



TESIS DOCTORAL

**SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA Y
APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO**

YOLANDA IBÁÑEZ PERNÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Conformidad del director Dr. Francisco Soler Rodríguez y del codirector Dr. Marcos Pérez López

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirector de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

A la memoria de mi abuela Teresa

YOLANDA IBÁÑEZ PERNÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la colaboración del personal del centro de recuperación de fauna y educación ambiental “Los Hornos” (Sierra de Fuentes, Cáceres) y a la Consejería de Transición Ecológica y Sostenibilidad de la Junta de Extremadura. Ha sido cofinanciado por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) y la Junta de Extremadura (GR 18080). Agradecer a la Junta de Extremadura la financiación de los análisis toxicológicos correspondientes mediante distintos convenios y contratos con la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente (años 2002 a 2008), Consejería de Industria, Energía y Medio Ambiente (años 2009 a 2012, Exptes: 09N4999FR074 y IIN499FR0012), Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural y Medio Ambiente (años 2013 a 2015, Exptes:1351SE3FR340, 1451SE3FR355 y 1551SE3CA564), Consejería de Medio Ambiente y Rural, Política Agraria y Territorio (años 2016 a 2018; Exptes.: 1651SE3FR428, 1751SE3FR366 y 1851SE3FR233) y Consejería de Transición para la Ecológica y Sostenibilidad (años 2019 a 2022; Exptes.: CMSERSO19029 y 2051999FR002).

A nivel personal, quiero expresar a través de estas líneas mi sincero agradecimiento a aquéllos cuyo apoyo y ayuda han sido totalmente imprescindibles para llegar a concluir esta tesis doctoral.

En primer lugar, a mis directores de tesis. Al Dr. Marcos Pérez López por hacerme la proposición de embarcarme en este desafío y depositar su confianza en mí, así como por todo el apoyo y el conocimiento compartido durante estos años. Al Dr. Francisco Soler Rodríguez, por prestarme toda su paciencia y sabiduría tanto en mis años como trabajadora en el Departamento de Toxicología, como en el desarrollo de esta tesis doctoral. Ha sido todo un privilegio.

A la Dr. M^a Prado Míguez Santiyán y al Dr. David Hernández Moreno por toda la ayuda y apoyo en los años compartidos.

A Caridad Masa, por ayudarme incondicionalmente en el trabajo de laboratorio cada día, por involucrarse todo lo posible en la consecución de esta tesis, sin que me faltasen sus cuidados y sus ánimos. Agradecimiento que quiero hacer extensivo a Ricardo Argent. Sin vosotros, no habría llegado hasta aquí.

A Carla Monteiro. Es imposible explicar todo lo que has aportado a este proyecto en unas pocas líneas, sin desistir y consiguiendo que yo no desistiese, aunque te haya resultado tan difícil como a mí. Gracias por todo.

A la familia Hernández Leza, a Maite y Markus, por compartir todo conmigo cuando ya no tenía opciones y hacer posible que continuase este proyecto. Nunca os lo podré agradecer lo suficiente.

A Julia Calvarro, por sus buenos consejos, su apoyo y su ayuda.

A Teresa Fernandes y Ana Lúcia Petrica, por ser el mejor apoyo al otro lado de la frontera.

A todas las personas que se cruzaron e mi camino durante mis años en Extremadura, que han conseguido que me sienta parte de esta tierra. A la Dra. María Plaza Dávila y Esther Rodríguez por todos los momentos de trabajo, diversión y amistad. A la Dra. Patricia Santofimia y la Dra. Asunción Ramos, por todos los momentos compartidos y su apoyo incondicional. Al Dr. Alfredo Escribano, por su entusiasmo contagioso y su amistad. Al Dr. Jorge Tovar, por su apoyo. A Estefanía Calaco, por su apoyo y ayuda que han sido tan importantes.

A la Dra. Natalia Dionisio, por los buenos momentos compartidos entre departamentos. A las Dras. Ana Raquel Maia, Irene de la Casa y Salomé Morcillo, por todos los momentos en el Departamento y toda la ayuda.

A mis compañeros de Imasde Agroalimentaria, por facilitar siempre que pudiese dedicarle tiempo a la tesis.

A Guillermo Cano y Paula Mesonero por su ayuda con la estadística.

A todos mis amigos de los distintos puntos geográficos que me han animado, ayudado y que se alegran de manera sincera tanto o más que yo por la finalización de esta tesis.

A mis padres, Tere y Carlos, por hacer posible que haya podido conseguir todos mis proyectos y ser el mejor ejemplo. A toda mi familia, por el apoyo y los cuidados constantes; por mostrarme siempre la confianza de que conseguiría llegar hasta aquí.

A mi abuela Teresa, sin la que nunca hubiese decidido convertirme en Veterinaria ni me hubiese planteado esta tesis doctoral. Por enseñarme a entender la naturaleza y el medio rural donde están nuestras raíces, despertando mi vocación veterinaria. Por ser la primera en hablarme de un caso de envenenamiento cuando a su padre Manuel Ibáñez se le murieron sus perros de caza en los alrededores de la finca burgalesa del Cristo de Villahizán allá por los años 30 tras cazar unas palomas. Por despertar la curiosidad que me ha traído hasta aquí y ser el mejor ejemplo de trabajo y dignidad.



Índice

RESUMEN / 13

ABSTRACT / 19

PRESENTACIÓN DE LA TESIS / 25

I. INTRODUCCIÓN GENERAL / 31

1.1 Introducción histórica de la toxicología aplicada a la fauna silvestre / 33

1.2. Plaguicidas sintéticos y medio ambiente. Nacimiento de la ecotoxicología / 34

1.3. Situación actual de las intoxicaciones de la fauna silvestre terrestre / 41

1.3.1. Especies afectadas en las intoxicaciones por plaguicidas / 44

1.3.3. Los cebos envenenados como herramienta de eliminación de depredadores / 51

1.3.4. Regulación y estrategias actuales contra el veneno / 51

1.4. COPs, los contaminantes orgánicos persistentes / 53

1.4.1. Medidas internacionales para su regulación y control / 56

1.4.2. COPs y fauna silvestre terrestre / 59

1.4.2.1. PCBs (bifenilos policlorados) / 61

1.4.2.2. OCs (plaguicidas organoclorados) / 61

1.5. Diagnóstico de intoxicaciones en Medicina Forense Veterinaria / 64

1.5.1. Diagnóstico toxicológico de plaguicidas en fauna / 64

1.5.2. Métodos Multirresiduo en la determinación de plaguicidas en tejidos / 66

1.6 Método QuEChERS / 68

1.6.1 Método QuEChERS para el análisis de COPs en fauna silvestre / 71

OBJETIVOS / 73

BIBLIOGRAFÍA / 75

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERÍODO DE 2002 A 2018 / 91

2.1. Resumen / 93

2.2. Palabras clave / 94

2.3. Introducción / 94

2.4. Material y métodos / 97

2.4.1. Recepción y tratamiento inicial de las muestras / 97

2.4.2. Análisis toxicológico / 99

2.4.3. Análisis instrumental / 101

2.4.4. Control de calidad de datos / 103

2.5. Resultados / 103

2.6. Discusión / 113

2.6. Conclusiones / 128

2.7. Bibliografía / 131

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO NATURAL DE EXTREMADURA (2002-2018) / 141

3.1. Resumen / 141

3.2. Palabras clave / 142

3.3. Introducción / 142

3.4. Material y métodos / 147

3.4.1. Área de estudio y toma de muestras / 147

3.4.2. Examen de las muestras / 147

3.4.3. Análisis toxicológico / 148

3.4.4. Procesado de las muestras / 150

3.4.5. Análisis instrumental / 153

3.4.6. Control de calidad de datos / 153

3.5. Resultados / 153

3.5.1. Tipos de cebos / 153

3.5.2. Sustancias detectadas / 158

3.6. Discusión / 162

3.7. Conclusiones / 171

3.8. Bibliografía / 172

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES / 181

4.1. Resumen / 183

4.2. Palabras clave / 184

4.3. Introducción / 185

4.4. Material y métodos / 189

4.4.1. Solventes y reactivos / 189

4.4.2. Patrones / 190

4.4.3. Equipos utilizados / 190

4.4.4. Puesta a punto del método / 192

4.4.5. Aplicación del método final / 201

4.5. Resultados y discusión / 202

4.5.1. Desarrollo del método / 202

4.5.2. Validación del método final / 203

4.5.2. Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) / 205

4.5.3. Análisis de OCs y PCBs en hígado de aves silvestres / 209

4.6. Conclusiones / 222

4.7. Bibliografía / 224

5. CONCLUSIONES GENERALES / 235

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

- 1. INTRODUCCIÓN GENERAL**
- 2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018**
- 3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)**
- 4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES**
- 5. CONCLUSIONES GENERALES**

Resumen

Resumen

La especial preocupación por parte tanto de los científicos como de la población general sobre los efectos adversos asociados a la utilización y/o liberación de plaguicidas y diversos contaminantes en el medio natural sobre organismos no diana, los desequilibrios ecológicos que provocan, la persistencia en el medio ambiente y su seguridad para el ser humano se remonta a más de medio siglo atrás. Pero a pesar de esta inquietud, hoy en día, las intoxicaciones accidentales o intencionadas de fauna silvestre siguen siendo una realidad a nivel internacional. Concretamente, este tipo de incidentes cobran una especial relevancia en una región como Extremadura, caracterizada por su gran riqueza faunística y por albergar ciertas poblaciones de fauna silvestre únicas a nivel nacional y europeo. En este entorno, la Unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura ha aportado soporte científico y técnico al gobierno autonómico para el estudio de estos casos acontecidos en la región desde el año 2002, todo ello mediado por un Convenio de Colaboración entre ambas instituciones. Por ello, en el presente trabajo se presentan los resultados de 17 años de estudio retrospectivo acerca de estas intoxicaciones (2002-2018), valorando así mismo su impacto en Extremadura.

Por otro lado, en base a la experiencia del equipo de trabajo, se ha avaluado la necesidad de optimizar el trabajo laboratorial tanto a nivel de medios humanos como económicos mediante la posible aplicación de un método de análisis multiresiduo (MMR) para este tipo de análisis que subsanase las actuales exigencias en cuanto a rapidez, ahorro de material y efectividad, de manera que se pudiese atender a la creciente demanda actual de este tipo de analíticas. La aplicación del método QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) en tejidos animales (que constituyen una matriz rica en grasas y proteínas)

para los distintos tipos de plaguicidas de interés en este campo, podría solventar las deficiencias expuestas anteriormente y aumentar la eficiencia del trabajo laboratorial. Cabe destacar que el método fue desarrollado y actualmente constituye un método de análisis de amplio espectro para plaguicidas en frutas y vegetales, principalmente. Por ello, se planteó como objetivo la validación del método QuEChERS para el análisis de plaguicidas en hígado de aves como herramienta de análisis toxicológico en tejidos animales. Dicha metodología se aplicó para la detección de plaguicidas pertenecientes a los grupos de interés para este tipo de estudios en base a nuestra experiencia para, en última instancia, aplicarla a muestras reales.

Palabras clave: intoxicaciones, fauna silvestre, plaguicidas, método multiresiduo.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

Abstract

Abstract

The special concern on the part of both scientists and the general population about the adverse effects associated with the use and/or release of pesticides and various contaminants in the natural environment on non-target organisms, the ecological imbalances they cause, the persistence in the environment and its safety for human beings dates back more than half a century. But despite this concern, today, accidental or intentional poisoning of wildlife continues to be a reality internationally. Specifically, these types of incidents take on special relevance in a region like Extremadura, characterized by its great faunal wealth and by housing certain unique wildlife populations at the national and European level. In this environment, the Toxicology Unit of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Extremadura has provided scientific and technical support to the regional government for the study of these cases that have occurred in the region since 2002, all mediated by a Collaboration Agreement between both institutions. Therefore, in this work the results of 17 years of retrospective study about these poisonings (2002-2018) are presented, also assessing their impact in Extremadura.

On the other hand, based on the experience of the work team, the need to optimize laboratory work has been evaluated both at the level of human and economic resources through the possible application of a multi-residue analysis method (MMR) for this type of analysis. that would correct the current demands in terms of speed, material savings and effectiveness, so that the current growing demand for this type of analysis could be met. The application of the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method in animal tissues (which constitute a matrix rich in fats and proteins) for the different types of pesticides of interest in this field, could solve the deficiencies explained above. and increase the efficiency of laboratory

work. It should be noted that the method was developed and currently constitutes a broad-spectrum analysis method for pesticides in fruits and vegetables, mainly. Therefore, the objective was to validate the QuEChERS method for the analysis of pesticides in poultry liver as a tool for toxicological analysis in animal tissues. This methodology was applied to detect pesticides belonging to the groups of interest for this type of study based on our experience to, ultimately, apply it to real samples.

