadas en la mayoría de los países (Stefanelli *et al.* 2004). Los niveles de estos compuestos encontrados en los organismos están relacionados con fuentes difusas (Teil *et al.* 1998, Ferreira *et al.* 2003) y el gran reciclaje de los mismos en los ecosistemas marinos (Dachs *et al.* 1997). La acumulación de organoclorados (OCs) en el pescado puede resultar de la ingesta directa del agua y/o de la alimentación (Vives *et al.* 2005) y, en general, especies de niveles tróficos superiores presentan concentraciones más elevadas (Perugini *et al.* 2004). Se han estudiado los residuos de organoclorados en especies

#### Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides, such as DDTs and dieldrin, are persistent in coastal ecosystems (Falandysz *et al.* 2004), although their production and use have been restricted or banned for some decades in most countries (Stefanelli *et al.* 2004). Diffuse sources (Teil *et al.* 1998, Ferreira *et al.* 2003) and intense cycling within the marine ecosystem (Dachs *et al.* 1997) contribute to the levels reported in organisms. The accumulation of organochlorines (OCs) in fish may result from direct water intake and/or from diet ingestion (Vives *et al.* 2005), and species from the higher trophic levels generally present higher concentrations (Perugini *et al.* 2004). Organochlorine residues in pelagic (Bayarri *et al.* 2001, Perugini *et al.* 2004, Stefanelli *et al.* 2004), demersal (Georgakopoulos-Gregoriades *et al.* 1991),

pelágicas (Bayarri *et al.* 2001, Perugini *et al.* 2004, Stefanelli *et al.* 2004), nectobentónicas (Georgakopoulos-Gregoriades *et al.* 1991), bentónicas (Voorspoels *et al.* 2004) y de gran profundidad (Storelli *et al.* 2004), y sus concentraciones han sido relacionadas con su disponibilidad en el medio ambiente y las cadenas alimentares, longitud/tamaño del pescado y contenido lipídico. Debido a que estos compuestos son lipofílicos, las concentraciones en los tejidos tienden a variar con la acumulación y consumo de lípidos (Antunes *et al.* 2001). Existen pocos trabajos que mencionen los niveles de OCs en *Sardina pilchardus*. Perugini *et al.* (2004) analizaron los niveles de PCBs y DDTs en sardina del Mar Adriático y estudiaron su variación en función de factores biológicos y distribución geográfica relacionada con la contaminación local. También dos artículos históricos describen las concentraciones de organoclorados en sardinas de aguas costeras ibéricas (Fernández y Franco 1976, Magalhães y De Barros 1987). En la base de datos de MEDPOL (MEDPOL, 1975–1993) se pueden consultar algunos valores de concentraciones residuales en especímenes de la costa mediterránea española de esta especie.

*Sardina pilchardus* (Walbaum) es una especie pelágica importante en aguas meridionales desde Marruecos/Mauritania al Canal de la Mancha y desde los Azores hasta el este del Mediterráneo/Mar Negro (Parrish *et al.* 1989, Borges *et al.* 2003). La pesca de cerco extrae más del 50% de las capturas totales de sardina en Portugal (Stratoudakis y Marçalo 2002) y, por tanto, es de gran importancia socioeconómica para los pescadores y la industria pesquera portuguesas. La sardina, tal como otros clupeidos, se alimenta principalmente de fitoplancton y zooplancton (Bode *et al.* 2003). Durante su primer año de vida (<18 cm) se alimenta básicamente de zooplancton, y los adultos consumen proporciones variables de fito y zooplancton, dependiendo de la disponibilidad (Bode *et al.* 2003). En la costa portuguesa, el periodo de desove de las sardinas ocurre entre octubre y abril, y prácticamente es inexistente durante el verano (Ré *et al.* 1990, Zwolinski *et al.* 2001). En este trabajo se presentan los niveles de PCBs, DDTs y dieldrina en músculo de sardina de la costa portuguesa y se examinan las relaciones entre las variaciones anuales de estos contaminantes y el ciclo reproductivo.

## Material y métodos

### Muestreo

Los especímenes de sardina provinieron de barcos comerciales que faenan en la región de Peniche, en la costa oeste portuguesa (fig. 1). Los individuos hembras y machos fueron recopilados en febrero, abril, mayo, septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2000 y enero de 2001. Durante el periodo de desove las muestras fueron analizadas mensualmente. Para este trabajo se utilizaron un total de 104 individuos, todos ellos entre 20.0 y 21.5 cm de longitud. Los pesos tuvieron una diferencia mayor (55–87 g) reflejando la variación entre las épocas del año asociadas al ciclo

benthic (Voorspoels *et al.* 2004), and deep-sea (Storelli *et al.* 2004) species have been surveyed, and the concentrations were related to the availability in the environment and food webs, fish length/size and lipid content. Since these compounds are lipophilic, tissue concentrations tend to fluctuate with the accumulation of lipids and consumption (Antunes *et al.* 2001). Only a few papers have reported levels of OCs in the sardine *Sardina pilchardus*. Perugini *et al.* (2004) recorded the levels of PCBs and DDTs in sardine from the Adriatic Sea and examined the variation in terms of biological factors and geographical distribution related to regional contamination. Two historical papers mentioned the concentrations of OCs in sardine from Iberian coastal waters (Fernández and Franco 1976, Magalhães and De Barros 1987). Values of residues can also be obtained for specimens from the Mediterranean coast of Spain from the MEDPOL (MEDPOL 1975–1973) database.

