

92
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN
LIPOSOLUBLE PRESENTE EN EL
VITELLO DEL HUEVO DE LAS
TORTUGAS MARINAS *Dermochelys*
coriacea y *Lepidochelys olivacea*.



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JORGE ARTURO JUAREZ CERON



DIRECTORA DE TESIS: BIOL. ANA REBECA BARRAGAN ROCHA
CODIRECTOR: M. EN C. HUMBERTO GOMEZ RUIZ

México, D.F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



260963



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

*Análisis de la fracción liposoluble presente en el vitelo del huevo de las tortugas marinas
Dermochelys coriacea y Lepidochelys olivacea.*

realizado por Jorge Arturo Juárez Cerón.

con número de cuenta 8935059-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Biol. Ana Rebeca Barragán Rocha.

Propietario M. en C. Humberto Gómez Ruiz.

Propietario Dra. Maria del Carmen Uribe Aranzabal.

M. del Carmen Uribe

Suplente Dra. Luisa Alvarina Alba Lois.

Suplente Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO

*A mis padres Berna y Luis
con todo cariño.*

*A mis hermanos
Luis, Joss y Carlos*

*A Eunice
con todo mi amor*

A Luis y Julio

AGRADECIMIENTOS

A Juan Carlos y Lupita por todo su apoyo en la colecta de las muestras y por comerse lo que hacía aunque supiera a "trapo viejo".

A Humberto, Libertad, Livia, Ninel, Paty, Miguel, Pancho, Lety, Cristina, Guayo y Elisa, por su amistad y por todo el apoyo otorgado a esta tesis.

A Lucía, Pilar, Silvia, Adolfo, Regina, Adriana, Erika y Fernando por todo su apoyo y principalmente por hacerme sentir como en casa en el laboratorio.

Quiero agradecer especialmente a Georgina Duarte Lisci por la paciencia y dedicación con la que me guió en todo el trabajo experimental de la tesis y sin duda, por su amistad.

A todos mis compañeros de la Biología de Campo.

A Laura Sarti, por todas las oportunidades brindadas y por el regalo de su amistad a pesar de haber cavado toda una noche en la arena en pos de una nidada etérea.

A Ana Barragán por haberse dado tiempo siempre para escucharme y leer mis avances, por creer en mí y por su amistad.

A Humberto Gómez, por todo su apoyo, por levantarme el ánimo siempre que flaqueaba haciéndome creer que mi trabajo valía la pena y por esas comidas ¡deliciosas!.

A mis sinodales, Dra. Luisa Alba, Dra. María del Carmen Uribe y Biol. Julio Prieto por su revisión y comentarios a esta tesis.

A la UNAM, por la maravillosa experiencia de vivir en sus instalaciones y por todas las oportunidades que ofrece.

A Eunice, por todo el apoyo durante la carrera y por llenar de amor toda mi vida.

A Tarín, Lupita M., Claudia, Laura S., Gustavo, Cecilia y Alejandro, ya saben porque.

Es inevitable sentir un profundo agradecimiento y la necesidad de expresarlo en mi "primer gran obra literaria" a todas aquellas personas (hermanos, amigos, familiares, compañeros) que aunque no participaron directamente en la tesis, sí fueron indispensables en mi vida y mi formación. Sin embargo, al tratar de nombrarlos a todos por separado, me arriesgo a no terminar u omitir a alguno por descuido. Por lo que, por todos esos momentos compartidos (buenos y malos) por todo el cariño, por todos sus pensamientos y sentimientos...

Mil gracias a TODOS.

ad imo pectore.

Esta tesis recibió el apoyo de Fundación UNAM, a través de su programa de becas y se realizó con el permiso No. 4235 expedido el 09 de noviembre de 1995 por la Dirección General de Aprovechamiento Ecológico de los Recursos Naturales; I.N.E., México, D.F.

RESUMEN

Con el fin de determinar cualitativamente los componentes grasos de la yema del huevo de dos especies de tortuga marina se colectaron 11 vitelos de *Lepidochelys olivacea* así como 14 vitelos de *Dermochelys coriacea*; y se les realizó una extracción de la fracción grasa con hexano. Este extracto, se separó en una fracción saponificable y otra no saponificable. Ambas fracciones se concentraron en una corriente de nitrógeno y se inyectaron a un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

Se determinó el perfil de ácidos grasos de ambas especies, estableciendo semejanzas y diferencias. Las características de los mismos, coinciden con lo descrito para animales de climas fríos en el caso de la laúd. Pequeños cambios aleatorios en los ácidos grasos minoritarios del vitelo de tortuga laúd, sugirió una eventual alimentación de los adultos en zonas de reproducción. Los resultados aquí obtenidos se comparan con otros análisis semejantes realizados en la grasa dérmica de otras especies de tortuga marina.

En la fracción no saponificable se observó la presencia de colesterol y vitamina E así como ceras y contaminantes provenientes de plásticos, éstos dos últimos no habían sido reportados para los huevos de tortuga marina. Algunos de los contaminantes encontrados se han reportado como potencialmente tóxicos afectando la fisiología reproductiva de algunos organismos.

INDICE

	pag.
I. INTRODUCCIÓN	01
1. MARCO TEÓRICO	02
1.1 BIOLOGÍA DE TORTUGAS MARINAS	02
1.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO ENERGÉTICO DE LOS HUEVOS	08
1.3 EVÁLUACIÓN DE CONTAMINANTES	16
1.4 BASES DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	23
4. HIPÓTESIS	24
5. ÁREA DE ESTUDIO	25
II. MÉTODO	27
1. TRABAJO EN CAMPO	28
2. TRABAJO EN LABORATORIO	30
3. ANÁLISIS DE DATOS	32
III. RESULTADOS	35
1. FRACCIÓN SAPONIFICABLE	35
2. FRACCIÓN NO SAPONIFICABLE	40
3. CONTROL DE REACTIVOS.	46
IV. DISCUSIÓN	47
1. FRACCIÓN SAPONIFICABLE.	47
2. FRACCIÓN NO SAPONIFICABLE.	54
V. CONCLUSIONES	61
VI. LITERATURA CITADA	63
ANEXOS	<i>i</i>

I INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista ecológico y evolutivo, el estudio de la energía invertida en el huevo por muchos reptiles ovíparos resulta interesante, ya que dicha materia representa el aporte parental más importante a la descendencia. Los estudios de la energía contenida en los huevos de tortuga son importantes ya que por medio de éstos es posible inferir la calidad y cantidad de alimento disponible para la madre, lo que repercute directamente en el tamaño y fuerza de las crías así como la variación de tiempo para la emergencia de las crías del nido en las diferentes especies de tortugas. Por ser la yema portadora de moléculas que aportan energía al embrión, los estudios que sobre ésta se reportan son muy útiles para saber en que medida afecta al desarrollo del embrión la cantidad de grasas en los huevos de las tortugas (Congdon, *et al.*, 1983 y Martín, 1984).

Hasta el momento la composición de ácidos grasos en los aceites de tortuga se ha estudiado con el fin de poder relacionarlo con la identificación entre especies y para vigilar su posible presencia en algunos cosméticos y alimentos; además podría proveer información de los posibles sitios de alimentación y saber en qué forma puede influir la deficiencia de ácidos grasos esenciales en las hembras al momento de anidar (Joseph *et al.*, 1985 y Seaborn y Moore, 1994).

Las diferencias biológicas de cada las especies estudiadas en este trabajo, en cuanto a hábitos alimentarios, distancias recorridas en sus migraciones, número de huevos por nidada y el número de nidadas en una temporada, son puntos interesantes a comparar en la inversión energética de cada huevo hecha por las hembras de cada especie. Al comparar los perfiles de ácidos grasos de la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y la golfina (*Lepidochelys olivacea*), resultará interesante

observar las diferencias que presenten, e inferir si se deben a las diferencias de historias de vida, así como a las características reproductivas y alimentarias de ambas especies.

Es bien conocido cómo el hombre ha afectado la sobrevivencia de las especies de tortuga marina ya sea por saqueo de nidos, captura de tortugas en redes de barcos pesqueros, urbanización y la introducción de fauna nociva en las playas; sin embargo no se ha hecho mucho énfasis en el daño causado por los contaminantes. En lo que respecta a los contaminantes liposolubles como grasas y aceites se sabe que provocan en las tortugas marinas irritación en los ojos y sistema respiratorio, algunas disfunciones de la glándula de sal entre otros (Hutchinson y Simmonds 1991), ocasionando con esto, serias alteraciones en la búsqueda de alimento, en la fuga de depredadores y la atracción sexual (Laws, 1993 en: Hernández 1995).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 BIOLOGÍA DE TORTUGAS MARINAS.

Las tortugas marinas son reptiles de los más antiguos, teniendo su apogeo durante el periodo Cretácico, hace 130 millones de años (Cruz y Ruiz, 1984). Taxonómicamente se encuentran dentro del orden Testudines, distribuidas en dos familias (Márquez, 1990):

Cheloniidae:

- Caretta caretta* (caguama)
- Chelonia mydas* (verde)
- Chelonia agassizii* (prieta)
- Eretmochelys imbricata* (carey)
- Lepidochelys olivacea* (golfina)
- Lepidochelys kempii* (lora)
- Natator depressus* (Kikila)

Dermochelyidae:

- Dermochelys coriacea* (laúd)

En general, las tortugas marinas, se caracterizan por tener una concha que protege a los órganos internos, dividida en una parte ventral (plastrón) y una dorsal (caparazón) cubiertas por escudos córneos de origen epidérmico; su cráneo es de tipo anápsido; sus extremidades están modificadas en aletas; su respiración es de tipo pulmonar y su alimentación varía de acuerdo al hábitat de cada especie. Son especies migratorias y la mayoría tiene distribución tropical, aunque algunos ejemplares de *D. coriacea* se han encontrado en zonas de aguas frías. Al igual que todos los reptiles son ectotermos; presentan dimorfismo sexual en su etapa adulta, distinguiéndose los machos por su cola y uñas más desarrolladas; con frecuencia las hembras tienen el caparazón más alto y son más pesadas. Las tortugas marinas dependen del medio terrestre durante su época reproductiva y es durante este periodo cuando se puede obtener mas información sobre su biología (Benabib y Cruz, 1981; Cruz y Ruiz, 1984; Eckert, 1991; Sarti *et al.*, 1994).

A lo largo de su historia, las diferentes especies de tortugas marinas se han enfrentado a diversos problemas tales como la sobreexplotación, pesca incidental y reducción de zonas de anidación; lo que ha traído como consecuencia que las poblaciones disminuyan y sean consideradas como especies en peligro de extinción (Diario Oficial de la Federación, 1986). En México, gracias a su situación geográfica, se encuentran algunas de las playas más importantes de anidación para 6 de las 7 especies existentes de tortugas marinas incluyendo una especie endémica, la tortuga lora *Lepidochelys kempii*. (Márquez, 1990; Sarti *et al.*, 1994). En el caso particular de la tortuga laúd el número de hembras ha demostrado un drástico decremento en los últimos doce años en todo el Pacífico mexicano y si bien se tienen diferentes hipótesis para explicar este

fenómeno se desconocen las causas (Sarti, *et al.*, 1996).

Sumado a lo anterior, dado el escaso conocimiento biológico y reproductivo que se tiene de dichas especies, surge la necesidad de implementar programas de investigación y protección, teniendo como objetivo el frenar los procesos de deterioro del hábitat y sus recursos, así como el restablecimiento del número de individuos de las poblaciones naturales (Cruz y Ruiz, 1984; Sarti *et al.*, 1993; Sarti *et al.*, 1994). En México estos esfuerzos de protección e investigación inician oficialmente en 1966, mediante el establecimiento de campamentos tortugeros (INP, 1990).

Descripción de las especies de interés:

Dermochelys coriacea (Vandelli, 1761); tortuga laúd, siete filos, de altura:

Esta tortuga es la única representante viviente de la familia Dermochelyidae. La tortuga laúd es la más grande de las tortugas marinas, su caparazón es voluminoso y alargado formado por placas osteodérmicas, es relativamente flexible y su textura es parecida a la del caucho, el grosor del caparazón es aproximadamente de 4 cm. con una capa subepidérmica principalmente constituida de grasa; el caparazón está dividido por siete quillas dorsales y 5 ventrales. Las aletas anteriores, son proporcionalmente más grandes que en las demás especies. En la parte superior de la mandíbula presentan dos proyecciones en forma de cúspides (figura 1a). La anatomía y fisiología de esta especie también es distintiva, pueden mantener la temperatura corporal varios grados arriba de la temperatura ambiental, lo que le permite desarrollarse en aguas frías. Lo anterior es debido a un eficiente sistema de contracorriente en las aletas y a la gruesa capa subepidérmica de lípidos. Posee un esqueleto único entre

las tortugas marinas, con gran cantidad de tejido cartilaginoso y una amplia zona de canales vasculares en las regiones epificiales (Eckert, 1991; Márquez, 1990, Greer *et al.* 1973, Rhodin, *et al.*, 1981; Sarti, *et al.*, 1994).

La anidación es típicamente nocturna, con preferencia en playas continentales; cada hembra llega a desovar a intervalos de 10 días aproximadamente con un promedio de 5 a 10 veces por temporada, el promedio de nidada es de 70 huevos cuyo periodo de incubación es de 60-65 días. En el Pacífico mexicano, la temporada de anidación va de noviembre a febrero, aunque empieza a haber anidaciones desde finales de agosto (Eckert, 1991; López, *et al.*, 1994).

La tortuga laúd es de hábitos pelágicos y su distribución es pantropical. sus zonas de anidación en México se localizan a lo largo de la costa del Pacífico, principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca, encontrándose aquí aproximadamente el 50% de las hembras anidadoras del mundo. Su alimentación es básicamente de scifozoarios (medusas, sifonóforos y salpas constituidos por un material gelatinoso llamado mesoglea), algunos tunicados y gusanos marinos. El alimento es consumido en verano en aguas relativamente frías localizadas a lo largo de su área de distribución (Den Hartog y Van Nierop, 1984; Eckert y Eckert, 1989; Eckert, 1991; Márquez, 1990; y Pritchard, 1982). Se desconoce si esta especie se alimenta en las zonas de reproducción.

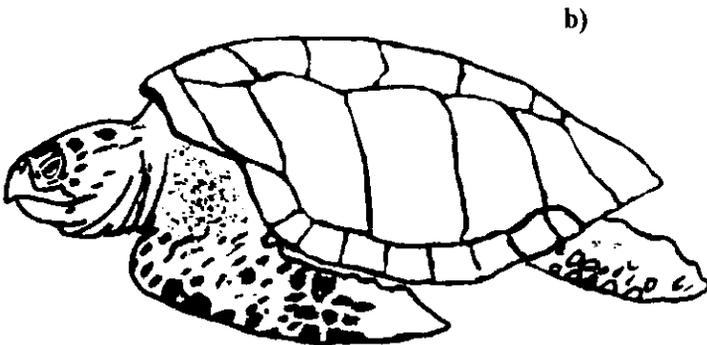
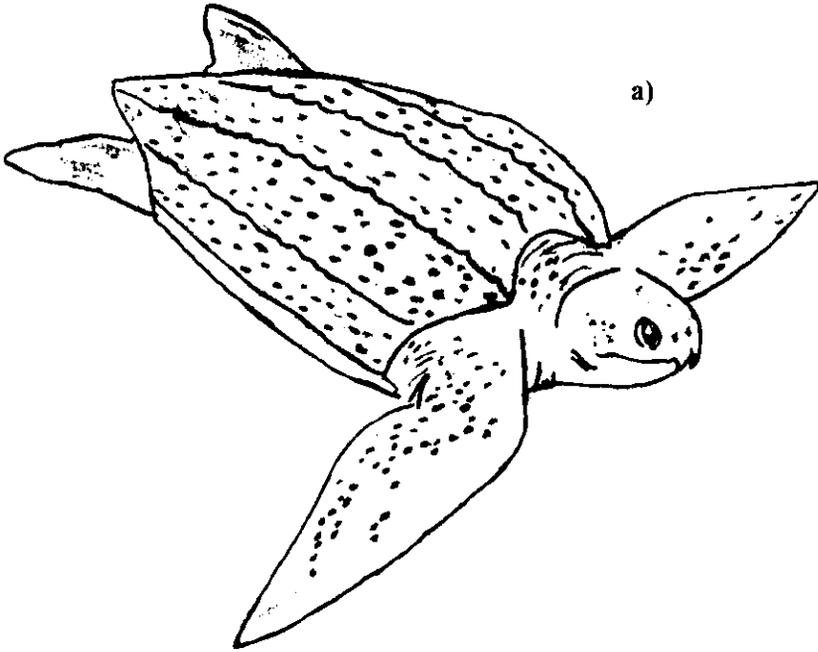


Figura 1. Tortuga laúd *Dermochelys coriacea* (a). Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (b)

Lepidochelys olivacea (Eschscholtz, 1829); golfina, olive ridley:

Pertenece a la familia Cheloniidae. En México es la tortuga más pequeña y abundante. Su caparazón es cordiforme casi circular, presentando de 6 a 8 y ocasionalmente 5 pares de escudos laterales (figura 1b). El caparazón es de color verde olivo y el plastrón es de color amarillo, las aletas y cuello son verde olivo por la parte superior y más claras por la parte inferior. En las aletas anteriores, tienen una o dos uñas. Su cabeza es relativamente larga en comparación con otras especies. En organismos juveniles, se distinguen quillas en el plastrón y caparazón que desaparecen conforme pasa el tiempo (Eckert, 1991; Márquez, 1990).

El dimorfismo sexual es muy evidente en adultos, los machos tienen una cola larga, que se extiende más allá del caparazón, sus caparazones son cóncavos y tienen uñas bien desarrolladas y curvas en cada aleta anterior (Eckert, 1991).

La tortuga golfina es una especie tropical de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. Su anidación es típicamente nocturna. Durante la temporada de anidación, pueden presentarse arribazones (anidaciones en masa). En México este fenómeno se presentaba en el Playón de Mismaloya (Jalisco), Piedra de Tlacoyunque (Guerrero), Bahía de Chacahua, La Escobilla y Morro de Ayuta (Oaxaca), reduciéndose actualmente a las dos últimas playas mencionadas. La temporada de anidación comprende entre junio y noviembre, las arribazones pueden ser entre 2-7 por temporada, aunque cada hembra no anida más de 2 veces. El número de huevos es de 155 en promedio con un periodo de incubación de 45-60 días (Eckert, 1991; Márquez, 1990).

Esta tortuga es de hábitos carnívoros y es poco específica en su dieta, alimentándose de organismos bentónicos y pelágicos.

encontrando moluscos, crustáceos, pequeños peces, madera, material vegetal, tunicados, cangrejos, camarón, etc. que se encuentran en un intervalo de profundidad que va desde 0 hasta 153 m (Barragán *et al.* 1992; Eckert, 1991; Márquez, 1990). Por lo tanto, a diferencia de la tortuga laúd, la golfina se alimenta en aguas más someras.

