

Evaluación de *Pontoporia blainvillei* como potencial especie bioindicadora de metales en el estuario del Río de la Plata y su frente marítimo

Mariana Foglia Costa

22 de octubre de 2013



PEDECIBA

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Universidad de la República - Ministerio de Educación y Cultura

Evaluación de *Pontoporia blainvillei* como potencial especie bioindicadora de metales en el estuario del Río de la Plata y su frente marítimo

Mariana Foglia Costa (mfoglia@fcien.edu.uy)

Orientador Dra. María Salhi Romero (msalhi@fcien.edu.uy)

Co-orientador: Dr. Pablo Muniz Maciel (pmmaciel@fcien.edu.uy)

RESUMEN

La franciscana *Pontoporia blainvillei* es endémica en la región del Atlántico sudoccidental, presenta hábitos costeros y dada su posición en la trama trófica como predador tope, puede potencialmente bioacumular los contaminantes que tienen como destino final la zona costera. El objetivo del presente trabajo fue evaluar a *Pontoporia blainvillei* como posible especie bio-indicadora de los niveles de mercurio y cadmio en el Río de la Plata y Océano Atlántico adyacente. Para ello se determinaron los niveles de mercurio y cadmio en hígado y riñón respectivamente en franciscana durante los años 2006, 2011 y 2012 (n=61), y se estudió su relación con el sexo, estado de descomposición, talla, año, zona y estación. Para determinar los niveles de ambos metales, se utilizó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por vapores fríos para mercurio y mediante llama para cadmio. Las tallas de las franciscanas comprendieron desde 60 a 164 cm y en promedio se obtuvieron valores de mercurio hepáticos de $2.8 \pm 5.6 \mu\text{g/g}$ y de cadmio en riñón de $1.3 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$. Dichos valores se encuentran por debajo de los niveles tolerables por mamíferos marinos. En franciscanas destetadas se encontró una correlación positiva con la talla ($p < 0.05$), opuestamente a lo encontrado en franciscanas no-destetadas. Las concentraciones de ambos metales en franciscanas, no se relacionaron con el sexo ($p = 0.78$ y $p = 0.15$, respectivamente), ni con el estado de descomposición ($p = 0.68$ y $p = 0.21$, respectivamente). No se encontró relación en las zonas de estudio y la concentración de Cd ($p = 0.55$), mientras que para Hg la misma fue marginal ($p = 0.048$). El verano presentó niveles de ambos metales levemente superiores a los del otoño y en cuanto a la variación anual, ambos metales presentaron una tendencia decreciente a lo largo del tiempo. El uso de *Pontoporia blainvillei* como posible bio-indicador de la contaminación por metales pesados, sería válido para estudios de monitoreo a lo largo del tiempo, mientras que su uso no es adecuado para estudios ambientales del tipo sitio-específicos.

ABSTRACT

Pontoporia blainvillei or franciscana, is endemic in the sudoccidental Atlantic region, presents coastal habits and due to his position in the trophic web as a top predator, can potentially bioaccumulate pollutants that have coastal zones as final destination. The aim of the present work was to evaluate *Pontoporia blainvillei* as a possible mercury and cadmium bioindicator species, in the Río de la Plata and the adjacent Atlantic Ocean. During 2006, 2011 and 2012, franciscana's, mercury and cadmium levels were measured in liver and kidney respectively (n=61). The relationship between mercury and cadmium levels was done by the sex, level of decomposition, length, year, zone and season. Levels of mercury and cadmium were determined by atomic absorption spectrophotometry, by cold vapor for mercury and by flame ionization for cadmium. Franciscana's lengths ranged from 60 to 164 cm and average mercury hepatic value was $2.8 \pm 5.6 \mu\text{g/g}$ and average cadmium in kidney was $1.3 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$. The above mentioned values were below the tolerable levels for marine mammals. In weaned franciscana a positive correlation with animal length was found ($p < 0.05$). This correlation was not observed in non-weaned dolphins. The concentrations of both Hg and Cd in franciscana, related neither to the sex ($p = 0.78$ and $p = 0.15$ respectively) nor with the degree of decomposition ($p = 0.68$ and $p = 0.21$ respectively) No relationship was found between the study zones and Cd levels ($p = 0.55$), for Hg level marginal relationship was found ($p = 0.048$). The summer presented levels of both metals slightly superior to those founding autumn, and both metals presented a decreasing trend throughout the time. The use of *Pontoporia blainvillei* as possible heavy metals pollution bioindicator, seems to be valid for biomonitoring throughout time, whereas its use is not adapted for site specific zones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto de un gran esfuerzo de personas e Instituciones que han dedicado y aportado su conocimiento y sus recursos. En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutores, Dra. María Salhi y Dr. Pablo Muniz, por su gran dedicación. Quisiera dar especial agradecimiento también a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el financiamiento a través de una beca de este trabajo, así como a la Facultad de Ciencias y a la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DI.NA.RA) que proporcionó sus instalaciones del Laboratorio de Análisis y Productos Pesqueros. Mi profundo agradecimiento, a los grupos de pescadores artesanales de Kiyú, Montevideo, Arroyo Pando y Piriápolis, así como a los guardavidas y sus coordinadores locales, al cuidador de la Isla Gorriti y al Museo del Mar (Maldonado) por su compromiso en el aviso de varamientos y a todos aquellos que supieron avisarme por franciscanas varadas. A Rafa por su ayuda en la parte estadística y a mis amigos que siempre estuvieron presentes en alguna caminata o anécdota de las idas a buscar muestras. Por último a mi familia, a mi esposo y a mi hija que me regalaron parte de su tiempo para la elaboración de este trabajo.

A todos ellos MUCHAS GRACIAS!

INDICE

LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ACRÓNIMOS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
Sistemas de aguas transicionales e indicadores biológicos de contaminación.....	2
Mamíferos marinos como bioindicadores de contaminantes	4
Factores que afectan la concentración de contaminantes en mamíferos marinos	6
Características de <i>Pontoporia blainvillei</i> en el marco de los bioindicadores	8
Mercurio y Cadmio en Uruguay.....	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
Objetivos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Evaluación Externa	17
Evaluación interna y toma de muestras.....	18
Análisis de Laboratorio	18
Análisis de mercurio total	19
Desarrollo del método de análisis de mercurio total	19
Análisis de cadmio	20
Desarrollo del método de análisis de cadmio.....	20
Adecuación de las técnicas a muestras de <i>Pontoporia blainvillei</i>	20
Determinación de la edad y grupos de alimentación.....	21
Análisis de datos.....	22
Modelos explorados dentro de LMM.....	23
RESULTADOS	25
Adecuación de las técnicas a muestras de <i>Pontoporia blainvillei</i>	25
Descripción de los datos.....	25
Análisis exploratorios de los datos.....	28
Modelación estadística	38
Modelo para la concentración de Hg.....	39
Modelo para la concentración de Cd.....	40
DISCUSIÓN.....	41
Adecuación de las técnicas de análisis de mercurio y cadmio	41
Niveles de mercurio y cadmio y su relación con el grado de descomposición.....	42
Niveles de mercurio y cadmio y su relación con la talla (LS) y alimentación (grupo destetadas y no destetadas).....	42
Niveles de mercurio y cadmio y su relación con el sexo de franciscanas.....	44
Variación interanual de la bioacumulación de mercurio y cadmio	45
Variación estacional de la bioacumulación de mercurio y cadmio	47
Variación zonal de la bioacumulación de mercurio y cadmio	50
Modelo estadístico.....	52
<i>Pontoporia blainvillei</i> ¿posible bio-indicador?	54
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores del porcentaje de recuperación (%REC) promedio de Hg y Cd en productos de la pesca y rango de aceptación (± 3 DS) del grupo A (pescados magros, moluscos bivalvos y crustáceos) y grupo B (pescados grasos y moluscos cefalópodos).....	19
Tabla 2. Datos de la edad (años), edad promedio, número de muestras (n) y rango, promedio y desvío estándar (DS) de la longitud (cm) de las franciscanas (Kasuya y Brownell, 1979).	21
Tabla 3. Valores del porcentajes de recuperación (%REC) para ensayos de Hg en hígado de franciscana y las distintas tomas de muestra (g), nivel de fortificación (μg), %REC histórico del grupo B (matrices grasas) y el rango %REC aceptado para matrices grasas.....	25
Tabla 4. Valores del porcentajes de recuperación (%REC) para ensayos de Cd en riñón de franciscana y <i>Pangasius</i> sp. y las distintas tomas de muestra (g), nivel de fortificación (μg), %REC histórico del grupo B (matrices grasas) y el rango %REC aceptado para matrices grasas.....	25
Tabla 5. Datos de cada una de las franciscanas analizadas: código, año, lugar donde se la encontró (departamento), estación del año, zona, sexo, longitud estándar (LS) (cm) y grado de descomposición, en donde ND=No determinado.	26
Tabla 6. Promedios estacionales de la concentración sin factores de confusión de Hg y Cd ($\mu\text{g/g}$) en hígado y riñón respectivamente del grupo destetadas, sus desvíos estándar y el valor-p de significancia obtenido del test ANCOVA no paramétrico.	37
Tabla 7. Parámetros b_0 y b_1 calculados y los intervalos de confianza correspondientes (IC 95%), para el modelo de la concentración Hg.	39
Tabla 8. Parámetros b_0 y b_1 calculados y los intervalos de confianza correspondientes (IC 95%), para el modelo de la concentración Cd.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la costa Uruguaya. Se indican las diferentes localidades y las zonas de la costa en donde fueron colectadas las muestras de franciscana.....	16
Figura 2. Datos de concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón de franciscana en función LS (cm) agrupados por año, estación y zona.....	29
Figura 3. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la LS (cm) de franciscanas discriminadas por años 2006, 2011 y 2012.	30
Figura 4. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas del grupo destetadas y no-destetadas. ...	30
Figura 5. Concentración de Hg en hígado ($\mu\text{g/g}$) (A) y de Cd en riñón ($\mu\text{g/g}$) (B) del grupo destetadas y no-destetadas y su relación con la LS (cm) respectivamente, durante los años 2006, 2011 y 2012	31
Figura 6. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas agrupada por sexo y años. H= Hembras y M= Machos.....	32
Figura 7. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas según el grado de descomposición en el cual se encontraba la muestra.	32
Figura 8. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas del grupo destetadas agrupadas por año.....	32
Figura 9. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) estacional en hígado del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).....	33
Figura 10. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) estacional en riñón del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).	34
Figura 11. Concentración de Hg en hígado ($\mu\text{g/g}$) (A) y Cd en riñón ($\mu\text{g/g}$) (B) de franciscanas del grupo no destetadas por mes.....	35
Figura 12. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) por zona en hígado del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).	36
Figura 13. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) por zona en riñón del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B). ...	36
Figura 14. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado del grupo de franciscanas destetadas agrupada por años, estación y zona.....	38
Figura 15. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón del grupo de franciscanas destetadas agrupada por años, estación y zona.	38

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACP	Análisis de Componentes principales
AIC	Criterio de Akaike
AMBI	Índice Biótico Marino
ANCOVA	Análisis de la Covarianza
ANOVA	Análisis de la Varianza
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica
ATDSR	Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
BENTIX	Índice biótico
BID	Banco Interamericano de Desarrollo
CCCB	Centro Coordinador del Convenio de Basilea para América Latina y el Caribe
Cd	Cadmio
CMS	Convención de Especies Migratorias
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DINAMA	Dirección Nacional de Medio Ambiente
DINARA	Dirección Nacional de Recursos Acuáticos
EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FMA	Áreas de Manejo de Franciscanas
GL	Grados de Libertad
Hg	Mercurio
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.
IPCS	Programa Internacional de Seguridad Química
ISI	Índice Indicador de Especies
LMM	Modelo Lineal Mixto
LS	Longitud Standard
MeHg	Metil Mercurio
MVOTMA	Ministerio de Vivienda y Organización Territorial y Medio Ambiente
Ni	Níquel
OEA	Organización de los Estados Americanos
OPP	Oficina de Planeamiento y Presupuesto
OUA	Organismo Uruguayo de Acreditación
Pb	Plomo
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
Se	Selenio
Zn	Zinc

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos, las zonas costeras y estuarios, suelen estar perturbados por factores de estrés tanto naturales como antropogénicos los cuales actúan por procesos directos, acumulativos o sinérgicos (Adams, 2005). Entre dichos factores se encuentran: los nutrientes, las condiciones de hipoxia, turbidez y sedimentos en suspensión, la alteración del hábitat, los cambios en los regímenes hidrológicos y los contaminantes tanto los metales pesados como los compuestos orgánicos (Adams, 2005). Algunas de las alteraciones que pueden ocasionar dichos factores son, en el caso de nutrientes, por ejemplo su exceso puede dar lugar a la eutrofización y generar algas tóxicas (Smith *et al.*, 1999), los sedimentos en suspensión, pueden modificar en estuarios la distribución de organismos y el ciclado de nutrientes (Bernát *et al.*, 1994) y el régimen hidrológico, que suele condicionar la estructura de la producción primaria y también la calidad de agua de los estuarios (Adams, 2005). La biota responde a dichas perturbaciones en forma integral generando consecuentemente, cambios en la abundancia, diversidad y en la adaptación de los individuos, poblaciones y comunidades (Adams, 2005). La complejidad de los sistemas marinos, su inherente variabilidad y la influencia de múltiples factores, sugieren que ninguna medida única (o incluso algunas medidas) son suficientes para evaluar los múltiples efectos que tienen dichas perturbaciones sobre la biota (Adams, 2005 y Salas *et al.*, 2006). Por otra parte, en términos de contaminación, los factores naturales y antropogénicos no actúan por separado (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1996). Así por ejemplo Leermarkers *et al.* (2001) y Laurier *et al.* (2003) mostraron que el material en suspensión y la salinidad en estuarios suelen condicionar la biodisponibilidad y especiación química de algunos metales. Existen varios trabajos que han contribuido a abordar el estudio del estado de salud, calidad de agua y efectos de contaminantes a nivel ecosistémico. Para estudiar el estado de salud de ecosistemas estuarinos, Meng y Liu (2010) plantean que la selección de los indicadores adecuados es crucial y juega un rol muy importante en los subsecuentes monitoreos. A su vez proponen, que no sería realista utilizar un indicador universal dado que los sistemas acuáticos presentan zonas ecológicas funcionales distintas, presiones antropogénicas puntuales (como uso del suelo para la agricultura y drenajes de aguas servidas), procesos de sedimentación que influyen en el intercambio de contaminantes en la interfase sedimento-agua y la contaminación emergente que usualmente no se incluye en los monitoreos.

Sistemas de aguas transicionales e indicadores biológicos de contaminación

Indicadores bióticos y abióticos han sido ampliamente utilizados para evaluar el estado de salud de ecosistemas acuáticos. En sistemas de aguas transicionales como estuarios, la variabilidad presente, desafía el encontrar parámetros indicadores, que en su conjunto reflejen la perturbación por contaminantes (Galloway *et al.*, 2004; Adams, 2005 y Salas *et al.* 2006). El utilizar criterios exclusivamente químicos para evaluar los efectos de una perturbación a nivel de calidad de agua no contempla lo que ocurre a nivel de comunidades u organismos (Adams, 2005 y Phillips, 1970). En cuanto a los sedimentos, son considerados buenos indicadores históricos locales de los impactos antropogénicos en ambientes costeros y estuarinos (Ridgway y Shimmield 2002) pero comparativamente insuficientes debido a la variabilidad en la tasa de sedimentación y el tipo de sedimento entre zonas estuarinas y marinas (Meng y Liu 2010). Por otra parte, los llamados bio-criterios permiten reflejar la exposición química a contaminantes y también la acción de perturbadores físicos, químicos, biológicos, integrándolos en el espacio y el tiempo (Adams, 2005). Ejemplo de ellos son los indicadores biológicos como macroalgas, moluscos bivalvos y peces teleósteos (Phillips 1970). Otro ejemplo son los biomarcadores, que a través de medidas funcionales pueden demostrar la exposición a contaminantes a nivel celular, pero al mismo tiempo no proporcionan evaluaciones de los daños ambientales a escala ecológica. Los bioindicadores son más amplios en su definición y pueden abarcar especies o comunidades centinelas (Adams, 2005). Los biomarcadores y bioindicadores aplicados en forma conjunta, pueden ser útiles para demostrar la exposición a contaminantes y ayudar a identificar como operan sus efectos a niveles organizacionales superiores, a través de la biotransferencia y biomagnificación (Adams, 2005). En este sentido, las comunidades bénticas han sido el grupo más utilizado como indicadores biológicos a nivel mundial. Su poca o nula movilidad los hace referentes locales de posibles impactos, incluyen distintas especies que tienen diversos grados de tolerancia al estrés, juegan un rol importante entre el ciclado de nutrientes y materiales en la interfase sedimento-agua y son el nexo con niveles tróficos más altos (Galloway *et al.*, 2004; Rogers y Greenaway, 2005 y Dauvin, 2007). Algunas de las desventajas que presentan, son que las respuestas no son específicas al tipo de disturbio, están sujetos a los cambios taxonómicos acorde al gradiente estuarino y no se pueden aplicar consistentemente entre zonas biogeográficas distintas (Dauvin, 2007). Para evaluar el status ecológico (según nivel de presión antropogénica) y contaminación en aguas transicionales a nivel mundial, se ha propuesto el uso de varios índices ecológicos que combinan elementos

abióticos (indicadores abióticos) con componentes bióticos (indicadores biológicos). Los mismos basan su componente biológico en comunidades bénticas como AMBI, BENTIX e ISI entre otros (Salas *et al.* 2006). Los mismos permiten la valoración del estado ecológico de un ecosistema acuático afectado por un proceso de contaminación, simplificando a un valor numérico comparable e interpretable (Salas *et al.* 2006). Para la evaluar estrés antropogénico en el caso de aguas transicionales (estuarinas), el tipo de índice a utilizar es discutido ya que la mayoría de ellos evalúan la abundancia de especies, las cuales también resisten a perturbaciones naturales (régimen frecuente en estuarios) (Dauvin 2007). El análisis de la situación en varios continentes (África, Asia, Australia, Europa y América del Norte) acerca de cuáles son las características de un buen indicador o índice ecológico para áreas costeras y aguas de transicionales sigue siendo tema de discusión actual (Borja *et al.*, 2008 y 2012). A nivel mundial las comunidades pelágicas como peces (Hodson, 1990) y mamíferos marinos (Muir *et al.*, 1999), también han sido utilizadas como indicadores del estado ambiental. Los indicadores nectónicos por su característica movilidad y heterogeneidad espacial, han sido utilizados para integrar la información del estado ambiental a una escala espacial y temporal mayor que los bentónicos, pero al mismo tiempo esto no los hace buenos indicadores locales (Salas *et al.*, 2006). De modo que distintas especies o grupos pueden ser utilizados como indicadores, dependiendo del tipo y escala de la perturbación a evaluar en el ambiente (Adams, 2002).

Para la bahía de Montevideo y zonas adyacentes se han estudiado distintos tipos de índices y bioindicadores. Por ejemplo Muniz *et al.* (2005) testearon el índice AMBI con resultados positivos, logrando clasificar dichas zonas según el grado de contaminación previamente establecido por Muniz *et al.* (2002). Pero como contraparte y según la variabilidad ambiental del estuario del Río de la Plata, la implementación de índices como AMBI para el análisis del estado de contaminación, no podrían utilizarse para zonas biogeográficamente distintas a menos que se conozca su ecología y funcionamiento ecosistémico (Muniz *et al.*, 2005 y Salas *et al.*, 2006). Para la bahía de Montevideo, Venturini *et al.* (2004) encontraron que la aplicación del análisis a nivel de phylum en comunidades bénticas geográficamente distintas, puede utilizarse para comparar en una misma escala de perturbación, los estatus ecológicos de dichas comunidades. Por otra parte Bergamino *et al.* (2009), encontraron para Uruguay que algunas especies de poliquetos son buenos bioindicadores (en playas arenosas) para detectar impacto ambiental en forma rápida. Las contribuciones de Bergamino *et al.* (2009), Muniz *et al.* (2002 y 2005) y Venturini *et al.* (2004) proveen información del estado ambiental de zonas

costeras de Uruguay, utilizando organismos del bentos como indicadores, a una escala espacial puntual, debido a las restricciones propias de los indicadores bentónicos.

Por otra parte, tanto los peces (Hodson, 1990) como los mamíferos marinos (Muir *et al.*, 1999) han sido utilizados como indicadores para la contaminación. Los peces son referentes de la bioacumulación y biomagnificación de contaminantes, ya que cumplen con el rol trófico de depredadores y presas, constituyendo así, un nexo importante en el traspaso de contaminantes desde niveles inferiores hacia niveles tróficos superiores (Hodson 1990 y Hartig *et al.*, 2007). Los mamíferos marinos son considerados buenos indicadores de contaminación ya que se encuentran en los últimos niveles de la trama trófica, presentan un tiempo de vida largo y una eliminación lenta de los contaminantes (Vos *et al.*, 2003). Tanto peces como mamíferos marinos han sido catalogados como buenos indicadores para el monitoreo de contaminantes (Hodson 1990; Muir *et al.*, 1999; Vos *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2013 y Evans, 2013). La escala tanto espacial como temporal de la perturbación, así como al nivel organizacional a la que opera, serán quienes guíen la elección del grupo de indicadores a utilizar (Adams, 2002). Actualmente el uso tanto de peces como mamíferos marinos como indicadores ecosistémicos se encuentra bajo revisión (Roger y Greenaway 2005).

Mamíferos marinos como bioindicadores de contaminantes

Las especies más adecuadas para realizar monitoreos de contaminación, deben ser endémicas a la región de estudio, alimentarse en el último nivel de la cadena alimenticia y acumular altas concentraciones de contaminantes (EPA, 1994 y Vos *et al.*, 2003). Los mamíferos marinos al encontrarse al final de la trama trófica suelen reflejar los niveles de contaminantes que se han transferido desde niveles inferiores (Vos *et al.*, 2003). Si bien en general los mamíferos marinos cumplen con estas condiciones, utilizar organismos indicadores de contaminantes a niveles tróficos altos, presenta la dificultad a la hora de identificar los procesos que controlan su bioacumulación (Dietz, 2008). Dichos procesos involucran escalas espacio temporales amplias, que muchas veces dificultan el entendimiento de la respuesta del indicador y su posterior asociación al estado de salud ambiental (Bowen, 1997 y Dietz, 2008).

Entre la gran variedad de contaminantes que se encuentran hoy en día en los ambientes acuáticos, existen diferentes elementos tóxicos a los cuales se les ha dedicado especial atención ya que son potenciales causantes de enfermedades tanto para el ser humano como

para otros animales (EPA, 1994). En mamíferos marinos se ha investigado un amplio rango de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Dentro de los contaminantes inorgánicos se encuentran los metales pesados, como cadmio, mercurio y plomo entre otros (O' Shea, 1999; Vos *et al.*, 2003 y Evans, 2013). El mercurio es un elemento no esencial (no se requiere para el desarrollo de la vida) y se encuentra en el ambiente debido tanto a la acción del hombre mediante la quema de combustible fósil, la industria papelera y uso como fungicida, como en forma natural existiendo en las llamadas fuentes geológicas de mercurio (O' Shea, 1999). Este elemento es muy tóxico y produce debilitamiento del sistema inmune, causa problemas renales, ataca al sistema nervioso, puede ser mutagénico al atravesar la barrera placentaria y concentrarse en la leche materna. Dentro de las formas en que se puede presentar el mercurio, el MeHg es la forma que se considera más tóxica, pero en mamíferos marinos su concentración es inferior al 10% (Nigro y Leonzio, 1996). El mismo es soluble en agua y se incorpora al organismo a través de la dieta (O' Shea, 1999). El cadmio también es un metal no esencial y se presenta en el ambiente tanto por fuente natural como antropogénica (descargas industriales de productos manufacturados, pinturas, baterías, escapes de gas de vehículos) (Furness, 1996). Se ha demostrado mediante pruebas de laboratorio, que altas concentraciones de cadmio producen desórdenes en el sistema circulatorio, nervioso y reproductor, en mamíferos marinos especialmente en los machos (O' Shea, 1999). Generalmente se presenta en sistemas de agua dulce como ión libre Cd^{2+} , $\text{Cd}(\text{OH})$, CdCO_3 y complejos orgánicos. A medida que aumenta la salinidad el cadmio se asocia al cloruro y en aguas marinas casi todo el cadmio está formando especies como CdCl^+ , CdCl_2 y CdCl^{3-} y una pequeña parte permanece como Cd^{2+} que sería la forma más tóxica (ATSDR, 1999). En cuanto a los órganos blanco donde se han estudiado los contaminantes en mamíferos marinos, varios autores han concluido que los tejidos más apropiados para realizar estudios de metales pesados son el hepático y el renal (EPA, 1994; Wood y Van Vleet, 1996; Beck *et al.*, 1997, Roditi-Elasar *et al.*, 2003). En mamíferos marinos el mercurio se bioacumula mayormente en el hígado debido a que es el órgano responsable de la detoxificación (O' Shea, 1999 y Jakismka *et al.*, 2011) y el cadmio se acumula en primera instancia en el hígado pero cuando existe exposición prolongada, el mismo es transferido a los riñones donde es absorbido y bioacumulado (Jakismka *et al.*, 2011). En general los mamíferos marinos presentan mecanismos de detoxificación ante los metales como las metalotioneinas que se inducen en presencia de Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} y se acumulan tanto en hígado como riñón, disminuyendo el efecto tóxico. Es por esta razón que los metales tienden a bioacumularse en dichos órganos. Asimismo existen evidencias de que el Zn y Se colaboran con la detoxificación ya que se

correlacionan positivamente con los metales formando las metalotioneinas (O' Shea, 1999 y Jakimska *et al.*, 2011).