*Sardina pilchardus* (Walbaum) is an important pelagic fish species from southern Morocco/Mauritania to the British Channel and from the Azores to the eastern Mediterranean/Black Sea (Parrish *et al.* 1989, Borges *et al.* 2003). Purse-seine landings of sardine in Portugal constitute more than 50% of the total landings (Stratoudakis and Marçalo 2002) and are thus of great socio-economical importance for the Portuguese fishing community and industry. Sardines, like other clupeid fishes, feed primarily on phytoplankton and zooplankton (Bode *et al.* 2003). During the first year of life (<18 cm), they feed primarily on zooplankton, while adults consume variable proportions of phyto- and zooplankton depending on the availability (Bode *et al.* 2003). On the Portuguese coast, sardine spawning occurs from October to April and practically ceases during summer (Ré *et al.* 1990, Zwolinski *et al.* 2001).

This paper reports the levels of PCBs, DDTs and dieldrin in muscle of *S. pilchardus* from the Portuguese coast, and examines the relationship between their annual fluctuation and the sexual cycle of this species.

## Material and methods

### Sampling

Specimens of *S. pilchardus* were obtained from commercial vessels operating off the coast of Peniche, Portugal (fig. 1). Female and male individuals were collected in February, April, May, September, October, November and December 2000, and January 2001. During the spawning period, samples were analyzed on a monthly basis. A total of 104 individuals were used in this study, ranging in length from 20 to 21.5 cm. Weight varied within a broader interval (55–87 g), reflecting the seasonal variation associated with the sexual cycle. Females were separated from males. Individuals were dissected and the muscle was removed and freeze-dried. Due to the small amount, each sample consisted of muscle from two individuals. In each sampling period, three sets of muscle tissues of males and females were prepared for chemical analysis.

reproductivo. Se separaron las hembras de los machos, los individuos fueron disecados, y el músculo fue removido y liofilizado. Debido al tamaño reducido de las sardinas, cada muestra consistió en músculo de dos individuos. En cada fecha de muestreo se analizaron tres conjuntos de músculo de hembras y tres conjuntos de machos.

### Material

Se utilizaron los siguientes solventes y reactivos: acetona y *n*-hexano destilados en el laboratorio, diclorometano (p.a. Merck), sulfato de sodio anhidro (p.a. Merck) calentado a 440°C durante una noche, Florisil malla 60–100 (Merck) activado a 440°C durante 17 h y parcialmente desactivado con 1% de agua destilada y ácido sulfúrico al 95–97% (p.a. Merck).

Como estándares se escogieron treinta congéneres de PCBs obtenidos como soluciones certificadas C-QME-01 de Accustandard (New Haven), y se obtuvo dieldrina, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE con cristales de Dr. Ehrenstorfer, Augsburg (>97.5%, 99.5%, 97.5% y 99.5% de pureza, respectivamente).

Como material certificado de referencia se utilizó tejido de mejillón fresco BCR-682 (Community Bureau of Reference), para la certificación de los clorobifenilos IUPAC números 28, 52, 118, 149, 153, 170 y 180.

### Métodos analíticos

Las muestras de músculo fueron extraídas en Soxhlet con *n*-hexano durante 6 h. El contenido lipídico se determinó gravimétricamente de las alícuotas de los tejidos extraídos. El remanente de los extractos fue concentrado y purificado en columnas con Florisil para la separación de los compuestos, (Antunes y Gil 2004) y expuesto a una segunda purificación con ácido sulfúrico. Después de la concentración, cada muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II equipado con un detector de captura electrónica y una columna capilar DB-5 (J&W Scientific, 60 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 mm de espesor de la película). Las condiciones del horno fueron: 60°C durante 1 min; incremento hasta los 210°C, a 20°C min<sup>-1</sup> manteniéndose así durante 27 min; incremento hasta 250°C, a 2°C min<sup>-1</sup>, 17 min a esta temperatura y finalmente incremento hasta 260°C a 4°C min<sup>-1</sup> manteniendo durante 15 min. La temperatura del inyector fue de 270°C y la del detector de 320°C. Se utilizaron helio y argón/metano (90/10) como gases portador y de complemento, respectivamente. Las concentraciones de PCBs, DDTs y dieldrina fueron cuantificadas por las alturas pico usando una mezcla de 30 CBs individuales (IUPAC N°. 17, 18, 28, 31, 44, 49, 52, 74, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 170, 177, 180, 183, 187, 194 y 199), y *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE y dieldrina como estándares externos. Se usaron dos curvas de calibración con intervalos de 2 a 75 pg y 75 a 250 pg de compuesto inyectado. La recuperación de las columnas de Florisil se evaluó con una solución estándar y se obtuvo más del 85% de cada compuesto. Se analizó un blanco entre cada

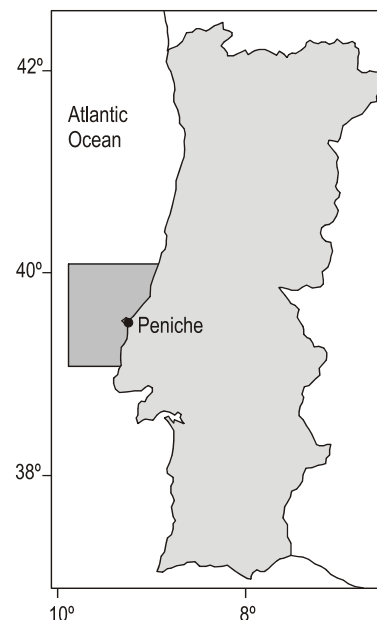


Figura 1. Localización del área de muestreo al NW de la costa portuguesa.  
Figure 1. Location of the sampling area on the NW Portuguese coast.