Ambas especies consumen organismos filtradores de agua y por lo tanto expuestos a ser almacenes vivientes de todos los contaminantes disueltos en su medio, lo que los hace biomagnificadores potenciales de la contaminación.

1.2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO ENERGÉTICO DE LOS HUEVOS

Dentro de las sustancias que proveen de energía a los animales, están aquellas que la proveen por oxidación; dicha energía es usada para la manutención de los procesos celulares y para la síntesis de nuevos tejidos. Los principales elementos que suministran energía para los animales son particularmente carbohidratos y grasas, que constituyen el grueso de la dieta en los animales heterótrofos maduros y representan frecuentemente más del 80% de la materia seca consumida y un requerimiento diario del 1% de la masa corpórea para los animales grandes y puede exceder el 10% de la masa corpórea en pequeños homeótermos (Prosser, 1991). Se ha demostrado que las crías de laúd tienen un coeficiente metabólico aproximadamente tres veces más grande que el de las tortugas verdes. Los valores máximos de consumo de oxígeno para tortuga verde y caguama son apenas similares a los registrados en la rutina de laúd (Lutcavage y Lutz, 1986). En este mismo estudio se calculó que las crías de laúd de alrededor de cinco días de nacidas consumen en promedio 1.76 Kcal. al día, por lo que tendrían que consumir aproximadamente 55.3g de medusa al día

para mantenerse y crecer; ésto representa un poco mas del 100% de su propio peso.

El vitelo de laúd es muy grande; ésto junto con su conducta (rechazo de cualquier alimento hasta el 5º o 11º día de nacidas), parecen indicar que las crías pueden durante los primeros días de vida dedicar toda su energía y tiempo a tomar camino por las más peligrosas áreas costeras sin molestarse por comer en este periodo, sobreviviendo con sus reservas vitelinas (Birkenmeier, 1971).

Los lípidos no son solo las moléculas mas importantes reconocidas como almacén de energía en animales, sino que también juegan un importante papel estructural; tanto en la superficie de los organismos, como en las membranas celulares, los lípidos son elementos esenciales que forman barreras entre el ambiente externo y el interno. Asimismo, en el metabolismo son de vital importancia ya sea como hormonas, segundos mensajeros, receptores de membrana, etc. (Gurr y Harwood, 1991).

Todos los compuestos de un huevo juegan un papel importante; sin embargo los lípidos por su versatilidad y utilidad durante toda la vida de los animales resaltan su importancia. Baste imaginar las primeras etapas de la vida de una tortuga marina, en las que el embrión toma forma generando una gran variedad de tejidos nuevos (importancia estructural) sin mas energía que la donada por la madre en forma de moléculas en el vitelo (importancia de almacén), y aún, con los reductos de esta energía generar un enorme esfuerzo físico para salir del nido, atravesar la playa y nadar hasta llegar después de un largo tiempo a una zona de alimentación (almacén y metabolismo).

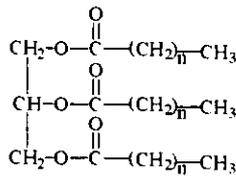
Fracción Liposoluble.

Un lípido es un compuesto orgánico de origen natural que es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos no polares. Esta definición incluye muchos tipos de compuestos. Las distintas clases de lípidos se relacionan entre si por esta propiedad física compartida, pero sus relaciones químicas, estructurales y funcionales, así como sus funciones biológicas son distintas. Su clasificación general es:

L	Lípidos simples	{	Grasas y aceites
I			Ceras
P	Lípidos compuestos	{	Fosfolípidos
I			Glucolípidos
D			Lipoproteínas
O	Sustancias asociadas a los lípidos	{	Vitaminas liposolubles
S			Hormonas

Grasas y aceites:

Las grasas y aceites constituyen en general una clase bien definida de sustancias neutras producidas por plantas y animales. Las grasas y aceites son sólidos o líquidos a la temperatura ambiente según el tipo y cantidad de ácidos grasos. Aquellos que son líquidos a temperatura ambiente tienen gran cantidad de ácidos grasos insaturados, mientras que las grasas o mantecas animales son generalmente sólidas o semisólidas a temperatura ambiente debido a que tienen gran cantidad de ácidos grasos saturados. Desde el punto de vista químico, las grasas y aceites son triglicéridos, es decir triésteres de glicerol, formados por la esterificación de grupos -OH del glicerol con ácidos grasos de cadena variable. La forma general de un triglicérido es:



Se les denomina triglicéridos simples si las cadenas de hidrocarburo son iguales o triglicéridos mixtos si son diferentes, siendo los segundos los que en su mayoría se encuentran en la naturaleza (Reyes 1993; Gurr y Harwood, 1991).

Cada aceite se compone de glicéridos que derivan de muchos ácidos carboxílicos diferentes. Las proporciones de los diversos ácidos varían de aceite a aceite, cada uno de ellos tiene una composición característica que no difiere mucho de una muestra a otra. Con solo unas pocas excepciones, los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza tienen un número par de átomos de carbono, porque se biosintetizan a base del grupo acetilo de dos carbonos de la acetil coenzima A (Reyes 1993).

Se han aislado hasta 100 clases diferentes de ácidos grasos procedentes de vegetales, animales y microorganismos; todos ellos poseen una cadena hidrocarbonada larga con un grupo carboxilo terminal, la cadena puede tener o no insaturaciones y/o ramificaciones, las cuales se producen por una enzima desaturasa específica que además mezcla la función de oxidasa creando dobles ligaduras en la mayoría de los casos en la configuración *Cis* (Prosser, 1991; Lehninger 1990).

Los ácidos grasos más abundantes poseen un número par de átomos de carbono, con cadenas comprendidas entre los 14 y los 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados en las plantas y en los animales que viven en temperaturas bajas; por otra parte aquellos ácidos grasos que

presentan un número impar de átomos de carbono, aparecen solo en cantidades mínimas en los animales terrestres, pero se presentan en cantidades importantes en muchos organismos marinos (Lehninger 1990).

Los animales no pueden sintetizar algunos ácidos grasos poliinsaturados (polienoicos), cuya deficiencia en la dieta causa serios efectos patológicos (inhibición del crecimiento y fallas reproductivas entre otros). A estos ácidos grasos se les conoce como ácidos grasos esenciales y los mas importantes son: Linoléico ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$), Linolénico ($C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$) y Araquidónico ($C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$). Los dos primeros son muy abundantes en vegetales, mientras que el ácido araquidónico se puede obtener a partir del ácido linoléico.

Los ácidos grasos esenciales son componentes de los fosfolípidos de membranas celulares y son precursores de varias series de sustancias biológicamente activas conocidas colectivamente como prostaglandinas, las cuales a su vez tienen profundos efectos metabólicos en el fluido sanguíneo (agregación de plaquetas sanguíneas, producción de anticuerpos y reacción de los tejidos a estimulantes, entre otros efectos en el organismo) (Prosser 1991; Lehninger 1990).

Ceras:

Las ceras son ésteres sólidos de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes grasos monohidroxílicos de cadena larga o con esteroides y tienen la fórmula general: RCOOR (Gurr y Harwood, 1991; Lehninger 1990).

Se ha dado por hecho que algunos recursos potenciales tales como las parafinas de cadena larga no pueden ser digeridos por los animales (Prosser, 1991); sin embargo, otros autores como Bauermeister

(1979) han demostrado que los ésteres de cera son metabolitos clave en el ambiente marino, ya que son sintetizados por una gran cantidad de animales marinos, principalmente por el zooplancton, siendo así la dieta de muchos peces y por lo tanto un vehículo para la transmisión del carbono en el intercambio de comida marina. Representan una considerable proporción del total de carbono fijado por medio de la fotosíntesis en los océanos y puede ser considerado como importantes intermediarios en el metabolismo del carbono. Además, las propiedades fisicoquímicas de los ésteres de cera difieren de los triglicéridos en que los primeros son más hidrofóbicos y menos densos, lo cual puede ayudar en la flotabilidad de los animales marinos (Bauermeister y Sargent, 1979; Gurr y Harwood, 1991).

Gran cantidad de análisis han demostrado que los ésteres de cera se encuentran en grandes cantidades en los animales que experimentan un corto periodo de abundante comida seguida de largos periodos de ayuno, por ejemplo en las regiones polares con un floramiento de fitoplancton en el corto verano, o en las aguas profundas donde la baja biomasa, provoca que los encuentros entre predadores y presas sean pocas y erráticas (Bauermeister y Sargent, 1979).

Aunque las verdaderas ceras son los ésteres mencionados en los párrafos anteriores, el término cera es también usado para referirse a una amplia mezcla de lípidos encontrados en las superficies de las hojas o el pelaje de los animales. Estos lípidos comprenden una compleja mezcla de ésteres de cera, hidrocarburos de cadena larga (alrededor de 30 carbonos), ácidos grasos de cadena larga no esterificados, alcoholes y esteroides. Son responsables del carácter impermeable de la superficie y son importantes conservando el

balance de agua del organismo y proveyendo una barrera contra el ambiente (Bauermeister y Sargent, 1979).

Esteroles.

Los esteroles constituyen una gran cantidad de compuestos derivados del complejo hidrocarburo tetracíclico saturado "perhidrociclopentano fenantreno". El colesterol es el más común esteroles animal y es el precursor para un largo conjunto de componentes con importantes funciones fisiológicas. El colesterol es un constituyente de la membrana celular; éste participa en el transporte de los ácidos grasos en la sangre; en su forma oxidada es un constituyente de sales biliares importantes en la digestión de la grasa; y precursor de vitamina D y hormonas esteroideas que tienen profundos efectos en el metabolismo y reproducción (Prosser, 1991; Lehninger, 1990).

Aparentemente, la mayoría de los animales usan colesterol en su metabolismo de lípidos, pero algunos animales no pueden sintetizarlos *de novo*. Los mamíferos sintetizan colesterol a partir de acetato (ácido acético); otras especies de animales parecen no requerir de colesterol o satisfacen sus requerimientos con cualquier otro esteroles como el ergosterol (Prosser, 1991).

Vitaminas.

Una vitamina es una sustancia orgánica que no puede ser sintetizada por un animal, pero sí es requerida en la dieta en bajas concentraciones para el funcionamiento normal del animal. Las vitaminas pueden ser sustituidas por organismos simbióticos o a partir de dietas en cantidades generalmente menores a 0.1% de la dieta en materia seca. Por convención, las vitaminas son agrupadas en base a

si son solubles en agua o grasa. Esta división arbitraria poco tiene que ver con sus funciones metabólicas, sin embargo las vitaminas solubles en agua (hidrosolubles) generalmente actúan como coenzimas, mientras que las vitaminas solubles en grasa (liposolubles) ocupan papeles más diversos.

Las vitaminas liposolubles incluyen a las vitaminas A, D, E, y K. Los vertebrados tienen un requerimiento metabólico para las cuatro vitaminas, sin embargo solo la vitamina A (o la provitamina caroteno) y la vitamina E son usualmente esenciales en la dieta. De estas últimas, es de mayor interés para este trabajo la vitamina E por su importancia en la reproducción de los organismos.

La vitamina E es un término genérico para un grupo de derivados liposolubles de Tocol y Tocotrienol que poseen actividad vitamínica, siendo la forma más activa de la vitamina E el D- α -tocoferol. La palabra "toco" en tocoferol, proviene del griego *tokos* que significa parto, porque ésta restablece la fertilidad en ratas deficientes en vitamina E. Los tocoferoles protegen a los lípidos poliinsaturados de membranas celulares contra el daño oxidativo. En diferentes invertebrados se ha demostrado la importancia de esta vitamina en la reproducción, principalmente como determinante en la oviposición y en la viabilidad del espermatozoide. La deficiencia de la vitamina E en peces teleósteos se ha manifestado en enfermedades tales como: eritropoiesis deficiente, fragilidad y fragmentación de eritrocitos, anemia extrema, alta mortalidad, acumulación de fluidos cerosos en la cavidad del cuerpo y acumulación de cuerpos de agua (diátesis exudativa); en cocodrilos se desarrolla esteatitis (acumulación de pigmentos ceroides en el tejido adiposo), mientras que en aves, esta deficiencia resulta en encéfalomalacia, diátesis exudativa o distrofia muscular nutricional. La adición de vitamina E o selenio en la dieta

prevendrá la ocurrencia de diátesis exudativa y distrofia muscular, pero la encéfalomalacia requiere la adición de vitamina E. En los mamíferos, las alteraciones provocadas por la deficiencia de vitamina E o selenio, incluyen retardo en el crecimiento de los animales jóvenes, distrofia muscular nutricional o "enfermedad del músculo blanco", desórdenes reproductivos incluyendo el nacimiento de crías débiles, infertilidad en machos y la reabsorción fetal en ratas (Prosser, 1991).

1.3. EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES.

Químicos Endócrino-Alterantes (QEA).

A pesar de no ser moléculas que se encuentren comúnmente en los cuerpos grasos de los seres vivos, no es posible pasar por alto los contaminantes que pueden encontrarse almacenados en la biota como bombas de tiempo.

Un gran número y grandes cantidades de QEA han sido liberados al ambiente desde la Segunda Guerra Mundial. Muchos de estos químicos pueden causar disturbios en el desarrollo del sistema endocrino y de los órganos que responden a señales endocrinas en organismos indirectamente expuestos durante su vida prenatal y/o postnatal temprana. Los efectos de esta exposición durante el desarrollo son permanentes e irreversibles. El riesgo de los organismos en desarrollo puede deberse a la exposición directa de la progenie después del nacimiento o la eclosión o bien, por una exposición transgeneracional, que es el resultado de la exposición de la madre a los QEA en cualquier momento a través de su vida antes de producir progenie debido a la persistencia de los QEA en los cuerpos grasos, los cuales son movilizados durante la puesta de huevos o el embarazo y la lactancia (Colborn, *et al.* 1993).

Los efectos de estos químicos no son comúnmente considerados como riesgosos para el humano y la vida salvaje; sin embargo, numerosos experimentos han demostrado el gran daño que causan en la biota ocasionando alteraciones organogénicas, teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas, glandulares, reproductivas y en el sistema inmune. Entre los QEA más comunes se encuentran una gran cantidad de pesticidas como herbicidas, fungicidas, insecticidas, nematocidas, etc. y químicos industriales entre los que se encuentran los PCB's, fenoles y ftalatos (Colborn, *et al.* 1993). Debido a las grandes cantidades de plástico que se vierten al mar, en cuya producción se utilizan los ftalatos, y por la gran cantidad de reportes que se tienen de tortugas marinas que ingieren plásticos, los ftalatos son de especial interés en este estudio.

Ftalatos:

Los ftalatos son de los químicos antropogénicos más abundantes que están en el ambiente; en el agua están presentes en concentraciones que van desde nanogramos hasta miligramos por litro. Son producidos industrialmente para dar flexibilidad a los plásticos (plastificantes) y pueden lixiviarse de estos materiales en agua, suelo o alimentos. Miles de toneladas de plásticos se depositan anualmente en rellenos de tierra, de esta forma se permite a los ésteres de ftalato migrar a las aguas subterráneas. La ubicuidad de estos compuestos en el medio acuoso es bien conocida y se han reportado en ríos, aguas potables y residuales, mar abierto, así como en biota y sedimentos (Jobling, *et al.* 1995; Giam, *et al.* 1978).

Hay una gran variedad de ftalatos, y comúnmente se detectan compuestos como Di-n-butil ftalato (DBP), Di-n-octil ftalato (DOP), Butil bencil ftalato (BBP) y Bis-(2-etilhexil) adipato (DEHA). Aunque no se ha

demostrado en todos los tipos de ftalatos, se asume que cualquiera de ellos tiene actividad estrogénica (Jobling, *et al.* 1995).

Todos los ftalatos tienen una tendencia a acumularse en tejidos grasos y pueden ser absorbidos a través de la piel humana muy fácilmente. Poco se conoce acerca del metabolismo de los ftalatos, sin embargo se sabe que en algunos organismos marinos se encuentran en menor concentración que otros contaminantes como el DDT y PCB cuando lo contrario ocurre en el medio marino, esto se debe según algunos estudios a que son más fácilmente metabolizados (Giam, *et al.* 1978). La toxicidad por vía oral de los ftalatos, en humanos es generalmente baja, sin embargo a altas concentraciones de estos compuestos (en particular DBP) en la fracción celular de esperma de hombre adulto, se correlaciona negativamente con la densidad o el número de espermatozoides. Cuando se administra en ratas en dosis altas, son tóxicos embriofetales y testiculares, en las hembras de rata el primer efecto en la reproducción es el aborto espontáneo o el decremento en el tamaño de la camada, además la administración de Di-n etil-hexil ftalato (DEHP) afecta la biosíntesis de lípidos en estos mismos organismos. Nada se sabe acerca de los posibles efectos estrogénicos y crónicos en la vida silvestre *in vivo*, en particular en el ambiente, marino cuando se administran en bajas concentraciones durante largos periodos de tiempo. Se tienen reportes de una reducción de eclosión en huevos de camarón marino provocado por DBP así como un decremento en el rango reproductivo de organismos acuáticos causados por DEHP (Jobling, *et al.* 1995; Giam, *et al.* 1978).

Hasta ahora, los ftalatos se han considerado como ligeramente estrogénicos en estudios *in vitro* (Jobling, *et al.*, 1995) y en ocasiones algunas publicaciones gubernamentales han concluido que los

ftalatos no representan un riesgo para el humano ni el medio ambiente (Canadian Environmental Protection Act, 1993; 1994a y 1994b), en ambos casos se reconoce que es necesario la experimentación *in vivo* y un monitoreo más detallado de la presencia de estos compuestos en el ambiente.

1.4. BASES DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Propiedades De Ésteres y Sales De Los Ácidos Grasos.

Al ácido carboxílico que se obtiene por hidrólisis de una grasa o aceite se le llama ácido graso. La hidrólisis de un éster puede llevarse a cabo en un medio ácido o en un medio básico, sin embargo, a diferencia de la primera, la hidrólisis básica, también llamada saponificación, es irreversible, por lo que se obtiene mejor rendimiento de ácido carboxílico y alcohol. El producto de la saponificación es la sal del ácido (carboxilato), generándose el ácido libre al acidificar la disolución (Reyes, 1993).

Los ácidos carboxílicos y sus sales de metales alcalinos exhiben un comportamiento de solubilidad totalmente opuesto (en solventes no polares y en agua respectivamente), y dada la facilidad de interconversión entre éstos, es empleada comúnmente para identificación y separación de los mismos. Frecuentemente se convierten los ácidos en sus ésteres por ser estos más volátiles y por lo tanto más fáciles de analizar. Un éster se puede formar directamente por reacción de un ácido carboxílico con un alcohol, reacción llamada esterificación. (Reyes, 1993).

Equipo Acoplado Cromatógrafo De Gases/Espectrómetro De Masas.