Keywords: poisonings, wildlife, pesticides, multi-residue analysis method.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

Presentación de la tesis

Presentación de la tesis

La toxicología aplicada a la fauna silvestre comenzó a desarrollarse, ligada a la toxicología ambiental, ya avanzado el s. XIX, por la preocupación ante las intoxicaciones no intencionales en la fauna, si bien se centraba más en los posibles problemas ambientales que en determinar concentraciones en tejidos de individuos específicos. Pero las primeras décadas del s. XX supusieron un punto de inflexión en este campo por el descubrimiento de los plaguicidas sintéticos y sus devastadoras consecuencias sobre el medio ambiente. Las primeras publicaciones sobre sus efectos en los organismos silvestres dieron lugar al despertar de un debate público sobre sus potenciales peligros, forzando la aparición de programas de estudio y seguimiento a nivel internacional. Éstos, a su vez, derivaron en estudios sobre los efectos de plaguicidas sobre poblaciones de aves y mamíferos, naciendo así el campo de la Ecotoxicología. En todo este proceso subyace que evidentemente la toxicología en fauna silvestre evoluciona paralelamente a la producción y uso que el ser humano hace de las nuevas sustancias químicas y de la preocupación de los efectos que pueden causar en el medio ambiente. Es, por tanto, de vital importancia en Salud Pública y Animal, conocer y valorar la exposición de la fauna silvestre a los compuestos químicos y sus posibles efectos sobre los animales, su hábitat, el medio ambiente y la exposición a la que acaba estando sometido al ser humano a nivel ambiental y alimentario. Además, el conocimiento de la casuística de intoxicaciones primarias y secundarias provocadas por el uso de cebos envenenados es necesario para una adecuada gestión de las poblaciones de fauna silvestre.

Actualmente, en el terreno de la toxicología ambiental nuestro país y, más concretamente, una región como Extremadura por su gran importancia en cuanto a diversidad faunística, están viendo amenazada

esta riqueza por diversos factores, entre los que destaca la mortalidad que provoca el uso de plaguicidas en el medio natural; mortalidad que puede aparecer a pesar del buen uso de los mismos, pero también por su abuso (provocando intoxicaciones accidentales en ambos casos) o al uso ilegal de los plaguicidas para la elaboración de cebos envenenados contra la fauna (intoxicaciones intencionales). Por tanto, el uso ilegal de venenos constituye una grave amenaza para la biodiversidad en España, en un proceso que además en las últimas décadas se ha incrementado, descubriéndose un mayor número de casos, debido seguramente a la utilización de estos venenos contra depredadores de especies cinegéticas pero que, en no pocas ocasiones, también acaban afectando a otras especies que pueden estar en un estado de conservación vulnerable. Ante esta situación, la Unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura ha aportado un relevante soporte técnico a las autoridades regionales extremeñas a raíz de un Convenio de Colaboración para el estudio de estos casos acontecidos en la región surgido el año 2002 y mantenido mediante sucesivas renovaciones hasta la actualidad. Los resultados obtenidos entre los años 2002 a 2018 son presentados de forma detallada en esta tesis doctoral. Para ello, se presentan los casos diagnosticados por especie, se clasifican los tipos de cebos envenenados encontrados en el medio natural y se valora su impacto sobre la conservación de las especies afectadas, así como su distribución geográfica, analizándose así mismo la progresión del marco legal y las diferentes medidas e iniciativas puestas en marcha a lo largo de los años para luchar contra estas prácticas criminales.

Durante los años de recopilación de datos recogidos en el presente estudio, y basándonos en la experiencia del equipo receptor, se valoró la necesidad de optimizar el trabajo laboratorial tanto a nivel de medios humanos como económicos, de manera que los datos obtenidos fuesen extensivos y útiles para otros laboratorios con actividad similar. Este planteamiento surgió debido a que los métodos multirresiduo (MMR) utilizados y que se han ido desarrollando en las últimas décadas, aun siendo los de elección de manera generalizada en los laboratorios para el análisis de plaguicidas, en ningún caso han llegado a ser

considerados como “el ideal” para tal fin. Siempre han sido largos y laboriosos, desarrollados en contextos en los que la demanda de este tipo de análisis era menor y la variedad y el uso de plaguicidas eran más limitados. En este entorno y, para solventar estas deficiencias, surgió la idea del incipiente método QuEChERS (acrónimo procedente de los calificativos en inglés *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que fue descrito por primera vez por Anastassiades *et al.* en 2003 como método de análisis de amplio espectro para plaguicidas en frutas y vegetales, previa remoción de azúcares, lípidos, ácidos orgánicos, esteroides, proteínas, pigmentos y exceso de agua. La técnica ofrecía una alternativa sencilla a la costosa extracción en fase sólida que se estaba desarrollando durante el estudio. Todo ello conseguido con dos simples pasos: primero, extracción de las muestras homogeneizadas utilizando un solvente orgánico en un medio de alta salinidad; segundo, purificación del extracto mediante una técnica de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Por ello, se planteó su posible aplicación en tejidos animales (con la particularidad de que constituyen una matriz rica en grasas y proteínas) para los distintos tipos de plaguicidas de interés en este campo, lo que solventaría las deficiencias expuestas anteriormente y aumentaría la eficiencia del trabajo laboratorial. El objetivo que se planteó, por tanto, en esta tesis doctoral fue la validación del método QuEChERS para el análisis de plaguicidas en una matriz tan compleja como el hígado de ave, convirtiéndolo en una herramienta de análisis toxicológico en tejidos animales. La validación se llevaría a cabo con plaguicidas pertenecientes a los grupos de interés para este tipo de estudios en base a nuestra experiencia, aplicándose en muestras reales pertenecientes a 3 grupos tróficos diferentes: cigüeña blanca, milano real y buitre leonado.

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

1

Introducción general

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción histórica de la toxicología aplicada a la fauna silvestre

La toxicología aplicada a la fauna silvestre forma parte de la ecotoxicología (ciencia que estudia los efectos tóxicos provocados por los contaminantes sobre los ecosistemas), ocupándose específicamente de los anfibios, reptiles, aves y mamíferos terrestres y acuáticos desde un punto de vista multidisciplinar (Rattner, 2009). Sus inicios se remontan a las décadas finales del s. XIX cuando, en el marco de la toxicología ambiental, se empezó a considerar el impacto de las intoxicaciones no intencionales (accidentales) sobre estos organismos: las primeras reseñas hacían referencia a intoxicaciones por plomo en aves (sobre todo especies acuáticas) al consumir perdigones o al contaminarse el agua por vertidos de residuos de la minería a los ríos. Estos casos llegaron a ser considerados incidentes habituales ya en la época (Calvert, 1876; Grinnell, 1894; Wetmore, 1919; Phillips y Lincoln, 1930; Rattner *et al.*, 2011). Otros casos acontecidos a finales del s. XIX fueron también registrados como, por ejemplo, uno en el que se relacionaron las muertes de gamos (*Dama dama*) en Alemania con la presencia en el entorno de numerosas industrias siderúrgicas y que fue publicado en la prensa ya en 1891. Ese mismo año, en California miles de zampullines cuellinegros (*Podiceps nigricollis*) y de patos cuchara (*Anas clypeata*) sufrieron intoxicación por álcalis, produciéndose más casos similares en distintas localizaciones del oeste de Estados Unidos (Fisher, 1893), sentando precedente para estudiar los efectos de álcalis como el cloruro cálcico y el cloruro de magnesio, ya con aves de experimentación. Durante esas primeras décadas de siglo se siguieron identificando peligros para la fauna silvestre derivados de la

actividad humana, tales como la ingestión de fósforo de las municiones militares por parte de las aves acuáticas o la muerte de estas mismas especies por contaminación por combustibles de propulsión marítima tras la Primera Guerra Mundial (Phillips y Lincoln, 1930). No se habían desarrollado todavía las actuales técnicas sensibles de detección de tóxicos en los tejidos, de tal forma que su presencia se confirmaba en gran medida mediante su evidencia en los casos que se estudiaban (perdigones en estómago, combustible cubriendo a las aves, etc.), pero es reseñable que en 1926 se detectaron restos de arsénico en hígado de ciervos tras su aplicación para el control de insectos en el medio natural (Keith, 1996). En 1931, Linsdale habló de la intoxicación de especies no diana (aves) causada por la colocación de cebos con talio para el control de ardillas y de la posibilidad de su detección y cuantificación en tejidos con diferentes métodos. Durante los años posteriores, se empezó a plantear la posibilidad y la importancia de la cuantificación de tóxicos en los tejidos, no solo determinando si el animal había muerto por exposición a un tóxico o no (Adler, 1944). A estos planteamientos les siguieron los primeros estudios con aves de experimentación para conocer los efectos de diferentes tóxicos utilizando cantidades controladas de los mismos (Coburn *et al.*, 1950, 1951), lo que supuso un avance en el conocimiento de gran utilidad para casos posteriores. Pero al mismo tiempo, las décadas de los años 30 y 40 supusieron un punto de inflexión importantísimo por el descubrimiento de los plaguicidas sintéticos y sus devastadoras consecuencias sobre el medio ambiente.

1.2. Plaguicidas sintéticos y medio ambiente. Nacimiento de la ecotoxicología

La era de los plaguicidas sintéticos comienza en 1939, cuando el químico suizo Müller descubrió las propiedades insecticidas de una molécula (el DDT o diclorodifeniltricloroetano) que había sido sintetizada en 1874, y después olvidada. Müller provocó así su utilización de manera exponencial durante la Segunda Guerra Mundial (Hayes, 1991;

Rattner, 2009) con el fin de evitar los daños por plagas en los cultivos (se empezó a usar contra el escarabajo de la patata), asegurando así el aprovisionamiento alimentario y evitando por tanto la propagación de enfermedades transmitidas por insectos que asolaban a la población en esos años (malaria, tifus, peste, etc.). En las siguientes décadas, tuvo un papel muy importante en la erradicación de la malaria en muchos países (entre ellos, España) al ser muy eficaz contra los mosquitos del género *Anopheles spp.*, lo que llevó a que se le concediese a Müller el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1948. Pero tras años de aplicación masiva a nivel mundial, a finales de los 40 y principios de los 50 se empezó a sospechar que los insectos empezaban a desarrollar cierta resistencia a su efecto (Tren y Bate, 2001) y además empezaron a aparecer estudios que evidenciaban sus efectos nocivos en fauna silvestre cuando era aplicado a ciertas concentraciones (llegando a cuantificarse en tejidos de aves), demostrándose así mismo su especial toxicidad sobre los organismos acuáticos. Paralelamente, el uso de otros insecticidas y fungicidas era generalizado y se observaron numerosos casos de mortalidad en fauna silvestre que ya se relacionaban con aplicaciones previas de plaguicidas organoclorados y organofosforados. También se desarrollaron los primeros estudios enfocados en las consecuencias subletales de estos compuestos en especies cinegéticas, llegando a generar ciertas restricciones sobre el uso de insecticidas ciclodienos en el Reino Unido ya en 1962. Tampoco en esos años se dejaron de estudiar los efectos de los demás contaminantes “más clásicos” como el plomo o los fungicidas organomercuriales, ni de mejorar los métodos de diagnóstico (Rattner, 2009). Años más tarde, se alzó con fuerza la voz de la bióloga marina y conservacionista estadounidense Rachel Carson, que con su libro “Silent Spring” (1969) abordó todos los aspectos relacionados con el alcance del uso de plaguicidas sintéticos, por ejemplo, el efecto acumulativo de los plaguicidas organoclorados como el DDT en la cadena alimentaria, las alteraciones sobre organismos no diana, los riesgos para el ser humano, la contaminación de las aguas o las evidencias de las resistencias a su efecto insecticida, convirtiéndose en pionera del ecologismo (Bouwman *et al.*, 2013). Generó así en Estados Unidos

un debate tanto a nivel científico como social que fue el motor para el desarrollo de una nueva legislación y el establecimiento de organismos gubernamentales para hacer frente a la contaminación ambiental. Ello dio lugar a que en la década de los 60 se establecieran programas de investigación a nivel internacional sobre los efectos de las sustancias químicas sobre la fauna y sus hábitats, se desarrollaran programas de detección de sustancias químicas y programas de monitorización de contaminantes ambientales a largo plazo, por ejemplo, el “Predatory Bird Monitoring Scheme” en el Reino Unido, que sigue estando plenamente vigente hoy en día (Dulsat-Masvidal *et al.*, 2021). Hay que recordar que cuando Müller estudió el efecto insecticida del DDT no tuvo en cuenta ciertos aspectos que hoy en día serían parte esencial en el desarrollo de cualquier compuesto, como su degradación y no acumulación en el medio ambiente, y su capacidad de acumulación en los seres vivos.