### Material

The following solvents and reagents were used: acetone and *n*-hexane distilled in the laboratory; dichloromethane (p.a. Merck); sodium sulphate anhydrous (p.a. Merck) heated at 440°C overnight; Florisil 60–100 mesh (Merck), activated at 440°C for 17 h and partially deactivated with 1% distilled water; and sulphuric acid 95–97% (p.a. Merck).

For the standards, 30 PCB congeners were obtained as certified solution C-QME-01 from Accustandard, New Haven; and dieldrin, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD and *p,p'*-DDE were obtained as crystals from Dr. Ehrenstorfer, Augsburg (>97.5%, 99.5%, 97.5% and 99.5% of purity, respectively).

The certified reference material used was fresh mussel tissue BCR-682 (Community Bureau of Reference), for the certification of chlorobiphenyls (CBs) IUPAC Nos. 28, 52, 118, 149, 153, 170 and 180.

### Analytical methods

The muscle samples were Soxhlet-extracted with *n*-hexane for 6 h. Fat content was gravimetrically determined from aliquots of the tissue extracts. The remaining extracts were concentrated and cleaned up using a Florisil glass column for separation of compounds (Antunes and Gil 2004) and subjected to a further clean-up with sulphuric acid. After the concentration, each sample was injected into a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph equipped with an electron capture detector and a DB-5 (J&W Scientific) capillary column (60 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 mm film thickness). The oven was operated under the following conditions: 60°C, 1

doce muestras. Para el control del método analítico se analizó material certificado de referencia (BCR-682) de tejido de mejillón fresco y las recuperaciones alcanzaron entre el 80% y 110%.

### Análisis estadístico

Las concentraciones de OCs en los diferentes meses se contrastaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la comparación múltiple Fisher LSD y para comparar pares de medias se utilizó el teste *t* de Student, con un nivel de confianza del 95% en todos los testes.

## Resultados

### Madurez sexual

El índice gonadosomático (GSI), comúnmente usado para caracterizar las fases de madurez de las gónadas, fue determinado de acuerdo con Figueiredo y Santos (1988):

$$\text{GSI} = (\text{W}_{\text{gon}} / \text{W}_{\text{gut}}) \times 100$$

donde  $\text{W}_{\text{gon}}$  es el peso de las gónadas y  $\text{W}_{\text{gut}}$  el peso del individuo desviscerado. La figura 2 muestra la evolución mensual del GSI de la sardina. Tanto las hembras como los machos revelan una gran variación mensual en el GSI, con valores bajos al final de la primavera/verano (mín. 2.2%) y valores mayores al final del otoño/invierno (máx. 9.7%). El aumento del GSI fue pronunciado en octubre para los machos y en noviembre para las hembras, los valores se mantuvieron relativamente constantes hasta enero. Los valores más altos son indicativos del periodo de desove (Ferreira *et al.* 2004).

### Contenido lipídico en el músculo

El contenido lipídico de las hembras y los machos varió en una proporción superior a 31 veces durante el estudio (fig. 3).

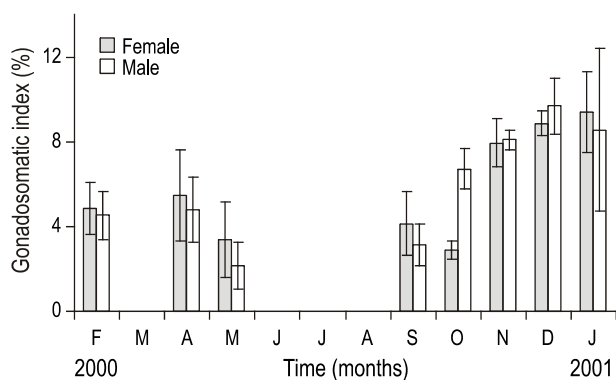


Figura 2. Índice gonadosomático (GSI, %) en sardinas hembra y macho de la región de Peniche (Portugal) entre febrero de 2000 y enero de 2001.

Figure 2. Gonadosomatic index (GSI, %) of female and male sardines (*Sardina pilchardus*) caught off the coast of Peniche (Portugal) between February 2000 and January 2001.

min hold; ramp to 210°C at a rate of 20°C min<sup>-1</sup>, 27 min hold; ramp to 250°C at a rate of 2°C min<sup>-1</sup>, 17 min hold; and ramp to 260°C at a rate of 4°C min<sup>-1</sup>, with a final hold of 15 min. The injector temperature was maintained at 270°C and the detector was kept at 320°C. Helium and argon/methane 90/10 were used as carrier and make-up gases, respectively. The concentrations of PCBs, DDT compounds and dieldrin were quantified from the peak heights using a mixture of 30 individual CBs (IUPAC Nos. 17, 18, 28, 31, 44, 49, 52, 74, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 170, 177, 180, 183, 187, 194 and 199), and *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE and dieldrin as external standards. Two calibration curves, ranging from 2 to 75 pg and from 75 to 250 pg of injected compounds, were used. The recovery of the Florisil column was evaluated with a standard solution and more than 85% of each compound was obtained. Procedural blanks were also analyzed in each batch of 12 samples. Certified reference material of fresh mussel tissue BCR-682 was examined for analytical method control and the recoveries ranged from 80% to 110%.

### Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's LSD paired comparison procedure was used to compare the concentrations of OCs from different months. To compare pairs of means, Student's *t*-test was used. A 5% significance level was used for the statistical tests.