El Cromatógrafo de Gases y el Espectrómetro de Masas son dos de los instrumentos más utilizados en el análisis de compuestos

orgánicos. La cromatografía de gases es una excelente herramienta para separar y cuantificar mezclas complejas, pero deja mucho que desear en cuanto a la identificación de compuestos que logra separar; la espectrometría de masas es un buen método para la identificación de compuestos orgánicos, sin embargo con ella no es posible el análisis de mezclas. Como se puede ver, ambas técnicas resultan complementarias por lo que se intentó su acoplamiento; el primer acoplamiento exitoso se logró en 1961 y a partir de entonces se ha ido mejorando. El resultado del acoplamiento dio una herramienta analítica complementaria para el análisis de compuestos orgánicos, con ella se realizan fácilmente análisis que antes requerían de mucho tiempo, grandes cantidades de muestra y mucha paciencia, y aún más, se pueden realizar análisis que antes eran imposibles. Por otro lado, está demostrado que con éste acoplamiento, el nivel de sensibilidad se incrementa tanto que estos equipos son capaces de registrar sustancias en el nivel de nanogramos y con una certeza absoluta en la identificación. Un aspecto importante es que este tipo de instrumentos se encuentran acoplados a equipos de cómputo, ya que de no ser así se requerirían meses de trabajo por un día de trabajo instrumental (Gómez y García, 1989).

Los estudios mas recientes sobre aceites, lo constituyen los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos y sus respectivos ésteres metílicos, cuya identificación se realiza por Cromatografía de Gases utilizando normalmente el detector de ionización de flama y cuya identificación está basada en la utilización de estándares. El uso del sistema acoplado de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas, permite una caracterización e identificación absoluta de los perfiles cromatográficos de los compuestos analizados, sin la ayuda de

estándares, en vista de que para cada pico cromatográfico le obtiene su correspondiente espectro de masas (Reyes, 1993).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De los primeros estudios en la grasa de tortuga laúd, se encuentra un reporte con especímenes de Sri Lanka y Japón (Deraniyagala en 1953 en: Eckert & Frazier, *FWS Draft*) en el que se reportan índices de saponificación de 199.6 y 181.3 e índices de yodo de 103.8 y 128.1% respectivamente.

Diversos estudios de Ackman (Ackman y Burgher, 1965; Ackman *et al.*, 1972; Hooper y Ackman, 1970) reportan la composición de ácidos grasos en la grasa dérmica de laúd, así como su distribución entre otros órganos. Este mismo autor en un estudio comparativo entre la grasa de tortugas marinas y dulceacuícolas (Ackman *et al.*, 1971), determinó además la composición de la grasa dérmica de la tortuga caguama y lora. Los resultados más sobresalientes de estos estudios son la baja proporción de los ácidos grasos C₁₈ poliinsaturados en las tortugas marinas a diferencia de las dulceacuícolas; la notable diferencia en la alta cantidad de C_{12:0} presente en las grasas de laúd y verde a diferencia de la caguama, lora y carey; además, de la presencia del monoeno C_{18:1} en posición *trans* en la grasa de las tortugas laúd, caguama y lora, mientras que la gran mayoría de los ácidos grasos insaturados en animales tienen la posición *cis*.

Joseph *et al.* (1985), al reportar el efecto de la dieta en la composición de la grasa de tortuga verde hace también una descripción del perfil de la composición de los depósitos grasos de adultos.

Los estudios de Weldon (Weldon *et al.*, 1990; Weldon y Tanner, 1990) determinaron la composición de ácidos grasos en las secreciones de la glándula de Rathke en tortuga lora y caguama.

Los estudios de Ackman y Joseph se realizaron con cromatografía de gases-líquido, con columnas cromatográficas mucho mas anchas y menos largas que las utilizadas ahora y sin la seguridad en la identificación de los compuestos que da la espectrometría de masas, mientras que los de Weldon se realizaron con cromatografía de capa fina y CG/EM. Ninguno de esos trabajos realizó estudios de la grasa invertida en el vitelo.

En lo que respecta al huevo, se tienen los trabajos no publicados de Vázquez *et al.*, en los que hace un estudio bromatológico del huevo de tortuga laúd cuantificando los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fosfolípidos, así como su pH, en este estudio se observó que el porcentaje que ocupan los lípidos en el huevo (sin cascarón) es de un 5.9% en base húmeda y de un 37.3% en base seca, además de un trabajo de Seaborn (1994), en los que determina el perfil graso de los huevos de caguama y carey con la intención de identificar la especie de huevos decomisados, pero de este trabajo solo se conoce el resumen.

Esta tesis, tuvo su origen a partir de un trabajo realizado como parte de la materia "Biología de Campo" (Barragán *et al.*, 1995) en donde se determinó el perfil de ácidos grasos del vitelo de tortuga laúd. En este trabajo se observó por primera vez la presencia de ceras (hidrocarburos saturados de C17 a C31) en el vitelo del huevo de tortuga y la presencia de un contaminante liposoluble (DOF), dato que no fue publicado en ese entonces con el fin de verificar que no fuera contaminación en el manejo de la muestra. En lo que respecta a contaminantes liposolubles, la información es aún más escasa, solo se

tienen algunos reportes de la presencia de contaminantes organoclorados (PCB's, DDT's, DDE's, DDD's, Dieldrin y Mirex) en huevos de tortuga caguama y verde y en algunos tejidos de laúd (Hutchinson y Simmonds, 1991).

La falta de datos en cualquier reservorio graso de golfina, la escasez de datos en el vitelo del huevo de laúd y los interesantes datos del trabajo preliminar realizado en 1995 entre los que se encuentran la posibilidad de contaminantes liposolubles en huevo, motivaron esta tesis con los siguientes objetivos:

3. OBJETIVOS

* Comparar las fracciones liposolubles (ácidos grasos, ceras, y esteroides) en el vitelo del huevo de tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y golfina (*Lepidochelys olivacea*).

* Observar la presencia de posibles contaminantes liposolubles en la yema de ambas especies y evaluar su importancia.

* Estimar la posible diferencia de los ácidos grasos a lo largo de la temporada en los huevos de tortuga laúd.

4. HIPÓTESIS

Los estudios realizados con la grasa dérmica de otras especies de tortuga y los estudios de Seaborn encaminados a identificar huevos en base a su perfil de ácidos grasos, demuestran semejanzas, pero también diferencias reconocibles en las grasas de las tortugas. Esto nos hace suponer que entre la grasa de laúd y golfina con hábitos y características tan diferentes, existen algunos patrones característicos de cada una. Como lo indican trabajos anteriores, es posible encontrar muy poco representados a los ácidos grasos esenciales a diferencia de las tortugas dulceacuícolas. Al tener la tortuga laúd una distribución más amplia y en aguas más frías, es posible encontrar una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en su grasa que en la de golfina como lo describe Lehninger, (1990).

La presencia de ceras en el estudio preliminar con tortuga laúd (Barragán *et al.*, 1995), no implica que estén presentes en la yema de tortuga golfina, sin embargo al no existir más estudios con CG/EM en la fracción no saponificable de la yema de los huevos de tortuga, es posible que estas ceras estén presentes en las de golfina.

Los reportes previos de contaminantes liposolubles en los huevos de algunas tortugas marinas (Hutchinson y Simmonds, 1991), demuestran que las tortugas marinas están expuestas a este tipo de contaminación y que puede estar presente en el huevo. Por lo es posible suponer que este tipo de contaminantes se presenten en los huevos de las tortugas golfina y laúd.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en el campamento para la conservación de la tortuga marina "Chacahua" que forma parte del "Parque Nacional Lagunas de Chacahua" (decretado como tal en junio de 1937) con una superficie de 14,187 hectáreas distribuidas en 10,162 hectáreas de tierra y 3,525 hectáreas de lagunas, y ubicado en el municipio de Tututepec, Distrito de Juquila, Oaxaca.

La playa de anidación se encuentra ubicada entre los 15°57' y 15°58' latitud norte y entre los 97°40' y 97°48' longitud oeste (Figura 2). Tiene una extensión de 12.4 Km., limitada al Oriente por Punta Galera y al Poniente por la desembocadura de Río Verde.

El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) con una temperatura media anual de 26.7° C, la precipitación del mes más seco es menor de 60 mm. (Alvarado, *et al.*, 1994)

Márquez en 1976 informa por primera vez que alrededor de 25 mil hembras de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) anidan en el área, con arribos de hasta 10 mil tortugas en 3 días consecutivos, y unos 2 mil ejemplares de laúd (*Dermochelys coriacea*), en toda la temporada. En 1982, Pritchard hace notar que los primeros 4 Km. al oeste de Punta Galera presentan una alta densidad de anidación. En 1982 se inicia un proyecto interdisciplinario e interinstitucional, dando principio al estudio y protección de las tortugas marinas en dicha zona. Desde 1986 esta playa opera bajo la responsabilidad de la entonces Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, ahora Instituto de Ecología (INE) de la SEMARNAP (Cruz y Ruiz 1984).

A partir de los 90's el número de anidaciones de golfina se ha incrementado considerablemente manteniéndose por arriba de 5,000

anidaciones. Aguilar, en 1991, reportó que el número de hembras de golfinia era alrededor de 1,000.

Se ha observado que el número de anidaciones de laúd reportadas para la zona ha disminuido de 2,841 en 1982, hasta 407 en 1989; mostrando una tendencia a disminuir, con ligeras oscilaciones en años posteriores (Aguilar 1991). Durante 1993-94 solamente ocurrieron 43 anidaciones; para la temporada 1995-96 se registraron 68 anidaciones (Alvarado *et al.* 1996).

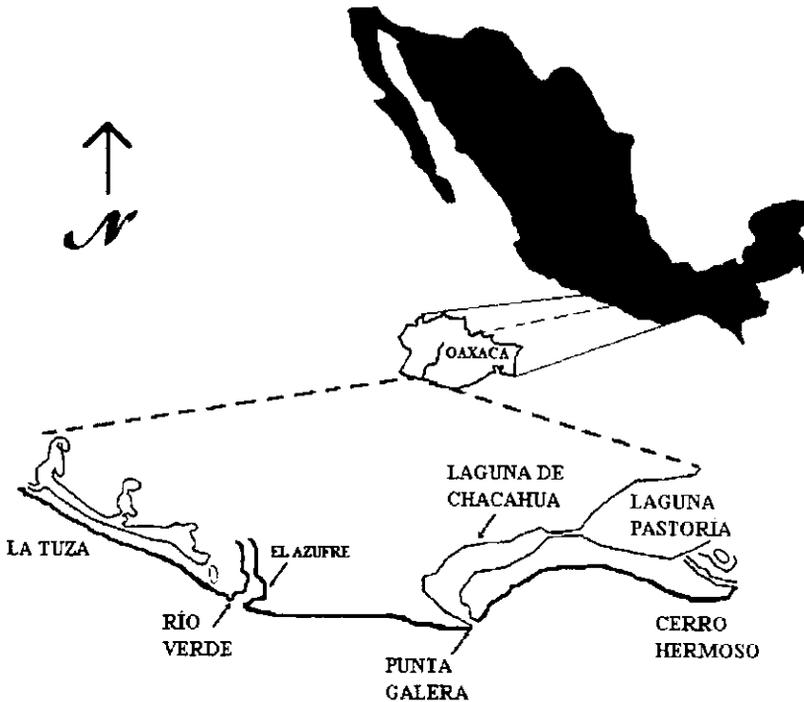
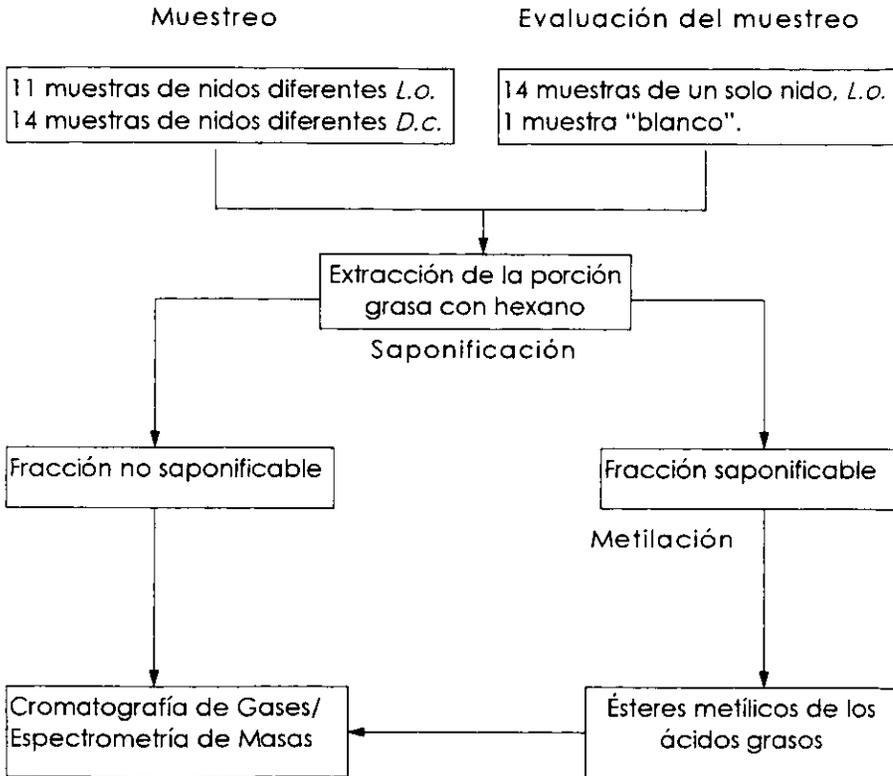


Figura 2. Ubicación del área de estudio.

II. MÉTODO

DIAGRAMA DE FLUJO



1. TRABAJO EN CAMPO:

Muestreo.

Como parte de las actividades de protección del campamento, se realizaron patrullajes nocturnos a lo largo de la playa de anidación, con el fin de localizar a las hembras anidadoras de ambas especies de tortuga y se colectaron sus nidos para trasladarlos a un vivero. Se registraron datos del estado físico aparente, número de marca de la madre (en caso de no estar marcada se colocó una marca tipo monel), el número de huevos viables, peso de cada uno de los huevos muestreados y fecha de colecta.

Para este estudio, se colectó 1 huevo con vitelo del nido de algunas tortugas de cada especie que se observaron durante los patrullajes, anotando el número de marca en el caso de las tortugas laúd ya que las tortugas golfinas no fueron marcadas. Además se colectó el vitelo de 3 embriones encontrados muertos de *Dermochelys coriacea* a punto de eclosionar (estadío VIII reportado por Sarti *et al.*, 1989) de tres nidos diferentes. Estos vitelos se incluyeron en el análisis debido a la importancia que tuvieron en presencia de contaminantes.

Se obtuvo así un total de 11 vitelos de diferentes nidos de *L. olivacea* y 14 vitelos de nidos diferentes de *D. coriacea* correspondientes a 8 tortugas laúd diferentes. Es importante hacer notar que este tamaño de muestra no afecta la producción total de crías de la población.

Evaluación del Muestreo.

Por otra parte, se colectaron 15 huevos viables de un solo nido de *Lepidochelys olivacea*. Del mismo modo que el resto de las muestras, se analizó la fracción saponificable de estas muestras para observar las posibles diferencias en presencia y ausencia de los ésteres metílicos identificados en cada muestra, esto es, la posible variación existente dentro de un mismo nido.

Dentro de las próximas 12 horas después del momento de colecta del nido, se llevó a cabo la extracción hexánica de la yema del huevo muestreado, basado en Barragán, *et al.* 1995 (modificado).

Extracción:

1. Se extrajo entera la yema del huevo eliminando la albúmina.
2. La yema se colocó en un mortero y se mezcló con aproximadamente 4 gramos de sulfato de sodio anhidro hasta lograr una pasta de aspecto homogéneo.
3. Se vertió la yema en un matraz Erlenmeyer; el mortero y el mango se enjuagaron con agua destilada que también se vertió en el matraz.
4. Se agregaron de 10 a 15 ml de hexano y se agitó constantemente durante 15 minutos con ayuda de un agitador magnético. Se dejó reposar otros 15 minutos hasta observar la separación de dos fases. En caso de emulsión, se agregaron unas gotas de éter ν /_o se agregó mas hexano y se repitió la operación.

5. La fase superior se extrajo con una pipeta pasteur y se depositó en un frasco seco y limpio.
6. Con la misma yema, se repitió el procedimiento desde el paso #4 y la fase superior extraída se depositó en el mismo frasco que la extracción anterior.
7. Los frascos eran de tapón de rosca con teflón y una vez con la muestra, se sellaron con cinta teflón y se etiquetaron con el número de huevo, y marca de la tortuga madre.

El extracto se mantuvo en refrigeración y debidamente etiquetado para su traslado a la ciudad de México donde se continuó con el proceso (Hidrólisis y análisis con cromatografía de gases/espectrometría de masas CG/EM)

La colecta de un huevo por nido, se repitió de igual forma a lo largo de la temporada tantas veces como fue posible recapturar alguna de las hembras inicialmente muestreadas de tortuga laúd.

2. TRABAJO DE LABORATORIO:

Hidrólisis.

1. Se evaporó la extracción hexánica con una corriente de nitrógeno, hasta obtener el aceite.
2. Se pesó el aceite obtenido y se trasladó a un vial para microreacciones.
3. Si se obtenía menos de 50 mg de aceite, se agregaba 0.5 ml de Potasa/Metanol al 20% peso/vol. o 1 ml si se obtenía entre 50 y 100 mg. Así se mantuvo agitando constantemente en baño maría entre 60 y 70°C durante 20 minutos.

4. Se dejó enfriar un poco y se le añadió 1 ml de agua destilada y 1 ml de n-hexano agitando.
5. Se extrajo la fase orgánica (fase superior) y se guardó en un vial etiquetado "fracción no saponificable", la fecha y los datos de la muestra.
6. A la fase acuosa que quedó en el vial, se le agregó HCl hasta alcanzar un pH ácido.
7. En el mismo vial se hicieron otras dos extracciones con n-hexano y se separó la fase superior de cada una, colocándolas en un vaso de precipitados y agregando a los extractos sulfato de sodio anhidro para desecar.
9. Se decantó el contenido del vaso de precipitados en un vial para microreacciones y se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno.
11. Con el mismo criterio del paso 3, se agregó trifluoruro de boro/Metanol al 10% agitando en baño maría entre 60 y 70° C durante 20 minutos.
12. Se realizaron dos extracciones más con n-hexano, se separó en un vaso de precipitados la fase orgánica y secó con sulfato de sodio anhidro.
13. Finalmente se decantó en un vial con la etiqueta correspondiente "fracción final" , la fecha y los datos correspondientes de la muestra.

Control De Reactivos.

Todos los reactivos utilizados durante el análisis fueron concentrados hasta 3 órdenes de magnitud y se inyectaron al sistema CG/EM para verificar su pureza, además se hizo una muestra control de la hidrólisis evaporando desde el principio 15 ml de n-hexano, con el que se habían hecho las extracciones.