En estas primeras fases de desarrollo de plaguicidas, los científicos pioneros de aquellos años revelaron de manera inequívoca que estos compuestos podían afectar la vida silvestre a través de su aplicación directa o indirecta, la intoxicación secundaria, la escorrentía hacia los cauces del agua o la contaminación del agua subterránea (es posible que algunos animales puedan tener contacto directo, otros consumen agua, plantas, animales o semillas que han estado expuestas a plaguicidas). En 1966, el científico sueco Soren Jenssen observó que, durante la cuantificación del DDT mediante cromatografía de gases, aparecían otros picos que interferían con dichos resultados y que posteriormente fueron identificados como Bifenilos policlorados (PCBs) (agentes químicos ampliamente utilizados en la industria como aceites lubricantes, dieléctricos, fluidos hidráulicos, resinas aislantes, pinturas, ceras, selladores de juntas de hormigón, etc.). Los laboratorios se dieron cuenta de que muchos resultados sobre niveles de DDT en tejidos animales podían haberse visto alterados (magnificados) por estas interferencias con PCBs. A este trabajo le siguió la exposición accidental y masiva que sufrió la población del oeste de Japón en 1968 a aceite de arroz contaminado por PCBs

durante su proceso de elaboración, sufriendo graves consecuencias sanitarias (hoy identificada como “enfermedad de Yusho”) y que despertó una mayor conciencia pública sobre los efectos adversos de los PCBs (Kuratsune *et al.*, 1972). Estos descubrimientos marcaron el comienzo de una época de preocupación por los efectos de los PCBs y otros compuestos químicos industriales y se llevaron a cabo numerosos estudios para determinar las enfermedades y alteraciones reproductivas en aves y mamíferos silvestres viendo, por ejemplo, que efectos antes achacados al DDT o al dieldrín eran provocados en realidad por los PCBs (Aulerich y Ringer, 1977). Otros muchos estudios demostraron la presencia generalizada de DDT y PCBs en todos los eslabones de la cadena trófica a nivel global, poniendo de manifiesto la preocupante omnipresencia de la contaminación ambiental (George y Fear, 1966; Koeman y van Genderen, 1966; Jensen *et al.*, 1969). A finales de la década de los 60 se identificaron también intoxicaciones generalizadas de aves y mamíferos por semillas recubiertas de organomercuriales y por mercurio inorgánico procedente de diferentes industrias como la papelera (Rattner, 2009), respaldando la alarma generada por los PCBs y que alertaba sobre el peligro de los residuos que iban generándose con el desarrollo industrial. Fueron las primeras etapas de una disciplina que fue evolucionando en décadas posteriores paralelamente a la producción y usos de sustancias químicas en todos los ámbitos de la actividad humana. De la misma manera, también ha ido creciendo el interés y la preocupación de la sociedad tanto por la propia salud como por la del entorno que le rodea, de manera que en 1969 se acuñó el término “ecotoxicología” como una necesidad del momento para ampliar la extensión de la “toxicología” (efecto del veneno sobre el individuo) al efecto de los contaminantes sobre los ecosistemas, integrando a la toxicología, la Ecología y la Química ambiental (Truhaut, 1977).

La década de los 70 del s. XX se caracterizó por la ampliación de los programas de investigación gubernamentales y la implicación de la industria en los mismos, así como por las primeras restricciones en Norteamérica y Europa para el uso de DDT y PCBs. Se publicaron gran cantidad de trabajos relacionados con la exposición de aves,

mamíferos y fauna marina a Organoclorados (OCs), PCBs y metales pesados. Lo novedoso en este momento de la historia fue el creciente interés por el estudio de la toxicidad de plaguicidas de vidas media y corta (organofosforados y carbamatos) con el fin de identificar y evitar la persistencia y efecto acumulativo de los OCs y PCBs observados en los últimos años, suponiéndolos más seguros para el medio ambiente que estos últimos. Sin embargo, las investigaciones demostraron que tampoco estos agentes “alternativos” estaban exentos de efectos peligrosos para individuos y poblaciones de fauna silvestre (Rattner, 2009).

El inicio de la década de los 80 estuvo marcado por la formación en 1979 de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, SETAC) “sobre un conjunto de principios fundamentales con los que la sociedad sigue comprometida. Los principios de SETAC, tal como se definen actualmente, son: enfoque multidisciplinar para resolver problemas ambientales, equilibrio en la participación al involucrar a las partes interesadas de todos los sectores y objetividad basada en la ciencia”, con funciones que hoy en día siguen vigentes: “promover la ciencia ambiental y su aplicación a través de proyectos en colaboración con las distintas partes interesadas (otras sociedades y agencias intergubernamentales), difundir la ciencia ambiental a través de publicaciones revisadas por expertos externos promoviendo la comprensión de temas ambientales emergentes, organizar talleres para abordar los desafíos ambientales para identificar soluciones, realización de reuniones multidisciplinarias para difundir las últimas herramientas de aplicación e investigación en ciencias ambientales, convocar reuniones y simposios para resumir el estado de la ciencia ambiental dirigido a reguladores para el ejercicio de políticas basadas en la información, formación de profesionales y promoción de oportunidades en el campo de conocimiento y reconocimiento de la excelencia con premios y subvenciones” (SETAC, 2021). De la misma manera, las principales agencias gubernamentales de todo el mundo incluyeron divisiones especializadas en medio ambiente, ecotoxicología y evaluación de daños, las cuales empezaron

a gestionar expertos en la materia, lo que exigió que paralelamente se creasen programas de formación especializada en estas áreas (Zylstra, 1994; Rattner, 2009). Obviamente, los estudios de monitorización de exposición a contaminantes y de evaluación de daños continuaron siendo llevados a cabo y publicados (Kubiak *et al.*, 1989; Gilbertson *et al.*, 1991; Beyer y Storm, 1995; Jessup y Leighton, 1996).

En ese momento, las herramientas convencionales de monitoreo ambiental podían evaluar los niveles de contaminantes en los organismos y el estado de salud ambiental, pero no la interrelación entre ambos. Esta necesidad llevó a investigar si podía existir algún tipo de “marcador” que revelase más información y permitiese interrelacionarla. Este campo de conocimiento emergió en la década de los 90. Se sabía que los efectos de las sustancias tóxicas sobre un ecosistema se inician con una reacción bioquímica en el individuo, y cuando aumenta su impacto, provoca una perturbación de las funciones vitales y/o la muerte del organismo, pudiéndose extender los efectos a toda la población y afectar, por tanto, al ecosistema. Así, se vio que el uso de biomarcadores podía permitir medir la respuesta biológica de un organismo a la exposición a un contaminante, medir los efectos subletales para una prevención más temprana de las posibles consecuencias ambientales, derivando en muchos ensayos moleculares (McCarthy y Shugart, 1990; Huggett *et al.*, 1992; Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Depledge *et al.*, 1995; Capó, 2002; Bozo *et al.*, 2007). Las revelaciones sobre las alteraciones bioquímicas sobre el sistema endocrino y la publicación en 1996 del libro “*Our Stolen Future*” (“Nuestro Futuro Robado”) (Colborn *et al.*, 1996) desvelaron la necesidad de incrementar los esfuerzos por conocer la actividad disruptiva sobre el sistema endocrino generada por diversas sustancias químicas. El libro reunió, por primera vez, las evidencias obtenidas en estudios de campo y laboratorio sobre los defectos congénitos, anomalías sexuales y reproductivas provocados por las sustancias químicas que actúan como disruptores endocrinos en poblaciones animales y seres humanos a lo largo y ancho de todo el planeta, complementando y dando sentido al camino emprendido por Rachel Carson en 1962 con su ya mencionado libro, y que a día

de hoy sigue invitando a plantear una revisión crítica acerca del tipo de sustancias químicas que el ser humano ha esparcido por todo el planeta. Como medida novedosa, en 1995 la US EPA desarrolló pautas de calidad de las aguas para DDT, dioxinas, PCBs y mercurio que supusieran una protección para la vida silvestre. También creó en 1996 el Comité Asesor para Detección y Pruebas de Disruptores (“*Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*” o EDSTAC) para hacer un seguimiento especializado de las pruebas y asesorar en las regulaciones sobre los disruptores endocrinos.

Con el cambio de siglo llegaron nuevas técnicas para la extrapolación de los efectos tóxicos entre especies de vertebrados (farmacocinética, modelos moleculares o toxicogenómica). La evaluación de riesgos se posicionó como herramienta para valorar las interconexiones entre la toxicología de vida silvestre, la integridad ecológica y la salud humana (Di Giulio y Benson, 2002). Los estudios y evaluaciones realizados en campo empezaron a incluir diversas sustancias al demostrarse que llegaban a afectar a las poblaciones silvestres como tensioactivos de origen doméstico e industrial, detergentes y fármacos (Giesy y Kannan, 2001; Norstrom *et al.*, 2002; Oaks *et al.*, 2004). Las herramientas actuales que permiten evaluar cambios fisiológicos en la vida silvestre producidos por contaminantes son cada vez más sofisticadas (PCR, huella genética, chips de ADN y otras técnicas moleculares) y brindan información más detallada sobre los impactos de los productos químicos más allá de los niveles individuales y celulares. Por lo tanto, los estudios de contaminantes sobre la vida silvestre actualmente pueden incluir mediciones en todos los niveles (molecular, celular, órganos, individual hasta poblacionales y ecosistemas completos). No hay que olvidar que las evaluaciones actuales de riesgos de sustancias químicas que establecen límites de protección para los seres humanos a menudo dependen de los datos aportados por los toxicólogos sobre exposición en la vida silvestre (Mayfield y Fairbrother, 2012). Por lo tanto, los toxicólogos de la vida silvestre tienen un papel fundamental en los procesos regulatorios destinados a proteger salud ambiental y humana (Beasley, 2009). Los desafíos futuros a los que se tendrá que enfrentar la toxicología de la

vida silvestre serán la influencia del cambio climático sobre los patrones de riesgos toxicológicos, el continuo crecimiento industrial a gran escala, el desarrollo de nuevos plaguicidas como los neonicotinoides y el desarrollo de la nanotecnología con la correspondiente liberación de nanopartículas al medio ambiente (Kendall, 2016).

Según el tipo de plaguicida sintético, los efectos sobre los organismos pueden ser agudos pudiendo incluso causar la muerte (intoxicación) o, por el contrario, ejercer como contaminantes a través de la cadena trófica dejando residuos en los tejidos, y provocando con ello un efecto crónico y acumulativo. Ambos casos serán abordados en esta tesis doctoral.

1.3. Situación actual de las intoxicaciones de la fauna silvestre terrestre

A pesar de que la deforestación y otras actividades humanas amenazan permanentemente a la fauna silvestre, las intoxicaciones agudas por plaguicidas (mayoritariamente) o fármacos son consideradas como una de las principales causas de mortalidad en España y en otros países europeos con características ambientales más o menos similares a la nuestra, como Francia, Italia, Grecia o Bélgica (Guitart *et al.*, 2010; Berny *et al.*, 2015). En el informe publicado en 2020 por el *World Wildlife Found* (WWF) conjuntamente con *SEO Bird Life* y titulado “*El veneno en España. Evolución de del envenenamiento de fauna silvestre (1992-2017)*” (De la Bodega *et al.*, 2020) se refleja que a lo largo de esos 25 años de estudio retrospectivo se registraron en nuestro país casi 10000 episodios de intoxicaciones que provocaron la muerte a más de 20000 animales. Siendo evidente que los casos detectados son sólo una pequeña parte de los sucedidos, estos datos suponen la punta de iceberg de una problemática que en un país como el nuestro, con uno de los conjuntos de hábitats naturales más favorables para la fauna silvestre de toda Europa, supone una grave amenaza para la biodiversidad a nivel nacional (y, por extensión, europeo). La preocupación actual por la

conservación de la biodiversidad es, por tanto, alta en lo concerniente al uso generalizado de las sustancias antes citadas y a su alta toxicidad. En el caso de los plaguicidas, son sustancias pertenecientes a decenas de familias químicas diferentes, que se utilizan o se han utilizado de forma masiva en el sector agrícola, además de que su uso deliberado para envenenar vida silvestre es una realidad en todo el mundo. Y en toda esa problemática, un caso especial de plaguicida no fitosanitario es el que conformarían los rodenticidas, que se emplean de manera masiva contra roedores pero que provocan una exposición involuntaria a especies no diana, especialmente aves rapaces, con unos desastrosos efectos deletéreos (Nakayama *et al.*, 2019).