Factores que afectan la concentración de contaminantes en mamíferos marinos

Según varios estudios (EPA, 1994; Vos *et al.*, 2003 y Pugliares *et al.*, 2007) los factores que controlan la concentración de los contaminantes en mamíferos marinos son el espesor de grasa corporal (indicador de salud), sexo, edad, estado de descomposición al encontrar los ejemplares, metabolismo/excreción de los contaminantes y posición en la trama trófica. En general los contaminantes que más se ven afectados por el estado nutricional del animal son los compuestos orgánicos por ser liposolubles, mientras que los metales pesados se ven menos afectados (EPA 1994). El estado de salud si bien repercute en el metabolismo de los metales pesados no constituye un factor que afecte significativamente las concentraciones de los mismos (Bennett *et al.*, 2001).

En referencia al sexo de franciscanas, tanto el período gestacional como la lactancia pueden modificar la concentración de los metales entre hembras y machos. Durante dichas etapas y dependiendo de las características de los contaminantes es posible un traspaso de madre a feto durante la gestación y de madre a cría durante la lactancia (Lahaye *et al.*, 2007 y Habran *et al.*, 2013). En algunas especies, como los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) se ha encontrado concentraciones de mercurio mayores en hembras preñadas y lactantes que en hembras no lactantes (Vos *et al.*, 2003). La edad de los mamíferos marinos presenta una estrecha relación con la concentración de algunos contaminantes. Especialmente los metales mercurio y cadmio, analizados en tejidos hepáticos, renales y musculares (Vos *et al.*, 2003) se correlacionan altamente con la edad. Sin embargo, se han constatado excepciones a dicha correlación en algunas especies como en la ballena minke (*Balaenoptera acutorostrata*) la cual presentó a edades más tempranas concentraciones más elevadas de algunos metales. Este hecho se ha adjudicado a que ballenas más jóvenes consumieron mayor cantidad de contaminantes que las adultas, debido a una competencia alimenticia menor que las adultas y por lo tanto mayor disponibilidad de alimento (Vos *et al.*, 2003).

El estado de descomposición surge al aplicar protocolos de necropsia para mamíferos marinos (EPA, 1994 y Pugliares *et al.*, 2007), en los cuales se sugiere caracterizar a los ejemplares encontrados varados muertos con un código que representa el grado de desintegración del animal. No todas las concentraciones de los contaminantes que se determinan en los tejidos se ven afectadas por el grado de descomposición de los organismos. Por ejemplo estudios en

contaminantes orgánicos (Borrell y Aguilar 1990) concluyeron que los distintos grados de descomposición afectan la concentración del contenido de compuestos orgánicos medidos en grasa subcutánea y que la relación que guardan es inversa (a estados menos frescos mayor concentración). Dicho resultado puede ser explicado a partir de que la grasa subcutánea es la que comienza a deteriorarse en las primeras etapas de descomposición (volverse más líquida) y por una relación de pérdida de masa de grasa los contaminantes se concentran. Sin embargo, Bennett *et al.* (2001) concluyeron que para los metales pesados el grado de descomposición no condiciona las mediciones de sus concentraciones en tejido hepático. A diferencia de lo que ocurre con la grasa subcutánea, los órganos internos como el hígado tienden a conservarse mejor.

Con respecto al metabolismo y excreción, el tiempo de exposición a los contaminantes tiene un efecto directo sobre su bioacumulación. El proceso por el cual se acumulan los contaminantes en los diferentes tejidos es especie dependiente y por lo tanto también a los mecanismos de asimilación y de detoxificación. Consecuentemente dentro de los mamíferos marinos, es factible encontrar distintos niveles de contaminantes en distintas especies, aunque habiten a la misma escala espacio-temporal (Jakimska *et al.*, 2011). Los mecanismos que regulan la eliminación de contaminantes son especie, órgano y ligando específicos y son difíciles de medir en mamíferos marinos vivos (Vos *et al.*, 2003 y Jakimska *et al.*, 2011). Por último en referencia al nivel trófico, no todos los contaminantes se bioacumulan o transfieren en la cadena trófica, ni todos los organismos son vectores de contaminantes (Mason, 2002; Vos *et al.*, 2003 y Jakimska *et al.*, 2011). Por ejemplo la bioacumulación del arsénico, selenio y plomo no ocurre en todos los niveles tróficos y es dependiente a la duración de la exposición, debido a la vida media de estos elementos. Sin embargo el MeHg debido a que se encuentra mayormente en los tejidos blandos de diatomeas e invertebrados marinos como copépodos, permite que los peces lo asimilen a través de la dieta y lo transfieran a niveles tróficos superiores como mamíferos marinos (Mason, 2002). La variación estacional en la biota marina y su alimentación, probablemente sean dos factores importantes causantes de diferencias en los niveles de contaminantes hallados en mamíferos marinos. Cuando se intenta comparar temporal y geográficamente, a muestras que no han sido obtenidas en la misma estación o zona, esto puede dar lugar a los llamados factores de confusión. La información sobre la variabilidad estacional está rara vez disponible para corregir o normalizar las diferencias en los niveles de contaminantes hallados (Dietz 2008).

Por último y en referencia a los niveles máximos tolerables en mamíferos marinos, se ha establecido para el mercurio en hígado, un rango entre 100-400 µg/g y para el cadmio en riñón, entre 20-200 µg/g (Wagemann y Muir, 1984).

Características de *Pontoporia blainvillei* en el marco de los bioindicadores

Pontoporia blainvillei (Gervais & D'Orbigny, 1844) conocido por su nombre común como la franciscana, es un pequeño delfín que habita la costa atlántica de Brasil, Uruguay y Argentina, así como el estuario del Río de la Plata. Su área de distribución comprende desde Itaúnas (18°25'S- 30°42'W), Espírito Santo, estado en el sureste de Brasil (Siciliano *et al.*, 2002), hasta el Golfo Nuevo (42°35'S- 64°48'W), Provincia de Chubut, Argentina (Crespo *et al.*, 1998). La población de franciscanas se encuentra dividida en dos grupos según el criterio de la segmentación filogeográfica aplicado por Secchi *et al.* (2002): un grupo en el norte, desde Itaúnas hasta Santa Catarina (Brasil) y otro en el Sur desde Santa Catarina hasta Golfo Nuevo (Argentina). La población del Sur a su vez se encuentra dividida en el stock Río Grande del Sur/Uruguay (FMA III – Áreas de manejo de franciscanas) y el stock de Argentina (FMA IV), siendo el estuario del Río de la Plata el límite más importante entre ambos stocks (Secchi *et al.*, 2002). Recientemente Costa *et al.* (2012) presentaron evidencias genéticas de que el stock poblacional perteneciente al estuario del Río de la Plata es diferente al del O. Atlántico, a través del análisis de marcadores del ADN mitocondrial y microsatélites. En el año 2003, la subpoblación de Río Grande del Sur/Uruguay fue formalmente recatalogada como especie vulnerable (Secchi y Wang, 2003). Asimismo, la Convención de Especies Migratorias ha incluido a la franciscana en sus Apéndices I y II correspondiente a su estatus en peligro (CMS, 2012).

Para la región del Atlántico sudoccidental, investigadores de Argentina y Brasil han estudiado la franciscana y su relación con contaminantes tanto inorgánicos como orgánicos. O'Shea *et al.* (1980) realizaron uno de los primeros estudios de contaminantes organoclorados en franciscanas capturadas incidentalmente en Uruguay. Castello *et al.* (2000) realizaron estudios en metales pesados y contaminantes orgánicos para franciscanas de Argentina, Brasil y Uruguay y Foglia (2008) realizó estudios de mercurio y cadmio para la región del Río de la Plata y océano Atlántico adyacente. Sesea reportado que el mercurio se bioacumula mayormente en el hígado mientras que el cadmio lo hace en el riñón (Marcovecchio *et al.*, 1990 y 1994; O'Shea, 1999; Gerpe *et al.*, 2002 y Monteiro-Neto *et al.*, 2002), siendo éstos dos metales los más estudiados en dichos órganos en Argentina y Brasil. Específicamente para la región de Brasil se han realizado estudios en metales pesados en Río de Janeiro por Di

Beneditto y Ramos (2000), Lailson-Brito (2000) y Lailson-Brito *et al.* (2002) que han reportado concentraciones de mercurio entre 1 a 7 $\mu\text{g/g}$ y de cadmio entre 0 a 1 $\mu\text{g/g}$. Para Río Grande del Sur, Soares (1998), Castello *et al.* (2000) y Seixas *et al.* (2007) reportaron concentraciones de mercurio promedio de 6 $\mu\text{g/g}$ y para cadmio de 4 $\mu\text{g/g}$. Para la región de Argentina, se encuentran los trabajos realizados por Marcovecchio *et al.* (1990 y 1994) y Gerpe *et al.* (2000 y 2002) que reportan valores de mercurio entre 0 a 8 $\mu\text{g/g}$ y de cadmio entre 0 a 5 $\mu\text{g/g}$. Según los factores que controlan la concentración de los contaminantes en mamíferos marinos, para franciscanas no se han encontrado estudios que analicen los diferentes estados nutricionales y las concentraciones de metales pesados. En referencia al sexo de franciscanas, estudios de metales esenciales como Zn y Cu (Panebianco *et al.*, 2011) mostraron diferencias en la bioacumulación entre machos y hembras, pero para mercurio y cadmio regionalmente, no se han encontrado diferencias según el sexo en la bioacumulación de ambos metales (Marcovecchio *et al.*, 1990 y 1994; O'Shea, 1999; Gerpe *et al.*, 2002 y Monteiro-Neto *et al.*, 2002). En cuanto a la fisiología de franciscanas no se han encontrado estudios acerca de las rutas internas que siguen los metales pesados, ni tampoco si a determinada edad acumulan más o asintotizan su concentración como se ha visto en otros mamíferos marinos (Sanpera *et al.*, 1995). Sin embargo existen estudios acerca de la alimentación de la franciscana que evidencian al menos tres períodos diferentes en la dieta vinculados a distintas edades de las mismas y a distintas estaciones del año: período exclusivamente lactante de 0 a 3 meses (primavera-verano), período mixto compuesto por una dieta lactante y comienzo de ingesta de pequeñas presas sólidas de los 3 a los 12 meses (verano-otoño) y período exclusivamente compuesto por presas sólidas de los 12 meses en adelante (puede ocurrir en todas las estaciones) (Kasuya & Brownell, 1979). Con respecto a la influencia de los diferentes estados de descomposición en las concentraciones de mercurio y cadmio, el estudio de Foglia (2008) indicó que no parece haber un efecto significativo en su influencia. En relación a su posición trófica, la franciscana presenta hábitos costeros (Pinedo *et al.*, 1989) y como depredador de alto nivel (Bergamino *et al.*, 2012) puede bioacumular los contaminantes que residen o tienen como destino final la zona costera (Drescher *et al.*, 1977; Olsson, 1977; Denton *et al.*, 1980; Fujise *et al.*, 1988 y Aguilar y Borell, 1995). Por último en referencia a los valores máximos tolerables de mercurio y cadmio, no se conocen las concentraciones específicas a la cuales pueden comenzar a manifestarse los efectos adversos en franciscana, pero sí se sabe, que tanto el mercurio como el cadmio se asocian a metalotioneinas para favorecer procesos de detoxificación (Gerpe *et al.*, 2002).

Mercurio y Cadmio en Uruguay

El sistema estuarial del Río de la Plata (Uruguay) es el cuerpo receptor final de muchos efluentes urbanos por vía de sistemas de aguas residuales, riachuelos y ríos. Los principales impactos ambientales que recibe, se han incrementado con la migración de la población rural hacia la zona urbana y de la población urbana hacia la zona este de Montevideo (EcoPlata, 1999). El nivel de contaminación del sistema estuarial presenta aspectos variables a lo largo de su cauce. La zona interna del Río de la Plata, es la más afectada por la descarga de afluentes cloacales y tributarios con contaminantes como metales pesados y compuestos orgánicos, producto de la actividad humana. El crecimiento de las ciudades, el mayor desarrollo industrial, la urbanización, la construcción de rutas y puertos y la actividad recreativa creciente, contribuyen al aumento de la contaminación de las aguas costeras del Río de la Plata (Janiot *et al.*, 2003 y Geo Montevideo, 2004).

El Hg elemental ingresa por la fabricación de numerosos instrumentos de medida, materiales eléctricos, interruptores, tubos de luz y lámparas de bajo consumo, pilas, en la manufactura de cloro y soda caustica, en la extracción de oro y plata, en joyería, fotografía, pinturas y pirotecnia entre otros. También se utiliza en laboratorios, en instrumentos de uso médico y en odontología en las amalgamas dentales. Algunas de sus sales se han utilizado como plaguicidas, preservador de madera, telas y cartón (CCCB, 2011a).

En Uruguay los residuos conteniendo mercurio metálico provienen en gran parte del sector salud que básicamente resultan de termómetros y de esfigmomanómetros, que se disponen junto con los residuos urbanos o con los infecciosos. De acuerdo a la forma en que se tratan los residuos de mercurio en Uruguay, se estima que lo generado y emitido por todo el sector salud, sería cercano a 1 tonelada de mercurio por año (CCCB, 2011a).

En el estudio de inventario sobre las emisiones mercurio en Uruguay (CCCB, 2011b) se señaló que las categorías industriales que más contribuyen a la emisión de Hg, son las que corresponden a “Sitios de producción abandonados o cerrados de cloro-álcali” y “Relaves, residuos de la minería artesanal y de gran escala de oro”. En lo que se refiere al “Sitios de producción abandonados o cerrados de cloro-álcali”, entre diciembre de 2009 a noviembre de 2010, la entrada de mercurio a la planta correspondió a 1140 kg. En conclusión, las salidas anuales de mercurio en la categoría cloro-álcali serían las siguientes: al aire 24 kg Hg, al agua 0.03 kg Hg y por el tratamiento específico de los desechos en la planta 1115 kg Hg (almacenados en recipientes). En cuanto a la subcategoría “Relaves, residuos de la minería artesanal y de gran escala de oro”, existió a principios del siglo XX un emprendimiento de

extracción de oro que utilizaba el método de amalgamación con mercurio, ubicado a orillas del Arroyo Cuñapirú (departamento de Rivera). En el año 2009 se estimó a partir de estudios retrospectivos que la liberación de mercurio al aire era de 1.77 kg, al agua 1.18 kg y en los relaves de 27 kg de Hg. Los valores guía de mercurio en agua el valor permitido de Hg es de 1 µg/litro para mercurio total, en aire: 1 µg/m³ (promedio anual) y se estima como tolerable una concentración de 0.2 µg/m³ para una exposición prolongada por inhalación al vapor de mercurio elemental y una ingesta total de mercurio de 2 µg/kg peso corporal por día (IPCS, 2005).

Actualmente en Uruguay se encuentran al menos dos proyectos en desarrollo: “Plan Nacional de Gestión y Minimización de Residuos conteniendo Mercurio en el Sector Salud” (2011) a cargo del MVOTMA, DINAMA y Dirección de la División de Control y Desempeño Ambiental y Departamento de Sustancias Peligrosas, y “Minimización y Manejo Ambientalmente seguro de desechos conteniendo mercurio que afectan a poblaciones expuestas de varios sectores económicos, incluyendo al sector salud, en varios países de América Latina y el Caribe”. El proyecto se ejecuta simultáneamente en Argentina, Costa Rica y Uruguay. La DINAMA es la responsable de su implementación en el país (CCCB, 2011b).

Para el cadmio no existe un inventario detallado acerca de que sectores consumen o producen sustancias con cadmio, ni tampoco el cálculo estimado de liberación de cadmio a los compartimentos ambientales. Pero se conoce que la industria que más introduce metales pesados a los cursos de aguas es la galvanoplástica y posee al menos siete industrias localizadas en Montevideo. Las concentraciones típicas de metales pesados en los efluentes de las líneas galvanoplásticas son del orden de miligramos por litro. La carga de metales pesados liberados se estima en menos de algunas centenas de gramo por día, para cada uno de los metales (Cu, Zn, Cr y Ni). La liberación de cadmio es todavía menor, porque es poco utilizado (OPP/OEA/BID, 1992).

Por otra parte, otras fuentes industriales de metales pesados son los fertilizantes que pueden contener cadmio cuando se utiliza como materia prima el fosfato de roca sedimentaria. La cantidad de cadmio y de otros oligoelementos, pueden variar considerablemente dentro de un mismo depósito o yacimiento. El Cd²⁺, aportado por la vía de la fertilización fosfatada, puede ser absorbido por los cultivos y llegar así hasta los animales y el hombre (INIA, 2004).

El cadmio no se recupera como producto principal de las minas, sino como un subproducto de la extracción de otros metales no ferrosos, principalmente de minerales de zinc. Alrededor del 18 % del consumo mundial proviene del reciclaje. Los usos principales del cadmio refinado

son las baterías (pilas de Ni y Cd), pigmentos para plásticos, cerámica y esmaltes. Existen dos principales fuentes de obtención de cadmio, de tipo primario obtenido de la recuperación de la fundición del zinc y del cadmio (PNUMA, 2010). La otra fuente es de tipo secundaria, derivado del reciclaje de baterías de níquel-cadmio, de las aleaciones de Cu-Cd, así como del reciclaje de polvos de Fe y Cd. El análisis del flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, en América Latina y el Caribe, propuesto por PNUMA (2010) enumera varios productos que contienen cadmio: Sulfuro de cadmio (galvanoplastia), pigmentos y preparaciones a base de compuestos de cadmio, acumuladores eléctricos de níquel-cadmio, cadmio en bruto, desperdicios y desechos de cadmio, polvo de cadmio, antioxidantes preparados, y otros compuestos estabilizados para caucho o plástico, abonos minerales o químicos y materiales fosfatados. Según este estudio, en el período 2001-2009, los productos con cadmio mayormente comercializados en América Latina son los abonos químicos, fertilizantes y materiales fosfatados. Uruguay figura en tercer lugar como país exportador de estos productos (PNUMA, 2010). Según el DECRETO 253/79 de la DINAMA, el valor máximo de cadmio permitido en aguas para consumo humano es de 0.001 mg/L y para aguas correspondientes a los cursos o tramos de cursos que atraviesan zonas urbanas (excluyendo aguas residuales) el límite fijado es de 0.01 mg/L.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que la franciscana se ubica en los últimos niveles de la trama trófica como depredador tope (Bergamino *et al.*, 2012), bioacumula contaminantes como Hg y Cd en sus tejidos hepáticos y renales (Marcovecchio *et al.*, 1994; Gerpe *et al.*, 2002; Lailso Brito *et al.*, 2002; Seixas *et al.*, 2007; Foglia, 2008 y Panebianco *et al.*, 2011 y 2012), su necropsia es accesible (EPA, 1994), es endémica de la región de estudio habitando tanto la región de Río de la Plata como parte del océano Atlántico (FMA III) (Secchi *et al.*, 2002), existen evidencias de genética poblacional que apoyan una división de la FMA III separando al grupo de franciscanas del Río de la Plata del grupo de franciscanas del océano Atlántico (Costa *et al.*, 2012), los hábitos alimenticios de la franciscana son diferentes en el estuario y en el océano (Praderi, 1984 y Rodríguez *et al.*, 2002) y dado que la zona estuarina se encuentra más afectada que la zona atlántica adyacente por la contaminación de descarga de efluentes cloacales y tributarios, producto de la actividad humana (Janiet *et al.*, 2003 y Geo Montevideo, 2004):

Hipótesis 1) El delfín Pontoporia blainvillei es una especie bio-indicadora para evaluar el estado de contaminación de mercurio y cadmio del Río de la Plata y su frente marítimo. Se predice que habrán diferencias en los niveles de metales en franciscanas asociados a la zona (estuario-océano).

Dado que existe una fuerte evidencia de que los metales tanto mercurio como cadmio ingresan y se bioacumulan a través de la dieta en mamíferos (Vos *et al.*, 2003 y Jakimska *et al.*, 2011), y que la franciscana presenta al menos tres períodos diferenciales en su alimentación; período lactante, mixto y de presas sólidas ((Kasuya & Brownell, 1979):

Hipótesis 2) Se encontrarán diferencias entre las franciscanas no destetadas (períodos lactante y mixto) y franciscanas destetadas (que comprenden el período de presas sólidas), en cuanto a la bioacumulación de ambos metales. Se predice que las franciscanas del grupo destetadas presentarán mayores niveles de los mismos.

Basándose en lo reportado por Bennett *et al.* (2001) y Foglia (2008), acerca de que no existen diferencias significativas entre los contenidos de los metales mercurio en hígado y cadmio en

riñón, respecto al estado de descomposición de muestras de cetáceos y franciscanas respectivamente:

Hipótesis 3) Se espera que los contenidos de ambos metales sean similares entre los diferentes estados de descomposición de las franciscanas analizadas.

Dado que no se han encontrado diferencias significativas en la bioacumulación de mercurio en hígado y cadmio en riñón, según el sexo tanto para franciscanas (O'Shea, 1999; Lailson-Brito *et al.*, 2002; Gerpe *et al.*, 2002; Kunito *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2008) como tampoco para otros mamíferos marinos *Sotalia fluviatilis* (Lailson-Brito *et al.*, 2002b y Monteiro-Neto *et al.*, 2002), *Balaenoptera physalus* (Sanpera *et al.*, 1995) y *Phocoena phocoena* (Szefer *et al.*, 2002) :

Hipótesis 4) Se espera que la bioacumulación de mercurio y cadmio sea similar en ambos sexos de las franciscanas analizadas.

Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar a la franciscana como especie bio-indicadora de la contaminación por metales pesados, mediante el relevamiento del contenido de mercurio y de cadmio en sus tejidos (hígado y riñón, respectivamente).

Como **objetivos específicos** se plantean:

- 1) Determinar los niveles de mercurio y cadmio de la franciscana, para evaluar su bioacumulación como depredador tope
- 2) Estudiar la bioacumulación de mercurio y cadmio en los grupos de franciscanas destetadas y no destetadas,
- 3) Estudiar la relación del contenido de mercurio y cadmio en la franciscana y el estado de descomposición de las muestras, para determinar si el mismo afecta o no a la concentración de los metales
- 4) Estudiar la relación del contenido de mercurio y cadmio en la franciscana y el sexo, para evaluar si existe o no una bioacumulación diferencial entre machos y hembras

5) Estudiar la relación del contenido de mercurio y cadmio en la franciscana y las zonas de muestreo, para evaluar si esta especie es reflejo de la contaminación de la zona estuarina y zona oceánica.

6) Estudiar mediante análisis estadísticos las diferentes relaciones de los niveles de mercurio y cadmio en franciscana con la talla, el grupo destetadas y no destetadas, el estado de descomposición, el sexo y la zona. Además, se espera contribuir a las discusiones científicas acerca de la idoneidad del uso de mamíferos marinos como indicadores biológicos ambientales y a la evaluación de patrones regionales de contaminación en el ambiente acuático (Argentina, Brasil y Uruguay).