Separación e Identificación.

En la mayoría de los casos, las muestras se concentraban al máximo evaporándolas con una corriente de nitrógeno.

La separación e identificación de los compuestos de la mezcla se realizó con un equipo acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), marca Hewlett Packard modelo 5988 A.

La temperatura del cromatógrafo inició en 60°C mantenida por 4 minutos y calentando después con una velocidad de calentamiento de 5°C/min. hasta alcanzar una temperatura de 300°C. El inyector tenía una temperatura de 250°C y el tiempo de corrida fue de 60 min. El rango de barrido de masas osciló entre los 33 y 550 unidades de masa. De cada muestra, se inyectaron 2 µl al sistema.

3. ANÁLISIS DE DATOS.

Cromatogramas y Espectros De Masas.

De cada inyección al equipo CG/EM, se obtuvo un cromatograma en el que se representa el tiempo de retención en la columna cromatográfica (eje de las X) contra la respuesta del sistema a la intensidad de un compuesto dado, es decir el

número de iones en el detector por unidad de tiempo que expresa la abundancia relativa (Ar) (eje de las Y). Así se forman los picos cromatográficos que representan cada uno de ellos, un compuesto de una mezcla (figura 3).

Los diferentes compuestos de la mezcla de lípidos se identificaron plenamente al obtener para cada uno de ellos su espectro de masa (figura 4 y anexo IV), en el que se representa la forma en la que las moléculas del compuesto se fragmentaron al ser sometidas al bombardeo con electrones del espectrómetro de masas. Estos datos se compararon con estándares ya conocidos, logrando así la plena identificación del compuesto.

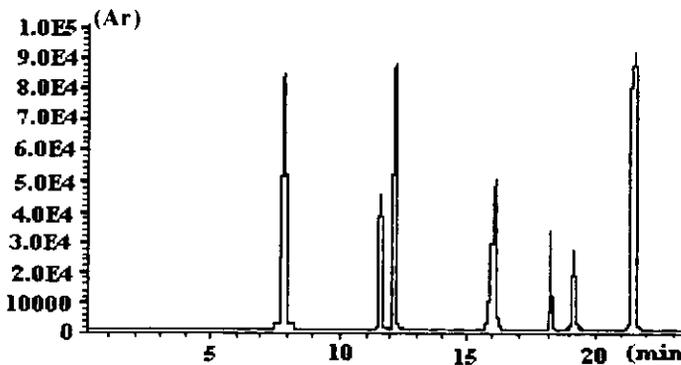


Figura 3. Ejemplo de un cromatograma, tiempo de retención vs. señal del equipo.

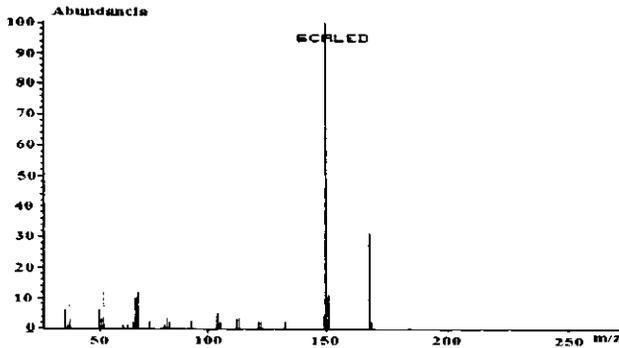


Figura 4. Ejemplo de un espectro de masa, masa del ion vs. abundancia.

Integración de los Picos Cromatográficos.

Una vez identificados los compuestos de cada muestra, se obtuvo el área bajo la curva de cada pico cromatográfico que representa un éster metílico de los ácidos grasos. La suma de estas áreas representa el 100% de los ácidos grasos en cada muestra y en base a esto se obtuvo el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos identificados.

Es indispensable hacer notar que este análisis es solamente semi-cuantitativo ya que para hacer un análisis cuantitativo se necesitaban haber tomado otras medidas como añadir un estándar interno a la muestra y ese no era el objetivo de este trabajo.

III RESULTADOS

1. FRACCIÓN SAPONIFICABLE.

En el análisis de estas muestras se caracterizó el perfil cromatográfico (figura 5) y se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las yemas de ambas especies de tortuga. En total se identificaron 19 ácidos grasos diferentes por espectrometría de masas, con algunas semejanzas y diferencias en presencia y abundancia entre la grasa de los huevos de las dos especies de tortuga. En el anexo I se detalla la presencia y ausencia de los ésteres metílicos de ácidos grasos en las diferentes muestras analizadas.

Se obtuvo también para cada muestra analizada el porcentaje relativo de cada uno de los ésteres identificados, basado en el área bajo la curva obtenida de cada uno de los picos cromatográficos (anexo II). El promedio de dichos porcentajes para cada éster se muestra en la tabla I. Los ácidos grasos mayoritarios (con porcentaje mayor a 5%) encontrados para *Dermochelys coriacea* fueron C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:1} y C_{22:5}, mientras que para *Lepidochelys olivacea* fueron C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:1} y C_{21:7}. El ácido graso con menor número de carbonos encontrado fue el ácido cáprico (C_{10:0}) presente solamente en una de las muestras de *Lepidochelys olivacea* pero con un porcentaje relativo de 3%. El ácido graso identificado con mayor número de carbonos fue el ácido graso insaturado de 22 números de carbonos presente en ambas especies. El ácido graso C_{18:1} fue el más abundante en el vitelo de ambas especies, mientras que el C_{12:0} presentó las diferencias más notables. En el caso de algunos ácidos grasos insaturados no fue posible determinar con certeza el número de insaturaciones que presentaban debido a su alto peso

molecular lo que dificultó ver su ion molecular en el espectro de masas; sin embargo el espectro demostraba un ácido graso insaturado al que se asignó el número de carbonos por tiempo de retención comparado con el resto de los ácidos grasos bien determinados. En la misma tabla se presenta la probabilidad de aparición de cada éster metílico basándose en el número de veces que dicho éster se presentó en las muestras analizadas de una especie dada.

Haciendo un promedio del porcentaje de los ácidos grasos insaturados encontrado en cada muestra, se encontró que la yema del huevo de tortuga laúd tiene un 56.7% (n=14) de éstos, mientras que en la yema de tortuga golfina solo ocupan un 41.8% (n=11).

Se encontraron algunas variaciones en la grasas de los huevos de diferentes nidadas de una misma tortuga a lo largo de la temporada; sin embargo, éstas se presentan en los ácidos grasos minoritarios y no parecen tener una tendencia definida como se puede ver en los resultados mostrados para las tortugas recapturadas en el anexo I y II.

En la tabla II se enlistan todos los ésteres metílicos encontrados en ambas especies, incluyendo los encontrados al mezclar todas las muestras analizadas en el estudio preliminar de este trabajo (Barragán et al., 1995). El potencial energético se obtuvo calculando el número de ATP's generados por la ruta de β -oxidación y multiplicándolos por la energía libre de Gibbs de cada ATP =7.30 Kcal mol⁻¹ (Lehninger, 1990). Bastó que un éster metílico se presentara en una sola de las muestras analizadas para considerar su presencia en dicha especie, por lo tanto, para apreciar diferencias entre las dos especies de tortuga, remitirse a la tabla I.

Tabla I. Promedio del porcentaje relativo y probabilidad de aparición en dos especies de tortuga marina

Éster metílico	Porcentaje \pm ee		Probabilidad	
	LAÚD	GOLFINA	LAÚD n=14	GOLFINA n=11
C10	0	3 \pm 0	0	0.09
C12	12.5 \pm 1.7	2.7 \pm 0.9	0.86	0.27
C14	17.8 \pm 1.3	21.6 \pm 2	1	1
C14:1	1.1 \pm 0.2	2 \pm 0.4	0.29	0.82
C15	1.9 \pm 1.6	2 \pm 0.2	0.43	0.82
C16	16.5 \pm 0.8	15.5 \pm 0.8	1	1
C16:1	8.2 \pm 0.9	16.4 \pm 0.7	0.86	1
C17	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.4	0.43	0.46
C17:1	1.6 \pm 0.2	2 \pm 0.3	0.36	0.73
C18	3.7 \pm 0.4	3.1 \pm 0.4	0.79	0.91
C18:1	31.1 \pm 2.4	28.1 \pm 2	1	1
C18:2	4.2 \pm 0.6	2.9 \pm 0.3	0.57	0.55
C19:?	1.5 \pm 0.2	3.3 \pm 0.6	0.14	0.27
C20	3.9 \pm 0	0	0.07	0
C20:?	2.7 \pm 0.6	3.7 \pm 0.6	0.5	0.64
C21:?	0	5.5 \pm 0.8	0	0.27
C22:?	6.3 \pm 1.8	3.6 \pm 0.7	0.36	0.55

Nota: En el promedio del porcentaje relativo "n" varía de acuerdo al número de datos disponibles para cada uno de los ácidos grasos (ver anexo II); en las muestras de laúd, no incluyó la muestra AC 668(1) por presentar solo tres picos debido a una baja concentración de la muestra.

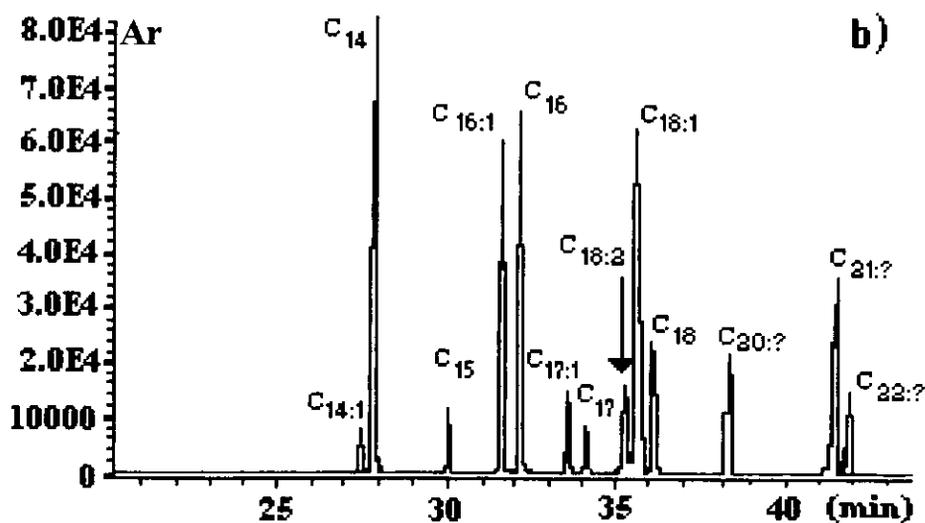
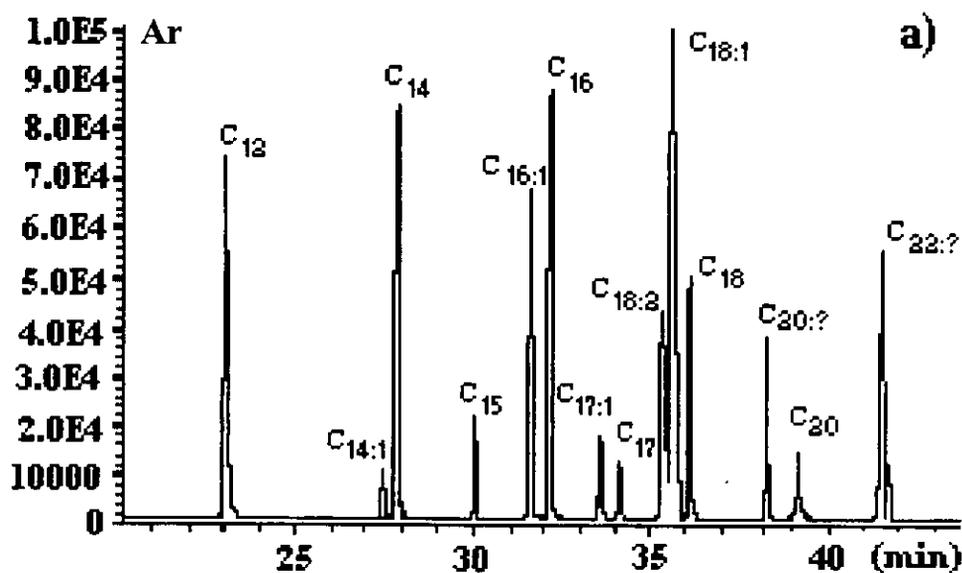


Figura 5. Reconstrucción de los cromatogramas típicos de la fracción saponificable en el vitelo del huevo de dos especies de tortuga marina; a) *Dermochelys coriacea* y b) *Lepidochelys olivacea*.

Tabla II. Listado de ácidos grasos identificados para dos especies de tortuga marina.

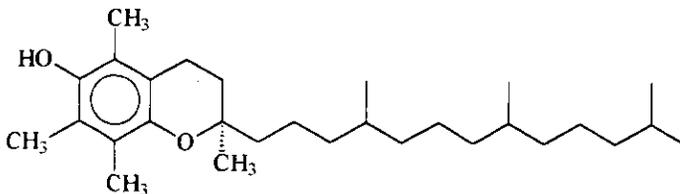
Número de Carbonos	Nombre común	Fórmula	Potencial Energético (Kcal mol ⁻¹)	Especie en la que se presenta
C10	ác. cáprico		569.40	L.o.
C12	ác. láurico		693.50	L.o. y D.c.
C13 [✓]	ác. tridecanoico		810.30	D.c.
C14	ác. mirístico		817.60	L.o. y D.c.
C14:1	ác. mirístico		803.00	L.o. y D.c.
C15	ác. pentadecanoico		934.40	L.o. y D.c.
C16	ác. palmítico		941.70	L.o. y D.c.
C16:1	ác. palmítoleico		927.10	L.o. y D.c.
C16:3 [✓]	ác. palmítolenico		897.90	D.c.
C17	ác. heptadecanoico		1058.50	L.o. y D.c.
C17:1	ác. cis-10-heptanoico		1043.90	L.o. y D.c.
C18	ác. esteárico		1065.80	L.o. y D.c.
C18:1	ác. oléico		1051.20	L.o. y D.c.
C18:2	ác. linoléico		1036.60	L.o. y D.c.
C19:?	---	----	≤1168.00	L.o. y D.c.
C20	ác. araquirico		1189.90	D.c.
C20:?	---	----	≤1175.30	L.o. y D.c.
C21:?	---	----	≤1292.10	L.o.
C22:?	---	----	≤1299.40	L.o. y D.c.

Nota: Las fórmulas químicas y los nombres pueden cambiar dependiendo de los diferentes isómeros.
[✓] Estos ácidos grasos fueron identificados en las muestras del estudio preliminar (Barragán et al. 1995)

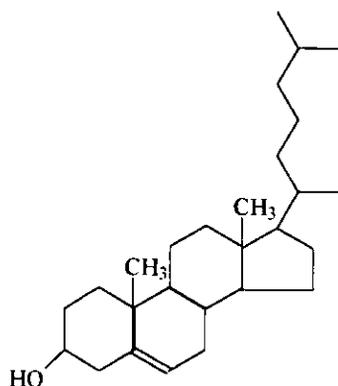
2. FRACCIÓN NO SAPONIFICABLE.

En esta parte de las muestras analizadas, se encuentra todo aquello que no forma sales de ácidos grasos y que se extrajo junto con la fracción grasa del huevo. Se anexan datos no publicados obtenidos al mezclar todas las muestras analizadas en el estudio preliminar de este trabajo (Barragán *et al.*, 1995). Se identificaron ceras (hidrocarburos saturados) de diferente número de carbonos para cada especie; esterol, vitamina E y presencia de contaminantes (tabla III).

Las ceras, compuestos no reportados anteriormente en los huevos de un reptil, se presentaron en ambas especies con una distribución de tipo normal (Gaussiana), centradas en los hidrocarburos de 22 y 23 átomos de carbono en el caso de la laúd, y en los hidrocarburos de 25, 26 y 27 átomos de carbono en el caso de la golfina (figura 6). Notándose una tendencia hacia las ceras más pesadas en la tortuga golfina. El colesterol se observó al mezclar todas las muestras de tortuga laúd, en el caso de las golfinas no se pudo observar el colesterol en ninguna de las muestras analizadas, sin embargo, en una de ellas se encontró un esterol que no se logró identificar claramente. La presencia de vitamina E, lo mismo que el colesterol, solo se observó al mezclar todas las muestras de laúd, y en tortuga golfina no se observó en ningún caso.



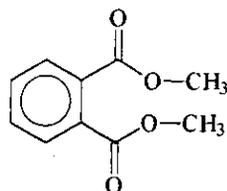
Vitamina E



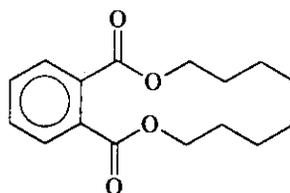
Colesterol

A pesar de no ser compuestos naturales, se encontró una amplia variedad de contaminantes provenientes de la ingesta de plásticos en el 42.8% de las muestras de laúd y en un 27.3% de las muestras de golfina; dichas moléculas no solo resaltan por su importante presencia, sino también por encontrarse a nivel de huevo, lo que implica que dichos contaminantes permearon a través de todo el sistema fisiológico de las grasas hasta la vitelogenénesis. Estos contaminantes se pueden separar en dos grupos:

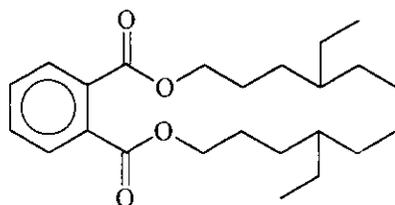
a) En el grupo de los ftalatos, se encontraron Dimetil ftalato, Dibutil ftalato y Dioctil ftalato en el 21.4% de las muestras de *Dermochelys* y Dioctil ftalato en 9.1% de los huevos de *Lepidochelys olivacea*, los cuales son utilizados en la elaboración de plásticos como moléculas plastificantes.



dimetilftalato (DMF)

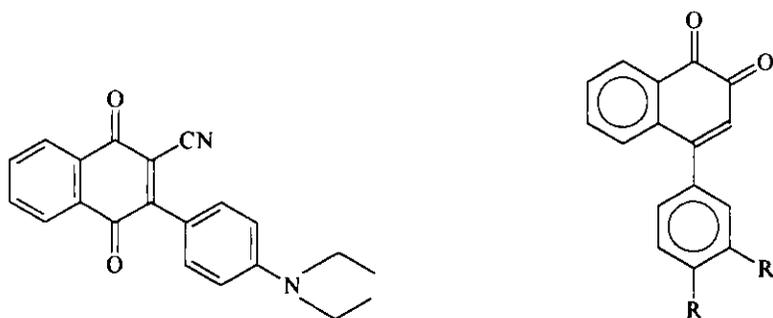


dibutilftalato (DBF)



diisooctilftalato (DOF)

b) El grupo de los antioxidantes (AO) que son compuestos derivados de las naftoquinonas tales como *terbutil-tolueno* y *butil hidroxitolueno*, este grupo de moléculas como su nombre lo dice previenen la oxidación del polímero y la polimerización en los prepolímeros. Al no estar claramente identificados los diferentes radicales de cada una de estas moléculas se denominaron con un número consecutivo según su orden de aparición (tabla III).