El diccionario de la Real Academia Española (RAE) define el término veneno en su acepción principal como “sustancia que, introducida en un ser vivo, es capaz de producir graves alteraciones funcionales e incluso la muerte”. Ello lleva a plantearse una pregunta: ¿cómo puede un animal (silvestre o doméstico) sufrir una intoxicación aguda por plaguicidas en el medio natural? Son varias las causas que pueden exponerse como respuesta a la pregunta:

- **Contacto accidental** con el veneno; por ejemplo, cuando se siembran semillas recubiertas por plaguicidas y que pueden quedar mal enterradas o pueden desenterrarse por diferentes causas y después pueden ser consumidas por aves granívoras.
- **Mal uso** de la sustancia sin respetar las indicaciones de seguridad en la aplicación, que provoca un efecto no deseado.
- **Intoxicaciones intencionales** a través de la colocación de las sustancias en el medio natural con la intención de eliminar depredadores deliberadamente. Esta práctica, a pesar de ser ilegal, es la principal causa de intoxicaciones en fauna en el medio natural y es el método más utilizado para matar depredadores a nivel mundial (Márquez *et al.*, 2012).

Pero, en definitiva, la clasificación se puede simplificar en intoxicaciones ACCIDENTALES o INTENCIONADAS. Y dentro de cada uno de estos subgrupos, pueden producirse intoxicaciones primarias (el animal que consume o contacta con el veneno sufre las consecuencias) o secundarias (intoxicación provocada por el consumo de otro animal que ha tenido contacto previo con el tóxico). Los ámbitos de intoxicación abarcan la ganadería (se busca eliminar intencionadamente las mal denominadas alimañas ante la casi inexistente práctica actual del pastoreo), a agricultura (intoxicaciones accidentales por aplicación de insecticidas o intencionales para eliminar animales que alteran o consumen los cultivos), a apicultura (intoxicaciones intencionales para eliminar animales que se alimentan de miel o abejas como osos y abejarucos), la colombicultura (para eliminar rapaces que pueden atacar a los bandos de palomas) y la gestión cinegética (para eliminar carnívoros que consumen especies de caza menor; suponiendo ésta la mayor parte de las intoxicaciones detectadas en España) (De la Bodega *et al.*, 2020). Las intoxicaciones intencionadas constituyen el grueso del problema y son la principal preocupación de la comunidad científica. Esta práctica criminal de alcance internacional suele ser llevada a cabo a través de cebos envenenados que se colocan en el medio natural para que sean consumidos por los animales (normalmente despojos cárnicos impregnados y rellenos con fitosanitarios con alta toxicidad), que provocan una muerte violenta con gran sufrimiento (Guzmán *et al.*, 2003; Berny, 2007; Giorgi y Mengozzi, 2011; Margalida, 2012; Motas- Márquez *et al.*, 2013; Margalida *et al.*, 2014; Ruiz-Suárez *et al.*, 2015; Chiari *et al.*, 2017). El origen de estas prácticas apunta al conflicto entre humanos y depredadores salvajes (Mateo-Tomás *et al.*, 2012) al compartir ambos un interés común hacia ciertos recursos limitados del medio natural que entrañan un valor, como las especies cinegéticas, las ganaderas o los cultivos (Cozza *et al.*, 1996; Reynolds y Tapper; 1996; Kaczensky, 1999; Pedersen *et al.*, 1999; Mech *et al.*, 2000; Mazzoli *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2005; Thirgood y Redpath, 2008; Sotherton *et al.*, 2009; Cano *et al.*, 2016). El conflicto gana especial relevancia y gravedad cuando esos recursos suponen un interés

económico e involucran a depredadores de presas que se encuentran bajo distintas formas de protección legal (Thirgood *et al.*, 2000), dando lugar a presiones poblacionales injustificadas que pueden generar importantes perjuicios ecológicos (Villafuerte *et al.*, 1998). De hecho, las especies depredadoras que se alimentan de especies cinegéticas y que pueden atacar al ganado o alimentarse de cultivos suelen ser el objetivo primordial de las intoxicaciones intencionadas. Como se ha comentado anteriormente, esta situación también alcanza otras actividades como la apicultura o la colombicultura, sin olvidar que las mascotas también se ven afectadas tanto accidental como intencionadamente, al compartir espacios con los animales salvajes (De la Bodega-Zugasti, 2014; Cano *et al.*, 2016; De la Bodega *et al.*, 2020). El envenenamiento es un método de eliminación masivo y no selectivo que busca causar la muerte en un breve espacio de tiempo, siendo muy complicados la cuantificación y el control de los daños que produce en el área afectada.

1.3.1. Especies afectadas en las intoxicaciones por plaguicidas

Cada país tiene sus propios sistemas para registrar y diagnosticar las causas de la muerte de los animales encontrados muertos o que fallecen al poco tiempo, en los que participan diferentes agentes sociales como cazadores, agentes medioambientales, veterinarios locales o centros de diagnóstico veterinario estatales, entre otros. Justamente el sistema de actuación de cada país determina qué tipos de casos sean más comúnmente remitidos y analizados en sus sistemas de control epidemiológico, pareciendo evidente en el conjunto de los registros europeos que las aves constituyen el grupo de especies más afectadas por los venenos; por ejemplo, en Francia las aves se vieron involucradas en el 60% de los casos. Guitart *et al.* (2010) publicaron una completa recopilación de los casos registrados de intoxicaciones en fauna silvestre en Europa, en la que las aves aparecieron como el grupo más afectado, destacando, por ejemplo, que:

- En Bélgica, era habitual la recepción de cadáveres de ratonero común (*Buteo buteo*), que era víctima habitual de intoxicaciones intencionales. Otras aves que se habían visto involucradas fueron el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), el gavilán (*Accipiter nisus*), el milano real (*Milvus milvus*), la urraca (*Pica pica*), el faisán vulgar (*Phasianus colchicus*) y la corneja negra (*Corvus corone*).
- En Francia, como según su protocolo nacional son los cazadores quienes se encargan de remitir los cadáveres encontrados en el campo a los veterinarios locales, es habitual la remisión de aves cinegéticas como palomas (*Columba livia*), ánades reales (*Anas platyrhynchos*) o perdices rojas (*Alectoris rufa*) pero sin duda los casos positivos más habituales son de aves rapaces, a pesar de su estatus de protección, como los buitres leonados y los milanos reales.
- En España, las aves también fueron las más afectadas por los venenos. De la Bodega *et al.* (2020) reflejaron en su informe que, en 25 años de registro de intoxicaciones intencionadas en España, el 70% de los animales afectados eran aves, apareciendo encabezando la lista, como en los países vecinos, el buitre leonado (*Gyps fulvus*) y el milano real, aunque se registraron otras 25 especies víctimas del veneno. El asunto cobraba especial gravedad cuando se trataba de especies protegidas o amenazadas cuya población cuenta con un número reducido de individuos, ya que el impacto sobre la población de una pérdida puntual en estos casos es enorme, como muestra la tabla extraída del informe de De la Bodega *et al.* (2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Impacto del veneno en especies protegidas o amenazadas en España (De la Bodega et al., 2020).

Especie	Número parejas reproductoras	Número envenenamientos detectados	% sobre población reproductora	Min. pp.	Número individuos según SEO	% respecto a la población
Buitre leonado	31.000-37.000 (34.000)	1.757	5,17%	31.000	62.000	2,83%
Águila real	1.553-1.769 (1.661)	194	11,65%	1.553	3.106	6,25%
Águila imperial	500	195	39%	500	1.000	19,50%
Buitre negro	2.548-3.140 (2.844)	624	21,94%	2.548	5.096	12,24%
Alimoche	1.500	325	21,67%	1.500	3.000	10,83%
Milano real	2.312	566	24,48%	2.312	4.624	12,24%
Quebrantahuesos	170	48	28,24%	170	340	14,12%

En Estados Unidos, las intoxicaciones secundarias de águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) y águila real (*Aquila chrysaetus*) con plaguicidas muestran la amenaza que estos compuestos suponen para estas aves (Wobeser *et al.*, 2004). Mineau *et al.* (1999) y Glaser (1999) concluyeron que estas dos especies de aves rapaces eran destacadas víctimas del abuso de plaguicidas en dicho país.

Los factores relevantes para que las aves rapaces se vean afectadas por plaguicidas con una frecuencia tan elevada son seguramente sus hábitos alimentarios (consumo de insectos y lombrices, captura de presas debilitadas por intoxicaciones, así como consumo de carroña de víctimas de intoxicaciones), su presencia habitual en las zonas agrícolas, el hecho de que se consideren una plaga dañina por parte de ciertos sectores económicos y su comportamiento gregario (Mineau *et al.*, 1999). No hay que olvidar que habitualmente diferentes grupos de sustancias tienen un mayor impacto en determinados tipos de aves en tipos de hábitats específicos (Ballesteros, 1997).

Por otro lado, los mamíferos carnívoros considerados en el ámbito ganadero y cinegético como alimañas por alimentarse de caza menor

o ganado, aunque con menos frecuencia que las aves, también se ven involucrados en intoxicaciones; por ejemplo, el zorro común o rojo (*Vulpes vulpes*), la garduña (*Martes foina*) o el tejón europeo (*Meles meles*) en España (Soler *et al.*, 2006) o el lince ibérico (*Lynx pardinus*) en Portugal (Grilo *et al.*, 2021). Y en este listado también han de recordarse los carnívoros domésticos, que no pocas veces suelen verse afectados por los plaguicidas en el medio natural porque en las zonas rurales los perros y gatos no suelen estar encerrados en los domicilios e, incluso, puede que vivan asilvestrados. Suelen tener el mismo acceso tanto a los tóxicos utilizados en el ámbito doméstico como a los utilizados en el medio natural y que también afectan a la fauna silvestre, por lo que son especies con un riesgo acrecentado de sufrir intoxicaciones.

En los últimos años reflejados en el informe, se ha visto un claro descenso de los episodios (del máximo registro alcanzado en 2008 con 634 intoxicaciones hasta los 200 registrados en 2017, es un claro ejemplo de la evolución) que, por otra parte, no se ve reflejado por igual en el impacto en todas las especies, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparativa de la mortalidad de las especies más amenazadas en nuestro país durante la primera y la segunda mitad del estudio de De la Bodega *et al.* (2020).

	1992 - 2004	2005 - 2017
Águila imperial	80	115
Milano real	595	591
Alimoche	172	149
Buitre negro	336	258

1.3.2. Compuestos involucrados en las intoxicaciones

En el informe referido anteriormente referido de De la Bodega *et al.* (2020), todos los casos de intoxicación son delitos enmarcados en el artículo 336 del Código Penal. La mayoría de los compuestos detectados fueron fitosanitarios. Entre los compuestos que aparecieron como resultado de los análisis, el aldicarb y el carbofurano aparecieron

en más del 60% de los casos (40 y 24% de los casos respectivamente), seguidos de la estricnina (5%). Estos resultados concuerdan totalmente con los encontrados en el estudio realizado previamente por Martínez-Haro *et al.* (2008), donde revisaron los casos de intoxicaciones en fauna silvestre y doméstica diagnosticados entre 1990 y 2005 en 4 laboratorios veterinarios españoles, y donde los insecticidas aldicarb y carbofurano y la estricnina estuvieron involucrados en casi el 60% de los casos, seguidos por los rodenticidas (identificados en el 30% de las intoxicaciones de mamíferos y en el 10% de las de aves).

El aldicarb y el carbofurano son plaguicidas inhibidores de la enzima acetil colinesterasa que tienen efectos neurotóxicos agudos y si el individuo sobrevive a la exposición, verá alterado su comportamiento. Esto último le llevará a sufrir la depredación más fácilmente, y además a tener dificultad para alimentarse correctamente, lo que desembocará en una condición corporal pobre y baja probabilidad de reproducción, necrosis musculares por la anoxia transitoria y síntomas nerviosos permanentes (Mineau y Tucker, 2002), además de otros muchos más concretos (Parsons *et al.*, 2005). El grupo de los plaguicidas inhibidores de la acetil colinesterasa está conformado por los plaguicidas organofosforados y los carbamatos (es a este último grupo al que pertenecen el aldicarb y el carbofurano). Cabe destacar que en la UE el uso del aldicarb estuvo limitado desde 2003 hasta su total prohibición en 2007 (Decisión 2003/199/CE), y que la comercialización del carbofurano fue totalmente prohibida a partir de diciembre de 2008 (Decisión 2007/416/CE).