## Results

### Sexual maturity

The gonadosomatic index (GSI), commonly used to characterize the maturity phases of gonads, was determined according to Figueiredo and Santos (1988):

$$\text{GSI} = (\text{W}_{\text{gon}} / \text{W}_{\text{gut}}) \times 100$$

where  $\text{W}_{\text{gon}}$  is the gonad weight and  $\text{W}_{\text{gut}}$  is the gutted fish weight. Figure 2 shows the seasonal evolution of the GSI of *S. pilchardus*. Both males and females exhibited a pronounced seasonal variation in GSI, with lower values in late spring/summer (min. 2.2%) and higher in late autumn/winter (max. 9.7%). The GSI values increased sharply in October (males) and November (females) and then remained relatively constant until January. The high values are indicative of the spawning period (Ferreira *et al.* 2004).

### Lipid content in muscle

Lipid content in muscle of females and males varied more than 31-fold during the one year of study (fig. 3). The lowest values were registered in February (approximately 0.8%) and the highest in November (27%). Lipid content in November was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than during the remaining

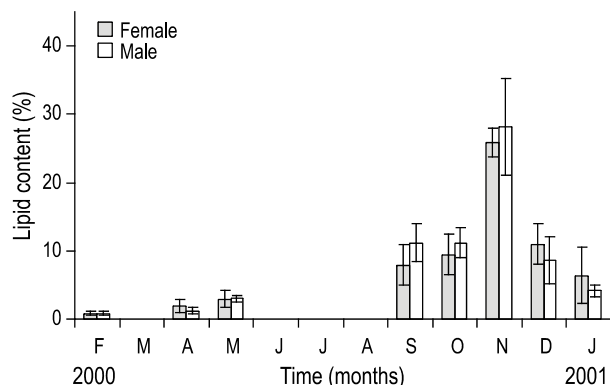


Figura 3. Media y desviación estándar del contenido lipídico (%) en el músculo de la sardina de la región de Peniche (Portugal) entre febrero de 2000 y enero de 2001.

Figure 3. Mean and standard deviation of lipid content (%) in muscle of *Sardina pilchardus* caught off the coast of Peniche (Portugal) between February 2000 and January 2001.

Los valores menores fueron registrados en febrero (aproximadamente el 0.8%) y los mayores en noviembre (27%). El contenido lipídico en noviembre fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más alto que para el resto de los meses. Después de este mes, los lípidos en el músculo disminuyeron pronunciadamente aunque las gónadas representaron una alta proporción del peso de los individuos.

#### Composición de PCB y DDT

Los 30 congéneres de PCB, el *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y la dieldrina fueron cuantificados en más del 94% de las muestras de músculo analizadas. El compuesto *p,p'*-DDT fue cuantificado únicamente en el 50% de las muestras. El metabolito *p,p'*-DDE representó más del 68% del DDT total. Los congéneres CB-153 y CB-138 (hexaclorobifenilos) y el pentaclorobifenil CB-149 fueron los compuestos predominantes, constituyendo 16%, 15% y 9%, respectivamente, de los PCBs totales analizados.

#### Variación anual de los organoclorados

En la figura 4 se presentan las concentraciones de los PCBs totales (calculados como la sumatoria de los CBs individuales), el DDT total (calculado como la suma de *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDT) y la dieldrina en las hembras y en los machos a lo largo del periodo estudiado. Los tres grupos de compuestos revelaron el mismo padrón de variación anual: valores más bajos entre febrero y mayo, incremento gradual en los meses siguientes, máximo en noviembre y decrecimiento hasta enero. Los rangos de concentración ( $\text{ng g}^{-1}$  peso seco) en las hembras y en los machos fueron los siguientes: 5.9–29 y 16–38 para los PCBs totales, 1.6–8.5 y 3.2–11 para el DDT total, y 0.09–2.4 y 0.18–2.9 para la dieldrina. Los máximos de dieldrina y DDT total se encontraron en noviembre, siendo los valores significativamente diferentes a los de los otros meses. Para los PCBs

study period. After this month, lipids in muscle decreased markedly, although gonads represented a high proportion of the fish mass

#### PCB and DDT composition

All 30 PCB congeners, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD and dieldrin were quantified in more than 94% of the muscle samples analyzed. The compound *p,p'*-DDT was only quantified in 50% of the samples. The metabolite *p,p'*-DDE represented more than 68% of the total DDT. The congeners CB-153 and CB-138 (hexachlorobiphenyls) and CB-149 (pentachlorobiphenyl) were the predominant compounds, accounting for 16%, 15% and 9%, respectively, of the total PCBs analyzed.

#### Seasonal variation of organochlorines

The concentrations of total PCBs (calculated as the sum of individual CBs), total DDT (calculated as the sum of *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD and *p,p'*-DDT) and dieldrin in females and males during the study period are given in figure 4. The three groups of compounds revealed the same seasonal concentration pattern: lower values between February and May, a gradual increase in the following months, a maximum in November, and a decrease until January. The following concentration ranges ( $\text{ng g}^{-1}$  dry weight) were obtained for females and males, respectively: 5.9–29 and 16–38 for total PCB, 1.6–8.5 and 3.2–11 for total DDT, and 0.09–2.4 and 0.18–2.9 for dieldrin. The maximum values of dieldrin and total DDT occurred in November, and were significantly different than those of the others months. For total PCB, concentrations in November only differed ( $P < 0.05$ ) from those in April, May, September and January. Differences between females and males were only significant ( $P < 0.05$ ) for total DDT in December, and for total PCB in February, April and May 2000 and January 2001.