Naftoquinonas (antioxidantes)

La presencia de contaminantes en cada una de las muestras se detalla en el anexo III; donde es posible apreciar que si bien, ambas especies se encuentran expuestas al mismo tipo de contaminantes plásticos; es en la tortuga laúd donde se presentaron con mayor incidencia y variedad.

Debido a problemas técnicos fue imposible obtener los porcentajes relativos de los compuestos de la fracción no saponificable; sin embargo, los cromatogramas aquí mostrados (figura 6) son bastante elocuentes; en éstos no solo se pueden apreciar las diferencias del perfil de ceras en laúd y golfina; si consideramos que el tamaño de los picos cromatográficos es proporcional al porcentaje relativo del compuesto que representan, resulta evidente que la presencia de los contaminantes puede ser tan representativa o más que cualquiera de los demás compuestos de la fracción no saponificable.

Tabla III. Comparación de los compuestos encontrados en la fracción no saponificable de las tortugas marinas *Dermochelys coriacea* y *Lepidochelys olivacea*.

FRACCIÓN NO SAPONIFICABLE	LAÚD <i>Dermochelys coriacea</i>	GOLFINA <i>Lepidochelys olivacea</i>
CERAS (hidrocarburos saturados)	De C ₁₇ a C ₃₁	De C ₁₉ a C ₃₃
ESTEROLES	Colesterol	Esterol no identificado.
VITAMINAS	Vitamina E.	---
CONTAMINANTES	di-metil ftalato, (DMF) di-n-butil ftalato (DBF) di-isooctil ftalato (DOF) Antioxidante 1 Antioxidante 2 Antioxidante 3 Antioxidante 5	di-isooctil ftalato (DOF) Antioxidante 1 Antioxidante 2 Antioxidante 3 Antioxidante 7

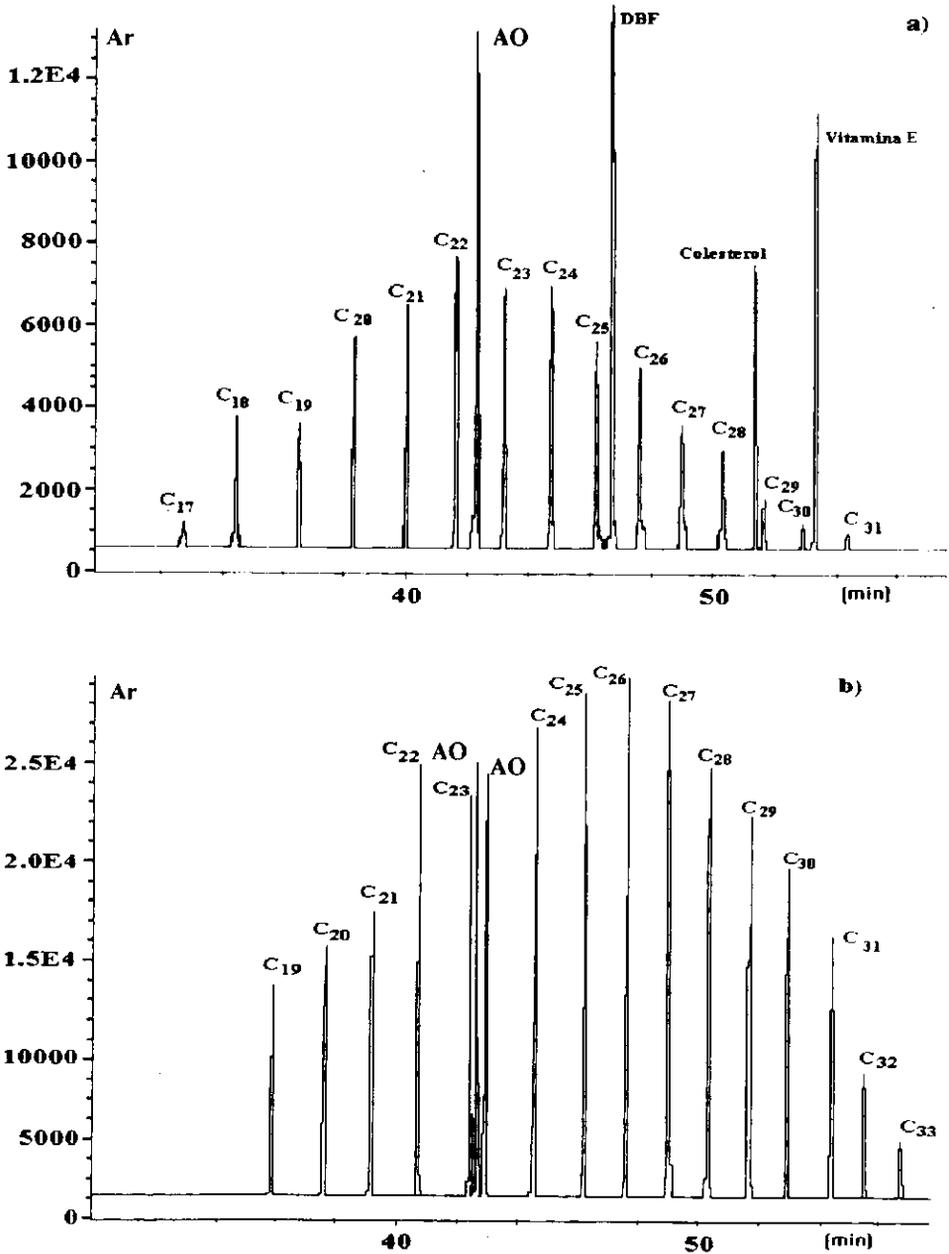


Figura 6. Reconstrucción de los cromatogramas de la fracción no saponificable en el vitelo de dos especies de tortuga marina a) *Dermochelys coriacea* y b) *Lepidochelys olivacea*

3. MUESTRAS DE UN SOLO NIDO Y CONTROL DE REACTIVOS.

El muestreo de un sólo huevo por nido es suficientemente representativo ya que los 15 huevos analizados de una nidada de 140 huevos totales, presentaron cromatogramas idénticos, por lo que resultó de más cualquier análisis probabilístico. Los ácidos grasos encontrados fueron los mismos y las proporciones se mantuvieron en las 15 muestras. Los resultados de una de estas muestras (M65) se detallan en los anexos I y II.

El análisis indicado para el control de reactivos no mostró ninguna impureza que pudiera afectar los resultados encontrados en este estudio.

IV. DISCUSIÓN

1. FRACCIÓN SAPONIFICABLE.

Los ésteres metílicos encontrados en las dos especies de tortugas analizadas en este trabajo, presentan muchas semejanzas en presencia y abundancia relativa; C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1} y C_{18:1} son los ácidos grasos mayoritarios mas importantes en los que coinciden los dos perfiles cromatográficos obtenidos aquí. Se encontraron algunas diferencias como la presencia de C_{10:0} y C_{21:0} solamente en tortuga golfina y el ácido graso C_{20:0} presente solo en laúd, así como una notable cantidad de C_{12:0} encontrada en la misma especie. La escasa abundancia relativa, así como la presencia en una sólo muestra, hacen poco útil al ácido C_{10:0} como referencia interespecífica; sin embargo, el ácido graso C_{12:0} si podría calificarse como característico de la tortuga laúd, dado su alto índice de aparición y su elevado porcentaje relativo, compartiendo esta característica únicamente con la tortuga verde (Joseph *et al.* 1985). Ackman y Burgher, en 1965 ya mencionaba esta similitud entre la grasa de tortuga verde y la de laúd, sin embargo propone que se podrían distinguir ya que "C_{12:0} se encuentra en mayor proporción que C_{14:0} en tortuga verde a diferencia de laúd". Estudios posteriores como el de Ackman *et al.* 1971, Joseph *et al.* 1985 y el presente trabajo no coinciden con esta aseveración ya que al comparar nuestros resultados con los trabajos citados, se observa que la relación entre C_{12:0} y C_{14:0} es la misma tanto en tortuga verde como en laúd. El ácido graso C_{14:0} se encuentra en considerable abundancia en laúd (17.8%) y golfina

(21.6%), y Ackman (1971) reporta que las tortugas marinas laúd, caguama y lora tienen de 3 a 4 veces más de este ácido graso que las tortugas dulceacuícolas; además Joseph *et al.* (1985) proponen que tanto C_{12:0} como C_{14:0} son organogénicos debido a la escasa presencia de estos compuestos en la dieta de tortuga verde y laúd.

A pesar de que en la tortuga golfina se encontraron 10 ácidos grasos insaturados diferentes, mientras que en laúd solo 8; en la grasa de tortuga laúd, los ácidos grasos insaturados tienen un porcentaje relativo superior al de los saturados (56.7% vs. 42.3%) a diferencia de la grasa de tortuga golfina, cuyos ácidos grasos insaturados solo ocupan un 41.8% de la fracción grasa. Esto es un dato esperado ya que se sabe que en las plantas y aquellos animales que viven en zonas frías, los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados (Lehninger, 1990), con lo que se pone de manifiesto el hábitat templado al que se someten las tortugas laúd en sus largas migraciones y con sus hábitos pelágicos, mientras que la tortuga golfina se mantiene en aguas tropicales.

Al menos la mitad de los ácidos grasos minoritarios (menor al 5% cada uno) encontrados en ambas especies, son moléculas con número impar de carbonos. Este tipo de ácidos grasos son raros en animales terrestres, pero se consideran con una presencia importante en organismos marinos; en estos ácidos grasos su porcentaje relativo oscila alrededor del 2% del total de la grasa y en todos los casos es mayor al 1% (ver tabla I).

El monoeno C_{18:1} se presenta como el ácido graso más abundante en ambas especies así como en el resto de las tortugas marinas estudiadas por otros autores (ver tabla IV); este monoeno también es prominente en los depósitos grasos de las otras cuatro clases de vertebrados (McMullin *et al.*, 1968), lo que pone de manifiesto

la preferencia de este ácido graso como reserva de energía. En cuanto a los ácidos grasos esenciales, el ácido graso $C_{18:2}$ es notablemente más abundante en laúd que en golfinia; el polieno $C_{18:3}$ no fue claramente visible en ninguna muestra y el ácido araquidónico podría estar ligeramente en mayor proporción en golfinia que en laúd, en caso de que los ácidos $C_{20:?}$ reportados aquí, sean en realidad $C_{20:4}$.

Es de notar también, que el polieno de 22 átomos de carbono es mayoritario solamente en laúd y que éste, en caso de tener 4 o 5 insaturaciones, podría ser un derivado por extensión del ácido araquidónico o ser resultado directo de la alimentación; es posible sin embargo, que los polienos de 20 y 22 átomos de carbono reportados aquí se traten de los ácidos grasos $C_{20:5\omega 3}$ y $C_{22:6\omega 3}$ que Joseph *et al.* (1985) mencionan como característicos marinos, en cuyo caso, se deberían muy probablemente a la influencia de la dieta, ya que en la misma cita se mencionan substanciales porcentajes de $C_{20:4\omega 6}$, $C_{22:4\omega 6}$, $C_{22:5\omega 6}$, $C_{20:5\omega 3}$, $C_{22:5\omega 3}$ y $C_{22:6\omega 3}$ en cnidarios y al ser éstos dieta principal de las tortugas laúd, se explicaría la notable abundancia del polieno $C_{22:?}$. Para conocer realmente cuantas insaturaciones tiene $C_{22:?}$, es necesario hacer una ionización química, la cual es una ionización suave y permite ver en gran abundancia al ion molecular.

Como los ácidos grasos esenciales no pueden ser generados por los animales, son los que mejor reflejan sus patrones alimenticios; al ser abundantes los polienos de C18 en las plantas; es evidente que se encuentre una baja abundancia de ácidos grasos esenciales en las tortugas marinas a diferencia de la grasa de tortugas dulceacuícolas como lo reporta Ackman *et al.* en 1971.

Si bien se demostró que el método utilizado es lo suficientemente

efectivo para no marcar diferencias entre las muestras de una misma nidada de golfina, si se encontraron diferencias en las diferentes nidadas de una misma hembra de laúd a lo largo de la temporada; sin embargo, estas diferencias se manifiestan principalmente en los ácidos grasos minoritarios con una variedad aparentemente aleatoria; por ejemplo, de las 4 anidaciones muestreadas de la tortuga con la marca AC-684 (ver anexo I), $C_{22:2}$ se presenta solo en las 2 primeras anidaciones, $C_{19:2}$ solo en las 2 últimas, $C_{14:1}$ en las dos intermedias y $C_{20:2}$ falta solo en la segunda anidación. Esta distribución aleatoria de los ácidos grasos minoritarios entre las diferentes anidaciones podría ser explicado en base a una posible alimentación esporádica de la tortuga madre ya que si bien, se propone que las tortugas laúd tienen zonas de alimentación en zonas mas frías donde abunda más su alimento, no se excluye que pudieran alimentarse ocasionalmente durante la época reproductiva. Es de esperar que los adultos acumulen grandes cantidades de grasa durante sus periodos alimenticios con el fin de alcanzar una exitosa reproducción, en el caso de las laúdes esto es un gran reto dado el pobre valor alimenticio de los cnidarios (2.5 Kcal/g. En Lutcavage y Lutz, 1986) que utilizan como dieta principal. Un dato interesante es el que se observa con la presencia del ácido graso $C_{18:2}$ (anexo I), que en la mencionada tortuga sólo se pudo ver hasta la tercer anidación (posiblemente en concentraciones mas pequeñas posteriormente). Es posible que la diferencia en la presencia, cantidad y calidad de ácidos grasos determine tanto el tiempo en el que se requerirá la propia alimentación de las crías, como la sobrevivencia de las mismas ya que hay que recordar que los ácidos grasos, en particular lo esenciales, no son sólo el almacén de energía que les permitirá llegar a una zona de alimentación, sino que tienen importantes vínculos con lo que

respecta a defensa parasitaria, coagulación y síntesis de tejidos al ser básicos en la formación de membranas. Birkenmeier (1971) propone que gracias a la energía almacenada en el saco vitelino, las crías pueden internarse en el océano alejándose de las peligrosas zonas costeras y satisfacer sus necesidades energéticas (1.76 Kcal/día según Lutcavage y Lutz, 1986) hasta por 11 días; sin embargo, la carencia de los ácidos grasos esenciales podría obligar a las crías a disponer parte de esta energía almacenada para proveerse de ellos a través de la dieta antes de llegar a una hipotética zona de alimentación de postneonatos.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por otros autores para depósitos grasos de otras especies de tortugas, se encontraron muchas semejanzas en los ácidos grasos mayoritarios (ver tabla IV); sin embargo en dichos trabajos (Ackman y Burgher, 1965; Ackman *et al.* 1971 y Joseph, *et al.* 1985) también reportan una gran variedad de isómeros con poca representación (ácidos grasos minoritarios) incluyendo al ácido graso C16:1 *trans* ω 10, el cual es muy extraño encontrar naturalmente en los animales ya que éstos, utilizan la configuración geométrica *cis* en su metabolismo. Esa gran variedad de isómeros encontrados por dichos autores, no se observó en este estudio, lo cual puede deberse a que los estudios realizados por Ackman y por Joseph son en la grasa dérmica de los organismos adultos en donde sea más fácil observar los ácidos grasos derivados de la dieta, o bien existe la posibilidad de que se trate de una sobreestimación al interpretar los cromatogramas dada la baja resolución de los equipos con los que se contaba en ese entonces, cabe recordar que estos equipos no tenían la seguridad de identificación que se obtiene al acoplar el equipo con un espectrómetro de masas y por lo tanto la identificación era solo a

base de tiempos de retención de picos de muy baja resolución y en donde el ruido del sistema podría ser interpretado como un isómero solo por presentarse en un tiempo de retención dado. Estudios mucho más recientes y con técnicas semejantes a la utilizada en este trabajo, como los de Weldon *et al.* 1990 y Weldon y Tanner, 1990 en secreciones glandulares de tortuga lora y caguama presentan una composición de ácidos grasos más parecida a la reportada en los presentes análisis, sin embargo desafortunadamente no reportan porcentajes relativos para poderlos comparar con los mostrados en la tabla IV.

Tabla IV. Comparación del porcentaje relativo de los ácidos grasos mayoritarios (más del 5%) encontrados en 6 especies de tortuga marina.

Ácido graso	Goffina [⊙]	Laúd [⊙]	Laúd [‡]	Caguama [‡]	Lora [↙]	Verde [✦]	Carey [✦]
12:0	2.70	12.5	9.55	0.4	0.75	9.68	0.43
14:0	21.60	17.8	15.77	9.12	13.11	12.61	?
16:0	15.50	16.5	11.87	16.65	20.03	17.99	?
18:0	3.10	3.7	5.09	6.23	5.73	4.67	?
16:1 _n 7	16.40 [✦]	8.2 [✦]	6.17	9.23	13.73	8.06	?
18:1 _n 7	28.10 [✦]	31.1 [✦]	20.45	18.96	22.93	25.72	?
21:?	5.50	0.00	0.06	--	0.05	--	?
22:5 _n 3	3.60 [♣]	6.3 [♣]	1.56	5.46	1.25	1.23	?
22:6 _n 3	--	--	2.5	11.36	3.38	7.26 [♣]	?
16:1 _{trans} 10	--	--	2.94	2.20	0.47	0.47 [♣]	?

⊙ Datos obtenidos de este trabajo.

‡ Datos tomados de Ackman et al., 1971.

↙ Es el promedio de 2 muestras reportadas en Ackman et al. 1971.

✦ Se promediaron los dos datos reportados para dos depósitos grasos de tortugas silvestres, reportado en Joseph et al. 1985.

♣ Reportado en Joseph et al. 1985.

♣ Este ácido graso no es mayoritario en ningún caso, pero se considera relevante por tener la posición trans.

♣ No podemos asegurar que estos ácidos grasos sean _n7.

♣ Solo se conoce que son ác. grasos insaturados, pero se desconoce el número de insaturaciones. En el caso de *L. olivacea* existen al menos dos C₂₂ con insaturaciones.

♣ Solo era mayoritario en una muestra (7.26%), en la otra tenía un porcentaje de 0.01%.

♣ Solo en una muestra era de 0.47%, en la otra era menor a 0.01%.