La estricnina (prohibida por la Decisión 2004/129/CE) es un alcaloide que provoca un cuadro convulsivo agudo a los pocos minutos de su ingestión, y que fácilmente puede derivar en muerte del animal afectado, incluso tras la aplicación de la terapéutica adecuada.

Estos compuestos son altamente tóxicos (García-Fernández *et al.*, 2006) (Tabla 3); por ejemplo, como referencia de la toxicidad del aldicarb, basta con decir que un sólo gránulo produce la muerte de un ave del tamaño de un gorrión común (*Passer domesticus*) (OMS, 1991).

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Tabla 3. Valores de toxicidad aguda para el aldicarb y la estricnina. Tomado de García-Fernández et al. (2006).

	DL50 oral, rata (mg/Kg) p.v.	Mamíferos ^a					
		oral	dérmica	inhalatoria	aves	peces	abejas
Aldicarb	0,93 ^c	++++	+++	++	+++	+++	+++
Estrictina	3 ^c	++++	?	no	+++	?	?

^a ? desconocido; + nocivo; ++ tóxico; +++ muy tóxico; ++++ altamente tóxico

^b En aves la DL50 es de 5-15 mg/Kg

^c En perros es de 0.75 mg/Kg; y en gatos de 2 mg/kg

Si bien en el informe se registran más de 80 sustancias utilizadas, el grueso se puede reducir a 9 grupos (Gráfico 1) y 10 sustancias (Gráfico 2) que sobresalen de manera evidente, siendo en su mayoría productos fitosanitarios.

Gráfico 1. Grupos de sustancias utilizadas en las intoxicaciones de fauna salvaje en España entre 1992 y 2017. Tomado de De la Bodega et al. (2020).

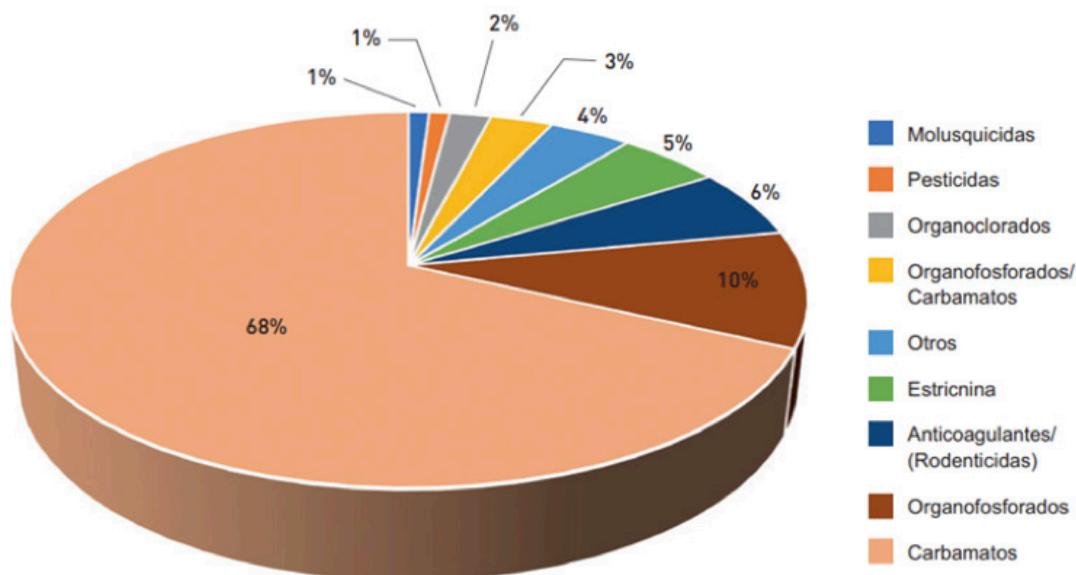
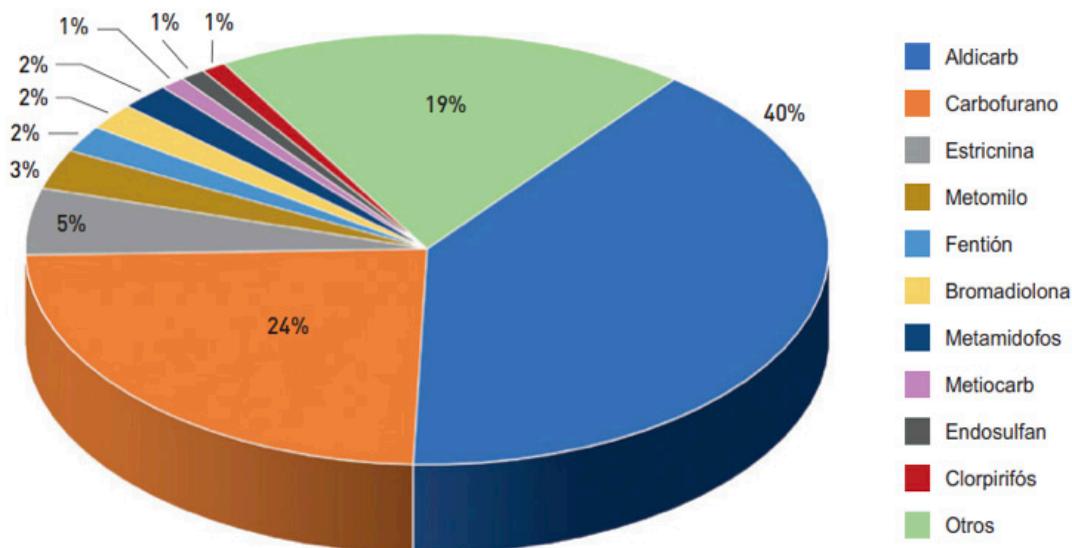


Gráfico 2.

Sustancias más utilizadas en España en las intoxicaciones entre 1992 y 2017. Tomado de De la Bodega et al., 2020.



Algunas sustancias son comercializadas hoy en día en nuestro país y en el conjunto de la Unión Europea (UE) al ser de uso legal, pero como se ha visto anteriormente, las más utilizadas tienen prohibido su uso por su peligrosidad para el medio ambiente y el ser humano. Este tipo de sustancias se caracterizan por tener una vida corta en el medio ambiente y por causar efectos tóxicos agudos. En este sentido conviene evidenciar que España es uno de los países de la UE donde se comercializan más cantidad de plaguicidas; los datos de ventas de plaguicidas sirven como indicador del consumo de los mismos y en el periodo entre 2011 y 2018 se vendieron en la Unión alrededor de 360 millones de kilos por año, acaparando 2/3 de las ventas Francia, España, Italia y Alemania (publicado por Eurostat en 2020, <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat.news/-/ddn-20200603-1>).

1.3.3. Los cebos envenenados como herramienta de eliminación de depredadores

El método más extendido para conseguir el contacto o consumo de la fauna salvaje con el tóxico es la elaboración y colocación de cebos envenenados en el medio natural (Giorgi *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2012). Consisten mayoritariamente en productos alimentarios y restos animales o vegetales adaptados a los hábitos alimentarios de las especies diana (Motas-Guzmán, 2003; Giorgi y Mendozzi, 2011; Chiari *et al.*, 2017; De Roma *et al.*, 2018; Gil-Sánchez *et al.*, 2021) impregnados o rellenos con fitosanitarios de alta toxicidad (Giorgi y Mendozzi, 2011; Chiari *et al.*, 2017) y son utilizados en el ámbito de la actividad cinegética, ganadera, agrícola, apícola y de la colombicultura (De la Bodega *et al.*, 2020). Es un método masivo (la toxicidad de las sustancias es muy alta y pueden provocar la muerte a un gran número de individuos) y no selectivo (cualquier animal al que esté dirigido o no puede ser víctima por intoxicación primaria o secundaria incluso el ser humano), además de ilegal y cruel al provocar una muerte muy violenta (Gil-Sánchez *et al.*, 2021)

El uso de cebos cárnicos es una prueba de que son efectivos contra las “especies diana”, básicamente depredadores carnívoros; además, son fáciles de manipular y elaborar, suponen un bajo coste económico y son resistentes a la degradación ante condiciones climatológicas adversas siendo duraderos en el tiempo (especialmente los elaborados con productos secos como los embutidos).

1.3.4. Regulación y estrategias actuales contra el veneno

A pesar de que se han llevado a cabo diferentes iniciativas para luchar contra el uso de cebos envenenados, tales como la “Convención sobre la Conservación de Especies Migratorias de Animales Silvestres” (CMS) o el “Convenio de Bonn” (<https://>

www.cms.int/) para la protección de especies migratorias y sus hábitats, no existe actualmente un marco legal a nivel global para penalizar estas prácticas. Este fue el primer tratado internacional para adoptar medidas de protección y conservación acordadas por todos los Estados por cuyo territorio transitan las especies migratorias (considerando las amenazadas y también las que se beneficiarían de las mismas). El papel de la CMS es el de ser una convención marco que da lugar a acuerdos que pueden ir desde tratados legalmente vinculantes (Acuerdos) hasta otros instrumentos menos formales (Memorandos de Entendimiento), contemplando las necesidades particulares de cada área. Cabe destacar que este convenio estuvo amparado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y entró en vigor desde el 1 de noviembre de 1983, y en España desde el 1 de mayo de 1985 (MITECO, 2022a). Previamente, a nivel europeo, se desarrolló la “Convención del Consejo de Europa sobre la Conservación de la Vida Silvestre y los Hábitats Naturales Europeos” (1979) o “Convenio de Berna” (<https://www.coe.int/en/web/bern-convention>), que fue el primer acuerdo de estas características en el que se tuvo en cuenta por primera vez a las especies migratorias y se aludió a la necesaria coordinación internacional para su protección (MITECO, 2022b). La Directiva 2009/147/EC relativa a la conservación de las aves silvestres y la Directiva 92/43/EEC relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, son los actuales marcos legales de la Unión Europea para aplicar las disposiciones contenidas en el Convenio de Berna.

En España, ya en 1995, la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, (Código Penal), penalizaba el uso de venenos para la caza y pesca por ser un método no selectivo y en 2007 la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad estableció la prohibición de todos los procedimientos masivos y no selectivos para capturar o matar animales.

Paralelamente, en las últimas décadas se han puesto en marcha diferentes campañas contra este tipo de delitos en las que participan tanto el sector público como el privado. Estas iniciativas han permitido

recopilar datos para evaluar la magnitud del problema, la efectividad de diferentes estrategias para enfrentarlo y planificar medidas futuras. Juega un papel fundamental la “Estrategia Nacional contra el uso ilegal de cebos envenenados en el medio natural” (Comisión Nacional de Protección de la Naturaleza, 2004), documento elaborado con las aportaciones de los técnicos de las Comunidades Autónomas, la experiencia de las asociaciones que cooperan en el “Programa ANTÍDOTO” y el Grupo de Trabajo de Ecotoxicología que depende del Comité de Flora y Fauna Silvestres (MITECO, 2022c). A través de este documento se establecieron criterios orientadores para erradicar el uso ilegal de cebos envenenados complementándose con las estrategias y acciones que están aprobando diferentes gobiernos regionales que siguen los criterios de la Estrategia Nacional y están destinadas a la prevención, disuasión, persecución, diagnóstico de los casos, etc. (actualmente casi todas las CC. AA. han aprobado sus estrategias o planes de acción contra el veneno, a excepción de Islas Baleares, La Rioja y Euskadi). Destacan también otras iniciativas llevadas a cabo por asociaciones ambientalistas como el “Programa ANTÍDOTO”, que se instauró en España en 1998 para proporcionar información clara sobre el impacto de las sustancias tóxicas sobre la fauna silvestre a un amplio nivel espacial y temporal y que está integrado desde entonces por las principales ONGs españolas que trabajan en la conservación de especies amenazadas por el uso ilegal de venenos (De la Bodega *et al.*, 2020).