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se determinaron los niveles de mercurio en hígado y cadmio en riñón de 44 franciscanas, colectadas durante los años 2011 y 2012. Se utilizaron datos de 19 franciscanas del año 2006 pertenecientes a un estudio realizado previamente (Foglia 2008). Las muestras de franciscanas colectadas pertenecieron a una extensión de costa desde el Balneario Kiyú en el departamento de San José hasta Barra del Chuy en el departamento de Rocha (Fig. 1). Las mismas se obtuvieron de ejemplares varados muertos y animales facilitados por pescadores artesanales.

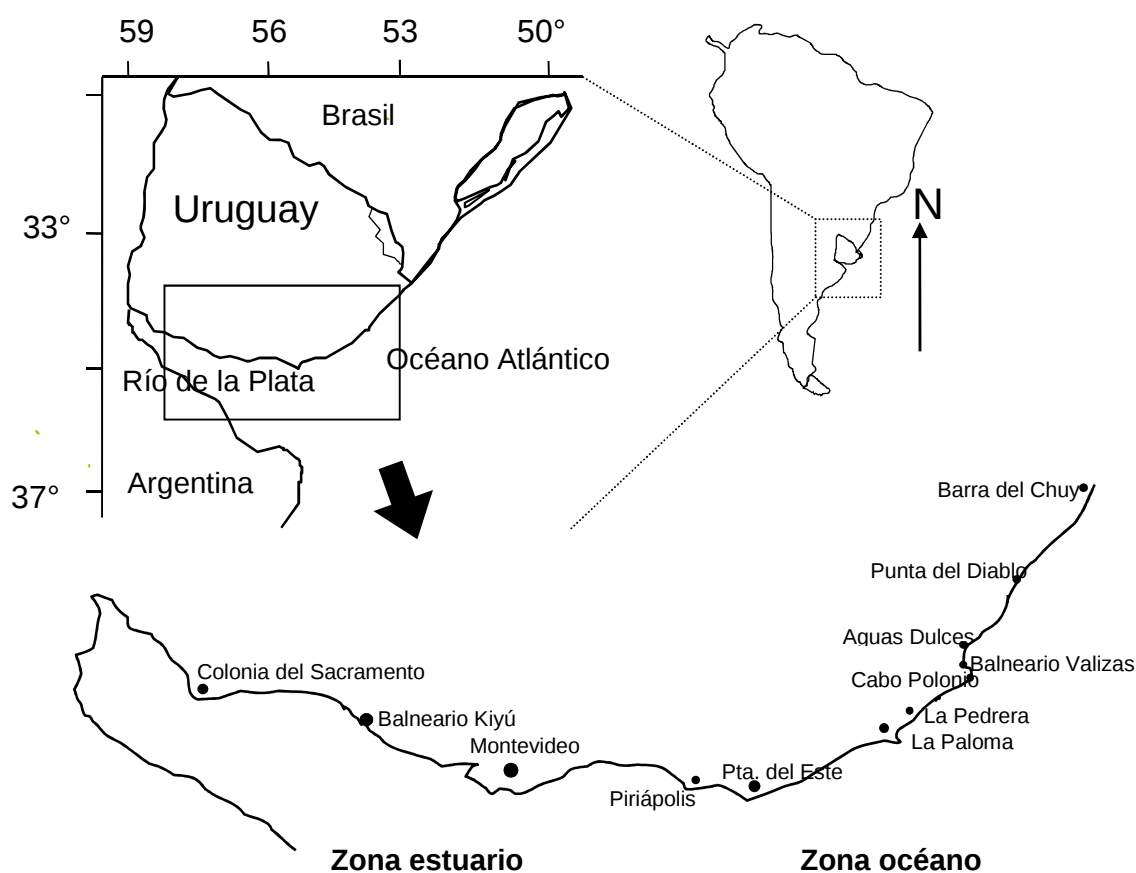


Figura 1. Mapa de la costa Uruguaya. Se indican las diferentes localidades y las zonas de la costa en donde fueron colectadas las muestras de franciscana.

A cada animal muestreado se lo evaluó externa e internamente como se detalla a continuación:

Evaluación Externa

En primer lugar a cada franciscana se la fotografió, se midió su longitud estándar (LS) en cm, se identificó el sexo y se le asignó: un código con la fecha correspondiente, la zona (estuarina, u oceánica), la localidad donde fue encontrada y la estación del año (verano, otoño, invierno o primavera). Siguiendo el criterio de la EPA (1994), se adjudicó a cada ejemplar un estado de descomposición:

- Grado 1 (preferible): el animal está vivo o se sabe que su muerte ocurrió en un plazo de 24 horas antes realizar su necropsia, ya que no cumple con las condiciones de los grados más avanzados de descomposición que se detallan a continuación.
- Grado 2 (aceptable): el tiempo de muerte es desconocido, o es mayor a 24 horas y cumple con las siguientes condiciones de muerte reciente:
 - Presencia de rigor mortis (usualmente ocurre entre las 6-24 horas después de muerto)
 - No hay evidencia de tejido degenerado postmortem, decoloración o autolisis
 - No hay signos de agujeros, especialmente en los ojos
 - No hay desangrado
 - Piel o pelo que no se desprende fácilmente
- Grado 3 (condicional): el animal no cumple alguna de la condiciones de muerte reciente, pero al realizar la necropsia, los órganos a muestrear se encuentran enteros y claramente identificables, indicando un estado moderado de descomposición.

Para asignar la zona correspondiente a cada franciscana encontrada, se tomó como límite estuarino/oceánico a la localidad de Punta del Este (EcoPlata, 1998). Las muestras encontradas desde Balneario Kiyú a Punta del Este se categorizaron como estuarinas y de Punta del Este a Barra del Chuy como oceánicas. Se asumió que las franciscanas provenientes de varamientos provenían de la zona donde se las encontró varadas, basándose en el protocolo de varamientos de la EPA (1994) y en el estudio de corrientes del Río de la Plata (Ré y Menéndez, 2003).

Para asignar la estación del año se tomó como referencia el calendario gregoriano. Las franciscanas del invierno (PbBK13-11 y PbPtaCta46-12) y primavera (PbPC21-11, PbAP15-11, PbAP14-11 y PbCP16-11), se les reasignó la estación otoño y verano respectivamente.

Evaluación interna y toma de muestras

Primero se examinó el estado de los órganos en general y cuando fue posible se confirmó el sexo. Se realizó un corte mediano en sentido longitudinal desde el orificio anal hasta la zona donde comienzan las aletas pectorales. Dentro de la cavidad abdominal se reconocieron, en el sector distal más superficial, a pocos centímetros de la margen anal, los riñones derecho e izquierdo, uno a cada lado de la línea mediana, y el hígado ubicado por debajo de la cúpula diafragmática derecha. Este último consiste en dos lóbulos, izquierdo y derecho, separados por un ligamento llamado falciforme (Yamasaki *et al.*, 1976). Se realizó la extracción completa de hígado y riñón derecho, luego se pesaron y se conservaron congelados en bolsas plásticas herméticamente cerradas a -20°C.

Análisis de Laboratorio

Los análisis de mercurio total y cadmio se realizaron por EAA con llama para el caso del Cd y por vapores fríos para el Hg. El equipo utilizado fue SHIMADZU AA-6300 con unidad de vaporización MVU-1A. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Análisis de Productos Pesqueros de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, que se encuentra acreditado por la Norma ISO 17025 (Norma ISO17025, 2005), en los productos de pesca. En el laboratorio se descongeló y realizó el homogeneizado de cada tipo de muestra, utilizando una multiprocesadora y luego se conservaron en bolsas plásticas herméticamente cerradas a -20°C hasta el momento de análisis. Se realizaron los ensayos necesarios para ampliar el alcance de las técnicas validadas en el laboratorio para productos de la pesca, para su aplicación en muestras de tejidos de mamíferos marinos. Esto se debe a que las mismas constituyen matrices con mayor contenido graso que además pueden presentar niveles de analito muy superiores a los encontrados en los productos de la pesca (Marcovecchio *et al.*, 1989; Gerpe *et al.*, 2002 y Foglia, 2008). Todo el material utilizado para los análisis de Hg y Cd, se descontaminó previamente mediante dos lavados: durante 24hs permaneció en HCl 10% y luego las siguientes 24hs, con HNO₃ 10%. Por último se lo enjuagó con agua nanopura. Para realizar el control de calidad interno de los ensayos se analizaron muestras fortificadas con el metal correspondiente y se realizó el cálculo del índice de recuperación en términos de porcentaje (%REC). En base a esto, los valores de recuperación obtenidos deben encontrarse dentro de los límites de control establecidos por el laboratorio ± 3 DS, respecto a la línea promedio (FAO, 2006 y Norma ISO17025, 2005a) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores del porcentaje de recuperación (%REC) promedio de Hg y Cd en productos de la pesca y rango de aceptación (± 3 DS) del grupo A (pescados magros, moluscos bivalvos y crustáceos) y grupo B (pescados grasos y moluscos cefalópodos).

Metal	Matriz biológica	%REC promedio	Rango aceptación (%)
Hg	Grupo A*	99,05	89-110
Hg	Grupo B**	85,32	61-108
Cd	Todas	97,38	85-110

Para la preparación de las curvas de calibrado y de las soluciones fortificadoras se utilizaron soluciones estándar certificadas de Hg y Cd de concentración 1000 ± 4 $\mu\text{g/ml}$ en ambos casos.

Análisis de mercurio total

El mercurio total se analizó por EAA por la técnica de vapores fríos, previa digestión ácida según el método de Hatch y Ott (1968) modificado por Méndez *et al.* (2001). El límite de detección de dicha técnica es $0,035$ $\mu\text{g/g}$ de Hg y el de cuantificación es $0,07$ $\mu\text{g/g}$ de Hg. La técnica está puesta a punto para cuantificar contenidos de mercurio en peso húmedo, entre 0 - $1,5$ μg Hg (rango de linealidad de la curva de calibración). La técnica está validada y acreditada por el OUA, para su aplicación en muestras de productos de la pesca (moluscos, crustáceos y pescado) en un rango comprendido entre $0,07$ y $1,5$ $\mu\text{g/g}$ de Hg.

Desarrollo del método de análisis de mercurio total

Se descongeló el total de la muestra homogeneizada y se pesó en balanza analítica ($0,0001\text{g}$) 1 gramo por duplicado o triplicado en un tubo de 50 ml. Se la sometió a digestión ácida agregando 5 ml de la mezcla sulfonítrica $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ ($1:1$). La digestión se realizó a temperatura ambiente por 24 horas (Méndez *et al.*, 2001). Tras la digestión, a cada tubo se le agregaron 15 ml de KMnO_4 . Si transcurrida media hora el color de la muestra no permanecía violeta (color que indica saturación de KMnO_4), se le agregaban 5 ml más de KMnO_4 . A continuación, se añadieron 5 ml de la solución $\text{NaCl}10\%:\text{NH}_2\text{HCl}$ 10% a cada tubo para neutralizar el exceso de KMnO_4 e inmediatamente se lo agitó en vórtex.

Para dar inicio a la medición se agregó una gota de aceite de silicona antiespumante y 5 ml de SnCl_2 a la muestra. El SnCl_2 produce la vaporización del contenido de mercurio de la muestra que se mide a su paso por la celda del espectrofotómetro.

Análisis de cadmio

Se utilizó la técnica de EAA con llama de aire-acetileno tras dilución de cenizas en solución de ácido nítrico (AOAC, 2006 y Jorhem, 2000). El límite de detección de dicha técnica es 0,009 µg de Cd /g y el límite de cuantificación es 0,0174 µg de Cd /g. El rango linealidad de la curva de calibración es entre 0-1,6 µg Cd/ml. La técnica está validada y acreditada por el OUA, para su aplicación en muestras de productos de la pesca (moluscos, crustáceos y pescado) en un rango comprendido entre 0,0174 y 4,5 µg de Cd /g.

Desarrollo del método de análisis de cadmio

Se descongeló el total de la muestra y en un crisol de cerámica se pesaron 10 gramos (0,0001 g). Cada muestra se analizó por duplicado o triplicado. La muestra se incineró en una mufla programada que lleva gradualmente la temperatura a 450°C, para eliminar la materia orgánica. Las cenizas obtenidas se mojaron con 1 a 3 ml de agua nanopura y se colocaron los crisoles sobre una platina para la evaporización. Una vez seca la muestra se volvió a colocar en la mufla programada que lleva la temperatura a 450 °C. El procedimiento se repitió hasta que se obtuvieron cenizas de color blanco. Se agregaron 5 mL de HCl 6N y se llevó a la platina para evaporar. El residuo se disolvió en 10mL de HNO₃ 0,1N y se dejó reposar por una hora. La solución obtenida se filtró por gravedad previo su lectura en el espectrofotómetro.

Adecuación de las técnicas a muestras de *Pontoporia blainvillei*

Se analizaron los contenidos de mercurio y cadmio para muestras de hígado y riñón de franciscana, respectivamente. Tanto las muestras de pescado como de moluscos bivalvos, poseen registros históricos en DINARA con concentraciones de mercurio y cadmio que son legibles dentro de la curva de calibración que se aplica para los ensayos respectivos. Los procedimientos para la determinación de Hg y Cd del laboratorio validados para muestras de pescado y almejas tienen aplicación para muestras de tejidos de franciscana, mientras la misma no exceda en contenidos de dicho metales el extremo superior de la curva de calibración (1,5 para µg Hg y 1,6 µg para Cd). Las muestras de franciscana, poseen la particularidad de que pueden contener cantidades de analito superiores al rango lineal de las curvas de calibración. Para poder cuantificar las concentraciones más altas en las muestras de franciscanas, se evaluó por un lado reducir la toma de muestra antes de ser sometida al proceso de análisis y por otro, la dilución de la solución final de la muestra previa a la lectura

del espectrofotómetro. Dichos ensayos se realizaron calculando los índices de recuperación mediante fortificaciones efectuadas sobre los resultados. Para aquellas muestras pertenecientes a franciscanas de mayor tamaño, las cuales potencialmente pudieran sobrepasar un nivel de mercurio de 1,5 µg/g, se pesó 0,5 g muestra y para el caso del cadmio donde el límite es 1,6 µg/g, se realizaron diluciones del extracto final hasta lograr concentraciones dentro del rango lineal de la curva de Cd.

Determinación de la edad y grupos de alimentación

La edad de las franciscanas obtenidas se calculó a partir de la relación entre rangos de longitud y edad, establecido por Kasuya y Brownell (1979) (Tabla 2). Con respecto a la alimentación, el destete en franciscanas ocurre desde los 6 meses a un año y a partir de los 3 meses de nacidas además de alimentarse de la leche materna, comienza la ingesta de pequeños alimentos sólidos (Kasuya & Brownell, 1979). De esta forma la dieta a lo largo de la vida de la franciscana podría dividirse en tres períodos: 1) período exclusivamente lactante que se extiende desde 0 a 3 meses, 2) período mixto (lactancia más comienzo de ingesta de presas sólidas), que se extiende desde los 3 a 12 meses y 3) período exclusivo de ingestas sólidas desde 12 meses en adelante. Los periodos 1 y 2 incluyen delfines recién nacidos a un año (para machos LS de 84-102 cm, para hembras LS 85-105 cm, Tabla 2). El período 3, abarca delfines de más de un año en adelante (para machos LS > 102 cm y para hembras LS > 105 cm). El grupo de franciscanas no-destetadas comprende los períodos de dieta 1 y 2 y el grupo de franciscanas destetadas comprende el período 3. De acuerdo a esta división según la dieta, los análisis estadísticos efectuados se realizaron separando ambos grupos.

Tabla 2. Datos de la edad (años), edad promedio, número de muestras (n) y rango, promedio y desvío estándar (DS) de la longitud (cm) de las franciscanas (Kasuya y Brownell, 1979).

Edad (años)	Edad promedio	n	rango de la longitud	longitud promedio	DS
Machos					
0 a 1	0,3	5	84,0 - 102,0	92,7	8,04
1 a 2	1,2	48	90,5 - 134,0	115,7	9,72
2 a 3	2,2	21	110,0 - 152,0	128,8	10,59
3 a 4	3,3	2	118,0 - 129,0	123,5	-
4 a 16	6,2	21	122,0 - 147,0	133,3	8,58
Hembras					
0 a 1	0,5	8	85,0 - 105,0	98,4	6,02
1 a 2	1,3	54	100,0 - 143,0	122,6	10,64
2 a 3	2,2	25	120,0 - 169,0	141,2	14,41
3 a 4	3,2	6	145,0 - 160,0	152,2	5,46
4 a 13	6,4	28	1370 - 171,0	152,8	9,23

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software libre RStudio versión 2.13.2 (R Development Core Team 2011). El primer análisis consistió en explorar los datos y utilizar las distintas funciones del programa RStudio para determinar las variables explicativas más influyentes y sus relaciones con la variable respuesta. Para ello se utilizaron representaciones gráficas basadas en diagramas de cajas o “boxplot” para explorar la relación entre la variable respuesta y las diferentes variables categóricas (estado de descomposición, sexo, zona y estación). Se realizaron test de comparación de medias ANOVA para los casos con distribución normal de la variable respuesta y ausencia de relación con la covariable y en el caso de distribución no normal se utilizó el test de Kruskal Wallis. Cuando la variable respuesta guardó relación con la covariable y tuvo distribución normal, se utilizó el test ANCOVA paramétrico, y ANCOVA no paramétrico en caso de ausencia de normalidad. Para explorar las relaciones entre la variable respuesta y la variable continua (LS) se realizaron gráficos que utilizan la función “lowess”, que permite aproximar la línea de tendencia entre ambas variables y los análisis de regresión lineal bajo el método de los mínimos cuadrados. En segundo lugar se estudiaron diferentes aproximaciones en cuanto a modelos estadísticos que permitieran integrar mejor los efectos de las variables explicativas, buscando obtener la mejor calidad en los análisis de los residuales. Se testearon los siguientes modelos: el modelo lineal generalizado del tipo ANCOVA, el modelo de los mínimos cuadrados generalizado y el modelo lineal mixto (LMM). Para ello se evaluaron los supuestos de cada uno de los modelos y se descartaron aquellos que no cumplieran con los mismos. El modelo que permitió representar mejor la variación de la variable respuesta fue el LMM. LMM son modelos estadísticos que proporcionan un entorno para responder a cuestiones de diseños experimentales con variables respuestas (dependientes) del tipo continua, modelando simultáneamente el fenómeno estudiado y su variabilidad. Los LMM contienen dos estructuras la de los factores fijos y los aleatorios. La distinción entre factores fijos y aleatorios y sus efectos relacionados sobre una variable dependiente es crítica en el contexto de LMM. El concepto de factor fijo es más comúnmente utilizado en ANOVA o ANCOVA. Se define un factor fijo como una variable categórica o de clasificación, para la cual el investigador ha incluido todos los niveles (o condiciones) que le es de interés en el estudio. Los niveles de un factor fijo son escogidos de modo que sean representativos de las condiciones específicas y que puedan ser usados para definir contrastes, que sean de interés en el estudio. Los efectos aleatorios dan cuenta de la variabilidad entorno a la variable respuesta.

Las variables categóricas en los efectos aleatorios, caracterizan la variación dentro del intercepto promedio que se estima a partir del LMM, llamado intercepto aleatorio y las variables continuas, caracterizan una variación de la pendiente promedio estimada por el LMM, y son llamados pendientes aleatorias. También permite el uso de interceptos aleatorios que estén anidados, para dar cuenta de la variación comprometida entre dos o más factores aleatorios (Zuur *et al.*, 2009).

Los LMM pueden escribirse en forma de matriz de la siguiente manera:

$$Y_i = X_i \times \beta + Z_i \times b_i + \varepsilon_i$$

Siendo X la matriz de diseño que denota a qué nivel de cada factor está asociado cada individuo, β son los coeficientes a estimar que reflejan los efectos fijos.

Z_i contiene los efectos aleatorios que cavarían con Y_i . La matriz Z denota la pertenencia de cada individuo a un nivel de la variable con efectos aleatorios.

$b_i \sim N(0, D)$ tienen distribución normal

$\varepsilon_i \sim N(0, \Sigma_i)$ son los errores aleatorios que tienen distribución normal y reflejan la variación de Y_i no explicada por la variables categóricas con efectos fijo y aleatorios

$b_1, \dots, b_N, \varepsilon_1, \dots, \varepsilon_N$ son independientes

Modelos explorados dentro de LMM

Se comenzó por el LMM más complejo que contemplara las variables de interés según las interrogantes planteadas en los objetivos de la tesis. Para ello se plantearon diferentes modelos, en los cuales se buscó inicialmente determinar la estructura aleatoria, para luego continuar con la determinación la estructura de los efectos fijos (Zuur *et al.*, 2009). La comparación entre los diferentes modelos fue analizada mediante el AIC (Burnham y Anderson 2002) y el test de ANOVA (entre modelos). Para la simplificación de los términos tanto aleatorios como fijos, del modelo elegido se utilizó la herramienta stepAIC (de descarte automático de términos no significativos), que elimina de forma descendente términos no significativos de mayor a menor orden de magnitud. Luego de esto se testeó manualmente si el modelo podía seguir siendo simplificado eliminando términos con interacciones de mayor orden no significativos, luego aquellos términos sin interacción, cuyo p-valor fuera no significativo y finalmente comparando mediante el test de ANOVA. Se siguió el criterio de

que si la extracción de términos daba como resultado un p-valor significativo al comparar ambos modelos, dichos términos permanecerían en el modelo. Para la estimación de los parámetros de cada uno de los modelos se utilizó el método de máxima verosimilitud mientras se realizó la comparación entre modelos. Finalmente para expresar el modelo óptimo se utilizó la estimación restringida de máxima verosimilitud (Zuur *et al.*, 2009)

RESULTADOS

Adecuación de las técnicas a muestras de *Pontoporia blainvillei*

Las práctica en la manipulación de las técnicas de análisis para mercurio y cadmio utilizando como matriz biológica hígados y riñones de franciscana, mostró ser consistente con la práctica de matrices en peces y moluscos bivalvos, ya que los controles internos realizados (%REC de las muestras) a través de la fortificación a distintos niveles de ambos metales, se encontraron dentro de los rangos aceptados para el %REC de grupo B (matrices grasas) (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Valores del porcentajes de recuperación (%REC) para ensayos de Hg en hígado de franciscana y las distintas tomas de muestra (g), nivel de fortificación (μg), %REC histórico del grupo B (matrices grasas) y el rango %REC aceptado para matrices grasas.

Metal	Especie	toma Muestra (g)	Nivel de Fortificación (μg)	Rango %REC muestras	%REC histórico grupo B	Rango %REC aceptado	Consistencia
Hg	franciscana (n=5)	1	0,5	88-110	85,3	61-108	Si
Hg	franciscana (n=3)	0,1	0,2	95-102	85,3	61-108	Si
Hg	franciscana (n=3)	0,5	0,2	83-101	85,3	61-108	Si

Tabla 4. Valores del porcentajes de recuperación (%REC) para ensayos de Cd en riñón de franciscana y *Pangasius* sp. y las distintas tomas de muestra (g), nivel de fortificación (μg), %REC histórico del grupo B (matrices grasas) y el rango %REC aceptado para matrices grasas.

Metal	Especie	toma Muestra (g)	Nivel de Fortificación (μg)	Rango %REC	%REC histórico todas las matrices	Rango %REC aceptado	Consistencia
Cd	franciscana (n=2)	10	5	106,4-107,1	97,4	85-110	Si
Cd	<i>Pangasius</i> (n=9)	10	5	93,3-105,7	97,4	85-110	Si
Cd	<i>Pangasius</i> (n=3)	10	2	94,2-104,9	97,4	85-110	Si

Descripción de los datos

Las franciscanas analizadas correspondieron a los años 2006, 2011 y 2012. Los delfines muestreados en el año 2006 se obtuvieron durante los meses de enero, febrero y marzo de ese año, abarcando una extensión de costa desde Montevideo hasta la localidad de La Paloma en Rocha (Fig. 1). El período 2011 y 2012 que transcurrió desde enero 2011 hasta julio 2012, abarcó desde la localidad de Kiyú en San José, hasta Barra del Chuy en Rocha (Fig. 1). En ese

período se obtuvieron muestras de un total de 44 franciscanas en la región, distribuidas de la siguiente manera: 7 en San José, 8 en Montevideo, 9 en Canelones, 14 en Maldonado y 6 en Rocha (Tabla 5). Del total, 30 franciscanas fueron proporcionadas por pescadores (capturadas y muertas incidentalmente) y 14 fueron encontradas varadas (muertas) en playas de la región de estudio. Para realizar la identificación del sexo fue necesario que el animal presentara sus características externas de género y órganos reproductivos en buen estado. En algunos casos no fue posible determinarlo ya que el animal se encontraba en avanzado estado de descomposición y su identificación resultó dudosa. Se encontraron 20 franciscanas hembras, siendo la más grande la de la zona de San José con 160 cm, 21 fueron machos siendo el mayor de 146 cm perteneciente a la zona de Piriápolis. En cuanto al grado de descomposición, un total de 30 animales presentaron un estado preferible, 3 aceptable y 14 condicional (Tabla 5). El rango de tallas que presentaron las 61 franciscanas analizadas abarca un gran espectro, desde 60 a 164 cm (n =23) para hembras y desde 71 a 151 cm (n =32) para machos. La talla es una variable cuantitativa y es una medida indirecta de la edad de las franciscanas. Según Kasuya & Brownell (1979), se corresponden con franciscanas que presentan edades desde recién nacidos hasta los 13 y 16 años respectivamente (Tabla 2).