2. FRACCIÓN NO SAPONIFICABLE.

En esta fracción de los lípidos de la yema, se encontraron compuestos que hasta la fecha no han sido publicados y tal vez sean por completo desconocidos en las tortugas marinas. El primer grupo de compuestos que resaltan por su importante presencia son las ceras, hidrocarburos saturados de 17 a 31 átomos de carbono en el caso de las laúdes y de 19 a 33 átomos de carbono para las golfinas; en ambas especies la abundancia de las ceras presenta una distribución normal centrada en los hidrocarburos de 22 y 23 átomos de carbono en las ceras de laúd y en aquellos de 25,26 y 27 carbonos en la cera de golfinas (figura 6). Este tipo de hidrocarburos, junto con otra gran variedad de lípidos, forman los llamados lípidos de superficie o cera que recubre normalmente algunas frutas, hojas y pelaje de animales; son responsables del carácter impermeable de la superficie y son importantes conservando el balance de agua de los organismos y proveyendo una barrera contra el ambiente (Gurr y Harwood, 1991). Es necesario realizar más estudios para saber cual podría ser el papel de estos hidrocarburos en la yema, así como cuales podrían ser los beneficios que de ellos obtenga el embrión. Debido a lo que se reporta de este tipo de ceras, su presencia en la yema del huevo sugiere una capa protectora que recubre el saco vitelino, lo cual podría contribuir a la flotabilidad a las crías y evitar la hidrólisis prematura de las moléculas de reserva energética; sin embargo para confirmar esta hipótesis sería necesario ubicar la posición y el porcentaje de estas moléculas en el saco vitelino.

La presencia de estos hidrocarburos nos motivó a investigar sobre la presencia de los ésteres de cera entre los lípidos del vitelo. Desafortunadamente no fue posible confirmar esta presencia experimentalmente, ya que dichos ésteres son saponificables y no

podían ser detectados con el método utilizado en este trabajo; sin embargo, en teoría no sería aventurado pensar que los ésteres de cera estén presentes en la grasa de las tortugas marinas, en particular en laúd ya que este tipo de moléculas han sido consideradas como importantes componentes transmisoras del carbono en el ambiente marino y se han encontrado en animales con largos periodos de ayuno, de aguas frías y se ha demostrado un rápido crecimiento asociado al consumo de estos lípidos en algunos peces marinos.

La creencia de que los huevos de tortuga marina poseen grandes cantidades de colesterol parece ser un mito similar al de los poderes afrodisiacos que se les atribuyen a los mismos. Un estudio realizado con *Lepidochelys olivacea* reveló que el colesterol que poseen los huevos de esta especie (3.33%) ocupa solamente la mitad de la proporción que presentan los huevos de gallina (6.%) (Annie Chaves *comentarios personales*). Los únicos trabajos a los que se tuvo acceso y que podrían sugerir altas cantidades de colesterol en los huevos de tortuga marina, son aquellos que utilizan la técnica del "índice de saponificación", en la cual se da por hecho que todo aquello que no es saponificable, además del glicerol, es colesterol y esto podría haber sido el origen del mito. La presencia de esta molécula en los huevos de tortuga laúd en el presente estudio; solo fue representativa al analizar una mezcla de todas las muestras, ya que en las muestras por separado, la señal correspondiente al colesterol era muy pequeña o no era visible; por otro lado resalta el hecho de que el colesterol no se haya localizado en ninguna de las muestras analizadas de tortuga golfina (incluyendo la mezcla de todas ellas) y sólo en una de ellas se observó un esteroide no identificado claramente .

A pesar de que el colesterol no se encuentre en las altas proporciones como se creía, resulta difícil explicar biológicamente la

notable ausencia de una molécula indispensable en el desarrollo y metabolismo (en particular transporte y digestión de lípidos) de los animales. El mismo caso resulta para las vitaminas liposolubles de las que sólo se encontró la vitamina E; si bien solo ésta y la vitamina A se consideran esenciales en la dieta y su requerimiento es menor al 0.1% de la materia seca consumida. La ausencia de estas moléculas en las muestras analizadas puede deberse principalmente a dos razones: a las bajas concentraciones en las que se encuentran dichas moléculas y/o al tipo de extracción utilizada. Existen diferentes métodos para extraer los diversos lípidos de una mezcla; sin embargo, en este estudio se decidió utilizar una extracción con hexano por las siguientes razones:

1) Era necesaria una extracción en campo para evitar la posible descomposición de las moléculas y las condiciones ambientales en campo requerían de un método sencillo y rápido.

2) Al ser poco específico el método de extracción no se excluía ningún compuesto, lo que permitía observar la mayoría de los componentes de la fracción grasa, y gracias a esto se lograron hallazgos importantes como la presencia de ceras y contaminantes; por lo tanto el tipo de extracción fue el adecuado para cumplir con los objetivos de este trabajo; pero si se deseara hacer un estudio con colesterol o alguna otra molécula en particular, sería necesario modificar el método, por ejemplo un sistema de extracción con fluido supercrítico para optimizar la obtención de colesterol.

Es notable que el único registro de vitamina liposoluble en este estudio, sea precisamente la vitamina E que además de prevenir muchas alteraciones en la salud de los organismos, se ha encontrado como determinante en la oviposición y la viabilidad del espermatozoide.

Dentro de los contaminantes encontrados en la yema del huevo

de tortuga marina, el grupo de los antioxidantes fue el más representativo, tanto en el número de ellos, como en su frecuencia de aparición. Si bien los antioxidantes parecen ser poco tóxicos, los altos niveles presentes en las muestras analizadas resulta asombrosa considerando que la gran mayoría de los compuestos que emplean estos químicos solo contienen del 0.05 al 0.1% de los mismos, mientras que sus picos cromatográficos al igual que aquellos de los ftalatos (DMF; DBF y DOF) muestran encontrarse en proporciones similares o mayores a las de el resto de los compuestos de la fracción no saponificable, lo que demuestra el papel de las tortugas marinas como "biomagnificadores" de este tipo de contaminantes, esto es que, al ser especies sensiblemente expuestas a este tipo de contaminación, acumulan las moléculas contaminantes en sus tejidos y son un indicador del verdadero impacto de los contaminantes en la biota. Aún con los altos niveles encontrados de contaminantes liposolubles, la extracción de éstos podría optimizarse utilizando cloruro de metileno como solvente.

Los ftalatos y las hidroquinonas son moléculas antropogénicas utilizadas en la elaboración de los plásticos y son fácilmente liberadas en cualquier medio, así sea terrestre, acuoso o aéreo. Experimentalmente se ha demostrado que los ftalatos son tóxicos con importantes repercusiones en la reproducción de los organismos y se han considerado como estrogénicos, cancerígenos, orquidotóxicos y mutagénicos como se ha mencionado ampliamente en el marco teórico de este trabajo.

Hasta fechas recientes y aún en algunos sectores como la industria y el gobierno, los plásticos no han sido más que un tipo de contaminación que causa solamente problemas mecánicos y su importancia se considera aislada. Sin embargo, la realidad es muy

diferente, en el Atlántico se han reportado concentraciones de ftalatos mayores a las de los DDT's y PCB's en el medio marino, Hirth (1987) en Tortuguero, Costa Rica y Sarti *et al* (1994) en varias playas de México han encontrado que los desechos mas comunes que llegan a las playas de anidación son plásticos. Carr (1986, 1987a y 1987b) reportó cómo las tortugas juveniles al comportarse como migrantes pasivos convergen en las grandes corrientes oceánicas con su alimento y desafortunadamente también con una gran variedad de desechos incrementando las posibilidades de enmallamiento e ingestión de éstos últimos. Existe gran cantidad de reportes de ingestión de plásticos en casi todas las especies de tortuga adultas por autores como Mrosovsky (1981), quien reporta la ingestión de plástico del 44% de 16 tortugas laúd; Den Hartog y Van Nierop (1984) quienes reportan el mismo caso en el 50% de 6 laúdes, y Barragán (1992) que reporta la presencia de plásticos en 3.6% de 95 tortugas *L. olivacea*, entre otros muchos. Dichos reportes son de todas partes del mundo, incluso en zonas costeras de baja densidad de población humana resaltando la importancia mundial de este problema.

Lutz (en Hutchinson y Simmonds, 1991), observó experimentalmente que pequeños trozos de plástico y látex pueden ser retenidos por mas de 4 meses dentro de las tortugas antes de desecharlos y encontró evidencia de descomposición del látex.

La presencia de estos contaminantes provenientes del plástico en las reservas de energía de los huevos de tortuga marina, demuestran la ubicuidad de estos contaminantes dentro de los organismos, traspasando toda la fisiología de las tortugas hasta el momento de la vitelogénesis, y alertan sobre el impacto de la contaminación humana, al menos en el caso de los plásticos. Nuestros resultados demuestran que las sustancias plastificantes son capaces de liberarse en el tracto

digestivo de las tortugas y migrar junto con las grasas hasta tejidos de reserva, donde pueden ser transportados hasta el huevo dentro del vitelo. Por lo tanto las consecuencias de la ingestión del plástico, pueden ir mucho más allá de bloquear el tracto digestivo y disminuir los esfuerzos alimenticios del individuo, pueden además, disminuir la adecuación de la especie alterando sus funciones reproductivas y tener efectos transgeneracionales ya que las crías pueden almacenar estos contaminantes como bombas de tiempo.

En algunos estudios *in vitro* se han considerado a los ftalatos como ligeramente estrogénicos (Jobling *et al.* 1995) o que no representan un riesgo para el humano ni el medio ambiente (CEPA 1993 y 1994), en ambos casos se reconoce que es necesario la experimentación *in vivo* y un monitoreo más detallado de la presencia de estos compuestos en el ambiente.

Creemos que ese monitoreo mas detallado puede y debe realizarse en organismos con altas probabilidades de ingestión de plásticos como la tortuga laúd la cual ha visto diezmada dramáticamente su población en el Pacífico, enfrentándose, no solo a amenazas como la captura incidental, la comercialización y los disturbios en la anidación, sino también a los efectos de sustancias contaminantes en su fisiología reproductiva. La presencia de varios ftalatos observada en los huevos de *Dermochelys* y sobretodo, los altos niveles que parecen tener en los cromatogramas aquí mostrados, implica una alta exposición a la ingesta de plástico, explicable por su dieta que se estima alrededor de 260 Kg. de medusa al día (Lutcavage y Lutz, 1986) y que fácilmente podría ser confundida con las grandes cantidades de plástico que se vierten al mar. Es factible pensar que la ingestión de plásticos en tortugas golfinas sea más esporádica debido a su dieta mas variada, sin embargo al alimentarse en zonas más

someras y costeras, la probabilidad de que la tortuga consuma plásticos es mayor debido a las descargas de ríos, las cuales acarrear desperdicios de tierra adentro.

Los ftalatos como químicos endocrino alterantes, han sido poco estudiados y se desconocen las concentraciones en las que se pueden considerar tóxicos en los diferentes organismos en vida silvestre; sin embargo, sí se reconoce su carácter teratogénico y mutagénico afectando principalmente a nivel del esperma. Esto incrementa el interés en evaluar y erradicar este problema, ya que no se conoce la proporción de machos y hembras en tortugas marinas, pero si como sugieren los escasos avistamientos de machos en tortuga laúd, su proporción es mucho menor al de las hembras, el efecto global de un daño en el sistema reproductivo de los machos incrementaría el daño en la población. Es necesario, por lo tanto, realizar estudios encaminados a evaluar los posibles daño en el sistema reproductivo de machos y hembras de tortuga marina y establecer su relación con las concentraciones de ftalato que presenten. Asimismo es necesario concientizar a las personas en general y a las autoridades del daño que se puede ocasionar al considerar al océano como un basurero interminable e inalterable y es un recordatorio para los biólogos y autoridades competentes de la necesidad de proteger a los ecosistemas como la base de los esfuerzos de protección de las especies.

V. CONCLUSIONES

Se obtuvo el perfil característico de los ácidos grasos que componen la yema de las dos especies de tortugas marinas estudiadas, encontrando a C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1} y C_{18:1} como los ácidos grasos mayoritarios en los que coinciden ambas grasas. El ácido C_{12:0} mostró suficientes diferencias como para considerarlo como característico de la grasa de tortuga laúd entre las tortugas marinas compartiéndolo solo con la tortuga verde (*Chelonia mydas*). A diferencia de la tortuga golfina, los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados en la grasa de tortuga laúd, lo cual se considera característico de animales que viven en zonas frías. En cuanto a los ácidos grasos esenciales, se observaron en muy bajas proporciones en ambas especies.

Los cambios en el perfil graso a lo largo de la temporada de los nidos de una sola hembra se observaron solamente en los ácidos grasos minoritarios, lo que podría sugerir una alimentación esporádica de las tortugas laúd en la zona de alimentación.

En la fracción no saponificable se encontró la presencia de ceras (hidrocarburos saturados) reportados por primera vez en tortugas marinas y cuya función aún desconocemos, además fue posible observar la presencia de colesterol y vitamina E, importantes compuestos en el metabolismo de las tortugas marinas. Se recomienda sin embargo utilizar métodos de extracción más adecuados si se desea hacer un estudio con estos compuestos en particular.

En este estudio, se demostró que una sustancia potencialmente tóxica (ftalatos y antioxidantes) ingerida por las hembras adultas es capaz de ser transmitida al huevo. Es de vital importancia conocer el efecto que los ftalatos e hidroquinonas pueden tener en el desarrollo embrionario y fisiología reproductiva de las tortugas marinas, así como cuáles son las concentraciones mínimas *in vivo* en que estos contaminantes pueden afectar al organismo.

VI. LITERATURA CITADA.

- Ackman, R.G. y R.D. Burgher. 1965. Cod liver oil fatty acids as secondary reference standards in the G.L.C. of Polyunsaturated fatty acids of animal origin: analysis of a dermal oil of the atlantic leatherback turtle. *J. Amer. Oil Chemists' Society* 42 (1):38-42.
- Ackman, R.G., S.N. Hooper y W. Frair. 1971. Comparison of the fatty acid compositions of depot fats from fresh-water and marine turtles. *Comp. Biochem. Physiol.* 40B:931-944.
- Ackman, R.G., S.N. Hooper y J.C. Sipos. 1972. Distribution of *trans*-6-hexadecanoic and other fatty acids in tissues and organs of the atlantic leatherback turtle, *Dermochelys coriacea coriacea* L. *Int. J. Biochem.* 3:171-179.
- Aguilar, R. H. 1991. Las Tortugas Marinas en Oaxaca. Oaxaca, *Ciencia y Tecnología* 4 y 5 :11-16.
- Alvarado, J. C., I. Rojas, y H. G. Cruz. 1994. Informe Final del Programa de Protección y Conservación de Tortugas Marinas en Chacahua, Oaxaca Temporada 93-94. Secretaría de Desarrollo Social I.N.E. 6-8 pp.
- Alvarado, J. C., H. G. Cruz y S.G. Sanchez. 1996. Informe Final de Actividades del Programa Nacional de Protección y Conservación de Tortugas Marinas en Chacahua, Oaxaca Temporada 95-96. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales Y Pesca. I.N.E. 32 p.
- Barragán, A., C. López, M. Mata, A. Quintana, E. Luz y L. Sarti 1992. Contenidos Estomacales de *Lepidochelys olivacea* en la Costa Sur del Estado de Michoacán. En: Benabib y Sarti (eds.). Memorias del VI Encuentro Interuniversitario Sobre Tortugas Marinas. Pub. de la Soc. Herp. Mex. No. 1 ISSN0188-6835, México D.F. pp 39-50.
- Barragán, A. R.; T. Argueta et al. 1995. Estudio de algunos aspectos biológicos y reproductivos de la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Playón de Mexiquillo, Mich. Temporada 1994-95. Informe Final de Biología de Campo. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. 85 pp.
- Bauermeister, A. and J.R. Sargent. 1979. Wax esters: Major metabolites in the marine environment. *Trends in Biochemical Sciences*, (septiembre): 209-211.
- Benabib, M. y L. Cruz. 1981. Las tortugas marinas en México. *Naturaleza* (3): 157-166.

- Birkenmeier, E. 1971. Juvenile leathery turtles, *Dermochelys coriacea* (Linnaeus), in captivity. *Brunei Museum Journal* 2: 160-172.
- Canadian Environmental Protection Act. 1993. Priority Substances List, Assessment Report (Di-n-Octyl Phtalate). Canada's Green Plan, Canada. 21pp.
- Canadian Environmental Protection Act. 1994a. Priority Substances List, Assessment Report (Bis(2-ethylhexyl) Phtalate). Canada's Green Plan, Canada. 44pp.
- Canadian Environmental Protection Act. 1994b. Priority Substances List, Assessment Report (Dibutyl Phtalate). Canada's Green Plan, Canada. 34pp.
- Carr, A. 1986. Rips, FADS, and little loggerheads. *Bioscience*, 36(2):92-100
- Carr, A. 1987a. Impact of nondegradable marine debris on the ecology and survival outlook of sea turtles. *Marine Pollution Bulletin*. 18(6B):352-356
- Carr, A. 1987b. New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conservation Biology*, 1(2):103-121
- Cruz, L. y G. Ruiz. 1984. La preservación de la tortuga marina. *Ciencia y Desarrollo* (56): 66-79.
- Colborn, T., F.S. vom Saal y A.M. Soto. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. 5 (101): 378-384.
- Congdon, J. D.; J. W. Gibbons y J. L. Greene. 1983. Parental investment in the chicken turtle (*Deirochelys reticularia*). *Ecology*. 64 (3):419-425.
- Den Hartog, J. y M.M. Van Nierop. 1984. A study on the gut contents of six leathery turtles *Dermochelys coriacea* (Linnaeus) (Reptilia: Testudines: Dermochelyidae) from British Waters and from the Netherlands. *Zoologische Verhandelingen*. 209: 3-36
- Diario Oficial de la Federación. 1986. Decreto por el que se determina como zonas de reserva y sitios de refugio para la protección, conservación, repoblación, desarrollo y control, de las diversas especies de tortuga marina, los lugares en que anida y desova dicha especie. Tomo CCCX CVIII No. 40. 29 de octubre 1986.
- Eckert, K. and J. Frazier. Synopsis of the Leatherback Turtle. *FWS Draft* Not for Distribution.