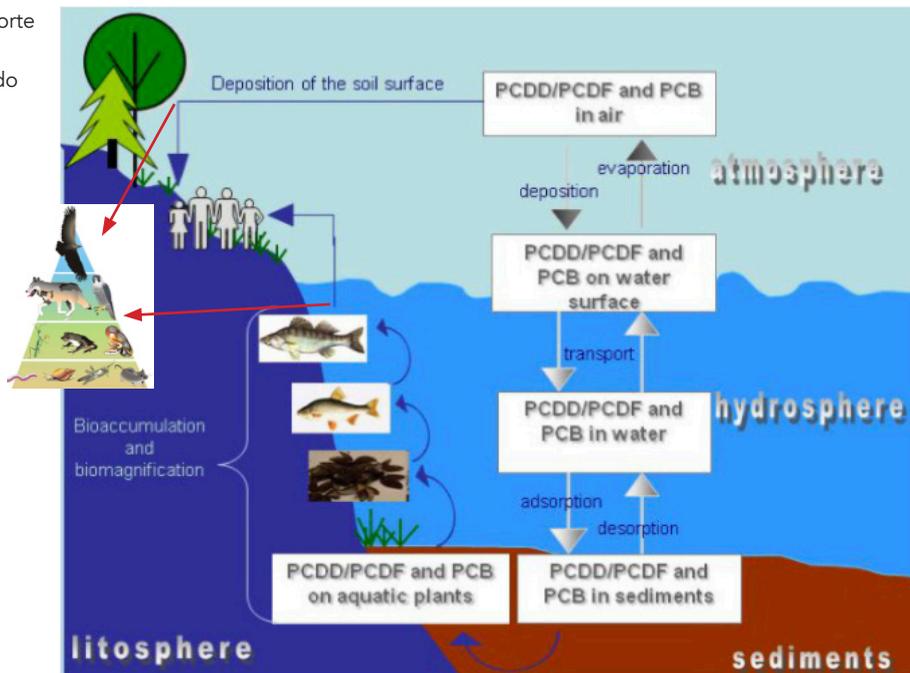
Las unidades caninas especializadas en la detección de venenos juegan hoy en día un apoyo fundamental en las CC.AA. que disponen de ellas; Andalucía fue la pionera en 2005, y actualmente también disponen de ellas Asturias, Castilla-La Mancha, Madrid y Extremadura (De la Bodega *et al.*, 2020).

1.4. COPs, los contaminantes orgánicos persistentes

La familia de productos químicos ambientales conocidos como contaminantes orgánicos persistentes (COPs) engloba algunos agentes

químicos utilizados en procesos industriales (por ejemplo, los PCBs) y subproductos generados como consecuencia de algunos procesos industriales o naturales por combustión (por ejemplo, dioxinas). Se caracterizan por su larga vida (persistencia) en el medio ambiente y en tejidos animales (pueden permanecer años o décadas al ser resistentes, en diferentes grados, a la degradación fotolítica, biológica y química), la capacidad de ser transportados a largas distancias (efecto de destilación global) y su capacidad de bioacumulación en los organismos vivos (Figuras 1 y 2). Esas características provocan un amplio potencial de exposición para animales y humanos y su creciente concentración en los tejidos según se va subiendo en los eslabones de la cadena

Figura 1. Transporte de COPs en el ambiente. Tomado y adaptado de Urbaniak (2013).

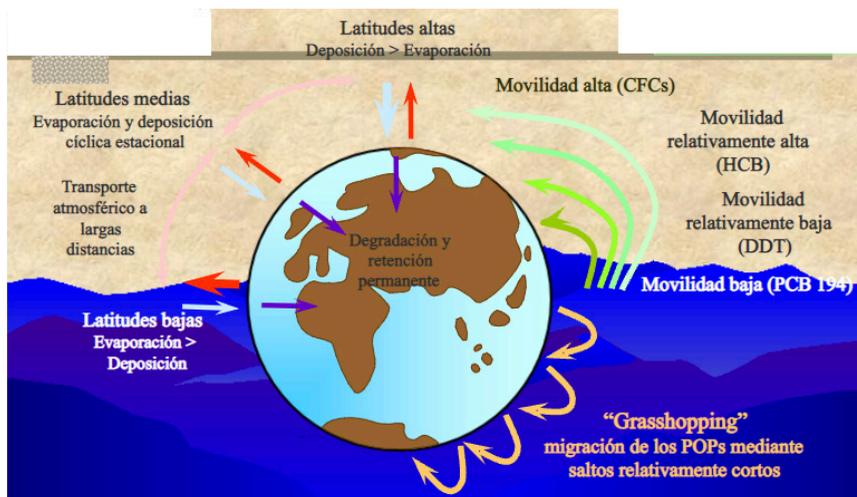


alimentaria (biomagnificación), amplificando su toxicidad y efectos adversos (Kodavanti *et al.*, 2014). Estas características son el resultado de sus propiedades físico-químicas (Miniero *et al.*, 2015).

Añadido a todo lo anterior, el impacto del cambio climático sobre las concentraciones de COPs es una preocupación notable y creciente en los últimos años para la comunidad científica. Existen evidencias de que los cambios en las condiciones ambientales como el aumento de la temperatura media o las radiaciones UV-B influyen en el comportamiento de los COPs; esto puede afectar a la salud humana y animal al cambiar los patrones de exposición. Es un tema candente en el que los actores del ámbito científico y político tendrán que intensificar los estudios y toma de decisiones para identificar y mitigar los efectos indirectos del cambio climático en la acumulación y exposición de COPs para minimizar su impacto en la salud (Sadler y Connel, 2012; Nadal *et al.*, 2015). El abordaje tendrá que ser desde una perspectiva internacional y bajo el concepto *OneHealth* o estrategia mundial interdisciplinar para abordar el cuidado de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, entendiendo que todas están ligadas entre sí. Actualmente se encuentran involucrados en ella la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (denominados colectivamente los «Asociados») llevando a cabo una búsqueda de expertos que formen parte del *Cuadro de Expertos de Alto Nivel para el Enfoque «Una Salud»* (OHHLEP).

La destilación global es un fenómeno geoquímico a través del cual los COPs son transportados de zonas cálidas del planeta a zonas frías, como las zonas polares y cumbres montañosas (Figura 2). Ello explicaría por qué, aunque la acumulación principal de COPs se genera en zonas industrializadas, también existen concentraciones relativamente altas de COPs en animales (y también personas) que viven en estas zonas. La volatilidad de estos compuestos es más marcada en zonas cálidas y se acumulan y condensan en zonas frías.

Figura 2. Fenómeno de destilación global en los COPs. Tomado de Wania y Mackay (1996).



1.4.1. Medidas internacionales para su regulación y control

Como se ha explicado anteriormente, hace décadas que la comunidad internacional empezó a identificar los COPs (ver apartado 1.1.1). Por el riesgo que suponen a escala global para la salud del medio ambiente y la salud humana, la comunidad internacional (a través de las Naciones Unidas) dio los primeros pasos para su regulación y control. En 1979 se firmó el “Convenio de Ginebra sobre Contaminación Transfronteriza a Gran Distancia” en el marco de la Comisión Económica de Naciones Unidas para Europa (CEPE); la Comunidad Económica Europea aprobó el Convenio en 1981 (Decisión 81/462/CEE, de 11 de junio) y España lo ratificó en junio de 1982, y publicó el correspondiente instrumento de ratificación en marzo de 1983 (BOE 59/1983). En él se estableció un marco de cooperación intergubernamental para proteger la salud y el medio ambiente contra la contaminación atmosférica que pudiera afectar a varios países. Las partes firmantes se comprometían a limitar, prevenir y reducir paulatinamente las emisiones de contaminantes atmosféricos y, con ello, a luchar contra la contaminación transfronteriza consiguiente (MITECO, 2022d). Su texto se completó con 8 protocolos que se

firmaron entre 1984 y 1999 relacionados con diferentes contaminantes; entre ellos, el de Contaminantes Orgánicos Persistentes (firmados en la ciudad danesa de Aarhus en 1998). Este Protocolo, que entró en vigor en octubre de 2003, establecía distintas medidas que inicialmente tenían puesto el foco en 16 sustancias seleccionadas según el criterio de riesgo acordado para considerarlas COPs que incluían 11 plaguicidas, 2 productos químicos industriales y 3 subproductos contaminantes (<https://unece.org/environment-policy/air/protocol-persistent-organic-pollutants-pops>). Pero el paso más ambicioso a nivel global fue el Convenio de Estocolmo (<http://chm.pops.int/>) que nació con el objetivo de proteger la salud humana y ambiental frente a los COPs reduciendo o eliminando estos contaminantes. Se firmó en el marco del PNUMA en 2001 y entró en vigor el 17 de mayo de 2004 (en España, el 26 de agosto de 2004). Constituyó una herramienta internacional jurídicamente vinculante que establecía una serie de medidas para lograr los objetivos antes comentados. La UE también ratificó este convenio, y el 20 de mayo de 2004 entró en vigor en todos los países miembros el Reglamento (CE) N° 850/2004 que estableció un marco jurídico común en la UE para garantizar la aplicación coherente de las obligaciones del Convenio de Estocolmo y del Protocolo sobre COP del Convenio de Ginebra. Se establecía la obligación de elaborar Planes Nacionales de Aplicación (PNA) para todos los estados miembros; el español fue actualizado en 2019 siendo de acceso público (https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/actualizacion2019pnadecop_tcm30-508025.pdf) (MITECO, 2019).

El Convenio de Estocolmo identificó inicialmente 12 COPs que debían prohibirse o usarse solo con restricciones (la conocida “docena sucia” original), incluidos los insecticidas OCs, los PCBs, las dioxinas policloradas y los furanos (PCDFs como siglas comunes) y el fungicida clorado/disolvente industrial hexaclorobenceno (HCB). Posteriormente, en 2009, la lista se amplió para agregar algunos compuestos no clorados, incluidos algunos retardantes de llama bromados (BFR) y perfluorooctanosulfonato (PFOS), uno de los más estudiados entre los compuestos perfluorados. En el grupo de los BFR

se incluyen varios compuestos con características muy diferentes; siendo los más utilizados y de los que se encuentran más frecuentemente como residuos ambientales los polibromodifeniléteres (PBDE). Paralelamente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también ha ido señalando posibles sustancias sobre las que habría que ir poniendo el foco debido a la escasez de información sobre sus riesgos y posible acumulación debido a la información que iba apareciendo, como por ejemplo sobre nuevos retardantes de llama (FR) que se están utilizando en la industria y sobre los que existen evidencias de que algunos son genotóxicos y cancerígenos. Por este tipo de evolución y decisiones, el mundo de los COPs cambia y a la “docena sucia” se le van agregando otras sustancias que se van encontrando en el medio ambiente de manera rutinaria y constante (Tablas 4 y 5). Pero hay que tener en cuenta que existen unos 30000 productos químicos en el mundo y entre ellos hay COPs todavía desconocidos (Miniero *et al.*, 2015).

Tabla 4. Nuevo listado aprobado en la actualización en la sesión 9 (Decisión SC-9/: Ácido perfluorooctano sulfónico, sus sales y el fluoruro de perfluorooctano sulfonilo). Tomado de BOE 121/2021.

Producto químico	Actividad	Finalidad aceptable o exención específica
Ácido perfluorooctano sulfónico (núm. de CAS: 1763-23-1), sus sales y fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (núm. de CAS: 307-35-7).	producción	Finalidad aceptable: de conformidad con la parte III del presente anexo, la producción de otros productos químicos destinados exclusivamente a los usos que figuran a continuación. Producción para los usos que figuran a continuación: Exención específica: Ninguna.
Por ejemplo, sulfonato de potasio perfluorooctano (núm. de CAS: 2795-39-3); perfluorooctano-sulfonato de litio (núm. de CAS: 29457-72-5); sulfonato amónico de perfluorooctano (núm. de CAS: 29081-56-9); perfluorooctano sulfonato de dietilamonio (núm. de CAS: 70225-14-8); perfluorooctano-sulfonato de tetraetilamonio (núm. de CAS: 56773-42-3); perfluorooctano-sulfonato de didecildimetilamonio (núm. de CAS: 251099-16-8).	uso	Finalidad aceptable: de conformidad con la parte III del presente anexo para las finalidades aceptables que figuran a continuación, o como intermediario en la producción de productos químicos para las finalidades aceptables siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Cebos para insectos con sulfuramida (núm. de CAS: 4151-50-2) como principio activo para el control de las hormigas cortadoras de hojas de <i>Atta</i> spp. y <i>Acromyrmex</i> spp. únicamente para uso agrícola. • Recubrimiento metálico (recubrimiento metálico duro) únicamente en sistemas de lazo cerrado. • Espumas contra incendios para la supresión de vapores de combustibles líquidos e incendios de combustibles líquidos (incendios de clase B) presentes en sistemas instalados, incluidos los sistemas tanto móviles como fijos, de conformidad con el párrafo 10 de la parte III de este anexo.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

1.4.2. COPs y fauna silvestre terrestre

Tabla 5.

Actualizaciones en la inclusión de nuevos COPs en los anexos del Convenio de Estocolmo. Tomado de PNA del MITECO (2019).