#### Organochlorine-lipid relationships

The concentrations of the OCs analyzed were significantly correlated to lipid content in muscle of both female and male sardines (table 1). The best correlations were found with dieldrin and differences between sexes were minor. For total PCBs, correlations were better in females, reflecting that in winter PCBs decreased more rapidly in females than in males.

## Discussion

#### Environmental factor

All the *S. pilchardus* samples analyzed in this work came from the Peniche region, a peninsula located in a rural area without industrial and river inputs to the sea. Results of a national mussel watch programme indicated low contamination by OCs in this coastal area and enhanced values restricted

totales, las concentraciones en noviembre apenas difirieron ( $P < 0.05$ ) de las de abril, mayo, septiembre y enero. Sólo se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre hembras y machos para el DDT total en diciembre, y para los PCBs totales en febrero, abril, mayo de 2000 y enero de 2001.

*Relaciones organoclorados-lípidos*

Las concentraciones de los organoclorados analizados obtuvieron buenas correlaciones con el contenido lipídico del músculo, tanto para sardinas hembras como machos (tabla 1). Las mejores correlaciones se encontraron para la dieldrina, y las diferencias entre sexos no fueron significativas. Para los PCBs totales las correlaciones fueron mejores en las hembras, reflejando que en el invierno los PCBs decrecen más rápido en las hembras que en los machos.

**Discusión**

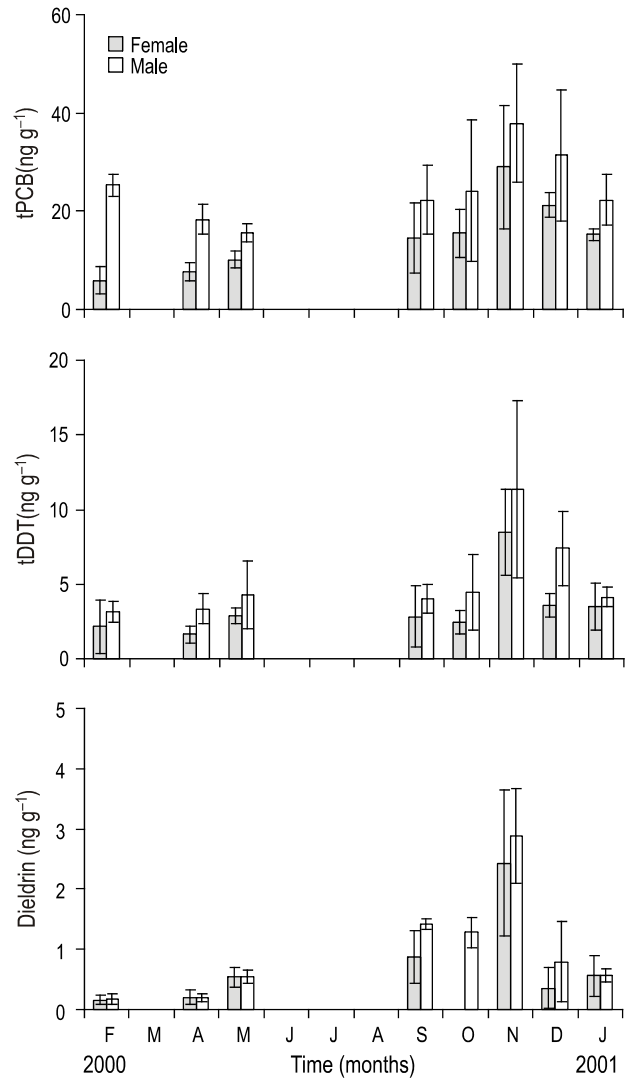
*Factor medioambiental*

Todas las sardinas analizadas en este trabajo provinieron de la región de Peniche, una península de Portugal localizada en una zona rural, sin industria y sin ríos que desemboquen al mar. Los resultados del programa nacional de monitoreo de mejillones indicaron bajas contaminaciones de OCs en esta área costera, mientras que las contaminaciones más elevadas se restringen a las desembocaduras de los principales estuarios (Vale *et al.* 1985). Un estudio reciente reveló los niveles de PCBs y DDTs en seston (<1 mm) y en plancton recogidos en una red de 20 µm a lo largo de la costa portuguesa (Quental *et al.* 2003), además de demostrar que las concentraciones más elevadas se encuentran en estas mismas áreas próximas a los estuarios, en particular durante la época de lluvias. Varios estudios han indicado residuos de contaminación en tejido de pescados con la polución (Bayarri *et al.* 2001, Stefanelli *et*

**Tabla 1.** Correlación entre los valores de las concentraciones de organoclorados y el contenido lipídico en el músculo de sardina de la región de Peniche (Portugal).

**Table 1.** Correlation between the organochlorine concentration values and lipid content in muscle of sardine (*Sardina pilchardus*) from Peniche (Portugal).

	$r^2$	$P$
<b>Females</b>		
Total PCB	0.64	<0.001
Total DDT	0.61	<0.001
Dieldrin	0.83	<0.001
<b>Males</b>		
Total PCB	0.50	<0.01
Total DDT	0.57	<0.001
Dieldrin	0.91	<0.001



**Figura 4.** Variación estacional del PCB total, el DDT total y la dieldrina (ng g<sup>-1</sup>) en el músculo de la sardina de la región de Peniche (Portugal) entre febrero de 2000 y enero de 2001.