- Eckert, L.K. 1991. The biological and population status of marine turtles in the North Pacific Ocean. Final Report. NOAA/NMFS Purchase Order 40ABNF002067. 119 pp.
- Eckert, S. y K. Eckert. 1989. Diving and foraging behavior of leatherback, sea turtle. *Can. J. Zool.* (67): 1834-2840.
- Giam, C.S., H.S. Chan, G.S. Neff, y E.L. Atlas. 1978. Phthalate ester plasticizers: A new class of marine pollutant. *Science*, (199): 419-421.
- Gómez, R. H. y O. A. García 1989. ¿Qué son? y ¿para qué sirven? los equipos acoplados de cromatografía de gases/espectrometría de masas. Facultad de química, UNAM. 14 pp
- Greer, A.E.; Lazell, J.D. and Wright, R.M. 1973. Anatomical Evidence for a Countercurrent Heat Exchanger in the Leatherback Turtle (*Dermochelys coriacea*). *Nature*. 244 (5412):181-184
- Gurr, M.I. y J.L. Harwood. 1991. *Lipid Biochemistry. an introduction*. Chapman & Hall. London. 406 pp.
- Hirt, H.F. 1987. Pollution on the marine turtle nesting beach in Tortuguero National Park, Costa Rica. *Environmental Conservation*, 14(1):74-75.
- Hooper, S.N. y R.G. Ackman. 1970. *trans-6- hexadecanoic acid* in the atlantic leatherback *Dermochelys coriacea coriacea* L. and other marine turtles. *Lipids* 5: 288-292.
- Hutchinson, L. y M. Simmonds. 1991. A review of the Effects of Pollution on Marine Turtles. A Greenpeace Ecotoxicology Project London. Greenpeace International 27 pp.
- INP. 1990. Programa Nacional de Investigación, Conservación y Fomento de Tortugas Marinas enero 1990. 15pp.
- Jobling, S., T. Reynolds, R. White, M.G. Parker y J.P. Sumpter. 1995. A variety of Environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives* 6(103): 582-587.
- Joseph, J.D.; R.G. Ackman y G.T. Seaborn. 1985. Effect of diet on depot fatty acid composition in the green turtle *Chelonia mydas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26:211-221.
- Lehninger, A.L. 1990. *Bioquímica*. Ed.Omega, Barcelona, España 285-314 p.

- López, S.C.; G.N. García T. y S. Karam M. 1994. Estrategias reproductivas de *Dermochelys coriacea* en el Playón de Mexiquillo Michoacán. Informe Final. Facultad de Ciencias UNAM. 52pp.
- Lutcavage, M. y P.L. Lutz. 1986. Metabolic rate and food energy requirements of the leatherback sea turtle, *Dermochelys coriacea*. *COPEIA*. Herpetological notes 3: 796-798.
- Márquez, M.R. 1990. FAO species catalogue . Vol. 11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species know to date. FAO Fisheries synopsis, No. 125, Vol. 11. Rome, FAO. 81p.
- Martín, D.W. et al. 1984. Bioquímica de Harper. El manual Moderno. México. 189-202p.
- Mc.Mullin, G.F.; S.C. Smith and P.A. Wright. 1968. Tissue Fatty Acid Composition in Four Diverse Vertebrate Species. *Comp. Biochem. Physiol.* 26:211-221.
- Mrsovsky, N. 1981. Plastic jellyfish. *Mar. Turtle Newsl.* (17):5-7
- Prichard, P. 1982. Nesting of the Leatherback Turtle *Dermochelys coriacea* in Pacific Mexico, with a New Estimate of the World population Status. *COPEIA* (4):741-747.
- Prosser, C.L. 1991. Environmental and Metabolic Animal Physiology. Ed. Wiley-Liss. New York USA. pp. 231-266.
- Reyes, G.A. 1993. Caracterización de aceites de semillas oleaginosas por sistema acoplado CG/EM. Tesis profesional de licenciatura en Química Industrial. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rhodin, A.G.J. y J.A. Ogden. 1981. Chondro-osseous morphology of *Dermochelys coriacea*, a marine reptile with mammalian skeletal features. *Nature* (290): 244-246.
- Sarti, M. L.; A. E. Villaseñor; B. Jiménez; J. Carranza y M. Robles. 1989. Investigación y conservación de las tortugas laúd (*Dermochelys coriacea*) y golfinia (*Lepidochelys olivacea*) en Mexiquillo, Mich. IV Informe de Trabajo. SEDUE, Subdelegación de Ecología, Michoacán. 1987-1988. 46pp.
- Sarti, M. L.; C. López S.; N. García T.; C. Ordoñez E.; L. Gámez G.; C. Hernández R.; A. Barragán R. y F. Vargas S. 1993. Protección e investigación de algunos aspectos reproductivos de las tortugas marinas *Lepidochelys olivacea* (golfinia) y *Dermochelys coriacea* (laúd) en el Playón de Mexiquillo,

- Michoacán. Informe final Temporada de anidación 1992-1993. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Sarti, M. L.; T. Argueta y A.R. Barragán. 1994. Aspectos biológicos y reproductivos de las tortugas marinas que anidan en México. *Biología de campo*. 1993-1994. Facultad de Ciencias UNAM. 62-76 pp.
- Sarti M., L.; N. García T.; A. Barragán y S. Eckert. 1996. Variabilidad Genética y Estimación del Tamaño de la Población Anidadora de Tortuga Laúd *Dermochelys coriacea* y su Distribución en el Pacífico Mexicano. Temporada de Anidación 1995-1996. Informe Técnico. Laboratorio de Tortugas Marinas, Facultad de Ciencias, UNAM., Programa Nacional de Tortugas Marinas, Instituto Nacional de la Pesca. México.
- Seaborn, G. y M. Moore. 1994. Unscrambling eggs: a Biochemical Method of Species Identification to aid in the prosecution of Marine Turtle egg Poachers. En: Schroeder and Witherington (comp.). *Proceedings of the XIII Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Jekyll Island, Georgia. 162 pp.
- Vázquez, L. M. et al. Estudio Bromatológico del huevo de Tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*), en el Playón de Mexiquillo Michoacán. Datos no publicados.
- Weldon, P.J. and M.J. Tanner. 1990a. Lipids in the Rathke's Gland Secretions of Hatchling Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *COPEIA* 1990, 570-573.
- Weldon, P.J.; R.T. Mason; M.J. Tanner and T. Eisner. 1990b. Lipids in the Rathke's Gland Secretions of Hatchling Kemp's Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys kemp*). *Comp. Biochem. Physiol.* 96B(4):570-573.



ANEXO I

Ésteres metílicos identificados por espectrometría de masas en 2 especies de tortuga marina.

TORTUGA LAUD <i>Dermochelys coriacea</i>																	
	C ₁₀	C ₁₂	C _{14:1}	C ₁₄	C ₁₅	C _{16:1}	C ₁₆	C _{17:1}	C ₁₇	C _{18:2}	C _{18:1}	C ₁₈	C _{19:7}	C _{20:7}	C ₂₀	C _{21:7}	C _{22:7}
AC 668 (1)				X			X				X						
AC 668 (3)		X		X		X	X				X						
AC 684 (1)		X		X			X	X	X	X	X	X		X			X
AC 684 (2)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
AC 684 (3)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
AC 684 (4)		X		X	X	X	X				X	X	X	X			
AC 701 (1)		X		X		X	X				X	X					
AC 701 (2)				X		X	X				X						
AC 701 (3)		X		X		X	X				X	X					
J 0775		X		X		X	X			X	X	X		X			X
J 0795		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X
Embrión A		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			
Embrión B		X		X	X	X	X		X	X	X	X		X			X
Embrión C		X		X		X	X			X	X	X					
TORTUGA GOLFINA <i>Lepidochelys olivacea</i>																	
	C ₁₀	C ₁₂	C _{14:1}	C ₁₄	C ₁₅	C _{16:1}	C ₁₆	C _{17:1}	C ₁₇	C _{18:2}	C _{18:1}	C ₁₈	C _{19:7}	C _{20:7}	C ₂₀	C _{21:7}	C _{22:7}
M28			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			XX
M29			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	
M31			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X
M32			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
M33			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		XX			XX
M34		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X			
M36				X		X	X				X						
M37				X		X	X			X	X	X					
M38		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X			X	
M39	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X				X
M65			X	X	X	X	X				X	X		X			

Nota: El número entre paréntesis, representa la anidación (recaptura) de la que se obtuvo la muestra. Las celdas con dos "X", representan dos ácidos grasos insaturados con el mismo número de carbonos, pero que difieren en el número de insaturaciones.

ANEXO II

Porcentaje relativo de los ésteres metílicos en cada muestra analizada.

TORTUGA LAUD <i>Dermochelys coriacea</i>																	
	C ₁₀	C ₁₂	C _{14:1}	C ₁₄	C ₁₅	C _{16:1}	C ₁₆	C _{17:1}	C ₁₇	C _{18:2}	C _{18:1}	C ₁₈	C _{19:7}	C _{20:7}	C ₂₀	C _{21:7}	C _{22:7}
AC 668 (1)				32.7			24.8				42.5						
AC 668 (3)		17.1		23.8		14.3	16.5				28.3						
AC 684 (1)		8.5		12.9			13.5	2.3	1.7	5.5	36.1	5.4		6			8.1
AC 684 (2)		10.7	0.7	18.3	1.3	7	16.2	1	0.8	3.3	26.4	2.7					11.6
AC 684 (3)		10.7	1.4	18.8	2.4	9.3	18.9	1.8	1.6	5.1	23.6	2.3	1.7	2.4			
AC 684 (4)		24.4		25.2	2.2	12.2	12.5				18.5	1.5	1.2	2.3			
AC 701 (1)		?		?		?	?				?	?					
AC 701 (2)				19.8		?	27.5				52.7						
AC 701 (3)		11.5		17.5		6.2	20				40	4.8					
J 0775		11.1		14.9		7.9	16.6			4.5	34.6	4		3.3			3.1
J 0795		8.5	0.8	12.4	1.8	7.6	13.4	1.7	1	7.2	29.4	4.1		1.1	4		7.1
Embrión A		19.1	1.6	21.4	1.9	6.5	16.9	1.1	1.3	1.5	24	3.3		1.4			
Embrión B		10.3		16.3	2.2	5.1	15.9		1.2	2.8	38.1	4.2		2.3			1.6
Embrión C		5.7		14.4		6.3	21.2			3.9	43.4	5.1					
TORTUGA GOLFINA <i>Lepidochelys olivacea</i>																	
	C ₁₀	C ₁₂	C _{14:1}	C ₁₄	C ₁₅	C _{16:1}	C ₁₆	C _{17:1}	C ₁₇	C _{18:2}	C _{18:1}	C ₁₈	C _{19:7}	C _{20:7}	C ₂₀	C _{21:7}	C _{22:7}
M28			1.1	16.5	1.3	15.1	14.9	1.8	?	3.9	31.4	3.8		2.4			5.9+1.9
M29			0.9	17.9	1.6	15.8	15.3	1.8	?	2	31.8	3.7		4.9		4.3	
M31			1	17.3	1.8	15.3	14.7	2.1	1	3	25.6	3.3		5.5		6.9	2.5
M32			1.1	22.1	1.7	17.1	17.4	2.6	1	2.7	31.7	2.6					
M33			0.9	10.9	2.2	13.2	15.4	3.2	2	3	28.1	5		5.6+2.3			5.6+2.6
M34		4	4	31.9	1.8	19.7	12.1	1.2			18.3	1.6	2.5	2.9			
M36				24.2		18.7	19.7				37.4						
M37				?		?	?			?	?	?					
M38		1	2.8	29.8	2.3	19.3	11.8	1.4			20.7	1.2	4.4			5.3	
M39	3	3.2	2.4	24.3	2.8	16.5	15	1.7			22.5	2.2	3.1				3.3
M65			3.5	21.2	2.3	13.5	19				33.5	4.4		2.6			

Nota: El número entre paréntesis, representa la anidación (recaptura) de la que se obtuvo la muestra. Los signos de interrogación se deben a que se trataban de picos cromatográficos muy pequeños y no se logró la integración de los mismos.

ANEXO III

Presencia de contaminantes en la fracción no saponificable.

TORTUGA LAUD <i>Dermochelys coriacea</i>								
	1	2	3	5	7	DMF	DOF	DBF
AC 668 (1)	X	X						
AC 668 (3)								
AC 684 (1)								
AC 684 (2)								
AC 684 (3)	X	X	X			X		
AC 684 (4)								
AC 701 (1)								
AC 701 (2)								
AC 701 (3)								
J 0775							X	
J 0795								
Embrión A	X	X						X
Embrión B	X			XXX				
Embrión C	X			X				
TORTUGA GOLFINA <i>Lepidochelys olivacea</i>								
	1	2	3	5	7	DMF	DOF	DBF
M28								
M29								
M31								
M32								
M33							X	
M34								
M36	X	X	X		X			
M37	X	X			X			
M38								
M39								
M65								

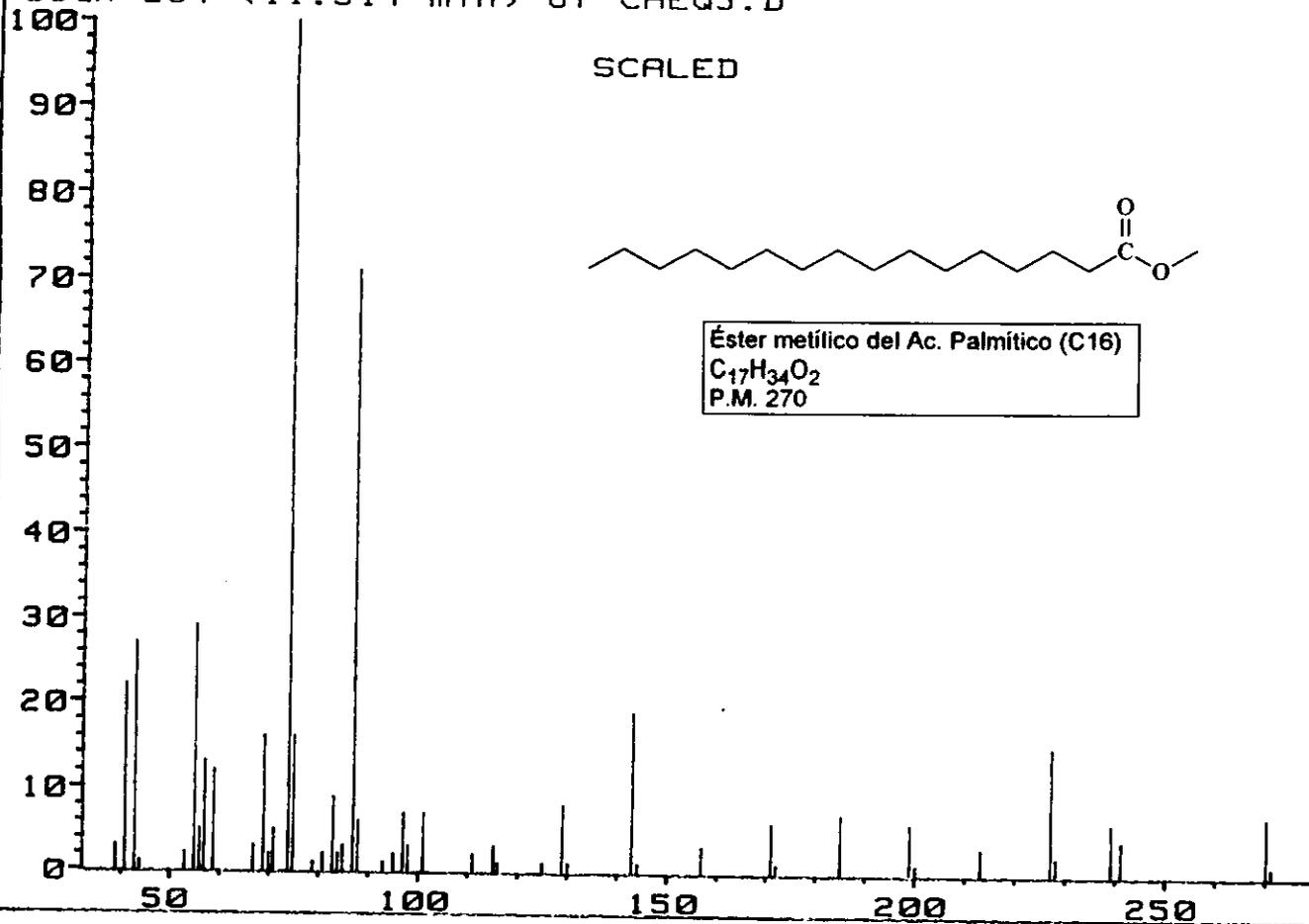
Nota: El número entre paréntesis, representa la anidación (recaptura) de la que se obtuvo la muestra. Las celdas con dos o más "X", representan isómeros de un mismo compuesto.

ANEXO IV

En este anexo se pretende mostrar un ejemplo de como se muestran los diferentes grupos de moléculas identificadas en este trabajo por espectrometría de masas. En orden de aparición se puede ver un ácido graso saturado representado por el ácido Palmítico, un ácido graso con una insaturación representado por el ácido Oleico, un ftalato representado por Dibutil-ftalato, una naftoquinona, el colesterol, una hidrocarburo (cera) y finalmente la vitamina E.

Cada gráfica (espectro de masas) representa en su eje de las "x" la relación masa valencia de los iones resultantes del bombardeo con electrones del sistema y en el eje de las "y" se aprecia la abundancia de cada ion. En cada espectro de masas se añadió la fórmula semidesarrollada de cada molécula que representa así como su nombre y su peso molecular. Los datos desglosados de cada gráfica aparecen en las tablas que siguen a cada una y es donde se puede buscar su ion molecular para su mejor identificación.