REUNIÓN DE LA COP/ AÑO	DECISIÓN	COP	ANEXO CONVENIO
Conferencia de plenipotenciarios: adopción y firma del Convenio de Estocolmo en 2001	Convenio de Estocolmo (12 COP iniciales) entrada en vigor 2004	Aldrina	Parte I del Anexo A
		Clordano	
		Dieldrina	
		Endrina	
		Heptacloro	
		Hexaclorobenceno	
		Mirex	
		Toxafeno	Parte I del Anexo B
		Bifenilos policlorados (PCB)	
		DDT	
		Hexaclorobenceno	
		Bifenilo policlorados (PCB)	
Dibenzoparadioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDF)	Parte I del Anexo C		
COP 4 (2009)	SC-4/10	Alfa hexaclorociclohexano	Parte I del anexo A
	SC-4/11	Beta hexaclorociclohexano	Parte I del anexo A
	SC-4/12	Clordecona	Parte I del anexo A
	SC-4/13	Hexabromobifenilo	Parte I del anexo A
	SC-4/14	Hexabromodifenil éter y heptabromodifenil éter (octabromodifenil éter comercial)	Parte I del anexo A
	SC-4/15	Lindano	Parte I del anexo A
	SC-4/16	Pentaclorobenceno	Parte I del anexo A
	SC-4/17:	Ácido perfluorooctano, sus sales y fluoruro de perfluorooctano sulfonilo	Parte I del anexo B
SC-4/18	Tetrabromodifenil éter y pentabromodifenil éter (pentabromodifenil éter comercial)	Parte I del anexo A	
COP5 (2011)	SC-5/3	Endosulfán técnico y sus isómeros conexos	Parte I del anexo A
COP6 (2013)	SC-6/13	Hexabromociclododecano	Parte I del anexo A
COP7 (2015)	SC-7/12	Hexaclorobutadieno	Parte I del anexo A
	SC-7/13	Pentaclorofenol y sus sales y ésteres	Parte I del anexo A
	SC-7/14	Naftalenos Policlorados	Parte I del anexo A Parte I del anexo C
COP8 (2017)	SC-8/10	Decabromodifenil éter	parte I del anexo A
	SC-8/11	Parafinas cloradas de cadena corta	Parte I del anexo A
	SC-8/12	Hexaclorobutadieno	Parte I del anexo C

Excepto algunas excepciones, los COPs son muy lipofílicos (es decir, poseen tendencia a contactar y mantener el contacto con los lípidos), lo que explica su movimiento entre los niveles tróficos de la fauna silvestre y su magnificación en los eslabones más altos al alimentarse unos animales de otros. Pero existen otras vías de exposición para la fauna, como son la inhalación y la exposición dérmica debido a la constante circulación y transporte de estos compuestos por el medio ambiente. Estos compuestos son relativamente resistentes a su eliminación por el metabolismo, pero existen diferencias entre especies en su nivel de acumulación, relacionadas con la tasa metabólica de cada una: de hecho, la capacidad de metabolización es mayor en los mamíferos, menor en las aves y mucho menor para peces y reptiles (Rattner *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha documentado que desde 1974 las poblaciones de vida silvestre se han visto reducidas en un 60% en todo el mundo (WWF, 2018) debido a diferentes causas antropogénicas y, entre ellas, la penetración y persistencia de compuestos químicos en la naturaleza (Hernout *et al.*, 2011; Rial-Berriel *et al.*, 2020). La cantidad y variedad de riesgos químicos a los que estamos sometiendo a la vida silvestre es enorme y todavía no se tiene un conocimiento absoluto de los mismos. Uno de los grupos químicos más estudiados en la vida silvestre es precisamente el de los COPs ya que se ha relacionado con la disminución de las poblaciones o anomalías en especies de peces, aves y mamíferos (Luzardo *et al.*, 2014). Este hecho obligó a la comunidad internacional a desarrollar una serie de esfuerzos en la regulación de estos compuestos, que ha tenido sus resultados con la disminución progresiva de la carga corporal de COPs en la vida silvestre en todo el mundo, aunque las concentraciones siguen siendo altas, sobre todo en los depredadores de niveles tróficos altos. Y como es sabido que las tasas de eliminación de la vida silvestre son más altas que las de degradación ambiental, esos cambios son un buen reflejo en los cambios de biodisponibilidad ambiental de los COPs, permitiendo identificar las tendencias de los niveles ambientales para evaluar la efectividad de las medidas de control internacional. Cabe destacar que, tras casi 40 años pasados desde la prohibición de su uso, los PCBs

siguen siendo los COPs más abundantes encontrados en los tejidos de fauna silvestre, seguidos de cerca por los OCs (De Solla, 2015). Por todas estas razones, el estudio de los niveles de COPs en fauna silvestre continúa siendo imprescindible para seguir gestionando correctamente todos los problemas generados.

1.4.2.1. PCBs (bifenilos policlorados)

Son compuestos que fueron ampliamente utilizados (hasta que fue prohibida su utilización en 1985 con la Directiva 85/467 en la UE) por ser estables a altas temperaturas y buenos aislantes térmicos; estaban presentes en una amplia variedad de productos de aplicación doméstica e industrial como transformadores, condensadores, aislantes eléctricos, selladores, etc. Se empezaron a comercializar en 1929 y Monsanto se encargó de producirlos a partir de 1935. No existen fuentes naturales de PCBs y consisten en un total de 209 congéneres distintos en función del número de átomos de cloro y su disposición molecular, aunque en los tejidos de animales silvestres se encuentran 30 ó 40 de ellos. Aunque su producción se paró en 1977 en Estados Unidos, y en Europa su fabricación y comercialización se prohibió en 1976 mediante las Directivas 76/403 y 76/769 seguidas de la posterior prohibición de su uso en 1985 mediante la Directiva 85/467, siguen en funcionamiento aparatos que fueron fabricados con PCBs y el medio ambiente sigue actuando de reservorio ya que se van liberando por erosión o volatilización (Hernández-Moreno *et al.*, 2016). A pesar de su total prohibición, cabe destacar que algún PCB se está generando hoy en día como subproducto de algunos procesos industriales (De Solla, 2015).

1.4.2.2. OCs (plaguicidas organoclorados)

La característica de estos compuestos es que existen en el medio ambiente no por liberación accidental o como residuo, sino que se han liberado en la naturaleza buscando su función plaguicida en grandes

extensiones. Normalmente, su presencia está más ligada a zonas agrícolas en las que se realizaron aplicaciones generalizadas, pero este hecho acaba por abarcar a prácticamente toda la superficie terrestre menos el Ártico y la Antártida, a donde de todas formas pueden llegar volatilizados.

El MAGRAMA publicó en 2012 un documento introductorio al conocimiento de los COPs, ofreciendo unas pinceladas de conocimiento general sobre cada OC:

- **Aldrín.** Plaguicida utilizado contra los insectos del suelo y otras plagas agrícolas.
- **Clordano.** Es, en realidad, una mezcla de compleja de isómeros; utilizado en la lucha contra las termitas y como insecticida de amplio espectro en cultivos agrícolas.
- **Diclorodifeniltricloroetano - DDT.** El OC más famoso y que fue más utilizado es el DDT, ya comentado en este trabajo (ver apartado 1.1.1). Su uso está limitado a ciertas aplicaciones en interiores para prevenir la malaria e India es el único país del mundo que lo produce y el que más lo utiliza (UNEP, 2010; De Solla, 2015), ya que hasta la fecha no se han encontrado alternativas económicamente viables.
- **Dieldrín.** Insecticida empleado contra termitas y en textiles.
- **Endrín.** Insecticida contra plagas de cultivos que también se ha usado como rodenticida en la lucha contra, por ejemplo, ratones, campañoles y topillos.
- **Heptacloro.** Usado para eliminar insectos del suelo y termitas. Insecticida contra plagas de cultivos y los mosquitos vectores del paludismo.
- **Hexaclorobenceno - HCB.** Fungicida de cultivos alimentarios. Es también un producto secundario de la fabricación de determinados productos químicos industriales.

- **Mirex.** Insecticida contra las hormigas rojas, y contra otros tipos de hormigas y termitas. Se ha utilizado también como retardante de llama en plásticos, caucho y aparatos eléctricos y electrónicos.
- **Toxafeno.** Insecticida también llamado canfecloro, se ha empleado en los cultivos y contra las garrapatas y los ácaros del ganado.
- **Lindano o gamma-hexaclorociclohexano - γ -HCH.** Insecticida para el tratamiento de semillas y suelos, aplicaciones foliares, tratamiento de árboles y maderas y contra ectoparásitos, tanto en aplicaciones veterinarias como humanas. El Reglamento 850/2004 permitía su uso de manera excepcional hasta 2007 en algunas aplicaciones industriales y domésticas y como insecticida tópico veterinario. En algunos países, no pertenecientes a la UE, aún se utiliza como producto farmacéutico para combatir la pediculosis y la sarna.
- **Alfa-hexaclorociclohexano y Beta-hexaclorociclohexano - α -HCH y β -HCH.** Son los dos isómeros mayoritarios generados durante la producción de lindano. Uso muy limitado debido a su baja efectividad. Su principal vía de entrada al medio fue la derivada del proceso de producción de lindano.
- **Clordecona.** Plaguicida agrícola, producido y comercializado en los años 50. Escasea la información sobre su utilización o producción debido a que hace tiempo muchos países prohibieron su venta y uso.
- **Endosulfán.** Insecticida de amplio espectro utilizado para el control de plagas en cultivos muy diversos (arroz, café, soja, etc.). Se comercializaba desde mediados de los años 50, pero actualmente está prohibido en España y en al menos otros 60 países, habiendo sido reemplazado. Se incluyó en el Convenio de Estocolmo en 2011 y, sin embargo, todavía se produce y utiliza en diferentes países del mundo, como Brasil, China o India.

En España, la Orden de 4 de febrero de 1994 prohibía la importación, comercialización y utilización dentro del territorio nacional de todos aquellos plaguicidas de uso ambiental que poseyeran alguno de los OC siguientes: aldrín, clordano, dieldrín, DDT, endrín, HCH con menos del 99% del isómero gamma, heptacloro, hexaclorobenceno y toxafeno. No obstante, permitía la autorización excepcional por parte de las autoridades cuando hubiese resistencias a otros insecticidas y estuviera entonces indicado el uso de alguno de los OCs prohibidos. Ya en el Convenio de Estocolmo se fueron incluyendo las sustancias para su total eliminación, uso restringido o minimización (Anexo A, B o C del Convenio) (Tabla 5).

1.5. Diagnóstico de intoxicaciones en Medicina Forense Veterinaria

1.5.1. Diagnóstico toxicológico de plaguicidas en fauna

Los plaguicidas, al ser sustancias diseñadas para provocar una actividad biológica en el organismo, en principio pueden intoxicar a cualquier individuo de cualquier especie. Obviamente no es posible generalizar, y en el medio natural, no todos los animales encontrados muertos son víctimas de intoxicaciones por plaguicidas (puede haber atropellos, electrocuciones, etc.). A veces, el entorno del cadáver ofrece pistas acerca de las circunstancias de la muerte e indica que puede haber sido causada por plaguicidas; es el caso de por ejemplo, la observación de una alta mortalidad de aves cerca de cultivos donde ha habido aplicaciones recientes de fitosanitarios, lo que puede sugerir una intoxicación masiva accidental; o la aparición de animales muertos cerca de despojos de comida, que sugieren una intoxicación intencionada (el veneno podría ser de aplicación agrícola o no). Si el animal se encuentra todavía vivo, los síntomas pueden arrojar luz para las conclusiones. El estudio postmortem, sobre todo, en vertebrados, es esencial a la hora de dirigir el diagnóstico, ya que se pueden observar traumas, síntomas o lesiones propias de ciertas enfermedades o daños provocados por los venenos, e

incluso al propio veneno en el interior del aparato digestivo. Por otro lado, es habitual que el cadáver ya esté en estado de descomposición, por lo que este estudio se ve muy limitado y la única opción es proceder directamente al análisis de los tejidos. Cuando el examen postmortem no arroja ninguna evidencia sobre la causa de la muerte, hay que sospechar de intoxicación. El contenido del estómago en mamíferos, o del buche/molleja en aves, también puede aportar una información directa y concluyente; aunque en este caso también hay que ser consciente de que el contacto con el tóxico puede darse por otras vías, como la inhalatoria o la dérmica. Tras el contacto, el compuesto será distribuido por todo el organismo y será el propio compuesto o un metabolito del mismo el que actúe en los órganos diana. El efecto podrá ser directo o una alteración en un punto de una cadena de reacciones bioquímicas que desembocará en un efecto adverso. Las posibles circunstancias tan variables otorgan un papel determinante al forense a la hora de identificar las causas de la muerte del animal y en el caso de que se trate de una intoxicación, demostrar que ha sido la causa de la muerte del animal. Es imprescindible para ello el conocimiento de la fisiopatología de las intoxicaciones y el mecanismo de acción de cada grupo de tóxicos para elegir qué tejido debe ser analizado, si se debe investigar el compuesto o un derivado del mismo, o si se debe analizar una alteración bioquímica para valorar indirectamente el efecto tóxico del compuesto. Ejemplo de esto último es la determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) cerebral mediante el método Ellman (Hill y Fleming, 1982) y su reactivación por dilución de la muestra en tampón o con la adición de Pralidoxima, 2-PAM, con el fin de detectar una inhibición reversible o irreversible del enzima (Stansley, 1993), pudiendo así diferenciar entre una exposición a plaguicidas organofosforados o carbamatos. A la hora de escoger un tejido para la analítica, el hígado siempre será una elección adecuada al ser el órgano mayoritario de detoxificación en los vertebrados y filtro de todos los compuestos que han sido absorbidos en aparato digestivo, pero también es una matriz compleja que puede contener muchos otros compuestos que dificulten el análisis. Si se conoce el

mecanismo de acción del tóxico, se puede analizar el daño causado a los procesos vitales (Brown *et al.*, 1996). Por tanto, la preparación del veterinario forense es imprescindible para que el diagnóstico llegue a buen término, ya que la pericia y los conocimientos juegan un papel imprescindible. El desafío de detectar tal variedad de posibles sustancias se ve agravado por el hecho de que la cantidad de muestra suele ser pequeña y/o estar en malas condiciones, por lo que disponer de métodos de análisis robustos y sensibles que complementen la labor del técnico es igualmente importante.