A pesar de la cercanía anatómica entre los órganos reproductivos y los riñones, estos últimos se conservaron mejor pudiendo realizar su extracción en todos los casos menos en la muestra PbAP37-12, en la cual ambos riñones estaban en avanzado estado de descomposición. Asimismo la extracción de los riñones de las muestras PbPP22-12 y PbAP10-11 no fue posible. Debido a esto el número de muestras para los análisis de mercurio fue n =44 mientras que para el cadmio fue n =41. De los años 2011 y 2012, se obtuvieron un total de 12 hígados de franciscanas de la zona oceánica y 32 de la zona estuarina. De la zona estuarina, 17 se obtuvieron en verano y 15 en otoño, mientras que en la zona oceánica las 12 muestras se obtuvieron en verano.

Tabla 5. Datos de cada una de las franciscanas analizadas: código, año, lugar donde se la encontró (departamento), estación del año, zona, sexo, longitud estándar (LS) (cm) y grado de descomposición, en donde ND=No determinado.

Muestra/ código	Año	Departamento	Estación del año	Zona	Sexo	LS(cm)	Grado de descomposición
PbPC21-11	2011	Montevideo	Verano	estuario	H	60	2
PbPch31-12	2012	Rocha	Verano	océano	H	62	1
Pb St CataLina-06	2006	Montevideo	Verano	estuario	M	71	1

Tabla 5. Continuación

Muestra/ código	Año	Departamento	Estación del año	Zona	Sexo	LS(cm)	Grado de descomposición
PbAD17-11	2011	Rocha	Verano	océano	H	77	1
PbPdelE26-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	M	77	3
PbLP02-11	2011	Rocha	Verano	océano	M	78	1
PbPP32-12	2012	Maldonado	Otoño	estuario	M	97	1
PbBK45-12	2012	San José	Otoño	estuario	H	97	1
Pb10-06	2006	Rocha	Verano	océano	ND	98	3
PbAP07-11	2011	Canelones	Verano	estuario	H	101	1
Pb18-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	102	2
PbAP37-12	2012	Canelones	Otoño	estuario	M	106	3
PbLP03-06	2006	Rocha	Verano	océano	H	107	1
PbAP15-11	2011	Canelones	Verano	estuario	M	107	1
PbAP14-11	2011	Canelones	Verano	estuario	H	108	1
PbBK35-12	2012	San José	Otoño	estuario	H	108	1
PbAP10-11	2011	Canelones	Otoño	estuario	M	109	1
Pb000-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	110	3
PbCW42-12	2012	San José	Otoño	estuario	M	110	1
PbLP -06	2006	Rocha	Verano	océano	M	111	1
PbPP09-11	2011	Maldonado	Verano	estuario	M	111	1
PbPtaCta44-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	H	111	1
PbLP02-06	2006	Rocha	Verano	océano	H	112	1
PbAP05-11	2011	Canelones	Verano	estuario	M	112	2
Pb20-06	2006	Rocha	Verano	océano	ND	116	3
Pb02-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	117	3
PbLP01-11	2011	Rocha	Verano	océano	H	118	1
PbPA39-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	M	118	3
PbBk13-11	2011	San José	Otoño	estuario	H	120	1
PbPA38-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	H	121	3
PbPA40-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	H	121	3
PbMvd33-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	M	122	3
PbSL08-11	2011	Canelones	Verano	estuario	M	123	1
PbPCH30-12	2012	Rocha	Verano	océano	ND	123	3
PbA-06	2006	Montevideo	Verano	estuario	M	124	1
PbLP18-12	2012	Rocha	Verano	océano	M	124	2
PbAP04-11	2011	Canelones	Verano	estuario	M	125	1
Pb09-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	126	3
PbAP11-11	2011	Canelones	Otoño	estuario	H	126	1
PbPP22-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	M	132	1
PbLP01-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	134	1
Pb05-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	134	3
PbPdelE27-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	ND	134	3
PbJI03-11	2011	Maldonado	Verano	océano	H	135	1

Tabla 5. Continuación

Muestra/ código	Año	Departamento	Estación del año	Zona	Sexo	LS(cm)	Grado de descomposición
PbPdelE28-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	M	137	3
Pb03-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	138	3
Pb06-06	2006	Rocha	Verano	océano	ND	139	3
PbCW41-12	2012	San José	Otoño	estuario	M	141	1
PbPdelE23-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	M	143	3
PbPdelE25-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	ND	145	3
PbPtaCta46-12	2012	Montevideo	Otoño	estuario	H	145	1
PbPP06-11	2011	Maldonado	Verano	estuario	M	146	1
PbPP19-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	M	148	1
PbCP-06	2006	Rocha	Verano	océano	M	151	1
PbPP20-12	2012	Maldonado	Verano	estuario	H	151	1
PbBk12-11	2011	San José	Otoño	estuario	H	160	3
PbCP16-11	2011	Montevideo	Verano	estuario	H	161	3
PbMvd-06	2006	Montevideo	Verano	estuario	H	164	1

De las muestras de riñones, 12 procedieron de la zona oceánica y 29 de la zona estuarina. De la zona estuarina, 12 se obtuvieron en el verano y 17 en otoño, mientras que en la zona oceánica las 12 muestras se obtuvieron en verano (Fig. 2). En el año 2006 las franciscanas pertenecieron todas a la estación verano, y se obtuvo el mismo número de hígados y riñones con un $n=15$ para zona oceánica y $n=3$ para la estuarina.

De esta forma el otoño quedó representado únicamente por muestras tomadas en los años 2011 y 2012 de la zona del estuario, mientras que el verano quedó representado en ambas zonas y en todos los años (Fig. 2).

Análisis exploratorios de los datos

La concentración de Hg en hígado y de Cd en riñón de franciscana varió según la LS, guardando una relación del tipo creciente (Fig. 2). El rango de la LS muestreado en los distintos años 2006, 2011 y 2012, es muy similar y no presentó diferencias interanuales significativas ($p=0.763$), permitiendo así, que los niveles de Hg y Cd sean comparables entre años (Fig. 3).

● Año 2006 ● Año 2011 ● Año 2012

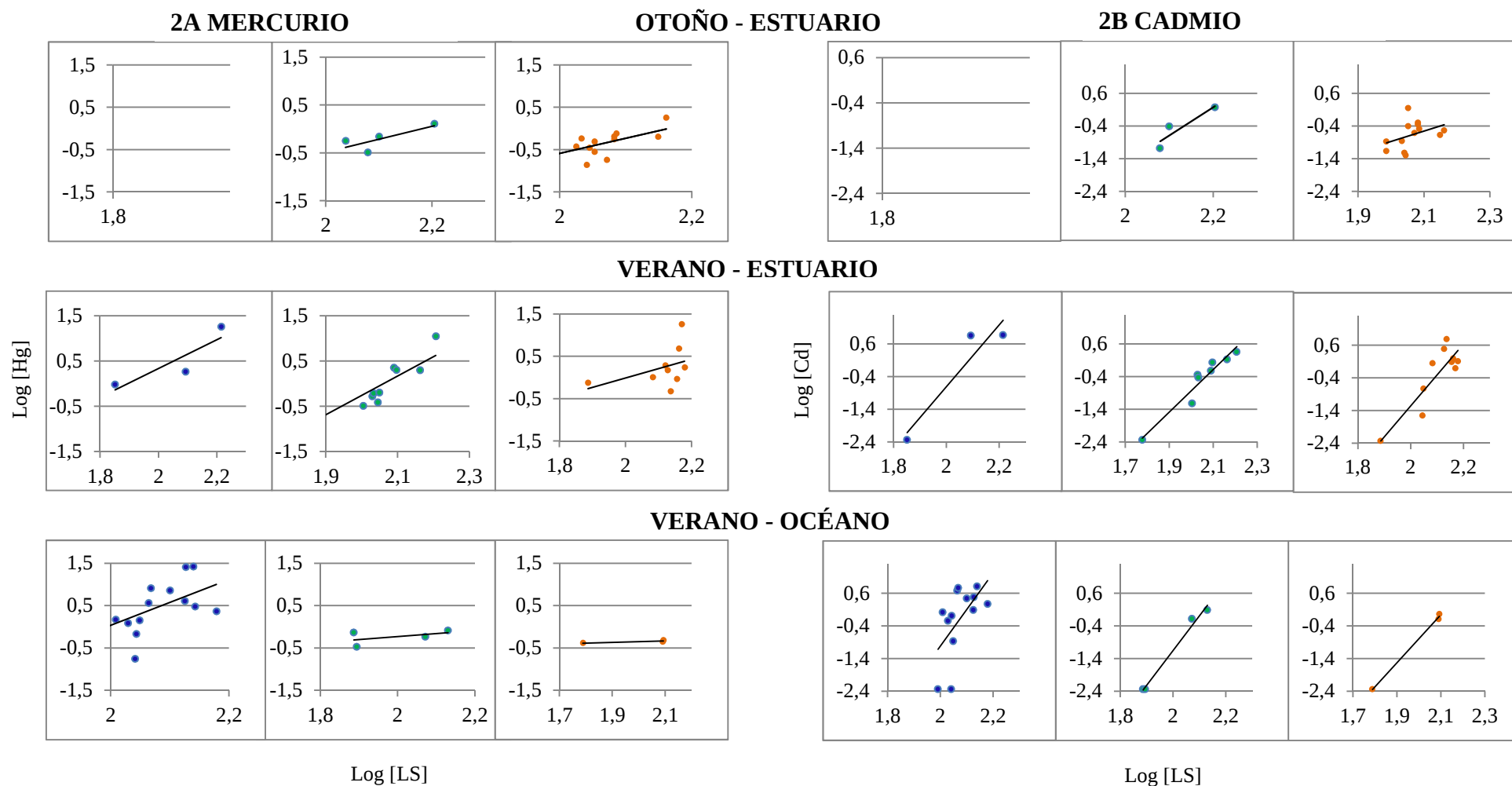


Figura 2. Datos de concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón de franciscana en función LS (cm) agrupados por año, estación y zona.

El grupo de franciscanas destetadas representó un $n=48$ para los análisis de Hg en hígado y de $n=49$ para Cd en riñón. El grupo de franciscanas no destetadas representó un $n=13$ para los análisis de Hg en hígado y de $n=8$ para Cd en riñón. Se observó que la concentración tanto de Hg como de Cd para el grupo de franciscanas destetadas fue significativamente superior ($p<0.05$) que para el grupo de las no destetadas (test Kruskal Wallis) (Fig. 4). Por otra parte, la concentración de Hg en hígado de franciscanas del grupo no-destetadas no guardó una relación lineal significativa con LS ($p=0.45$), mientras que la concentración de Cd en riñón resultó ser significativa ($p=0.038$). El grupo de franciscanas destetadas sí presentó una relación significativa con la LS ($p<0.01$) (Fig. 5).

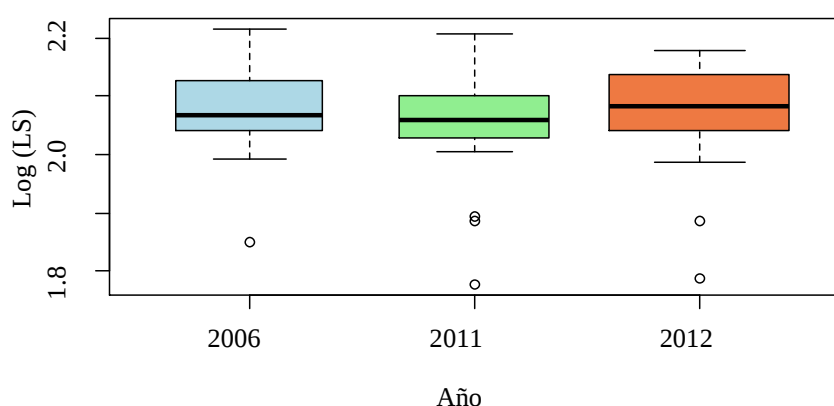


Figura 3. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la LS (cm) de franciscanas discriminadas por años 2006, 2011 y 2012.

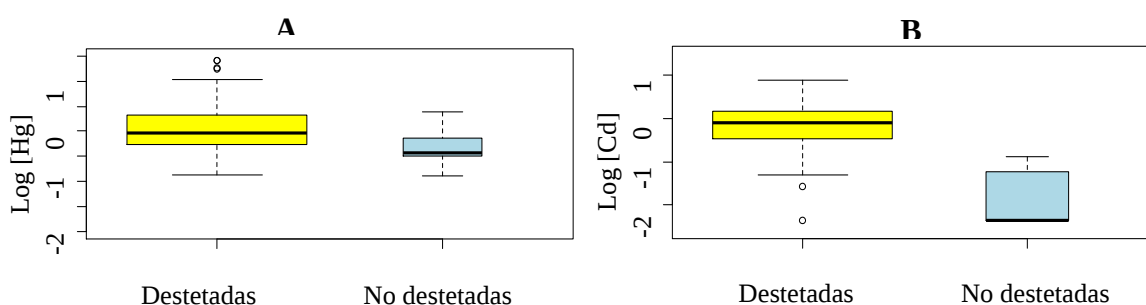


Figura 4. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas del grupo destetadas y no-destetadas.

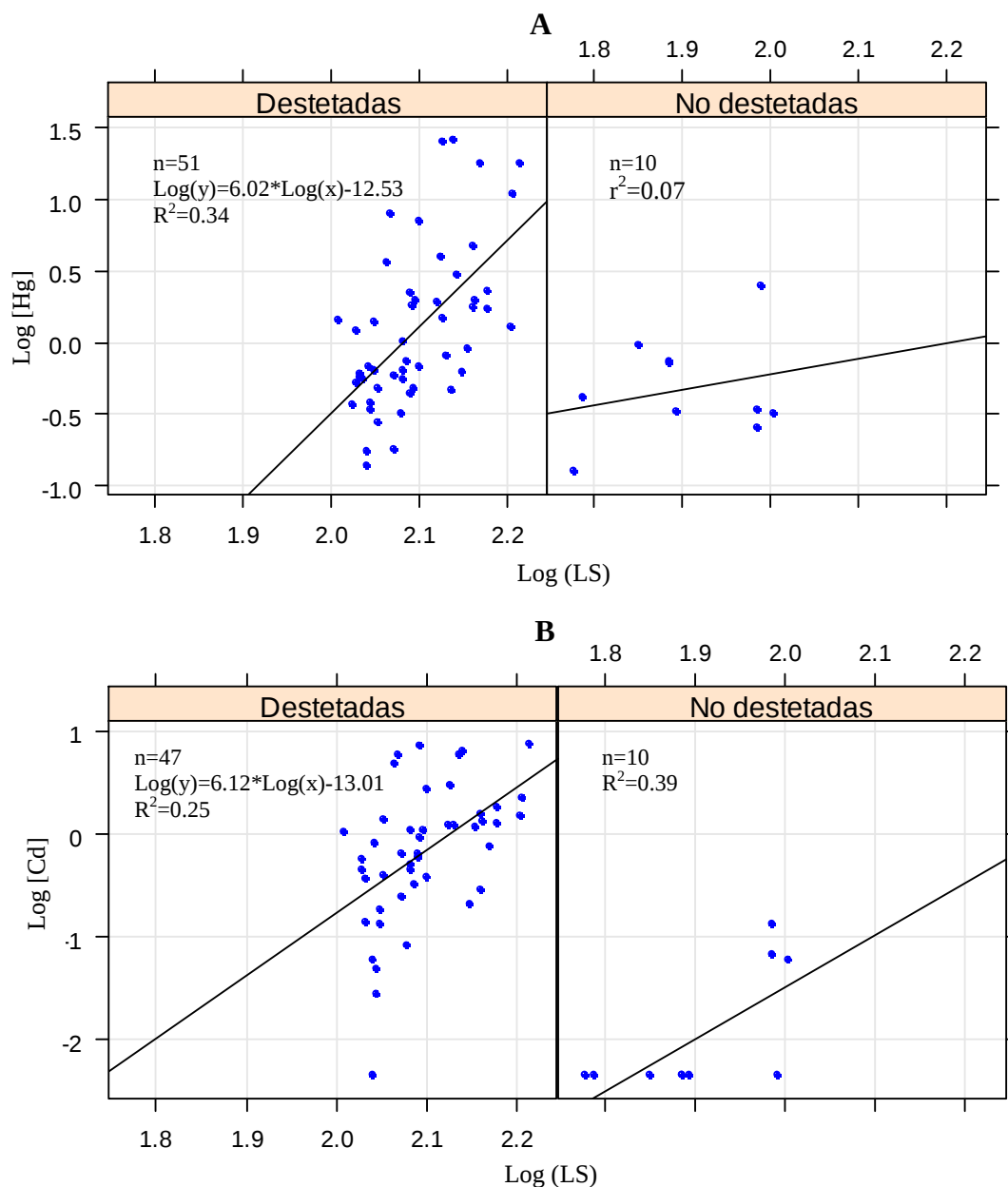


Figura 5. Concentración de Hg en hígado ($\mu\text{g/g}$) (A) y de Cd en riñón ($\mu\text{g/g}$) (B) del grupo destetadas y no-destetadas y su relación con la LS (cm) respectivamente, durante los años 2006, 2011 y 2012

Tanto para la concentración de Hg en hígado como para la concentración de Cd en riñón de franciscanas no hubo diferencias significativas entre sexos ($p=0.7803$ y $p=0.1149$ respectivamente, ANCOVA no paramétrico) (Fig. 6), así como tampoco según el grado de descomposición ($p=0.6843$ ANCOVA no paramétrico y $p=0.2059$ ANCOVA, respectivamente) (Fig. 7).

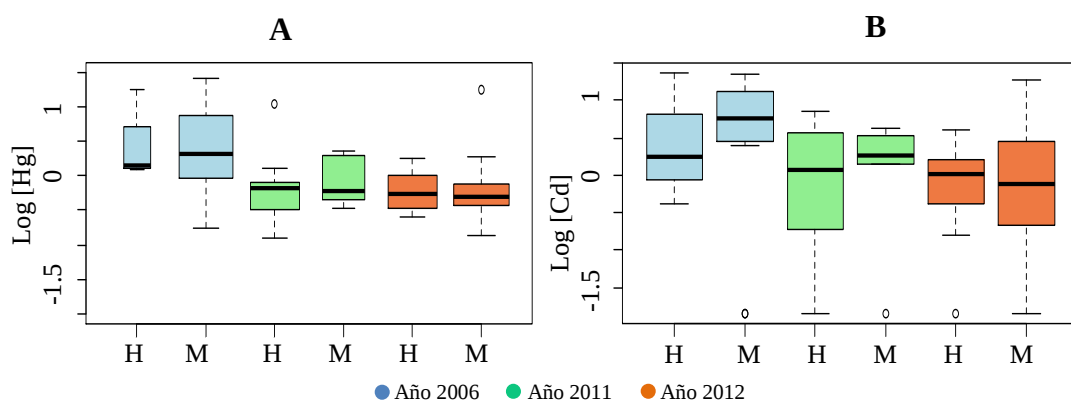


Figura 6. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas agrupada por sexo y años. H= Hembras y M= Machos.

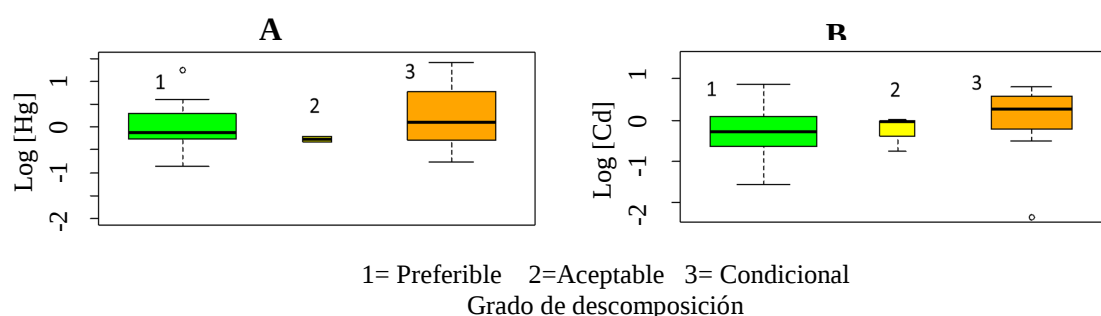


Figura 7. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas según el grado de descomposición en el cual se encontraba la muestra.

La concentración de Hg en hígado y de Cd en riñón del franciscana del grupo destetadas, (Fig. 8A y 8B respectivamente), mostró una tendencia decreciente hacia los años más recientes (2006 a 2012). Debido a la disparidad de estaciones muestreadas entre años, las comparaciones estadísticas para determinar o no diferencias significativas interanuales no fueron evaluadas. La variación interanual fue contemplada en la modelación estadística en los efectos aleatorios para ambos metales en forma aleatoria.

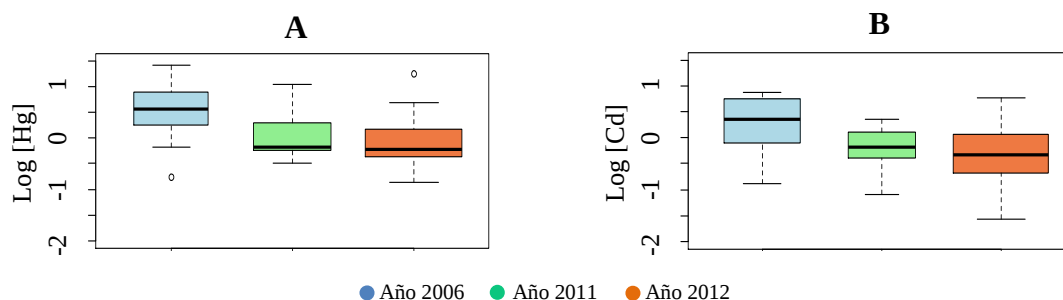


Figura 8. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado (A) y Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón (B) de franciscanas del grupo destetadas agrupadas por año.

La variación de la concentración de Hg en hígado de franciscana del grupo destetadas, mostró una mayor variabilidad en el verano que en el otoño (varianza heterogénea $p < 0.05$) (Fig. 9A), mientras que la varianza de la LS estacional fue homogénea ($p > 0.05$). La concentración estacional de Hg en hígado de franciscana del grupo destetadas fue superior en el verano que en el otoño ($p = 0.043$, ANCOVA no paramétrico) (Fig. 9B).

La concentración de Cd en riñón de franciscana del grupo destetadas presentó una variabilidad similar en verano y otoño (varianza homogénea $p > 0.05$) (Fig. 10A), al igual que la varianza homogénea de la LS estacional ($p > 0.05$). La concentración estacional de Cd en riñón de franciscana del grupo destetadas fue superior en el verano que en el otoño ($p = 0.036$, ANCOVA no paramétrico) (Fig. 10B).