**Figure 4.** Seasonal variation of total PCB, total DDT and dieldrin (ng g<sup>-1</sup>) in muscle of *Sardina pilchardus* caught off the coast of Peniche (Portugal) between February 2000 and January 2001.

to the mouth of major estuaries (Vale *et al.* 1985). A recent study recorded the levels of PCBs and DDTs in seston (<1 mm) and plankton collected by a 20-µm net along the Portuguese coast (Quental *et al.* 2003), and reported higher concentrations in suspensions from those areas, particularly during the wet season. Several studies have associated the contaminant residues in fish tissues with pollution (Bayarri *et al.* 2001, Stefanelli *et al.* 2004). In general, the levels of OCs in sardine muscle tissues reflect the concentration in plankton that constitutes its energy source. Although the specimens captured off the coast of Peniche may not be year-round residents, it is assumed that the sardines remain in this area at least during the spawning period between October and April (Carrera and Porteiro 2003). Since most of the individuals analyzed were



*al.*2004). En general, los niveles de OCs en el músculo de sardina reflejan la concentración en el plancton, el cual constituye su fuente de energía principal. A pesar de que los especímenes capturados en la zona de Peniche pueden no habitar en dicha zona durante todo el año, se supone que las sardinas permanecen en esta área por lo menos durante la época de desove, entre octubre y abril (Carrera y Porteiro, 2003). La mayor parte de las sardinas fueron pescadas durante esta época reproductiva y lejos de los principales estuarios, por lo cual que alimentaron de plancton que contenía niveles uniformemente bajos de OCs. Por lo tanto, es de esperarse que la biodisponibilidad de los OCs en esta área costera de Peniche sea baja y por sí sola no justifique la variación estacional de los residuos de estos contaminantes encontrados en el músculo de sardina, lo cual constituye la discusión principal de este trabajo.

#### *Comparación con otros ambientes*

Las concentraciones de PCBs y DDTs en el músculo de sardinas capturadas en Peniche, una región con oleaje característico sin aportes antropogénicos directos, fueron respectivamente cinco y tres veces inferiores a niveles indicados para la misma especie en el Mar Adriático (Perugini *et al.* 2004). Perugini *et al.* (2004) y Stefanelli *et al.* (2004) concluyeron que los altos contenidos de residuos en las sardinas del Mar Adriático fueron consecuencia de la elevada polución por OCs que contiene esa masa de agua. Estos valores resultaron más bajos que los indicados en dos estudios históricos (Fernández y Franco 1976, Magalhães y De Barros 1987) para la costa Atlántica ibérica, a pesar de que esta comparación se limita a diferencias por procesos analíticos, y comparables a concentraciones observadas en la costa mediterránea española durante el periodo de 1989–90, cuyos valores se encuentran en la base de datos MEDPOL. Con el tiempo, el *p,p'*-DDT en el medio ambiente se metaboliza a *p,p'*-DDE, y cuando este compuesto llega a ser más del 60% del DDT total, los aportes recientes de polución por *p,p'*-DDT se consideran ausentes (Tsydenova *et al.* 2004). En las sardinas de Peniche analizadas, los valores alcanzaron un rango entre 68% y 98%, lo que confirma la ausencia de aportes recientes de *p,p'*-DDT en esta región costera.

#### *Ciclo reproductivo*

Debido a que los individuos analizados presentaron el mismo tamaño (entre 20.0 y 21.5 cm) la dependencia de la acumulación de OCs con la longitud/tamaño, común en otras especies (Antunes *et al.* 2001, Vives *et al.* 2005), puede ser despreciada en este estudio. De hecho, las concentraciones de OCs en el músculo de sardina apuntan a una evolución estacional; un máximo destacable en noviembre y valores más bajos durante el invierno y la primavera. Este padrón de comportamiento está de acuerdo con varios trabajos que describen las variaciones de los residuos de organoclorados con el ciclo reproductivo de los organismos (Loizeau *et al.* 2001). En la

capturada durante este reproductivo periodo and far from the major estuaries, it is likely that they fed on plankton containing uniformly low OC levels. It is therefore supposed that bioavailability of OCs in the coastal area around Peniche is low and does not solely justify the seasonal variation of residues in sardine muscle observed in this study.

#### *Comparison with other environments*

The concentrations of PCBs and DDTs in muscle of *S. pilchardus* caught off Peniche, a wave-exposed region without direct anthropogenic inputs, were five and three times lower, respectively, than the levels reported for the same species in the Adriatic Sea (Perugini *et al.* 2004). Residues in sardines from the Adriatic Sea were considered a consequence of the high pollution by OCs in this water mass (Perugini *et al.* 2004, Stefanelli *et al.* 2004). The values were also considerably lower than those reported for Atlantic Iberian waters in two historical studies (Fernández and Franco 1976, Magalhães and De Barros 1987), though the comparison is limited by different analytical procedures; however, they are comparable to concentrations obtained for the Mediterranean coast of Spain for the period 1989–1990 and included in the MEDPOL database. In time, *p,p'*-DDT in the environment is metabolized to *p,p'*-DDE. When this compound accounts for more than 60% of the total DDT, it is considered absent in recent inputs of *p,p'*-DDT pollution (Tsydenova *et al.* 2004). The values recorded for the Peniche specimens analyzed ranged from 68% to 98%, confirming the lack of recent inputs of *p,p'*-DDT to the coastal region.