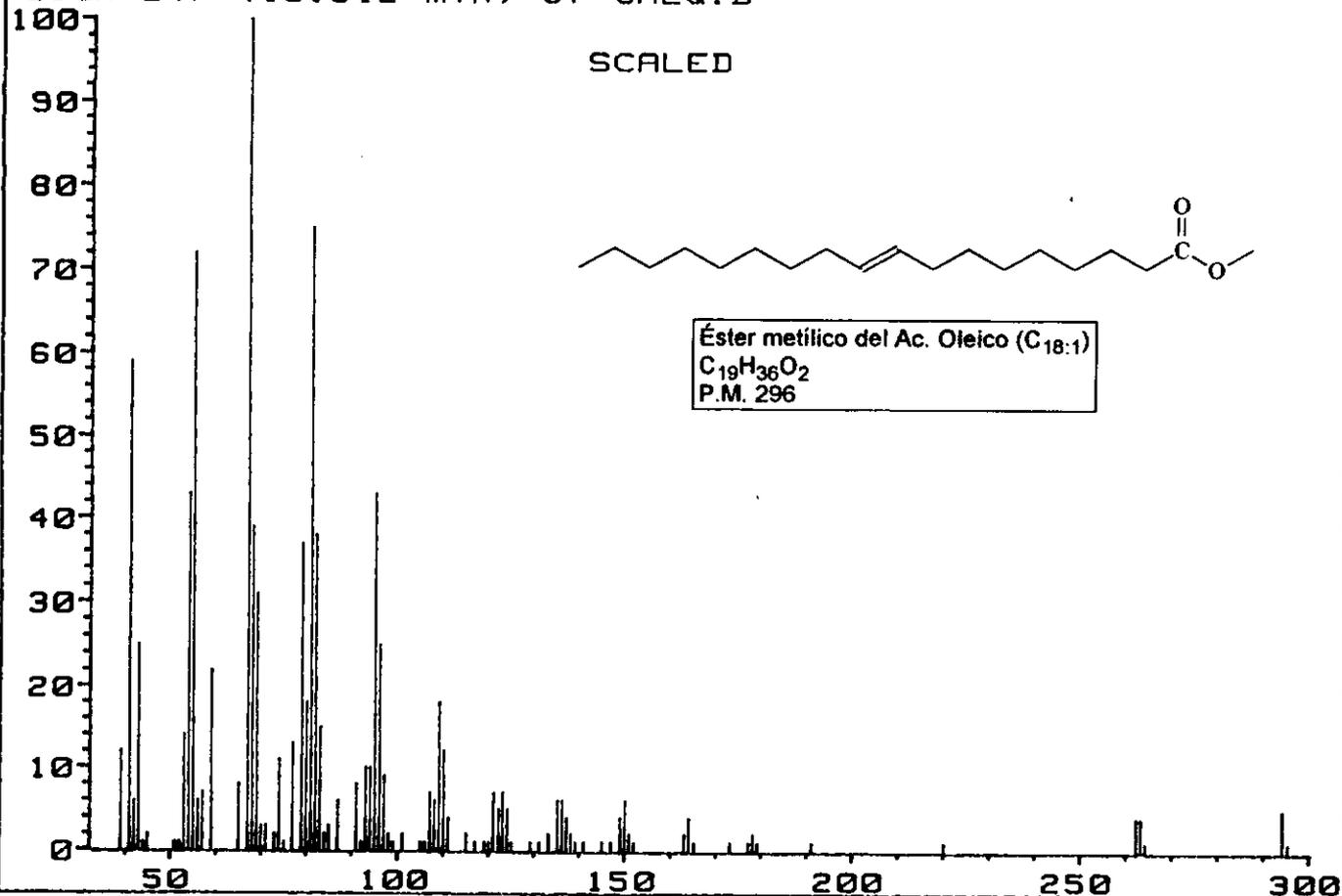
Scan 284 (11.914 min) of CHEQ5.D



Scan 284 (11.914 min) of CHEQS.D

EST.MET.CHINCHILLA		371096		FOO.CHICO			
m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
38.95	3	70.95	5	96.95	7	171.15	6
40.95	22	72.95	100	97.95	3	172.15	1
42.95	27	74.95	16	100.95	7	185.05	7
43.95	1	76.95	1	111.00	2	189.05	6
53.05	2	80.95	2	115.15	3	200.20	1
54.95	29	82.95	9	116.00	1	213.20	2
56.05	5	83.95	2	125.00	1	227.20	19
56.95	13	84.95	3	129.00	8	228.20	2
58.00	12	86.95	71	130.15	1	239.20	9
66.95	3	87.95	6	143.00	19	244.20	4
68.95	16	92.95	1	144.15	1	272.25	7
70.05	2	95.05	2	157.00	3	273.25	1

Scan 247 (10.512 min) of CHEQ.D



Scan 247 (10.512 min) of CHEQ.D
EST.MET.C18:1

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
38.95	12	75.05	1	107.00	7	141.00	1
40.95	59	76.95	13	108.00	6	145.00	1
41.95	6	78.95	37	109.00	13	147.00	1
42.95	25	79.95	18	110.00	12	149.00	4
43.95	1	80.95	75	111.00	4	150.00	6
44.95	2	81.95	38	115.00	2	151.00	2
50.95	1	82.95	15	117.00	1	152.00	1
51.95	1	83.95	2	118.00	1	153.00	2
52.95	14	84.95	3	120.00	1	164.00	4
53.95	43	86.95	6	121.00	7	165.15	1
54.95	72	90.95	8	122.15	5	173.05	1
55.95	6	92.05	1	123.00	7	177.20	1
56.95	7	92.55	10	124.00	5	178.20	2
58.95	22	93.95	10	125.00	1	179.20	1
64.95	8	94.95	43	129.15	1	191.05	1
66.95	100	95.95	25	131.15	1	200.05	1
67.95	39	96.95	9	133.15	2	262.15	4
68.95	31	97.95	2	135.15	6	263.15	4
69.95	3	98.95	1	136.15	6	264.15	1
70.95	3	101.00	2	137.15	4	294.15	5
72.95	2	105.00	1	138.15	2	295.05	1
73.95	11	106.00	1	139.15	1		

Scan 201 (6.298 min) of MPURA72.D

100

SCALED

90

80

70

60

50

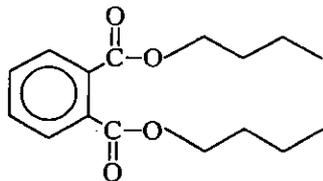
40

30

20

10

0



n-Dibutylfthalato
C₁₆H₂₂O₄
P.M. 278

50

100

150

200

250

Anexos

Scan 20: (6.298 min) of MPURATO.D

MEZCLA FTALATOS

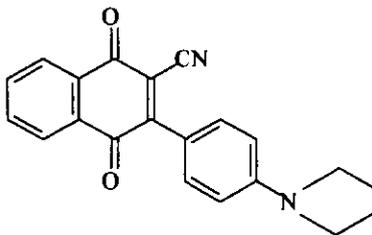
961122

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
103.95	2	146.95	100	205.00	15	224.05	2
104.95	1	145.95	9	206.00	2	277.55	1
120.95	1	150.95	1	222.55	15		

Scan 1347 (44.252 min) of INS2AFMS.D

100

SCALED



Naftoquinona
 $C_{21}H_{15}O_2N_2$
P.M.330

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

100

200

300

ESTA TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

Anexos

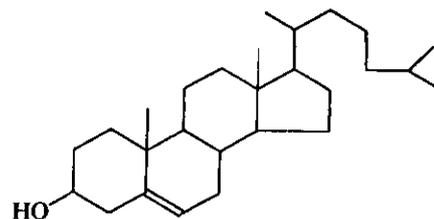
Scan 1347 (44.252 min) of INS2AFMS.D
FRACC.INSAP.MTRA.2 COL. SXFMS (DIC.95)

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
41.00	3	127.80	2	180.45	1	237.15	25
47.00	1	130.95	2	181.20	7	238.15	3
55.15	1	140.55	2	189.05	2	253.00	4
64.90	1	140.95	2	189.30	2	255.25	2
90.95	9	145.05	2	190.05	2	313.15	1
96.20	1	147.30	3	194.05	3	315.15	100
102.80	4	149.80	11	200.80	2	316.15	21
103.20	5	154.05	1	202.05	3	317.25	6
105.20	3	158.95	4	203.80	1	318.50	2
111.20	1	165.05	2	204.05	1	330.15	35
115.45	1	166.95	1	207.05	1	331.25	6
119.05	6	178.20	5	218.95	1	332.25	1
127.55	2	179.05	2	220.70	1	374.25	1

Scan 726 (25.917 min) of MPURA18.D

100

SCALED



Cholesterol

$C_{27}H_{46}O$

P.M. 386

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

100

200

300

Anexos

Scan 726 (25.917 min) of MPURA18.D
 COLESTEROL 960822

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
15.25	1	105.00	55	152.20	2	197.15	5
21.90	3	106.00	11	152.95	2	198.15	3
26.75	2	107.00	50	154.20	1	199.15	28
28.80	5	108.15	9	155.05	4	200.15	8
29.45	1	109.00	15	156.05	5	201.15	13
33.20	1	110.00	3	157.05	21	202.15	3
36.80	3	115.00	9	158.05	18	203.15	6
39.70	1	116.00	4	159.05	49	205.15	6
40.80	33	117.00	24	160.05	30	206.25	5
41.80	10	118.00	8	161.05	36	211.15	3
42.80	100	119.00	40	162.05	9	213.15	69
43.80	2	120.00	19	163.05	27	214.15	18
52.80	7	121.00	22	164.05	5	215.15	12
53.95	2	122.00	6	165.05	7	216.15	3
54.95	26	123.00	8	166.20	1	217.15	7
55.95	5	124.00	5	167.95	2	218.25	2
56.95	44	125.15	5	169.05	5	219.15	7
57.95	3	127.00	1	171.05	22	220.15	4
64.70	5	128.00	13	172.05	10	221.25	1
66.90	14	129.00	17	173.05	30	221.65	1
67.80	2	130.00	10	174.05	7	225.25	1
68.95	18	131.00	40	175.05	10	227.15	12
69.95	3	132.00	13	175.95	4	228.15	12
70.95	16	133.00	41	177.05	10	229.15	13
76.95	13	134.05	10	178.05	12	230.15	4
77.80	1	135.05	25	178.95	4	231.15	33
78.80	27	136.05	4	183.05	3	232.15	8
79.95	4	137.05	2	184.05	2	233.15	5
81.00	19	138.05	1	185.05	22	234.40	1
82.00	3	141.05	8	186.05	12	239.00	5
83.00	5	141.95	4	187.15	22	240.05	2
84.90	1	143.05	26	188.15	5	241.20	5
91.00	45	144.20	12	189.15	9	242.05	1
92.15	8	145.05	63	190.15	4	243.30	1
93.00	27	146.05	12	191.15	9	244.45	1
94.00	12	147.05	29	192.25	2	245.20	7
95.00	30	148.05	9	192.50	2	246.20	7
96.90	5	149.05	17	193.25	8	247.20	14
103.00	4	150.20	3	194.00	2	248.30	5
104.00	5	151.05	5	195.15	1	255.20	45

Scan 726 (26.917 min) of MPUR13.D
COLESTEROL

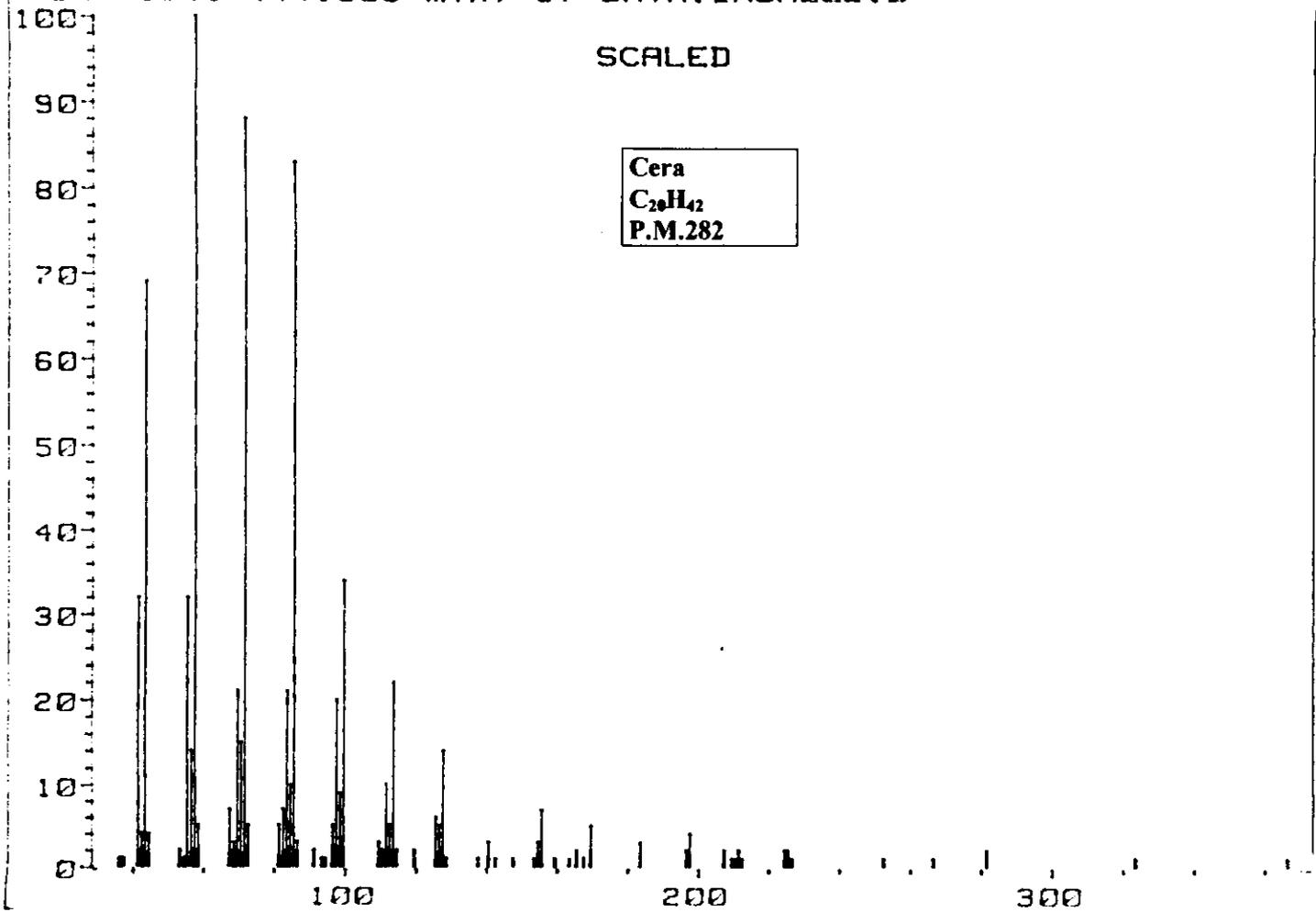
950822

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
256.20	7	287.30	2	326.25	3	354.20	12
257.20	3	288.20	2	327.25	7	355.45	2
259.20	5	289.25	3	328.25	1	359.30	42
260.20	4	300.25	4	329.40	7	359.30	10
261.30	4	301.25	62	330.25	2	370.45	3
271.20	2	302.40	16	339.40	2	371.30	34
273.20	31	303.15	2	340.25	2	372.30	9
274.20	21	311.15	3	342.15	1	384.45	1
275.20	70	312.00	1	343.40	1	386.30	69
276.20	14	313.40	4	344.15	1	387.30	21
277.20	1	314.25	3	353.30	47	388.30	2
283.30	1	315.25	3				

Scan 1341 (44.806 min) of DATA:INSMEZZ.D

SCALED

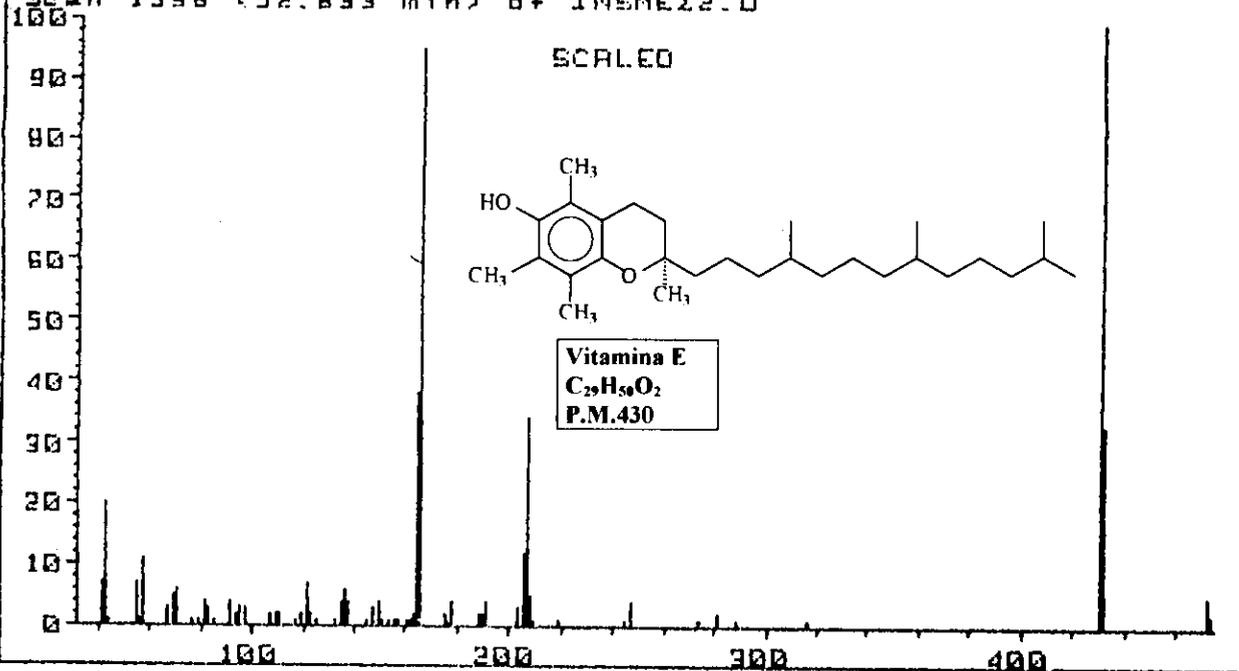
Cera
 $C_{20}H_{42}$
P.M.282



Scan 1341 (44.806 min) of DATA:INSME22.D
 FRACCION INSAPONIFICABLE MEZCLA (MAYOR CONC)

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
35.80	1	71.15	88	112.15	5	167.20	1
36.05	1	72.15	5	113.15	22	169.20	5
36.80	1	81.00	5	114.15	2	183.20	3
37.05	1	82.15	7	119.15	2	196.30	2
41.15	32	83.15	21	125.20	6	197.20	4
42.15	4	84.15	10	126.20	5	207.15	2
43.15	69	85.15	83	127.20	14	209.40	1
44.15	4	86.15	3	128.20	1	210.15	1
53.00	2	91.00	2	137.30	1	211.25	2
54.15	1	93.25	1	140.20	3	212.25	1
55.00	32	94.00	1	142.20	1	224.25	2
56.15	14	96.15	5	147.20	1	225.25	2
57.15	100	97.15	20	153.20	1	226.40	1
58.15	5	98.15	9	154.20	3	252.25	1
67.00	7	99.15	34	155.20	7	266.25	1
68.15	3	109.15	3	159.05	1	281.25	2
69.15	21	110.00	2	163.20	1	323.30	1
70.15	15	111.15	10	165.20	2	366.40	1

Scan 1596 (52.893 min) of INSMEZ2.D



Scan 1596 (52.032 min) of INSMEI2.D
 FRACCION INSAPONIFICABLE MEZCLA (MAYOR CONC)

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
41.00	7	55.00	3	151.20	1	205.15	12
42.15	1	57.15	3	153.05	1	206.25	2
43.15	20	107.15	2	155.00	1	207.15	34
44.00	1	109.15	2	157.20	1	208.15	5
55.15	7	111.15	2	161.05	1	209.00	1
56.15	1	117.15	1	162.20	1	219.15	1
57.15	11	119.15	2	163.05	2	245.00	1
67.15	3	121.20	7	164.05	36	247.15	4
68.15	5	122.05	1	165.05	55	274.15	1
70.15	1	123.20	2	166.05	12	281.00	2
71.15	5	125.20	1	175.05	2	289.30	1
77.20	1	133.05	1	178.05	1	318.20	1
78.00	1	135.05	4	177.05	4	430.40	59
81.15	4	136.20	6	178.20	1	431.40	32
83.00	3	137.20	4	189.05	2	432.40	4
85.15	1	145.05	1	190.20	2	472.45	5
91.15	4	147.05	3	191.05	4	473.30	2
93.15	2	149.20	4	203.15	3		