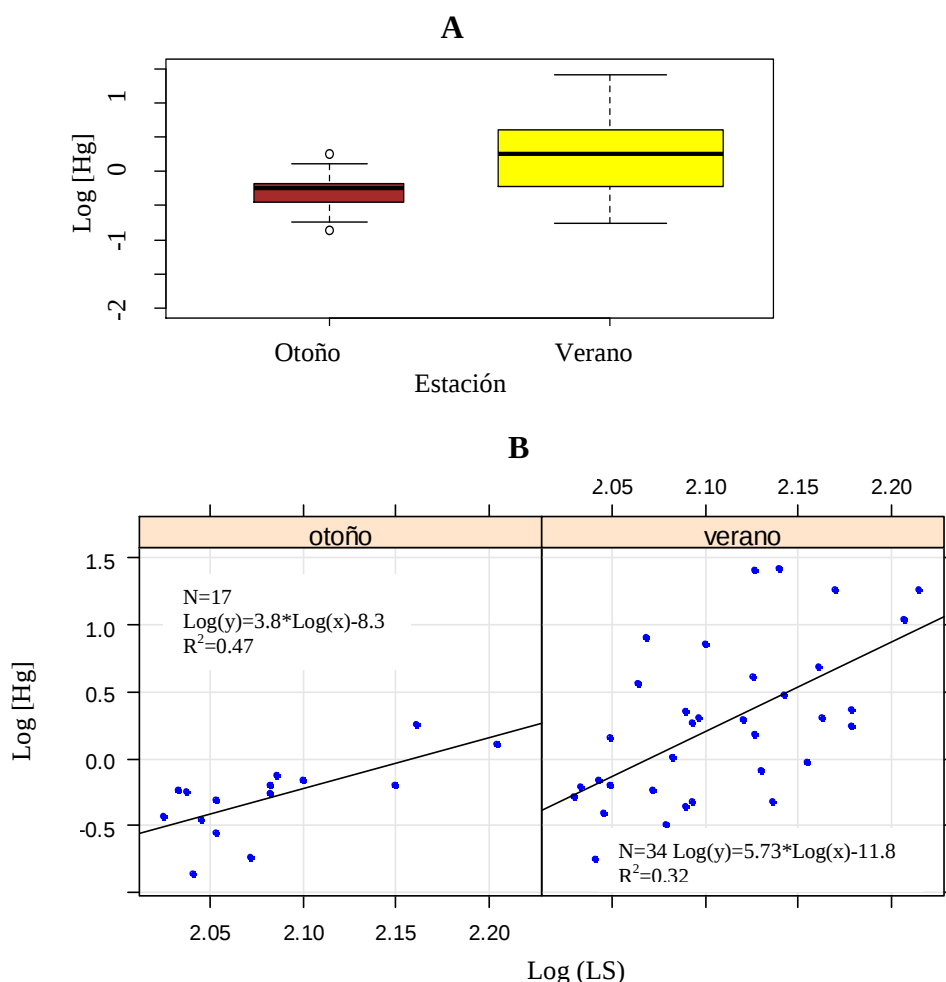


Figura 9. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$)estacional en hígado del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).

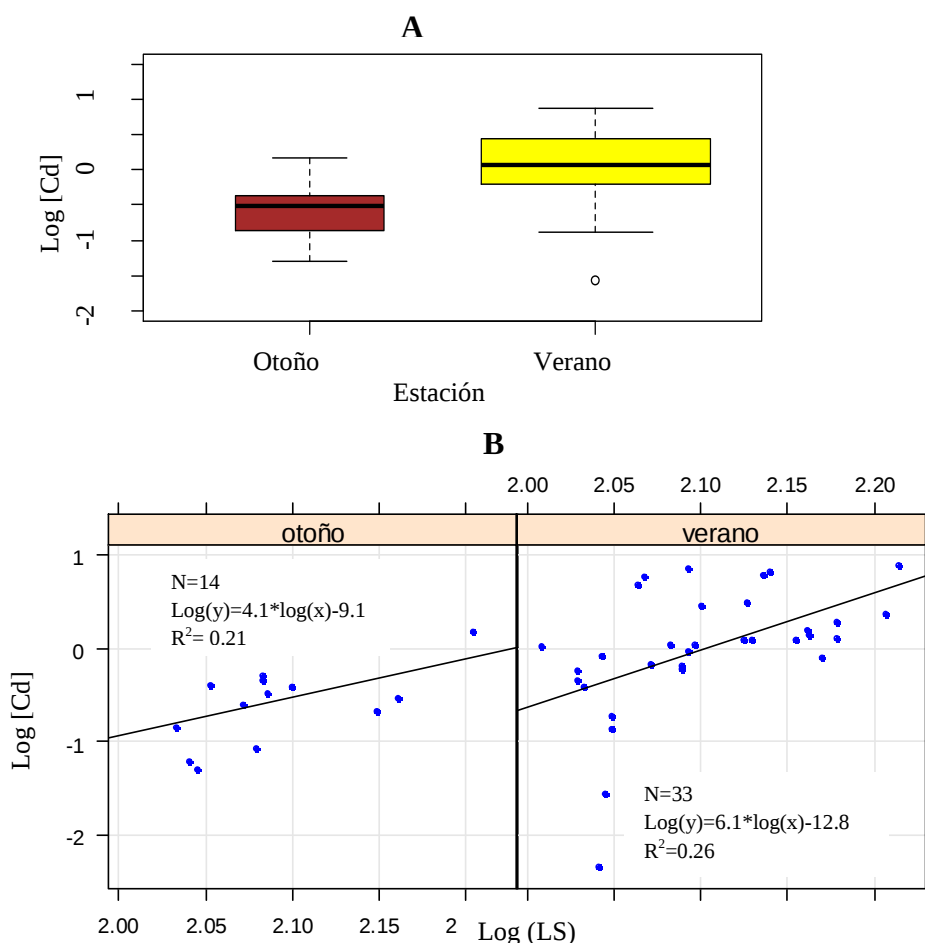
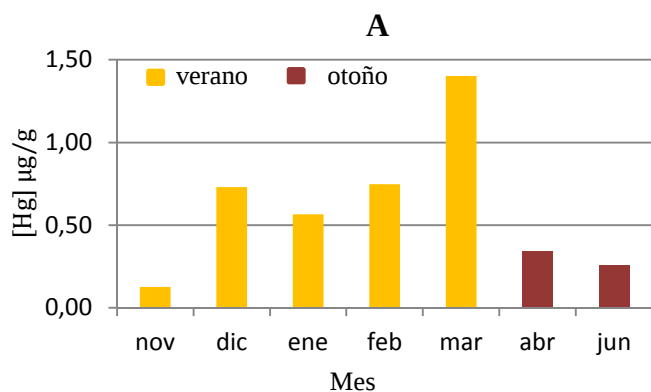


Figura 10. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) estacional en riñón del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).

La concentración de Hg y Cd estacional de franciscanas del grupo no destetadas fue variable respecto a los meses correspondientes a cada estación (Fig. 11). No se encontraron diferencias significativas entre la concentración estacional de Hg de dicho grupo ($p=0.2963$, test Kruskal Wallis) (Fig. 11A), mientras que para el Cd el otoño presentó significativamente una concentración mayor que el verano ($p<0.05$, test Kruskal Wallis) (Fig. 11B).



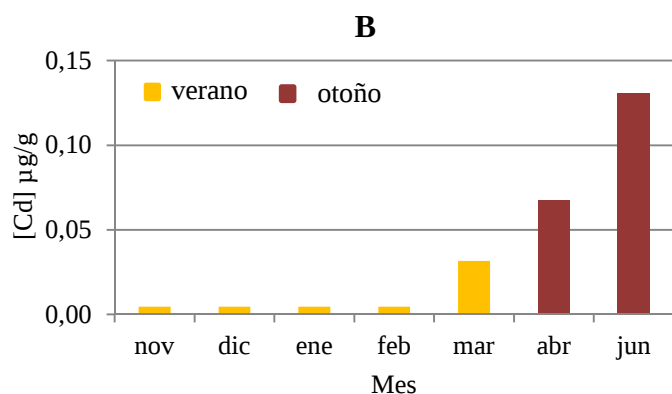
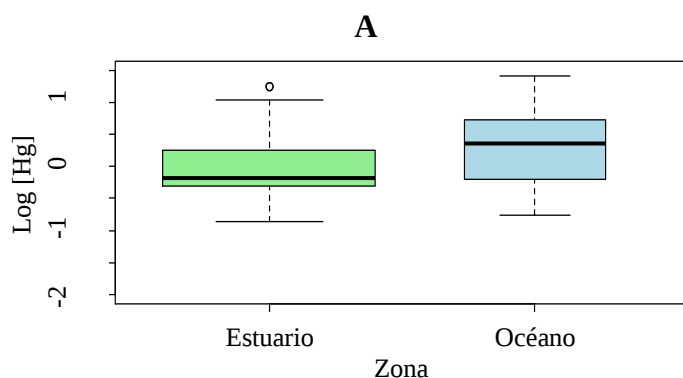


Figura 11. Concentración de Hg en hígado ($\mu\text{g/g}$) (A) y Cd en riñón ($\mu\text{g/g}$) (B) de franciscanas del grupo no destetadas por mes.

La variación de la concentración de Hg en hígado de franciscana del grupo destetadas, mostró una variabilidad similar para ambas zonas (varianza homogénea $p > 0.05$) (Fig. 12A), al igual que la varianza homogénea de la LS en ambas zonas ($p > 0.05$). La diferencia entre zonas, de la concentración de Hg en hígado de franciscana del grupo destetadas fue marginalmente significativa ($p = 0.048$, ANCOVA no paramétrico) (Fig. 12B).

La variación de la concentración de Cd en riñón de franciscana del grupo destetadas, mostró una variabilidad similar para ambas estaciones (varianza homogénea $p > 0.05$) (Fig. 13A), al igual que LS ($p > 0.05$). La concentración por zona de Cd en riñón de franciscana del grupo destetadas no presentó diferencias significativas ($p = 0.5495$, ANCOVA no paramétrico) (Fig. 13B).



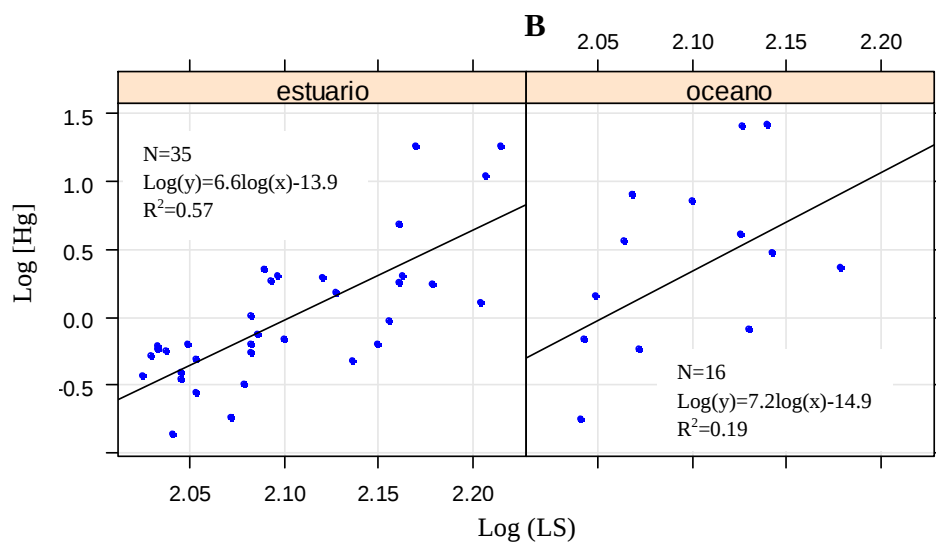


Figura 12. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) por zona en hígado del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).

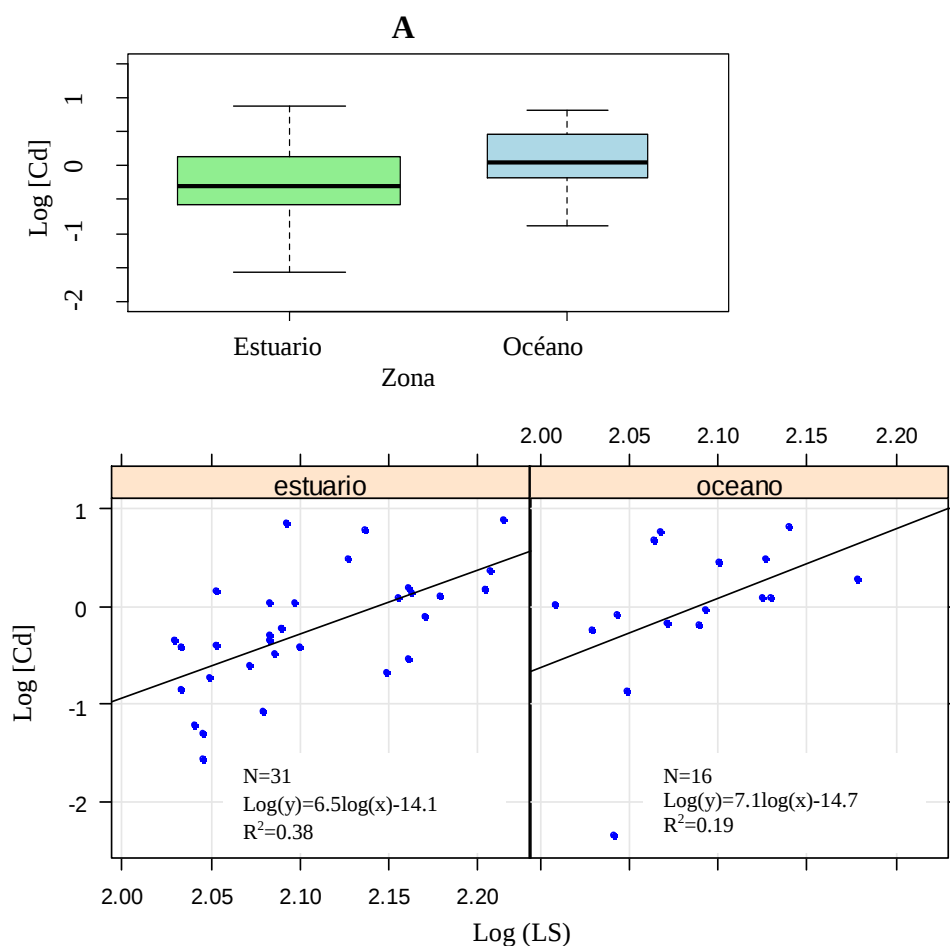


Figura 13. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) por zona en riñón del grupo de franciscanas destetadas (A) y su relación con de LS (cm) (B).

Para visualizar el efecto únicamente de las estaciones y zonas, evitando factores de confusión (años y zonas no muestreados en ambas estaciones o estaciones no muestreadas en ambas zonas) se establecieron comparaciones que asocian ambas estaciones en la zona del estuario y ambas zonas en la estación del verano (Tabla 6). No se encontraron diferencias significativas entre la concentración de Hg en franciscanas del grupo destetadas, según las zonas durante el verano y estaciones dentro del estuario ($p>0.05$) (Tabla 6). Para la concentración de Cd en riñón, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre zonas durante el verano, mientras que entre estaciones dentro del estuario las diferencias fueron significativas ($p=0.044$) (Tabla 6).

Tabla 6. Promedios estacionales de la concentración sin factores de confusión de Hg y Cd ($\mu\text{g/g}$) en hígado y riñón respectivamente del grupo destetadas, sus desvíos estándar y el valor-p de significancia obtenido del test ANCOVA no paramétrico.

Sin factores confusión		Promedio Hg ($\mu\text{g/g}$)	DS	Valor- p	Promedio Cd($\mu\text{g/g}$)	DS	Valor- p
Zonas en verano	Promedio estuario	5.00	7.55	0.454	1.95	2.11	0.964
	Promedio océano	4.54	7.16		2.04	2.18	
Sin factores confusión							
Estaciones en estuario	Promedio verano	1.37	2.13	0.097	1.28	1.39	0.044
	Promedio otoño	1.86	3.56		0.93	1.27	

Al subdividir entre la variables año, estación y zona las concentraciones de Hg y de Cd, los grupos establecidos, presentaron un tamaño de muestras muy reducidos para la realización de comparaciones estadísticas. Para la concentración de Hg en hígado de (Fig. 14), se observó que las franciscanas del verano del año 2006, en las zonas oceánica y estuarina (a2 y a3) y franciscanas del verano del año 2012 en zona estuarina (c2) fueron las que presentaron los valores de mediana más altos. Se observó que la concentración de Hg en hígado de franciscana del año 2011 en todas las zonas y estaciones (b1, b2 y b3), fue similar a la del 2012 excepto con el grupo del estuario-verano (c2). Entre las muestras de las zonas oceánicas para verano de los años 2011 y 2012 no pareció haber diferencias (b3 y c3).

En el mismo análisis para la concentración de Cd en riñón de franciscana (Fig. 15), se observó que las franciscanas de las zonas oceánica y estuarina del verano del año 2006 (d2 y d3) y franciscanas de la zona estuarina en verano del año 2012 (f2) presentaron valores de la mediana de Cd más altos, y que parecieron ser superiores a todos los de los demás grupos. Se observó que las concentraciones de Cd en riñón de franciscanas del año 2011 del estuario tanto para el verano como el otoño (e1 y e2) parecen ser menores o iguales a las del océano en verano del mismo año (e3). La zona estuarina en otoño para los años 2011 y 2012 (e1 y f1)

parece tener una mediana similar y menor en comparación con las muestras del estuario en el verano (e2 y f2) y a su vez estas últimas parecen ser bastante similares a la mediana de las muestras del océano en el verano (e3 y f3). Las muestras de verano para las zonas estuarina y oceánica tanto para los años 2011 como 2012 (e2 y e3; f2 y f3 respectivamente) no parecen mostrar medianas diferentes, mientras que dentro de cada año (2011 y 2012) las diferencias de la mediana entre cada grupo parecen deberse más a la estación que a la zona (e1 contra e2 y f2 y f1 contra f2 y f3), en donde el verano parece tener la mediana más alta que el otoño.

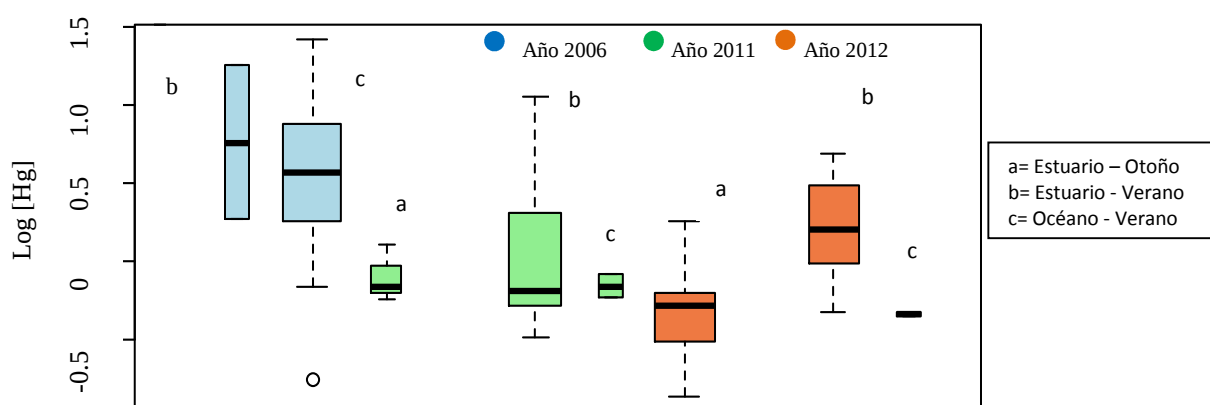


Figura 14. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$) en hígado del grupo de franciscanas destetadas agrupada por años, estación y zona.

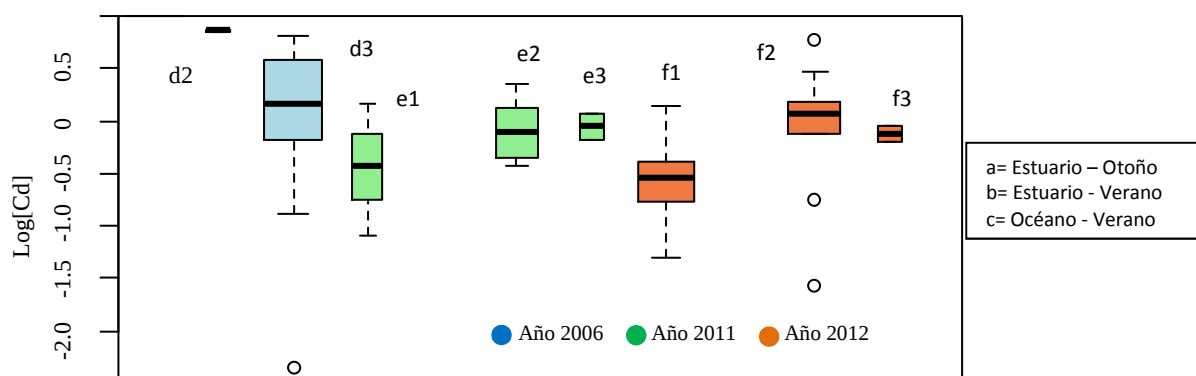


Figura 15. Mediana, mínimos, máximos y valores atípicos (outliers) de la concentración de Cd ($\mu\text{g/g}$) en riñón del grupo de franciscanas destetadas agrupada por años, estación y zona.

Modelación estadística

Se testearon como efectos aleatorios a nivel de intercepto: al año, la zona, la estación, el sexo, el estado de descomposición y luego se testeó la anidación de interceptos aleatorios dados

por: año con estación, año con zona y zona con estación. De todas las pruebas realizadas el modelo que mejor combinó la complejidad de la estructura aleatoria y la capacidad predictiva/explicativa del modelo fue aquel que presenta al año como intercepto aleatorio.

Una vez determinada la estructura aleatoria se continuó con la estructura fija. Los efectos fijos estudiados fueron, la LS como variable continua y, el sexo, grado de descomposición, zona y estación como categóricas. Los resultados mostraron que los factores, sexo, grado de descomposición y zona no presentaron significancia estadística ($p > 0.05$). La estructura fija quedó determinada luego de la simplificación del modelo, tanto por la LS como por la estación (Ecuación 1). Con respecto al cálculo de los intervalos de confianza (IC 95%), los mismos no incluyeron al valor cero (Tabla 7 y 8).

El modelo final para franciscanas del grupo destetadas, hembras LS > 108 cm y machos LS > 106 cm es:

$$\text{Esperanza [metal]} = 10^{b_0} * LS^{b_1} + \mathcal{E}, (\text{intercepto aleatorio} = \text{AÑO}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

b_0 = estimación del parámetro que da cuenta de la variación estacional

b_1 = estimación del parámetro que da cuenta de la bioacumulación de los metales en relación a LS

$\mathcal{E}$ = errores que reflejan la variación de la esperanza de la concentración del metal no explicada el modelo

Modelo para la concentración de Hg

Tabla 7. Parámetros b_0 y b_1 calculados y los intervalos de confianza correspondientes (IC 95%), para el modelo de la concentración Hg.

Modelo Hg	b_0			b_1		
Estación	Estimado	IC 95%	p-valor	Estimado	IC 95%	p-valor
Verano	$1.86E^{-12}$	$[9.25E^{-17}, 3.72E^{-08}]$	0.045	5.69	[3.74, 7.63]	<0.001
Otoño	$1.02E^{-12}$	$[9.12E^{-17}, 1.15E^{-08}]$	<0.001	5.69	[3.74, 7.63]	<0.001

ESTACIÓN VERANO

$$\text{Esperanza [Hg]} = 1.86E^{-12} * LS^{5.69} + \mathcal{E} \quad (\text{Ecuación 2})$$

ESTACIÓN OTOÑO

$$\text{Esperanza [Hg]} = 1.02E^{-12} * LS^{5.69} + \mathcal{E} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Modelo para la concentración de Cd

Tabla 8. Parámetros b_0 y b_1 calculados y los intervalos de confianza correspondientes (IC 95%), para el modelo de la concentración Cd.

Modelo Cd	b_0			b_1		
Estación	Estimado	IC 95%	p-valor	Estimado	IC 95%	p-valor
Verano	$1.00E^{-12}$	$[5.62E^{-19}, 1.82E^{-06}]$	0.015	5.70	[2.71, 8.70]	0.0004
Otoño	$3.47E^{-13}$	$[1.95E^{-19}, 6.31E^{-07}]$	0.0002	5.70	[2.71, 8.70]	0.0004

ESTACIÓN VERANO

$$Esperanza [Cd] = 1.00E^{-12} * LS^{5.70} + \mathcal{E} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

ESTACIÓN OTOÑO

$$Esperanza [Cd] = 3.47E^{-13} * LS^{5.70} + \mathcal{E} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

El modelo LMM estimado para ambas concentraciones de metales, indicó que la estación tuvo un efecto positivo sobre el promedio de las concentraciones de Hg hepáticas y Cd renales en franciscanas. El mismo se ve reflejado en el parámetro b_0 que toma valores distintos según sea verano u otoño (Ecuaciones 2, 3, 4 y 5). Los valores que toma b_1 son los mismos tanto para las ecuaciones de Hg y Cd reflejando que la tasa de acumulación de ambos metales se incrementa en la misma proporción por unidad de talla (Tabla 7 y 8).