#### *Sexual cycle*

Since all the individuals analyzed were 20 to 21.5 cm long, the length/size dependence of OC accumulation registered in other species (Antunes *et al.* 2001, Vives *et al.* 2005) could be disregarded in this study. In fact, the concentrations of OCs in sardine muscle indicate a seasonal evolution, with a clear-cut maximum in November and lower values in winter and spring. This pattern is in agreement with other works that have related the variations of OC residues to the sexual cycle of the organisms (Loizeau *et al.* 2001). It is particularly interesting to examine this relation in sardines because the long spawning period makes it possible to follow the evolution of the OC concentrations with the metabolic changes occurring during these months (Perugini *et al.* 2004). The evolution of the GSI and lipid content in muscle is in accordance with a previous study of lipids in sardine from the same region (Bandarra *et al.* 1997), which associates lipid content in muscle with the reproductive cycle and attributes lower levels during spawning to fat mobilization. The levels of PCBs, DDTs and dieldrin in muscle appear to vary with the GSI. In October and November, when the GSI increased during the final stages of gonad development and the beginning of spawning activity (Ferreira *et al.* 2004), OCs presented maximum values in muscle. In the final spawning period (February to May), the GSI decreased and the

sardina, esta relación es particularmente interesante debido a su largo periodo de desove, lo que permite acompañar la evolución de las concentraciones de OCs con los cambios metabólicos ocurridos durante esos meses (Perugini *et al.* 2004). La evolución de los índices gonadosomáticos (GSI) y el contenido lipídico en el músculo, está de acuerdo con un estudio previo de los lípidos en las sardinas de esta región (Bandarra *et al.* 1997) que relaciona el contenido lipídico en el músculo con el ciclo reproductivo y atribuye los valores más bajos durante el desove a la movilidad de los lípidos. Los niveles de PCBs, DDTs y dieldrina en el músculo aparentemente varían con el GSI. En octubre y noviembre, cuando el GSI aumenta más rápidamente debido a la fase final del desarrollo de las gónadas y al inicio de la actividad de desove (Ferreira *et al.* 2004), los OCs presentan valores máximos en el músculo. En la fase final del desove (de febrero a mayo) el GSI decrece y las concentraciones de OCs son menores. La dieldrina mostró concentraciones más bajas que los DDTs y PCBs, y también una menor fluctuación anual y mejor correlación con el contenido lipídico (tabla 1). Este padrón indica que la dieldrina tiene mayor movilidad que los DDTs y PCBs ya que probablemente éstos tendrán mayor tiempo de residencia en el músculo durante el ciclo anual.

#### Diferencias con el género

El músculo de los machos presentó niveles de PCBs más elevados, en el periodo final de desove (enero–mayo), que las hembras, y no se encontraron diferencias significativas en el contenido lipídico (0.82–3.0% en las hembras y 0.86–3.0% en los machos), lo que demuestra que las variaciones en los residuos de PCBs no pueden ser atribuidas al contenido lipídico. Esto sugiere que la eliminación de los PCBs del músculo es más rápida en las hembras, eventualmente como consecuencia de la transferencia hacia las gónadas y la eliminación de los huevos que se lleva a cabo durante el periodo más intensivo del desove. Aparentemente, los mecanismos existentes en los machos durante la reproducción son un medio menos eficaz de eliminación de PCBs del músculo. Se han descrito diferencias en la eliminación de PCBs en función del género en la trucha (Vives *et al.* 2005). Tales diferencias con el género no fueron observadas ni para los DDTs ni para la dieldrina en el músculo de las sardinas.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento de Recursos Marinos (DRM) por ceder las muestras de sardina y los datos del ciclo reproductivo de estos organismos. Parte de este trabajo fue financiado por la Fundación Portuguesa para la Ciencia y Tecnología (FCT) y QCA-III a través de los proyectos MACAC FCT-PLE-14 y QCA-III-MARE, 22-05-01-FOR-00005. Paulo Antunes agradece su beca a la FCT.

Traducido al español por Hilda de Pablo y Paulo Antunes.

concentrations of OCs were lower. Dieldrin showed lower concentrations than the DDT and PCB compounds, as well as less annual fluctuation and a better correlation with lipid content (table 1). This pattern indicates that dieldrin has a higher mobility than DDTs and PCBs, which probably have a longer residence time in muscle during the annual cycle.

#### Gender differences

Males presented higher levels of PCBs in their muscle in the final spawning period (January to May) than females, whereas no differences were found in lipids (0.82–3.0% in females and 0.86–3.0% in males); hence, changes in PCB residues cannot be attributed to lipid content. These differences suggest that the elimination of PCBs in muscle is faster in females as a consequence of transference to the gonad and the excretion of eggs that occurs during the most intensive spawning period. Apparently, mechanisms existing in males during reproduction are a less effective means of PCB elimination from muscle. Gender differences in PCB elimination were reported for trout (Vives *et al.* 2005). Such alterations in relation to gender were not observed for DDTs and dieldrin in sardine muscle.

#### Acknowledgements

The authors thank the Marine Resources Department for providing the sardine samples and data of the sardine reproductive cycle. Part of this work was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) and QCA-III, through projects MACAC FCT-PLE-14 and QCA-III-MARE, 22-05-01-FOR-00005. Paulo Antunes acknowledges a grant from FCT.

#### Referencias

- Antunes P, Gil O. 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere* 54: 1503–1507.
- Antunes P, Gil O, Costa O. 2001. Accumulation pathways of PCBs in sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Ecotoxicol. Environ. Restor.* 4: 39–44.
- Bandarra NM, Batista I, Nunes ML, Empis JM, Christie WW. 1997. Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Food Sci.* 62: 40–42.
- Bayarri S, Baldassarri LT, Iacovella N, Ferrara F, di Domenico A. 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 43: 601–610.
- Bode A, Carrera P, Lens S. 2003. The pelagic foodweb in the upwelling ecosystem of Galicia (NW Spain) during spring: Natural abundance of stable carbon and nitrogen isotopes. *ICES J. Mar. Sci.* 60: 11–22.
- Borges MF, Santos AMP, Crato N, Mendes H, Mota B. 2003. Sardine regime shifts off Portugal: A time series analysis of catches and wind conditions. *Sci. Mar.* 67: 235–244.
- Carrera P, Porteiro C. 2003. Stock dynamic of the Iberian sardine (*Sardina pilchardus*, W.) and its implication on the fishery off Galicia (NW Spain). *Sci. Mar.* 67: 245–258.



- Dachs J, Bayona JM, Albaigés J. 1997. Spatial distribution, vertical profiles and budget of organochlorine compounds in western Mediterranean seawater. *Mar. Chem.* 57: 313–324.
- Falandysz J, Wyrzykowska B, Warzocha J, Barska I, Garbaciak-Wesoowska A, Szefer P. 2004. Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chem.* 87: 17–23.
- Fernández MJ, Franco JM. 1976. Presence of DDT, its derivatives, and polychlorinated biphenyls (PCB) in the sardine (*Sardina pilchardus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) of northwestern Spain. *Inf. Téc. Inst. Invest. Pesq.* 39, 15 pp.
- Ferreira AM, Martins M, Vale C. 2003. Influence of diffuse sources on levels and distribution of polychlorinated biphenyls in the Guadiana River estuary, Portugal. *Mar. Chem.* 83: 175–184.
- Ferreira M, Antunes P, Gil O, Reis-Henriques MA. 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro Estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 69: 347–357.
- Figueiredo I, Santos M. 1988. On sexual maturation, condition factor and gonadosomatic index of *Sardina pilchardus*, Walb., off Portugal (1986/1987). *ICES CM*, 1988/H, 70, 29 pp.
- Georgakopoulos-Gregoriades E, Vassilopoulou V, Stergiou KI. 1991. Multivariate analysis of organochlorines in red mullet from Greek waters. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 237–241.
- Loizeau V, Abarnou A, Cugier P, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AN, Ménesguen A. 2001. A model of PCB bioaccumulation in the sea bass food web from the Seine Estuary (eastern English Channel). *Mar. Pollut. Bull.* 43: 242–255.
- Magalhães MJ, De Barros MC. 1987. The contamination of fish with chlorinated hydrocarbons in Portugal: Continental coast and Azores Islands. *Environ. Monit. Assess.* 8: 37–57.
- MEDPOL. 1975–1993. Mediterranean Pollution Monitoring and Research Programme, Databases for Trace Elements and Chlorinated-Hydrocarbons of Phase I and II. UNEP.
- Parish RH, Serra R, Grant WS. 1989. The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: Their taxonomy, distribution, stock structure and zoogeography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 2019–2036.
- Perugini M, Cavaliere M, Giammarino A, Mazzone P, Olivieri V, Amorena M. 2004. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea. *Chemosphere* 57: 391–400.
- Quental T, Ferreira AM, Vale C. 2003. The distribution of PCBs and DDTs in seston and plankton along the Portuguese coast. *Acta Oecol.* 24: S333–339.
- Ré P, Cabral e Silva R, Cunha E, Farinha A, Meneses I, Moita T. 1990. Sardine spawning off Portugal. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, Lisboa* 15: 31–44.
- Stefanelli P, Di Muccio A, Ferrara F, Barbini DA, Generali T, Pelosi P, Amendola G, Vanni F, Di Muccio S, Ausili A. 2004. Estimation of intake of organochlorine pesticides and chlorobiphenyls through edible fishes from the Italian Adriatic Sea during 1997. *Food Control* 15: 27–38.
- Storelli MM, Storelli A, D'Addabbo R, Barone G, Marcotrigiano GO. 2004. Polychlorinated biphenyls residues in deep-sea fish from Mediterranean Sea. *Environ. Int.* 30: 343–349.
- Stratoudakis Y, Marçalo A. 2002. Sardine slipping during purse-seining off northern Portugal. *ICES J. Mar. Sci.* 59: 1256–1262.
- Teil MJ, Blanchard M, Chesterikoff A, Chevreuil M. 1998. Transport mechanisms and fate of polychlorinated biphenyls in the Seine River (France). *Sci. Total Environ.* 218: 103–112.
- Tsydenova O, Minh TB, Kajiwara N, Batoev V, Tanabe S. 2004. Recent contamination by persistent organochlorines in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from Lake Baikal, Russia. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 749–758.
- Vale C, Ferreira AM, Cortesão C, Barros MC, Castro OG, Mendes R. 1985. A mussel watch on the Portuguese coast, 1984. *ICES, C.M.* 1985/E, 18 pp.
- Vives I, Grimalt JO, Ventura M, Catalan J, Rosseland BO. 2005. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redó, Pyrenees). *Environ. Pollut.* 2: 343–350.
- Voorspoels S, Covaci A, Maervoet J, De Meester I, Schepens P. 2004. Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 393–404.
- Zwolinski J, Stratoudakis Y, Soares E. 2001. Intra-annual variation in the batch fecundity of sardine off Portugal. *J. Fish Biol.* 58: 1633–1645.

*Recibido en abril de 2005;  
aceptado en enero de 2006.*