DISCUSIÓN

Adecuación de las técnicas de análisis de mercurio y cadmio

Actualmente existen varios métodos que permiten identificar y cuantificar la concentración total de los contaminantes y/o las especies químicas de los mismos. Las técnicas empleadas en este estudio para mercurio y para cadmio, son ambas útiles para la detección de contenido total de los metales (Skoch, 1990). En el caso de la determinación de mercurio, se requirió una digestión ácida previa, lo cual no permite extraer las fracciones de muestra con las distintas especies de mercurio. Varios autores de la región de Argentina y Brasil como Marcovecchio *et al.* (1994), Gerpe *et al.* (2002), Lailso Brito *et al.* (2002), Viana *et al.* (2005), Seixas *et al.* (2007) y Panebianco *et al.* (2011 y 2012), han utilizado espectrofotometría de absorción atómica por vapores fríos para la cuantificación de Hg total. En el caso del cadmio la técnica utilizada en este trabajo fue EEA con llama de aire/acetileno. Varios autores proponen esta técnica para el análisis de Cd total (Marcovecchio *et al.*, 1994; Gerpe *et al.*, 2002; Lailso Brito *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2005, Dietz *et al.*, 2004; Panebianco *et al.*, 2011 y 2012). Algunos autores proponen una variante a la EEA y en vez de llama se utiliza un atomizador calentado eléctricamente (por ejemplo horno de grafito) (Dorneles *et al.*, 2007a). El espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito es más sensible y permite trabajar con muestras de volumen muy reducido (inferior a 100 microlitros) o directamente sobre muestras orgánicas líquidas. Por su elevada sensibilidad (niveles de ppb), la técnica se aplica en la detección de metales en productos de alta pureza, como por ejemplo fármacos, alimentos (peces y carne) y productos industriales, y también en aguas de bebida y de acuíferos. Se recomienda también para muestras con bajas concentraciones de este metal. En este sentido, las técnicas analíticas de espectrofotometría de absorción atómica por vapores fríos para Hg y para Cd, empleadas en el presente estudio son adecuadas y contemplan las condiciones de precisión analítica planteadas en los objetivos y materiales y métodos del presente trabajo.

La evaluación del efecto matriz para las muestras de hígado y riñón de la franciscana y los ensayos de robustez de los métodos, en cuanto a la reducción de la toma y dilución de las muestras, tuvieron como finalidad determinar la aplicación de las técnicas de análisis para el tipo de muestras problema, debido a que la misma se encuentra validada y acreditada en el laboratorio de DINARA para muestras de músculo de pescado y calamar. Los ensayos de validación complementarios (Tablas 1, 2 y 3) permitieron asegurar la correcta aplicación de las técnicas para matrices de hígado y riñón de franciscana.

Niveles de mercurio y cadmio y su relación con el grado de descomposición

Los niveles de mercurio en hígado y cadmio en riñón encontrados en franciscanas no presentaron una relación significativa con el estado de descomposición. Esto permite que puedan utilizarse para análisis de metales animales varados muertos en diferentes grados de descomposición, dentro de lo aceptable (grado 1, 2 y 3) ya que dicho factor no parece condicionar los resultados en cuanto al contenido de metales en estos órganos. Este resultado concuerda con lo encontrado por Bennett *et al.* (2001), en donde sus análisis muestran que el grado de descomposición no condiciona las concentraciones de los metales. Por lo tanto el resultado del presente trabajo permite incrementar el número de muestras.

Niveles de mercurio y cadmio y su relación con la talla (LS) y alimentación (grupo destetadas y no destetadas)

La correlación lineal significativa observada entre la LS y la concentración de ambos metales en el grupo de franciscanas destetadas, ha sido comprobada por varios autores (Marcovecchio *et al.*, 1994; Gerpe *et al.*, 2002; Lailso Brito *et al.*, 2002; Seixas *et al.*, 2007 y Panebianco *et al.*, 2011 y 2012) y se denomina bioacumulación. En general la franciscana se alimenta de peces (82%), crustáceos (9,2%) y moluscos cefalópodos (7,9%) es oportunista y se nutre de las presas que más frecuenten su área (Bassoi, 2005). Algunos autores han estudiado los contenidos de metales pesados la ictiofauna del Río de la Plata (Marcovecchio *et al.* 1988 y 1989; Viana *et al.*, 2005 y Viana, 2011). Los niveles de Hg encontrados en ejemplares de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), corvina (*Micropogonias furnieri*), brótola (*Urophycis brasiliensis*) y pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) (ítems alimenticios de la franciscana en nuestra costa) fueron todos detectables en los tejidos hepático y muscular, oscilando entre 0,31 y 0,77 µg/g para el hígado y entre 0,21 y 0,61 µg/g para el músculo. Además se encontró que para pejerrey, corvina y pescadilla la concentración de mercurio se relacionó positivamente con el tamaño del pez y que la especie que presentó mayor concentración de mercurio tanto en hígado como en músculo fue *Micropogonias furnieri*. Por otra parte los cefalópodos y especialmente la familia Loliginidae integran la dieta de la franciscana (Bassoi, 2005). Algunas especies de calamares son grandes acumuladoras de cadmio en su glándula digestiva con valores que rondan en los 1000µg/g (*Illex argentinus*) (Dorneles *et al.*, 2007b). Los valores mínimos y máximos de Hg en tejido hepático de franciscana $0,14 \pm 0,00$ y $26,00 \pm 0,31$ µg/g respectivamente, son mayores a los encontrados peces, como resultado de la biomagnificación del Hg en la trama trófica. Para el Cd los valores observados en la glándula

digestiva de calamar superan ampliamente al valor máximo hallado en riñón ($7.44 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$). Una posible explicación para estas diferencias en los valores de Cd entre las presas y la franciscana, es que si bien los cefalópodos tienden a acumular grandes cantidades de Cd, no todas las especies son vectores de cadmio para los cetáceos (Dorneles *et al.* 2007b y Bustamante *et al.*, 1998). Los cefalópodos de la familia Loliginidae son los más consumidos por la franciscana (Basso, 2005) y no participan en la transferencia de cadmio en cadenas alimentarias marítimas (Dorneles *et al.*, 2007b). Por esta razón los niveles de Cd hallados en la franciscana no son representativos de las concentraciones halladas por Dorneles *et al.* (2007b). Otro factor que contribuye sinérgicamente a la bioacumulación de metales en franciscana es que sus presas también correlacionan su concentración de metales positivamente con el tamaño (Viana *et al.*, 2005) y además franciscanas de mayor tamaño se alimentan de peces de mayor longitud (Basso, 2005).

Los niveles de Hg y Cd en el grupo de franciscanas no destetadas no parecen tener el mismo comportamiento que en el grupo destetadas. Los valores de Hg hepático en el grupo no destetadas, sobre todo los que se corresponden con las tallas más cercanas al punto de separación entre franciscanas no destetadas/destetadas (LS= 102 cm en machos y LS= 105cm en hembras) presentan concentraciones muy variables para valores muy similares de la LS, por ejemplo para Pb10-06 LS=98 cm, el valor de Hg en hígado es de $2.48 \mu\text{g/g} \pm 0.14$ y para PbAP07-11 LS=101cm, el valor de Hg en hígado es $0.32 \mu\text{g/g} \pm 0.014$. Para el caso de la concentración de Cd renal, la mayoría de las muestras presentaron niveles inferiores al límite de detección ($\text{Cd} < 0.009 \mu\text{g/g}$) salvo tres delfines, con una concentración de Cd muy superior, que se encuentran en el límite superior de la LS para ser considerados no destetados. Es por esta razón que al establecer la relación lineal entre la concentración de Cd y la LS, el p-valor resulta marginalmente significativo, pero carece de sentido debido a que no encuentran muestras con concentraciones de Cd intermedias entre estos mínimos y máximos. Por lo tanto los niveles de Hg y Cd en el grupo de franciscanas no destetadas no se correlacionan positivamente con la talla. Esta diferencia con lo observado en las franciscanas destetadas, es debida a las diferentes fuentes de ingreso de ambos metales durante edades tempranas y coincide con que la bioacumulación de metales en mamíferos marinos ocurre a través de la dieta sólida (Vos *et al.*, 2003 y Jakimska *et al.*, 2011). Mientras la fuente de ingreso de metales de las franciscanas del grupo destetadas está dada por la alimentación compuesta de presas sólidas que bioacumulan metales, la del grupo no destetadas es lactante y mixta (leche y presas sólidas) (Kasuya & Brownell, 1979). La diferencias en la variación que presentan las concentraciones de Hg y Cd dentro del grupo no destetadas, puede deberse principalmente al

traspaso diferencial de metales durante el período gestacional y período lactante. Varios autores han estudiado el traspaso de metales como Hg y Cd a través de la barrera placentaria durante la gestación y también en el período de lactancia en mamíferos marinos. En éste sentido, por ejemplo, Gerpe *et al.* (2002) estudiaron los pares madre/cría y madre/feto de franciscanas, encontrando que la contribución maternal de Hg y Cd vía placenta es insignificante. En lo que refiere a los estudios de otros mamíferos marinos en el traspaso de metales vía placentaria y/o lactante, como en las focas grises (*Halichoerus grypus*) se observó que el Hg se transfiere a través de la leche materna pero no así el Cd (Habran *et al.*, 2013). Por otra parte estudios realizados en crías y madres de *Phoca groenlandica* analizando contenidos de Cd y Hg en leche estomacal de crías y tejidos (hígado, riñón y músculo), indican que gran parte de los contenidos de Hg son adquiridos durante la gestación, pero no así los de Cd (Wagemann *et al.*, 1988). En el mismo estudio, si bien los niveles de Cd fueron más altos que los de Hg en la leche, las crías presentaron el patrón opuesto. Por otra parte Lahaye *et al.* (2007), estudiaron contenidos Cd y Hg en pares de madre/feto del delfín común (*Delphinus delphis*), sugiriendo la participación de metalotioneinas de Cd desde el período fetal dado su bajo contenido en riñones. También encontraron una transferencia maternal de Hg limitada durante el período de gestación y una bioacumulación de Hg hepático en fetos que resultó ser proporcional a los niveles de Hg (hepáticos, renales y musculares) de las madres.

La variación observada en los contenidos de Hg de las franciscanas no destetadas está dando cuenta de que ambos tipos de transferencia están ocurriendo. Esto permite anticipar una relación positiva entre el contenido de Hg de las madres y el de las crías. No se observa la misma variación en el caso de los niveles de Cd del grupo no destetadas lo que sugiere que el Cd posiblemente no se acumule en sus riñones por la transferencia vía lactante ni por la vía gestacional, o si lo hace sería en un nivel mínimo no detectable por el método analítico empleado. Estos resultados son congruentes con lo que la bibliografía propone acerca de la casi nula acumulación de Cd renal en fetos y crías (Wagemann *et al.*, 1988) y de la no transferencia de Cd por vías gestacional y lactante (Lahaye *et al.*, 2007 y Habran *et al.*, 2013).

Niveles de mercurio y cadmio y su relación con el sexo de franciscanas

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas de los contenidos hepáticos de Hg y renales de Cd conforme al sexo de las franciscanas, en concordancia con lo observado por otros autores (O'Shea, 1999; Lailson-Brito *et al.*, 2002; Gerpe *et al.*, 2002;

Kunito *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2007; Seixas *et al.* 2008) para la franciscana y otros mamíferos marinos. Por otra parte en relación a metales no esenciales Panebianco *et al.* (2011) encontraron que el Cu y Zn se acumulan más en franciscanas machos que en hembras. En relación a otros mamíferos marinos, estudios realizados (Sanpera *et al.*, 1995) en ballenas (*Balaenoptera physalus*) de Islandia y España, no presentan diferencias entre sexos al analizar concentraciones de cadmio en hígado y riñón. Sin embargo, al analizar otros metales como Cu, los machos presentaron mayor cantidad de este metal en hígado que las hembras. Estas diferencias podrían relacionarse con la preñez y la lactancia en las hembras que según Watanabe *et al.* (1998), las propone como rutas de eliminación de estos metales. Se puede concluir que la bioacumulación de Hg como de Cd, tanto en hembras como machos es similar y que por lo tanto: los mecanismos de excreción/detoxificación podrían ser análogos entre ambos sexos y que las áreas de alimentación podrían ser similares para ambos sexos.

Variación interanual de la bioacumulación de mercurio y cadmio

Los resultados del presente estudio muestran una tendencia a la reducción del contenido de Hg hepático de franciscanas entre los años 2006 a 2011-2012. Los promedios anuales incluyen a franciscanas de ambas estaciones (otoño-verano) y ambas zonas (estuario-océano). Sin embargo, para el año 2006 se cuenta con muestras que provienen únicamente de la estación verano y de ambas zonas, lo que hace que las comparaciones interanuales sean dispares en cuanto a las estaciones de año muestreadas. Dicha tendencia decreciente está en concordancia con lo observado en tejidos de peces en la costa de Montevideo (Corrales *et al.* en prensa) y con el trabajo realizado en peces marinos (Viana, 2011) que reportan concentraciones de Hg inferiores para los años 2011 y 2012 que para el 2005. Esta reducción de Hg, podría estar relacionada con las medidas de minimización de residuos de Hg en el sector de la salud en Uruguay (CCCB 2011a y 2011b). Los estudios de emisiones de Hg en Uruguay se centran en la identificación de las fuentes emisoras desde el sector industrial como de la salud. En lo que respecta a emisiones de sector de salud, se distinguen las vías de desecho de los residuos de mercurio metálico contenidos en termómetros de Hg y esfigomanómetros, como por ejemplo a relleno sanitario, incineración o autoclavado y de cómo es el traspaso a los distintos compartimentos como aire, por volatilización, suelo, por derrames de residuos llevados a vertederos, y a al agua, por el mercurio derramado y no recogido a través de limpieza de pisos. El cálculo de la emisión de Hg de todas estas

emisiones está cercano a 1 tonelada de mercurio por año (CCCB, 2011a). En relación con este dato y a las identificaciones de la fuentes emisoras de Hg, a partir del año 2006 se comenzó con la sustitución de termómetros de Hg por los digitales, que a partir del año 2008 pasaron a ser los únicos adquiridos por el Hospital de Clínicas así como el reemplazo de esfigmomanómetros por aquellos del tipo aneroides. Luego de tomada esta medida la reducción en la emisión de Hg fue cercana a 15 kg de Hg/año (CCCB 2011a).

Si bien la relación entre la reducción de la emisiones de Hg y la reducción de los valores de Hg observados en peces (Viana, 2011 y Corrales *et al.* en prensa) no se está evaluando la causalidad, sería una primera aproximación a cotejar contenidos de Hg en la biota con lo que está sucediendo a nivel país y sus planes de reducción de emisiones de Hg. En lo que respecta a la concentración de Cd en riñón de franciscana, la tendencia en variación anual es similar a la que presenta el Hg con el mismo problema para comparar valores interanuales. No se encontraron estudios de la variación anual de las emisiones de cadmio en Uruguay que permitan sugerir una posible relación con los valores hallados de Cd en franciscanas. La normativa vigente por la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Ley 17.774/2004) propone para Cd y Pb, la gestión de residuos sólidos industriales, agroindustriales y de servicios y un anteproyecto de ley para la gestión de residuos de aparatos eléctricos. No se encontraron estudios acerca de relevamientos de Cd pre y post gestión de los residuos de cadmio. Pero existen varios proyectos realizados en Uruguay con el objetivo de detectar fuentes de cadmio, como el de la Intendencia Municipal de Montevideo (Informe Ambiental, 2003) acerca de las fuentes de cadmio y sus vías de exposición en fundiciones, metalúrgicas y chatarrerías, estudiando además el impacto en suelos provocado por fuentes móviles de cadmio. Por otra parte en referencia al uso de fertilizantes en los cultivos de arroz, desde el año 2007 se lleva a cabo un estudio cuyos objetivos incluyen conocer el estado actual de la producción de arroz en relación con posibles residuos de agroquímicos en suelo y agua (Geo Uruguay, 2008). De esta forma si bien no se cuenta con valores exactos en la reducción de emisión de cadmio, los contenidos anuales decrecientes de cadmio en riñón de franciscana podrían estar relacionados con las medidas de control de cadmio que Uruguay se encuentra desarrollando.

La tendencia decreciente observada tanto para el Hg como Cd en franciscanas concuerda con lo que ha ocurrido a nivel mundial en otras especies de mamíferos marinos, en los cuales los niveles de contaminantes (metales pesados y contaminantes orgánicos) han decrecido desde finales de 1970 a la actualidad, como consecuencia de las medidas y acciones tomadas globalmente en la reducción de vertidos contaminantes a ambientes acuáticos (Evans, 2013).

Variación estacional de la bioacumulación de mercurio y cadmio

Al comparar los niveles de Hg y Cd en hígado y riñón de franciscana del grupo destetadas, según las estaciones otoño –verano, se está evaluando también lo que ocurre en otros componentes como el año y la zona (estuario – océano) que están comprendidos por la estación. Las condiciones altamente variables del estuario del Río de la Plata (eventos ENSO - El Niño–Southern Oscillation que afectan la descarga del Río de la Plata, el régimen climático local, los procesos oceanográficos físicos, químicos y biológicos, así como descargas puntuales de contaminantes), originan que la comparación estacional entre niveles de metales contemple información a diferentes escalas espaciales y temporales (EcoPlata, 1998).

El contenido de Hg en franciscanas presentó una tasa de acumulación (medida como la pendiente) que durante el verano fue una vez y media más grande, que para el otoño. Para el otoño solo se dispuso de muestras de la zona estuarina en los años 2011 y 2012, mientras que para la estación verano se contó con muestras de ambas zonas y todos los años. La comparación de la concentración de Hg según la estación, introduce factores de confusión (Dietz, 2008) que para este caso serían el año 2006 y la zona del océano. Por esta razón para eliminar los componentes confusos, las estaciones se compararon únicamente en la zona del estuario en los años 2011 y 2012. Dicha comparación mostró que la tasa de acumulación de Hg entre verano y otoño no se modificó al quitar dichos factores, mientras que el resultado de comparar el Hg entre ambas estaciones se modificó obteniéndose un p-valor no significativo. Por lo tanto la inclusión o no de los factores de confusión afecta a la comparación estacional de la concentración de Hg, mientras que en principio los aportes de la zona océano y año 2006, no estarían modificando la tasa de acumulación de Hg.

Para el caso de los niveles Cd en riñón de franciscana la tasa de acumulación durante el verano fue una vez y media más grande que para el otoño. Al comparar las concentraciones estacionales de Cd quitando los factores de confusión, no se modifica el resultado obtenido a partir de los cálculos que sí incluyen los factores de confusión. La exclusión de los factores de confusión en las comparaciones estacionales de Hg y Cd en franciscanas, ayudan por un lado a despejar la información y compartimentarla, pero por otro no permiten contemplar la totalidad de la variación que puede estar presente en las estaciones al incluir zonas geográficas como estuario y océano, en las cuales las características oceanográficas físicas, químicas y biológicas varían durante las estaciones del año (Calliari *et al.*, 2005). Debido a esto, resulta complejo aislar los efectos de las estaciones y las zonas, sobre el comportamiento

de ambos metales en franciscanas, ya que ambas variables se encuentran estrechamente ligadas y su influencia ocurre en forma simultánea en la naturaleza y no por separado.

Tanto para las concentraciones de Hg como Cd en franciscanas, los niveles parecen ser sutilmente menores en otoño que en verano. Este resultado puede ser explicado a través de varias hipótesis, la primera es la *hipótesis de la biodisponibilidad diferencial de metales según la estación*: Si bien para el estuario del Río de la Plata no existen comparaciones estacionales de biodisponibilidad de metales, algunos estudios hechos para otros estuarios (Laurier *et al.*, 2003) sugieren que durante el verano el Hg contenido en el material particulado se encuentra más biodisponible que durante el invierno, contribuyendo así a una oferta de Hg mayor para la biota durante la estación del verano. Esto puede traducirse en una ingesta de presas con concentraciones metálicas temporalmente más altas de mercurio durante el verano (Fairbrother *et al.*, 2007). A su vez la biodisponibilidad de los metales está regulada por parámetros como el material en suspensión y la salinidad (entre otros factores) (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1996; Leermakers *et al.*, 2001 y Laurier *et al.*, 2003), que varían estacionalmente en el estuario del Río de la Plata (EcoPlata, 1998). Dicha variabilidad podría verse reflejada en las variaciones estacionales de los contenidos de metales pesados encontrados en depredadores tope como la franciscana. Por otra parte, la descarga fluvial hacia el Río de la Plata ofrece uno de los mayores niveles de COP (carbono orgánico particulado) los cuales se correlacionan positivamente con los metales, como la descarga fluvial es mayor en otoño-invierno, los metales estarían menos disponibles en esta estación (Carsen, 2003). Sin embargo, para poder interpretar adecuadamente esta posible variación de los contenidos de metales entre el verano y otoño en franciscanas a través de la biodisponibilidad de metales, se deberían conocer por un lado la escala temporal a la que se dan los procesos de bioacumulación y biomagnificación y por otro si existen mecanismos de excreción y de detoxificación que se vean afectados por las estaciones de año. Dados estos factores la *hipótesis de la biodisponibilidad diferencial de metales según la estación*, estaría muy poco sustentada. La segunda hipótesis es la *hipótesis de la alimentación diferencial de la franciscana según las estaciones*: Otro factor que afecta la dinámica de las vías de acumulación de contaminantes es el régimen alimenticio de las franciscanas. La dieta de la franciscana ha sido estudiada por varios autores de la región de Argentina (Rodríguez *et al.*, 2002), Brasil (Basso 2005), y Uruguay (Brownell 1975; Fitch y Brownell 1977 y Praderi 1984). Los estudios del índice de importancia relativa de las presas muestran que la franciscana se alimenta preferentemente de *Micropogonias furnieri* (corvina), *Odontesthes argentinensis* (pejerrey), *Macrodon ancylodon* (pescadilla de red), *Cynoscion guatucupa*

(pescadilla), *Loligo sanpaulensis* (calamar) y *Urophycis brasiliensis* (brótola) (Praderi, 1984; Rodriguez *et al.*, 2002 y Bassoi, 2005). Peces como *M. furnier*, *Mugil liza*, *Odontesthes spp.* y *C. quatuorcupa* presentan una correlación positiva de la concentración de metales con la talla (Marcovecchio *et al.* 2004 y Viana *et al.* 2005), de modo que peces de mayor tamaño presentan una concentración mayor de Hg y Cd en sus tejidos (hígado y músculo). La diferencia sutil estacional encontrada entre niveles de Hg y Cd de franciscana podría deberse a que durante el verano, la diversidad de presas, la biomasa y el tamaño de las presas ingeridas son mayores que en el invierno (Bassoi, 2005) y que por lo tanto, durante el verano la ingesta de ambos metales sea mayor que durante el invierno. Dado que los estudios estacionales hechos en los ítems presas son para invierno y verano, y los resultados del presente trabajo son para otoño/verano, no es posible una comparación exacta por estación, sin embargo la leve diferencia encontrada en este estudio, podría estar indicando que el otoño sea una estación de transición en los hábitos alimenticios. Esta hipótesis estaría indicando que las mediciones de ambos metales en franciscana son reflejo instantáneo de alimentación reciente pero dado que no se conoce el metabolismo interno tanto de absorción como de excreción de metales para esta especie, no es posible sustentar dicha hipótesis. La tercer hipótesis es la *hipótesis del solapamiento estacional de áreas alimenticias con otras poblaciones de franciscana*. Aznar *et al.* (1995) estudiaron la carga parasitaria gastrointestinal de franciscanas con el fin de clasificar sus áreas de alimentación. Sus resultados sugieren que al menos durante la primavera, las franciscanas del Sur de Brasil, Uruguay y Argentina están utilizando recursos alimenticios de diferentes hábitats, concluyendo que en primavera las franciscanas están separadas al menos en 2 stock ecológicos: el litoral brasileiro sur y el norte de Argentina. Es decir que dependiendo de la estación del año las franciscanas de distintas regiones comparten o no hábitats alimenticios. No está descripto si los grupos de franciscanas se solapan durante otras estaciones. Podría suceder que durante las distintas estaciones del año, las concentraciones de metales halladas en franciscanas reflejen niveles de metales de otros lugares y no necesariamente expresen los niveles de metales según las *hipótesis de la biodisponibilidad diferencial de metales según la estación y solapamiento estacional de áreas alimenticias con otras poblaciones de franciscana*. Así pues la posibilidad de que la franciscana refleje la concentración de metales de otros lugares es un factor a tener en cuenta, aunque no se han encontrado estudios que evidencien el comportamiento migratorio estacional que pueda tener la franciscana. Además, no hay que descartar la posibilidad de que los niveles de metales encontrados pertenezcan a distintas poblaciones de delfines halladas en

verano y otoño dentro de la región de estudio. En resumen y dada la escasa referencia bibliográfica encontrada no es posible argumentar a favor de ninguna hipótesis.

Por otra parte, en el grupo de franciscanas no destetadas se encuentra que los contenidos de Hg en hígado varían según la estación y que la variabilidad observada en verano (Fig. 11A) coincide con los valores de Hg más altos que se corresponden con el período de mayor probabilidad de partos y por lo tanto de crías lactantes (Kasuya y Brownell, 1979). Para el Cd se observa lo opuesto es decir, en otoño los valores de Cd son más altos que para el verano. Esto podría estar relacionado con que en otoño el período de lactancia está culminando y la ingesta de presas sólidas comienza a ser más predominante, mientras que durante el verano, cuando las crías son aun lactantes, los contenidos de Cd son bajos debido a que el Cd no atraviesa la barrera placentaria y tampoco se excreta a través de la leche materna. De esta manera, posiblemente las 3 franciscanas del grupo no destetadas pertenecientes al otoño (que poseen la mayor concentración de Cd) sean franciscanas que hayan tenido un destete más temprano.

Variación zonal de la bioacumulación de mercurio y cadmio

En el presente trabajo se analizaron franciscanas que según Secchi *et al.* (2002) pertenecen al stock Río Grande del Sur / Uruguay, de la población de franciscanas del Sur (Franciscana Management Área - FMA III). La existencia de algunas evidencias sugería como *hipótesis, esperar que las franciscanas reflejaran diferencias en los niveles de mercurio y cadmio acorde a las zonas*. Esta hipótesis se fundamentaba en que a) los vertidos puntuales de contaminación se localizan en la zona más cercana al estuario (Geo Montevideo, 2004), b) el incremento de la migración de la población rural hacia la zona urbana y de la población urbana hacia la zona este de Montevideo aumenta los volúmenes de los vertidos (EcoPlata, 1999), c) el crecimiento de las ciudades, mayor desarrollo industrial, construcción de rutas y puertos contribuyen al aumento de la contaminación de las aguas costeras del Río de la Plata (Janiot *et al.*, 2003 y Geo Montevideo, 2004), y por último, d) considerando los gradientes de salinidad y material en suspensión en el Río de la Plata (Calliari *et al.*, 2005) y que la biodisponibilidad de metales, se correlaciona negativamente con la salinidad y positivamente con el material en suspensión (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1996; Leermarkers *et al.*, 2001 y Laurier *et al.*, 2003), el estuario ofrecería una mayor oferta de metales que la zona atlántica. Esto fue corroborado por Janiot *et al.* (2003), que muestran que la concentración de los metales (Cd, Cu, Cr y Pb) en muestras de agua de la zona interior del Río de la Plata es superior a la zona

exterior y que la concentración de metales en sedimentos aumenta progresivamente hacia la zona exterior, disminuyendo su biodisponibilidad. Además, los hábitos alimenticios de la franciscana son diferentes en el estuario y en el océano (Praderi, 1984 y Rodríguez *et al.*, 2002), y basándose en las evidencias anteriores que muestran que los niveles de contaminación varían de una zona a otra, sería de esperar encontrar dichas variaciones en las franciscanas. Por otra parte Bassoi (2005) evaluó el solapamiento de las dietas de franciscanas de la costa de Uruguay, con las del Sur y Norte de Brasil y concluyó que los grupos de Uruguay y sur de Brasil estarían ocupando el mismo hábitat alimenticio, mientras que las franciscanas del norte de Brasil ocuparían una región alimenticia diferente.

A pesar de estas evidencias y que podría esperarse que las franciscanas del estuario presentaran mayor contenido de metales que las del océano, las franciscanas del presente estudio no reflejan esta variación en los niveles de metales encontrados en sus tejidos, por lo que esta hipótesis no se sustenta a partir de los niveles de metales encontrados en franciscanas estuarinas y oceánicas. Probablemente lo que esté sucediendo es que debido a la escala espacial en la que se mueve la franciscana, las posibles diferencias de contaminantes entre ambas zonas no puedan elucidarse.

Respecto a esto, estudios de bioacumulación y biomagnificación de metales a escalas geográficas distintas (Chen *et al.*, 2008), indican que las fuentes y receptores biológicos de los metales, como los peces y sus consumidores, no siempre están relacionados espacialmente. De modo que si las franciscanas migran del estuario al océano y viceversa para alimentarse, intentar explicar posibles diferencias de niveles de metales entre las zonas de estudio, a través de la bioacumulación de la franciscana, no sería aplicable, dado que en realidad lo que las franciscanas analizadas estarían indirectamente reflejando, serían los niveles de metales a lo largo de ambas zonas. Los factores ecológicos como interacciones depredador presa y los comportamientos migratorios de las franciscanas serían los que regularían su bioacumulación (Chen *et al.*, 2008).

Para la costa Argentina, Polizzi *et al.* (2013) han descripto un uso diferencial de hábitats de franciscanas, en base a niveles de metales adquiridos a través de la dieta. Dicho estudio fue realizado en los niveles Cd de franciscanas del estuario del Río de la Plata y en el grupo costero marino (FMA IV). Los investigadores reportaron que el principal vector de Cd para la franciscana es la especie *Engraulis anchoíta* presente mayoritariamente en franciscanas marinas. Adjudican las diferencias de Cd encontradas entre ambos grupos, en base a la dieta diferencial y apoyan el hecho de que la FMA IV, estaría sub-dividida (stock estuario y stock océano). Por otra parte sugieren, que el Cd estaría más vinculado a un origen natural sub-

antártico (a través de *Engraulis anchoíta*). Esto va en contraposición a lo que antes se pensaba del origen antropogénico del Cd en franciscanas asociado al estuario del Río de la Plata. Bassoi (2005) también reportó *Engraulis anchoíta* como un ítem presa importante en las franciscanas del litoral sur brasileiro durante la estación de invierno. Así también esta especie fue reportada en estómagos de franciscanas de Uruguay, por Brownell (1975) y Fitch y Brownell (1977), en franciscanas oceánicas y Praderi (1984) no lo reportó para franciscanas estuarinas. En contraposición a lo encontrado por Polizzi *et al.* (2013), en el presente trabajo, las franciscanas de la zona oceánica presentan concentraciones de Cd y de Hg similares a las de la zona estuarina, a pesar de que sus hábitos alimenticios también guardan selectividad de presas según la zona (Praderi, 1984 y Rodríguez *et al.*, 2002). El hecho de no haber encontrado diferencias en los niveles de Cd, ni tampoco en los de Hg, estaría indicando que las franciscanas de la zona FMA III no tendrían una sub-división (estuario-océano) y que los niveles similares de metales, podrían deberse a que las franciscanas migran de una zona a otra. Para entender globalmente las transferencias de los metales y su biomagnificación en las tramas tróficas, Chen *et al.* (2008) sugieren aplicar un modelo ecosistémico que comprenda las fuentes de los metales y la unión con los procesos ecológicos, que vinculan las diferentes vías de transferencia de metales en la escala espacial y temporal. Acorde a esto, adjudicar diferencias zonales en la concentración de metales, únicamente a una escala espacial sería incompleto ya que no se estaría evaluando la variación temporal ni la alimentación, ni en la bioacumulación de metales en las presas, ni tampoco en la biodisponibilidad de los metales a través de los efectos sinérgicos o antagónicos con las propiedades oceanográficas locales. En este sentido, serían necesarios estudios sobre la estructura genética poblacional y la migración de las franciscanas de la zona FMA III, para poder relacionar más estrechamente los niveles de contaminación a una determinada zona y poder evaluar a escala espacio-temporal la evolución de la contaminación en el ambiente.

Modelo estadístico

De acuerdo al LMM estimado la talla y la estación fueron las variables que mejor explicaron la variación de las concentraciones de Hg y Cd, mientras que el año predice la varianza inter anual asociada a las concentraciones de ambos metales. Si bien el modelo predicho, permite incluir un espectro mayor de variables, se requiere un estudio detallado de cómo se selecciona la estructura aleatoria y bajo qué criterio de entropía se estima. Los valores que se obtuvieron al estimar los parámetros del modelo LMM muestran que en promedio las franciscanas

estarían acumulando en sus órganos (hígado y riñón) por unidad de talla valores similares de ambos metales que deben ser corregidos según la estación del año. Esta modificación viene dada por el valor que multiplica a la talla y que cambia según la estación del año (Ecuaciones 2, 3, 4 y 5). Estos resultados no conducen a probar diferencias significativas entre estaciones ya que por un lado el set de datos es pequeño para afirmar una variación estacional que requiere varios años de muestreo, el diseño experimental está desbalanceado y el ajuste de entropía realizado por el método del AIC no se ajusta totalmente a las características de los datos. En lo referente al diseño experimental, la amplitud de la escala espacial que contempla este estudio está restringida al lugar donde se colectaron las muestras y tanto la zona estuarina como oceánica están incluidas en esa escala, pero la distribución real que tienen la población de franciscana de la región de la FMA III (Secchi *et al.*, 2002), se extiende más allá de la escala espacial de este estudio. La escala temporal está definida en el modelo según las estaciones (verano-otoño). Dicha escala no contempla lo que ocurre en invierno y primavera, es decir que este estudio se restringe a lo que ocurre en la zona de estuario y océano en ambas estaciones, con la salvedad de que el otoño solo fue muestreado en el estuario. De esta manera no todas las zonas tienen las combinaciones de todos los niveles del factor estación generando un diseño desbalanceado tanto para el estudio de mercurio como para el cadmio y por lo tanto los resultados del modelo predicho están sujetos a los límites espaciales y temporales del diseño experimental. Otros autores han utilizado otras herramientas estadísticas para analizar posibles diferencias en las concentraciones de metales y compuestos orgánicos (CO) según factores como la ubicación geográfica (zona). Por ejemplo análisis de componentes principales (ACP) (Alonso *et al.* 2012) o ANOVA/ANCOVA (Dietz *et al.*, 2004) y por análisis no paramétricos el test de Mann Whitney (Polizzi *et al.*, 2013). Desde el punto de vista estadístico una vez que se determina que existe una co-variación de la talla con los niveles de metales o CO, la misma debe ser tomada en cuenta a la hora de comparar los niveles de dichos contaminantes entre zonas distintas, porque de otra manera las diferencias halladas podrían estar sesgadas al efecto de la talla. El ANCOVA resuelve este problema ya que permite la introducción de co-variables. Así, por ejemplo, Dietz *et al.* (2004), han utilizado ANCOVA o ANOVA, dependiendo de la significancia de la relación entre la concentración de contaminantes con la talla. Pero este tipo de análisis consume muchos grados de libertad y reduce la potencia estadística frente al uso de LMM que consume menos grados de libertad (GL), debido a que los términos ubicados en la estructura aleatoria no restan GL. Respecto al cómputo de los GL en los LMM, estudios hechos en simulaciones (Zhang *et al.*, 2012), muestran que contar el número de parámetros estimados para determinar los GL en los LMM,

es una importante subestimación y que podrían alterar la significancia de los efectos fijos. Estos autores proponen que si bien los LMM brindan escenarios flexibles en cuanto a la introducción de variables, este mismo hecho incrementa el número de parámetros desconocidos (que se introducen a partir de los efectos aleatorios) aumentando su complejidad. Por esta razón el criterio de entropía que se utilice para estimar los parámetros juega un rol importante. El criterio de AIC utilizado en el LMM del presente trabajo puede contener dichas restricciones. Una posible solución a esto es corregir el AIC por el AICc (Hurvich y Tsai, 1989), que introduce aún más penalización por la estimación de parámetros extra.

Si bien la elección del modelo lineal mixto para explicar la concentración de ambos metales de las franciscanas en estudio, no permite ser concluyente en cuanto a si los niveles de ambos metales varían significativamente entre una estación u otra, permite observar que la estación es una variable influyente y que debería ser tomada en cuenta en estudios futuros.

Pontoporia blainvillei ¿posible bio-indicador?

El conjunto de efectos que pueden darse en un ecosistema debido a las diferentes presiones antropogénicas y/o naturales, ocurren a distintas escalas y niveles jerárquicos (Adams, 2002). En general todos los ecosistemas son resilientes a los cambios regulares y diarios de la variación estacional, pero los cambios que son más importantes, son los que duran más que aquellos producidos por la variación estacional (Thrush *et al.*, 2009). Al elegir un bioindicador, la respuesta medida va a estar condicionada por el ciclo de vida del organismo, su vulnerabilidad al factor de estrés (perturbación) tanto en frecuencia como intensidad y por la escala a la que se haya medido esa perturbación (Petersen *et al.*, 2008). Por lo tanto las preguntas que surgen a raíz de esto son:

- ¿Los niveles de metales hallados en la franciscana (respuesta del indicador), involucran escalas espaciales y temporales?
- Si es así, ¿a qué escala está medida la respuesta? ¿cuál es el dominio de aplicación del indicador, si la dieta de la franciscana abarca especies de peces migratorias que bioacumulan metales en otras zonas?

Respondiendo a estas preguntas, al menos los niveles de contaminantes en franciscana encontrados corresponden a una zona muy amplia (aproximadamente 1300 km de costa), que abarca desde el estuario del Río de la Plata hasta la zona de Río Grande del Sur. Esto sería solo en términos de distribución espacial de la franciscana, mientras que los procesos que se

suceden antes de que los metales se bioacumulen en ellas, ocurren a escalas espaciales mayores (por que la alimentación podría provenir de regiones alejadas de la zona de estudio) y depende de la escala temporal. Por esta razón la franciscana de ser considerada un posible bioindicador integraría los procesos que ocurren a ambas escalas constituyendo una especie centinela a una escala más global. Por tal motivo, el uso de la franciscana como indicadora de la contaminación por metales debería ser utilizado en el dominio correcto de aplicación, el cual requiere estudios acerca del comportamiento de los vectores físicos y biológicos que transfieren ambos metales.

La variabilidad del estuario del Río de la Plata comprende una dinámica a escalas tanto espaciales como temporales y los procesos que la regulan están anidados y solapan sus efectos a ambas escalas. Esto lleva a otros cuestionamientos:

- ¿Cómo afecta la variabilidad estacional y espacial la biodisponibilidad de los metales en la región de estudio?
- ¿A qué escala se dan los procesos de bioacumulación/biomagnificación de metales en la trama trófica en el Río de la Plata?

A micro escala, es más fácil estudiar causa-efecto, mientras que a meso y macro escala es más difícil determinar esta relación, ya que los efectos y procesos que ocurren a una escala mayor pueden opacar los que suceden a otra escala menor. Lo importante es que es que haya concordancia a nivel de escala, entre las hipótesis que se plantean, la elección del indicador y su variable respuesta y los procesos que la controlan. Hay un compromiso entre el entendimiento de los mecanismos de funcionamiento y el incremento en la integración y significancia ecológica (Adams, 2002). Es decir, que el utilizar biomarcadores por ejemplo, facilitaría el entendimiento de los mecanismos de respuesta, pero a la hora de extrapolar los resultados, el dominio de aplicación no abarcaría una escala de procesos ecológicos. En cambio, el uso de un indicador biótico, como por ejemplo un organismo bentónico, daría cuenta a mayor grado de la significancia ecológica, pero el entendimiento de los mecanismos intrínsecos disminuiría. Utilizar organismos indicadores de contaminantes a niveles tróficos altos, para evaluar estados ambientales de contaminación, presenta la complejidad de identificar los procesos que controlan la bioacumulación de los contaminantes que muchas veces están asociados a eventos que ocurren a diferentes escalas de espacio y tiempo. El tipo de respuesta al utilizar a la franciscana como un posible bioindicador de la contaminación de Hg y Cd en el Río de la Plata y su frente marítimo, tendría un alcance que no sería sitio-específico e integraría procesos de mayor escala tanto espacial como temporal. Ambos procesos deberían ser contemplados para entender el tipo de respuesta. El proceso de

bioacumulación de metales en franciscana está sujeto a su ciclo de vida y depende si hubo o no transferencia de metales durante la gestación o lactancia. Dicho evento está sujeto a al nivel de contaminación de la madre, el cual está vinculado a la bioacumulación a través de la dieta, la cual se ve afectada por la estación del año y la zona geográfica. Sin embargo, Bowen (1997) propone que como los mamíferos marinos integran y reflejan la variación ecológica a lo largo de escalas espaciales y temporales y pueden ser útiles como bioindicadores ecosistémicos. Hay algunos mamíferos marinos descritos como posible bioindicadores ecosistémicos: la nutria de mar (*Enhydra lutris*) *nereis* (Jessup *et al.*, 2004), delfines como *Tursiops truncatus* (Wells *et al.*, 2004) y manatíes (*Trichechus manatus*) (Bonde *et al.*, 2004), pero al mismo tiempo concluyen que el entendimiento acerca del rol ecológico que tienen los mamíferos marinos está poco estudiado para procesos de gran escala a nivel ecosistémico y que esta ausencia de información es la que no permite establecer el enlace entre la respuesta medida y el ambiente.

Por otro lado, Meng y Liu (2010) proponen que no sería realista utilizar un indicador universal. Por esta razón para los estudios ambientales de la contaminación por metales de la región del estuario del Río de la Plata y su océano atlántico oriental, sería adecuado el uso de vectores a distintos niveles de la trama trófica que fueran clave en el traspaso de metales. Esto permitiría establecer los enlaces ecológicos entre ellos y obtener respuestas que, por un lado puedan ajustarse a los distintos niveles organizacionales de un ecosistema y por otro, puedan dar una respuesta integral para trazar las rutas de mayor exposición a los metales y sus principales fuentes. Dentro de este esquema, la franciscana se ubica como bioindicadora de metales en determinado nivel trófico del ecosistema, pero no aporta información acerca de cuan contaminado está el ambiente, ya que faltarían los nexos con otros niveles tróficos y otros indicadores en su mismo nivel. Los resultados de este trabajo si bien no permiten adjudicar a la franciscana el carácter de especie bioindicadora de la contaminación ambiental, sí permiten elucidar que esta especie es bioindicadora temporal de la contaminación lo que permite su uso como especie biomonitora.

CONCLUSIONES

- 1) La franciscana bioacumula mercurio en hígado y cadmio en riñón.
- 2) La tasa de bioacumulación, medida como la relación de la concentración de mercurio y cadmio con la talla, es similar para ambos metales.
- 3) El grupo de franciscanas destetadas bioacumula niveles superiores de mercurio y cadmio comparado con el grupo no destetadas, evidenciando que la fuente principal de ingreso de contaminantes proviene de la dieta compuesta por presas sólidas.
- 4) Las franciscanas del grupo no destetadas presentan evidencias de acumulación de mercurio durante el período gestacional y lactante, mientras que el cadmio no presenta evidencias de acumulación por estas vías y su bioacumulación no se demuestra sino hasta que comienza el período de alimentación de presas sólidas.
- 5) Los niveles de mercurio y cadmio encontrados en hígado y riñón no se relacionan con el estado de descomposición, indicando que muestras colectadas en distintos grados de desintegración (1 a 3) pueden ser utilizadas para análisis de ambos metales.
- 6) Los niveles de mercurio y cadmio encontrados en hígado y riñón no se relacionan con el sexo de las franciscanas muestreadas.
- 7) Los niveles de mercurio y cadmio en franciscana presentan una tendencia decreciente conforme a los años más recientes (2006 a 2012), indicando que la especie *Pontoporia blainvillei* puede ser un buen indicador temporal a ser utilizado en estudios de monitoreo.
- 8) Los niveles de mercurio y cadmio encontrados en franciscanas en verano fueron superiores a los encontrados en otoño.
- 9) Las franciscanas estuarinas y oceánicas presentan niveles similares de mercurio y cadmio.

A continuación se presenta el siguiente protocolo de trabajo para *Pontoporia blainvillei* a ser considerado para futuros estudios de contaminación en metales pesados:

Con un diseño de muestreo adecuado que contemple las variaciones a escala temporal y espacial, que reflejen la variabilidad ambiental, *Pontoporia blainvillei* puede ser considerado un indicador de la contaminación por mercurio y cadmio en el Río de la plata y océano atlántico adyacente, para estudios de monitoreo ambiental, con las siguientes recomendaciones, cuidados y restricciones:

- Es aceptable el uso muestras hepáticas y renales de franciscanas, entre los grados de descomposición 1 (preferencial) a 3 (condicional) para análisis de la concentración de mercurio (hígado) y cadmio (riñón).
- Dada la ausencia de relación en la bioacumulación de ambos metales entre machos y hembras en hígado y riñón respectivamente, es posible el uso indistinto de delfines de ambos sexos como indicadores
- Es preferible utilizar franciscanas con tallas mayores a 102 cm para machos y 105 cm para hembras, para asegurar la observación clara de bioacumulación a partir de presas sólidas.
- No es recomendable el uso de la franciscana como un indicador sitio específico de los niveles contaminación de ambos metales.

BIBLIOGRAFÍA

Adams S.M. 2002. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society Bethesda, Maryland, USA. 274 p.

Adams S. M. 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine system. *Marine Pollution Bulletin* 51:649-757.

Aguilar A. y Borrell A. 1995. Pollution and harbour porpoises in the eastern north Atlantic: A review. Reports of the International Whaling Commission, 16: 231–242.

Alonso M.B., Eljarrat E., Gorga M., Secchi E.D., Bassoi M., Barbosa L., Bertozzi C.P., Marigo J., Cremer M., Domit C., Azevedo A.F., Dorneles P.R., Torres J.P.M., Lailson-Brito J., Malm O., y Barceló D. 2012. Natural and anthropogenically-produced brominated compounds in endemic dolphins from Western South Atlantic: Another risk to a vulnerable species. *Environmental Pollution* 170:152-160.

AOAC 2006. Official methods 999.11; *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 9: 19.

ATSDR 1999. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Cadmium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Aznar F. J., Rraga J. A., Corcuera J. y Monzón F. 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia*, 59 (3): 427-435.

Bassoi, M. 2005. Feeding ecology of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), and oceanographic processes on the Southern Brazilian coast. Tesis doctoral de Graduate school of the National Oceanographic Centre, Southampton, 190pp.

Beck K. M., Fair P., McFee W. y Wolt D. 1997. Heavy metals in liver of bottlenose dolphin stranded along the South Carolina coast. *Marine Pollution Bulletin*, 34: 734-739.

Bennett P.M., Jepson P.D., Law R.J., Jones B.R., Kuiken T., Baker J.R., Rogan E. Y Kirkwood J.K. 2001. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Environmental Pollution* 112: 33-40.

Bergamino L., Muniz P., Defeo O. 2009. Effects of a freshwater canal discharge on polychaete assemblages inhabiting an exposed sandy beach in Uruguay. *Ecological Indicators* 9(3):584-587.

Bergamino L., Szteren D. y Lercari D. 2012. Trophic Impacts of Marine Mammals and Seabirds in the Río de la Plata Estuary and the Nearshore Oceanic Ecosystem. *Estuaries and Coasts*, 35:(6) 1571-1582.

Bernát N., Köpcke B., Yasseri S., Thiel R. y Wolfstein K. 1994. Tidal variation in bacteria, phytoplankton, zooplankton, mysids, fish and suspended particulate matter in the turbidity zone of the Elbe estuary; Interrelationships and causes. *Netherland Journal of Aquatic Ecology*, 28: (3-4), 467-476.

Bonde R.K., Aguirre A.A. y Powell J. 2004. Manatees as Sentinels of Marine Ecosystem Health: Are They the 2000-pound Canaries? *EcoHealth* 1(3):255-262.

Borja A., Bricker S. B., Dauer D.M., Demetriades N.T., Ferreira J.G, Forbes A.T., Hutchings P., Jia X., Kenchington R., Marques J.C. y Zhu C. 2008. Overview of integrative tools and

methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Marine Pollution Bulletin* 56: 1519–1537.

Borja A., Bald J., Franco J., Larreta J., Muxika I., Revilla M., Rodríguez Germán J., Solaun O., Uriarte A. y Valencia V. 2009. Using multiple ecosystem components, in assessing status in Spanish (Basque Country) *Atlantic Marine Waters* 59:54-64

Borja A., Dauer D.M., Grémare A. 2012. The importance of setting targets and reference conditions in assessing marine ecosystem quality. *Ecological Indicators*, 12(1): 1-7

Borrell A. y Aguilar A. 1990. Loss of organochlorine compounds in the tissues of a decomposing stranded dolphin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* , 45: 46–53.

Bowen W.D. 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 158:267-274.

Brownell, R. L. J. 1975. Progress report on the biology of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, in uruguayan waters. *Journal of Fisheries Research* 32:1073–1078.

Burnham M.A. y Anderson D.R. 2002. Model selection and inference: a practical information-theoretic approach (2da Ed.). 1998 S Springer-Verlag, New York Inc, EEUU, 488 pp

Bustamante P., Caurant F., Fowler S.W. y Miramand P. 1998. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Science of Total Environment* 220: 71-80.

Calliari D., Gómez M. y Gómez N. 2005. Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata: large-scale distribution and relationship with environmental variables during spring cruise. *Continental Shelf Research* 25: 197-210.

Carsen A. 2003. Aportes de Contaminantes y Sedimentos al Río de la Plata Interior. Franja Costera: Calidad de Agua, Sedimentos y Presencia de Contaminantes en Biota (Primer Borrador), 30pp. Documento perteneciente a Freplata (PNUD/GEF RLA/99/G31), Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitat.

Castello H. P., Junin M., Rotman F. y Sartí G. C. 2000. Análisis de contaminantes organoclorados y metales pesados en franciscana, *Pontoporia blainvillei*, de Argentina y Brasil. UNEP/CMS (Eds). Report of the Third Workshop for Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Southwestern Atlantic. UNEP/CMS, Bonn, 16pp.

CCCB 2011a. Centro Coordinador del Convenio de Basilea para América Latina y el Caribe. http://www.ccbasilea-crestocolmo.org.uy/wp-content/uploads/2011/08/EstudioPiloto_Scrn.pdf. Acceso 27/10/2013

CCCB 2011b. Centro Coordinador del Convenio de Basilea para América Latina y el Caribe, <http://www.ccbasilea-crestocolmo.org.uy/wp-content/uploads/2011/08/Inventario-Emisiones-Mercurio-Industria-Uruguay.pdf>. Acceso 27/08/2013

Chen C., Amirbahaman A., Fisher N., Harding G., Lamborg C. Nacci D. y Taylor D. 2008. Methylmercury in marine ecosystem: spatial patterns and processes of production, bioaccumulation and biomagnification. *Ecohealth* 5(4): 399-408.

CMS 2012. Convention on Migratory Species/UNEP.
<http://www.cms.int/documents/index.htm>. Acceso 27/08/2012

Corrales C., Acuña A., Salhi M., Saona G., Odino R., Gabrielli A., Piuma L., Reina E. y Brugnoli E. en prensa. Study of Cu, Zn, As and Hg content in two fish (*Micropogonias furnieri*, *Mugil platanus*) from the coastal zone of Montevideo (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*.

Costa U.P., Abud C., Secchi E.R. y Lessa E.P. 2012. Population Genetic Structure and Social Kin Associations of Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Journal of Heredity* 103(1):92-102

Crespo E. A., Harris G. y González R. 1998. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Marine Mammal Science*, 14: 845-849.

Dauvin J. C. 2007. Paradox of estuarine quality: Benthic indicators and indices, consensus or debate for the future. *Marine Pollution Bulletin* 55:271-281.

Davis J.A., Ross J.R.M., Bezalel S.N., Hunt J.A., Ichikawa G., Bonnema A., Heim W.A., Crane D., Swenson S., y Lamerdin C. 2013. Contaminants in Fish from California Rivers and Streams. A Report of the Surface Water Ambient Monitoring Program (SWAMP). California State Water Resources Control Board, Sacramento, CA.

Denton G. R. W., Harsh H., Heinsohn G. E. y Burdon-Jones C. 1980. The unusual metal of the dugong, *Dugong dugong*. *Marine Biology*, 57: 201-219.

Di Benedetto, A. P. y Ramos, R. M. A. 2000. *Pontoporia blainvillei* (Gervais and D'Orbigny, 1844) in the northern Rio de Janeiro (21° 18'S - 22° 25'S), Brazil. Technical Paper WP11 presented to the IV Workshop para a Coordenação, da Pesquisa e Conservação da Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, no Atlântico Sul Ocidental. 05-09 November, Porto Alegre.

Dietz R. 2008. Contaminants in Marine Mammals in Greenland with linkages to trophic levels, effects, diseases and distribution. Tesis doctoral. National Environmental Research Institute, University of Aarhus, Dinamarca. 124pp.

Dietz R., Riget F, Hobson K.A., Heide-Jørgensen M.P., Møllera P., Cleemann M., Boer J. y Glasius M. 2004. Regional and inter annual patterns of heavy metals, organochlorines and stable isotopes in narwhals (*Monodon monoceros*) from West Greenland. *Science of The Total Environment* 331(1-2) 83-105.

Dorneles P. R., Lilson-Brito J. Jr., Secchi E. S., Bassoi M., Lozinsky C. P. C., Torres J. P. M. y Malm O. 2007a. Cadmium concentrations in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from south brazilian coast. *Brazilian journal of Oceanography* 55(3): 179-186.

Dorneles P. R., Lailson-Brito J. Jr., Dos Santos A. R., Da Costa P.A.S., Malm O. Azevedo A.F. y Torres J.P.M. 2007b. Cephalopods and cetaceans as indicators of offshore bioavailability. *Environmental Pollution* 148: 352-359.

Drescher H. E., Harms U. y Huschenbeth E. 1977. Organochlorines and heavy metals in the harbour seal *Phoca vitulina* from de German North Sea Coast. *Marine Biology*, 41: 99-106.

EcoPlata 1998. El Río de la Plata. Una Revisión Ambiental. Un Informe de Antecedentes del Proyecto EcoPlata. Wells, P. G. y Dabron G. R. (Eds). Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, 256pp.

EcoPlata 1999. Diagnóstico Ambiental y Socio-Demográfico de la Zona Costera del Río de la Plata. Recopilación de Informes Técnicos, INAPE, SOHMA, Universidad de la Republica Facultad de Ciencias y de Ciencias Sociales, PNUD IDRC, CIID, DINAMA, Ministerio de Vivienda y ordenamiento territorial y medio ambiente. UNESCO, 991pp.

Elbaz-Poulichet F. C., Garnier J. M., Guan D. M., Martin J. M. y Thomas A. J. 1996. The conservative behaviour of trace Metals (Cd, Cu, Ni and Pb) and As in the surface plume of stratified estuaries: Example of the Rhone river (France) estuarine. *Coastal and Shelf Science*, 42(3): 289-310.

EPA 1994. Recommended guidelines for sampling marine mammal tissue for chemical analyses in Puget Sound. U.S, Environmental Protection Agency. Puget Sound Water Quality Authority, Washington, EEUU, 71 pp.

Evans P.G.H. 2013. Chemical Pollution and Marine Mammals. En: Proceedings of the ECS Workshop, European Cetacean Society's 25th Annual Conference, 99pp, Cadiz, España.

Fairbrother A., Wenstel R., Sappington K. y Wood W. 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 145–227.

FAO 2006, Taller subregional sobre aseguramiento de la calidad y validación de la metodología para análisis químicos. BPL y Norma ISO/IEC 17025

Fitch J.E. y Brownell Jr. R.L. 1977. Food habits of the franciscana *Pontopori blainvillei* (Cetacea:Platanistidae) from south america. *Bulletin of Marine Science* 21(2):626-636.

Foglia M. 2008. Niveles de mercurio y cadmio en franciscana, *Pontoporia blainvillei* a lo largo de la costa uruguaya. Tesis de Licenciatura en Área Oceanografía, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo. Uruguay 49 pp

Fujise Y., Honda K., Tatsukawa R. y Mishima S. 1988. Tissue distribution of heavy metals in Dall's porpoise in the northwestern Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 19: 226–230.

Furness R.W. 1990. Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Florida, EEUU, 256pp.

Galloway T. S., Brown R. J., Browne M. A., Dissanayake A., Lowe D., Jones M. B. y Depledge M. H. 2004. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58:233-237.

Geo Montevideo 2004. Informe Ambiental. Gabriella Feola G., Gómez A., Herou L. y Scarlatto G. (Eds). Publicado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), Oficina Regional para América Latina y el Caribe y la Intendencia Municipal de Montevideo con el apoyo del Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y el Grupo Ambiental de Montevideo (GAM). Montevideo, Uruguay, 196pp.

Geo Uruguay 2008. Informe del Estado del Ambiente. Informe elaborado por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), Centro Latino Americano de Ecología Social (CLAES) y Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), 352 pp, Montevideo, Uruguay.

Gerpe M. S., Moreno V. J., Rodríguez D. y Bastida R. 2000. Contaminación por metales pesados en *Pontoporia blainvillei*. En: Report of the Third Workshop for Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Southwestern Atlantic. UNEP/CMS (Eds.), 83-84pp, Bonn, Alemania.

Gerpe M., Rodríguez D., Moreno V., Bastida R. y Moreno J. E., 2002. Accumulation of heavy metals in franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) from Buenos Aires Province, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Mammals (special issue)*, 1: 95-106.

Habran S., Pomeroy P.P., Debier C. y Dasa K. 2013. Changes in trace elements during lactation in a marine top predator, the grey seal. *Aquatic Toxicology* 126: 455-466.

Hartig, J.H., Zarull M.A., Ciborowski J.J.H., Gannon J.E., Wilke E., Norwood G. y Vincent A. 2007. State of the Strait: Status and Trends of Key Indicators. Great Lakes Institute for Environmental Research, Occasional Publication No. 5, University of Windsor, Ontario, Canada. ISSN 1715-3980

Hatch W. R. y Ott W. 1968. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 40: 2085-2087.

Hodson P. V. 1990. Indicators of ecosystem health at the species level and the example of selenium effects on fish. *Environmental monitoring and Assessment* 15:241-254.

Hurvich C. M. y Tsai C.L. 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* 76: 297-307.

Ré M. y Menéndez A.N. 2003. Modelo Hidrodinámico del Río de la Plata y su frente marítimo. En: Proyecto de Protección Ambiental del Río de la Plata y su frente marítimos: prevención y control de la contaminación y restauración de hábitats, PNUD/GEF RLA/99/G31, 68 pp, Argentina.

Informe Ambiental, 2003. Informe ambiental de Montevideo. Grupo ambiental de Montevideo. [http:// www.gam.org.uy/infamb.htm](http://www.gam.org.uy/infamb.htm). Acceso 1/10/2013.

INIA 2004. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Informe del seminario de actualización técnica para la fertilización fosfatada de pasturas en la región este. http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/tt/ad/2004/ad_356.pdf. Acceso 27/08/2013.

IPCS 2005. Programa internacional de seguridad química. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0056.pdf>. Acceso 27/08/2013

Jakimska A., Konieczka P., Skóra K. y Namieśnik J. 2011. Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5): 1117-1125.

Janiot L. J., Sik E., Marcucci O., Gesino A., Molina D. A., Martinez L. L. y Marcucci P. 2003. Contaminantes orgánicos persistentes (Cops) y metales pesados en agua y sedimentos del río de la Plata y su frente marítimo. Documento perteneciente al proyecto Freplata 2003, presentado en las V Jornadas de Ciencias del Mar, Mar del Plata, Argentina, 4pp.

Jessup D., Harris M., Kreuder C., Ames J., Conrad P. y Miller M. 2004. Southern Sea Otter as a Sentinel of Marine Ecosystem Health. *EcoHealth*, 1(3): 239-245

Jorhem L., 2000. Determination of metals in foods by atomic absorption spectrophotometry after dry ashing. NMKL collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 83(5):1204-1211.

Kasuya T. y Brownell Jr., R. L. 1979. Age determination, reproduction and growth of the Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Scientific Reports of the Whales Research Institute*, 31: 45-67.

Kunito T., Nakamura S., Ikemoto T., Anan Y., Kubota R., Tanabe S., Rosas F.C.W., Fillmann G. y Readman J.W. 2004. Concentration and subcellular distribution of trace cetaceans incidentally caught along the Brazilian elements in liver of small coast. *Marine Pollution Bulletin* 49: 574-587.

Lahaye V., Bustamante P., Dabin W., Churlaud C. y Caurant F. 2007. Trace element levels in foetus-mother pairs of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded along the French coasts. *Environment International* 33(8):1021-8

Lailson-Brito J. Jr. 2000. Estudo ecotoxicológico de metais-traço (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e Pb) em cetaceos da costa do estado do Rio de Janeiro. Master Dissertation. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Brasil, 107pp.

Lailson-Brito J. Jr, Kehrig J., Amaral H. y Malm O. 2002. Total e Metilmercúrio nos tecidos do Boto-Cinza, *Sotalia fluviatilis* (Cetacea, Delphinidae), da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. En: PIAGET, Instituto. (Org.). *Bioindicadores*, 291-300 pp.

Laurier, F. J. G., Cossa, D., Gonzalez, J. L., Breviere, E. y Sarazin, G. 2003. Mercury transformations and exchanges in a high turbidity estuary. *Geochimica, Cosmochimica*, 67(18): 3329-3345.

Leermarkers, M., Galletti, S., De Galan, S., Brion, N. y Baeyens, W. 2001. Mercury in the Southern North Sea and Scheldt estuary *Marine Chemistry*, 75: 229-248.

Marcovecchio J. E, Moreno V. J. y Perez A. 1988. Determination of heavy metal concentrations in biota of Bahía Blanca, Argentina. *Science of Total Environment*, 75:181-190.

Marcovecchio J. E, Moreno V. J. y Perez A. 1989. Cadmium, zinc and total mercury distribution in organisms from Samborombón Bay (La Plata river estuary), in Argentina. Proceeding of International Conference, *Heavy Metals in the environment*, 1:366-369.

Marcovecchio J., Moreno V. J., Bastida R. O., Gerpe M. S. y Rodríguez D. H. 1990. Tissue distribution of heavy metals in small cetaceans from the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 21: 299-304.

Marcovecchio J., Gerpe M. S., Bastida R. O., Rodríguez D. H., y Morín S. G. 1994. Environmental contamination and marine mammals in coastal waters from Argentina: an overview. *The Science of the Total Environment*, 154: 141-151.

Mason R. P. 2002. The bioaccumulation of mercury, methylmercury and other toxic elements into pelagic and benthic organisms. En: Coastal and Estuarine Risk Assessment. M.C. Newman, M.H. Roberts y R.C. Hall (Eds), CRC/Lewis Publisher., Washington (EEUU), 127-149 pp.

Méndez E., Giudice H., Pereira A., Inocente G. y Medina D. 2001. Total mercury content-fish weight relationship in swordfish (*Xiphias gladius*) caught in the Southwest Atlantic Ocean. *Journal of Food Composition Analysis*, 14: 453-460.

Meng W. y Liu L., 2010. On approaches of estuarine ecosystem health studies *Estuarine, Coastal and shelf Science* 86: 313-316

Monteiro-Neto C., Vinhas Itavo R., De Souza Moraes L. E. 2002. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceará, northeast Brazil. *Environmental Pollution*, 123: 319-324.

Muir D., Braune B., DeMarch B., Norstrom R., Wagemann R., Lockhart L., Hargrave B., Bright D., Addison R., Payne J. y Reimer K. 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. *The Science of The Total Environment* 230(1-3):83-144.

Muniz P., Venturini N. y Martinez A. 2002. Physico-chemical and pollutants of the benthic environment of the Montevideo coastal Zone, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin* 44:962-968.

Muniz P., Venturini N., Pires-Vanin A. M. S., Tommasi L. R. y Borja A. 2005. Testing the applicability of a Marine Biotic index (AMBI) to assessing the ecological quality of soft-bottom benthic communities, in the South America Atlantic region. *Marine Pollution Bulletin* 50:624-637.

Norma ISO 17025 2005. Norma Unit – ISO/IEC 17025:2005 Punto 5.4.2 Selección de métodos (5.4 Métodos de ensayo, calibración y validación de los métodos).

Norma ISO 17025 2005a. Norma Unit – ISO/IEC 17025:2005 Punto 5.9 (Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración).

O'Shea T. J. 1999. Environmental Contaminants and Marine Mammals. En: Biology of marine mammals, J.E Reynolds III y S.A. Rommel (Eds.). Smithsonian Institution Press, Washington (EEUU), pp. 485-560.

O'Shea T. J., Brownell Jr., R. L., Clark, D. R., Walker, W. A., Cay, M. L. y Lamont, T. G. 1980. Organochlorine pollutants in small cetaceans from the Pacific and South Atlantic Ocean. *Pesticide Monitoring Journal* 2: 35-46.

Olsson M. 1977. Mercury, DDT and PCB in aquatic test organisms. Baseline and monitoring studies, field studies on biomagnification, metabolism and effects of some bioaccumulating substances harmful to the Swedish environment. Report from the National Swedish Environmental Protection Board 1977, 139 pp.

OPP/OEA/BID 1992. Oficina de Planeamiento y Presupuesto/Organización de los Estados Americanos/Banco Interamericano de Desarrollo. Uruguay Estudio Ambiental. Washington, D.C., Estados Unidos.

Panebianco M.V., Negri M.F., Botté S.E., Marcovecchio J.E., Cappozzo H. 2011. Metales pesados en el riñón del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) y su relación con parámetros biológicos. *Latin American Journal Aquatic Research* 39, 526–533.

Panebianco M.V., Botte S.E., Negria M.F., Marcovecchiob J.E., y Cappozzo H.L. 2012. Heavy Metals in Liver of the Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from the Southern Coast of Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 7: 33-41.

Phillips D. J. H., 1970. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review. *Environmental Pollution* 13(4): 281-317.

Pinedo, M. C., Praderi, R. y Brownell, R. L. J. 1989. Biology and Conservation of the River Dolphins, chapter Review of the biology and status of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Orbigny, 1844). IUCN *Species Survival Commission Occasional*. Paper. No. 5.

PNUMA 2010. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Análisis del flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y el Caribe, 409 pp.

- Petersen J. K., Hansen J.W., Laurensen M. B., Clausen P., Carstensen J. & Conley D. 2008. Regime shift in a coastal marine system. *Ecological Applications* 18, 497–510.
- Polizzi P.S., Chiodi Boudet L.N., Romero M.B., Denuncio P.E., Rodríguez D.H. y Gerpe M.S. 2013 Fine scale distribution constrains cadmium accumulation rates in two geographical groups of Franciscana dolphin from Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 72:41-46.
- Praderi R. 1984. Mortalidad de Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en pesquerías artesanales de tiburón de la costa atlántica uruguaya. Actas III Reunión Iberoamericana de Conservación y Zoología de Vertebrados. *Museo Argentino de Ciencias Naturales, Zoolología XIII* (1-60): 259-272.
- Pugliares K.R., Bogomolni A.L., Touhey K.M., Herzig, S.M., Harry C.T. y Moore M.J. 2007. Marine mammal necropsy : an introductory guide for stranding responders and field biologists. Woods Hole Oceanographic Institution Technical Reports, The Cape Cod Stranding Network, Inc. EEUU.
- Ridgway J. y Shimmield G., 2002. Estuaries as repositories of historical contamination and their impact on shelf seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55:903-928.
- Roditi-Elasar M., Kerem D., Hornung H., Kress N., Shoham-Frider E., Goffman O. y Spanier E. 2003. Heavy metal levels in bottlenose and striped dolphin off the Mediterranean coast of Israel. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 491-52.
- Rodriguez R., Rivero L. y Bastida R. 2002. Feeding ecology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in marine and estuarine waters of Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Mammals 1 (Special Issue 1)*: 77-94.
- Rogers S.I. y Greenaway B., 2005. A UK perspective on the development of marine ecosystem indicators. *Marine Pollution Bulletin* 50(1): 9-19.
- Salas F., Marcos C., Neto J.M., Patrício J., Ruzafa-Pérez A. y Maruques J.C., 2006. User-friendly guide for using benthic ecological indicators in coastal and marine quality assesment. *Ocean & Coastal Management* 49:308-331.
- Sanpera C., González M. y Jover L. 1995. Heavy metals in two populations of North Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*). *Environmental Pollution* 91: 299-307.
- Secchi, E., Danilewicz, D., Ott, P. H., Ramos, R., Lazaro, M., Marigo, J. y Wang, J. 2002. Report of the working group on stock identity. The Latin American Journal of Aquatic Mammals, 1:47–54.
- Secchi, E.R. y Wang, J. I. 2003. *Pontoporia blainvillei* (Rio Grande do Sul/Uruguay subpopulation). In: IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org (Consulta diciembre 2006).
- Seixas T. G., Kehrig H. A., Fillmann G., Di Benedetto A. P. M., Souza C. M. M., Secchi E. R., Moreira I. y Malm O. 2007. Ecological and biological determinants of trace elements accumulation in liver and kidney of *Pontoporia blainvillei*. *Science of the Total Environment*, 385: 208–220.
- Seixas T.G., Kehrig H.A., Costa M., Fillmann G., Di Benedetto A.P.M, Secchi E.R., Souza C.M.M., Malm O. y Moreira I. 2008.Total mercury, organic mercury and selenium in liver and kidney of a South American coastal dolphin. *Environmental Pollution* 154(1):98–106.

- Siciliano S., Di Benedetto A. P. y Ramos R. M. A. 2002. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterizações dos habitats e fatores de isolamento das populações. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, 476: 1-15.
- Skoch E. J. 1990. Heavy metals in marine mammals: presence and analytical methods. En: Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation, pp. 127-137. L.A Dierauf (Ed), CRC Press, Boca Raton,
- Smith V.H., Tilman G.D. y Nekola J.C. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100:179-96.
- Soares, M. P. 1998. Proposta de uma metodologia para utilização de ossos de cetáceos como indicadores de poluição por chumbo (Pb). Bachelor Dissertation, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 73pp.
- Thrush S.F., Hewitt J.E., Dayton P.K., Coco G., Lohrer A.M., Norkko A. y Norkko J. y Chiantore M. 2009. Forecasting the limits of resilience: integrating empirical research with theory. *Proceedings of the Royal Society* 276: 3209–3217.
- Venturini N., Muniz P. y Rodriguez M. 2004. Macrobenthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-eastern coastal región of South America. *Marine Biology* 144:119-126.
- Viana, F. 2011. Niveles de metales en peces marinos. Informe técnico del Proyceto Valentines, Anexo ELB Marino.
- Viana F., Huertas R. y Danulat E. 2005. Heavy Metal levels in fish from coastal waters of Uruguay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 530–537.
- Vos J.G., Bossart G.D., Fournier M. y O'Shea T. J. 2003. Toxicology of Marine Mammals. Taylor & Francis Inc., EEUU.
- Wagemann R. y Muir D.C.G. 1984. Concentrations of heavy metals and organochlorines in marine mammals of northern waters: overview and evaluation. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*, 1279: 1-97.
- Wagemann R., Stewart R.E.A., Lockhart W.L., Stewart B.E y Povoledo M. 1988. Trace metals and methyl mercury: associations and transfer in Harp Seal (*Phoca groenlandica*) mothers and pups. *Marine Mammal Science* 4(4):339–355.
- Watanabe I., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A., Tatsukawa R. 1998. Age-Dependent Accumulation of Heavy Metals in Baikal Seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 35: 518-526.
- Wells R.S., Rhinehart H.L., Hansen L.J., Sweeney J.C., Townsend F.I., Stone R., Casper D. , Scott M.D., Hohn A.A. y Rowles T.K 2004. Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: Developing a health monitoring system. *Ecohealth* 1:246–254
- Wood M. C. y Van Vleet E. S. 1996. Copper, cadmium and zinc in liver, kidney and muscle tissue of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in Florida. *Marine Pollution Bulletin* 32: 886-889.
- Yamasaki F., Takahashi K. y Kamiya T. 1976. The liver of franciscana (la Plata dolphin), *Pontoporia blainvillei*. *Okajimas Folia Anatomica japonica* 52: 313-330.

Zhang B., Shen X. y Mumford S. L. 2012. Generalized degrees of freedom and adaptive model selection in linear mixed-effects models. *Computational Statistics & Data Analysis* 56 (3), 574–586.

Zuur A.F., Ieno E.N. y Walker N.J. 2009. Mixed effect modeling for nested data 101-142pp. En: *Mixed Effects Models and Extension in Ecology Data* (Gail M., Krickeberg K., Sanet J., Tsiatis A. y Wong W. Eds), Springer Verlag Business Media LLC, EEUU.