En el caso de los cebos envenenados todo el procedimiento es más sencillo, ya que el tóxico suele estar impregnado en la superficie o inyectado en su interior y la concentración del mismo es, por tanto, muy alta en comparación con la presente en los tejidos de los animales envenenados.

1.5.2. Métodos Multirresiduo en la determinación de plaguicidas en tejidos

Como se ha comentado en el apartado anterior, en muchos casos de intoxicación no hay una idea clara del compuesto involucrado en el proceso. Lo ideal sería que un solo análisis abarcara todos los posibles tóxicos. La separación e identificación de compuestos que permite la determinación por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia o *High Performance Liquid Chromatography*) o por GC (cromatografía de gases o *Gas Chromatography*) puede ser perfecta, pero casi siempre es necesaria una limpieza específica previa (purificación) del extracto bruto de la muestra. Dicha limpieza se realiza de manera específica para cada familia química de compuestos presentes en la muestra, lo que permitirá que se puedan identificar y cuantificar por cromatografía con selectores específicos. Este tipo de métodos se conoce como MMR (Métodos Multirresiduo), ya que permite la identificación y cuantificación de varios plaguicidas pertenecientes a la misma familia química, o de numerosas familias químicas, y alguno de sus metabolitos aplicando un único procedimiento de análisis.

El primer paso necesario en todo proceso de análisis toxicológico es la **extracción** del compuesto de la matriz del tejido. Para ello, ésta debe triturarse para que el compuesto se exponga extracelularmente y la extracción con solventes sea más efectiva. Esta extracción se hace con el uso de solventes miscibles en agua (como acetona o acetonitrilo) o bien usando primero un desecante (como el sulfato sódico anhidro) y luego empleando un solvente inmiscible en agua (como el hexano). El tipo de solvente a utilizar se debe escoger según el tejido y la familia de tóxico que se quiere extraer. Los solventes miscibles en agua extraen la mayor parte de plaguicidas, pero también arrastran otros compuestos que pueden ensuciar el extracto; los solventes inmiscibles conseguirán un extracto más limpio, pero puede que la extracción de plaguicidas quede incompleta (Brown *et al.*, 1996; Rudakov *et al.*, 2018). En el caso de los cebos, si se sospecha que tienen el tóxico en la superficie, bastaría con sumergirlos o raspar la superficie directamente en el solvente y agitar durante un tiempo; debido a la facilidad de extracción y la alta cantidad de tóxico, estas muestras pueden no requerir más pasos de purificación o limpieza. Los métodos de extracción son muy numerosos, siendo los más frecuentes la extracción líquido-líquido (LLE) (se extraen los compuestos de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible con ella), en fase sólida (SPE) (se provoca una partición selectiva de la muestra en una fase líquida y en otra sólida por contacto con un material sólido adsorbente), con fluidos supercríticos (SFE) (se basa en la capacidad de algunos fluidos de alterar su poder disolvente en estado supercrítico), o el método QuEChERS (desarrollado en 2003 por Anastassiades *et al.*, siendo el más utilizado hoy en día; se comentará más adelante). El siguiente paso es la **purificación o limpieza de los extractos** obtenidos, que debe ser valorado según la cantidad de compuestos coextractivos que puedan existir en el extracto e interferir el análisis, ya que supone un aumento del coste y el tiempo. Su finalidad es reducir las interferencias para el análisis cromatográfico (efecto matriz) eliminando impurezas que se hayan extraído junto con los analitos. Uno de los métodos más universales de purificación es la cromatografía de permeación en gel (GPC o *Gel Permeation Chromatography*) que permite separar los compuestos

del extracto al pasar por una columna de gel poroso de manera que los elementos con diferente masa molecular salen separados y permite recoger la fracción concreta en la que salen solo los analitos de interés. Otro método de purificación es el uso de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE o *Solid Phase*) (Dömötörová y Matisová, 2008; Rejczak y Tuzimski, 2015; Amelin y Abramenkova, 2017; Lehotay y Chen, 2018). El extracto ya purificado permite **determinar**, e incluso **cuantificar**, los plaguicidas presentes en el mismo mediante técnicas cromatográficas. Alder *et al.* (2006) evaluaron la aplicabilidad de la HPLC y de la GC combinadas ambas con la espectrometría de masas (MS) comparando ambos métodos para la determinación de 500 compuestos. Sólo en el caso de los plaguicidas organoclorados, la GC-MS logra un mejor rendimiento, mostrando mayor sensibilidad la HPLC-MS para el resto de plaguicidas. Independientemente de este hecho, ambas técnicas son las más utilizadas en la actualidad en el análisis múltiple de residuos de plaguicidas.

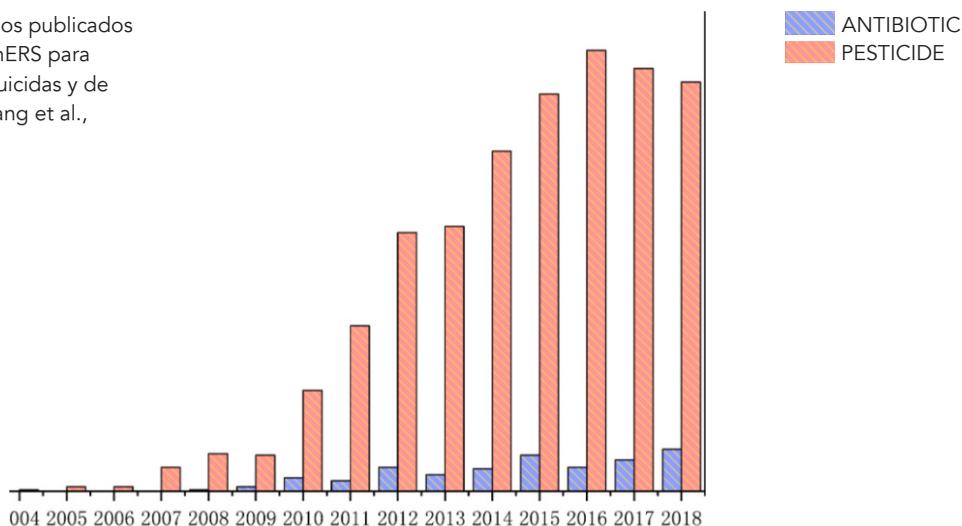
1.6 Método QuEChERS

Se trata de un método de extracción que hace referencia en su nombre a las iniciales en inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*, que significan rápido, fácil, efectivo, robusto y seguro. Desarrollado y publicado por Anastassiades *et al.* en 2003 para ser aplicado en productos vegetales, es actualmente el más utilizado por sus evidentes ventajas, entre las que destaca que se puede aplicar para el análisis de residuos de más plaguicidas que otros métodos de extracción (Wilkowska y Biziuk, 2011), y estando cada vez implementado en el análisis de un mayor número de distintas matrices biológicas, aparte de las vegetales. Consiste en un método de análisis multirresiduo rápido y muy poco laborioso que combina una primera fase de extracción simple de la muestra con acetonitrilo (ACN), seguida de una partición líquido-líquido al adicionar sulfato de magnesio ($MgSO_4$) anhidro y NaCl. Posteriormente, se lleva a cabo simultáneamente la eliminación del agua

y la limpieza de 1 ml del extracto resultante mediante una dSPE con una mezcla de MgSO_4 anhidro y de amina primaria secundaria (PSA) para eliminar muchas impurezas, como ácidos orgánicos, pigmentos polares y azúcares, que pueden interferir en la identificación de los plaguicidas. Tras agitación y centrifugación, el extracto queda preparado para su análisis cromatográfico. Los excelentes resultados, sumados a la rapidez y bajo coste, consiguieron que a partir del 2003 se hayan publicado más de 2000 trabajos sobre adaptaciones y optimización del método para multitud de matrices alimentarias (Musarurwa *et al.*, 2019) y ambientales (Bruzzoniti *et al.*, 2014; González-Curbelo *et al.*, 2022) analizando mayoritariamente residuos de una gran amplitud de plaguicidas y, en menor medida, sustancias como antibióticos (Zhang *et al.*, 2019) (Figura 5), otros productos farmacéuticos, micotoxinas (Facorro *et al.*, 2020; Pantano *et al.*, 2021), colorantes, COPs (Kim *et al.*, 2019) y otros compuestos químicos (García y Gotah, 2017).

Dentro de cada grupo de compuestos, el método se aplica y se adapta a su vez a una amplia variedad de matrices. A modo de ejemplo, en el trabajo de Zhang *et al.* (2019) se revisan las diferentes matrices en que se ha aplicado el método QuEChERS para el análisis de residuos de antibióticos:

Figura 5. Número de artículos publicados utilizando el método QuEChERS para análisis de residuos de plaguicidas y de antibióticos (Tomado de Zhang *et al.*, 2019).



- Matrices alimentarias de origen animal: leche (Aguilera-Luiz *et al.*, 2008; Martínez Vidal *et al.*, 2010; Lombardo-Agui *et al.*, 2011), carne de pollo (Stubbings y Bigwood, 2009; Chen *et al.*, 2017); miel (Jin *et al.*, 2017), gambas (Villar-Pulido *et al.*, 2011), leche en polvo (Parab y Amritkar, 2012), carne de ternera, carne de cerdo, huevos (Nakajima *et al.*, 2012), papillas infantiles (Aguilera-Luiz *et al.*, 2012; Konak *et al.*, 2017), riñones de aves y cerdo (Rocha *et al.*, 2016), productos lácteos (Schwaiger *et al.*, 2017).
- Matrices ambientales: suelo (Salvia *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018), estiércol de porcino (Guo *et al.*, 2016), hojas de vegetación (Yu *et al.*, 2018), vegetación (Amelin y Avdeeva, 2018; He *et al.*, 2018).

Como evidencia de este apartado, los trabajos en torno a la aplicación del método para el análisis de plaguicidas son muy numerosos, y además existen diferentes revisiones que comparan las modificaciones aplicadas y los resultados en matrices vegetales, que son en las que se desarrolló el método original (Rejczak y Tuzimski, 2015), con matrices ambientales (Tadeo *et al.*, 2012; Bruzzoniti *et al.*, 2014; Pszczolińska y Michel, 2016) y con matrices de productos alimentarios de origen animal como carne, vísceras, miel o lácteos (Jeong *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2015; Han *et al.* 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Recientemente, QuEChERS se ha actualizado a QuEChERSER mediante la adición de los conceptos de eficiente y robusto (*Efficient* y *Robust* en inglés) para aprovechar mejor las técnicas analíticas modernas y de preparación de muestras. Lehotay (2022) lo define por tanto como un “megamétodo” que cubre un mayor rango de analitos polares y no polares en diversos tipos de muestras, explicando en su artículo sus ventajas sobre el método tradicional. Además, a partir de su trabajo, han sido publicados estudios de validación del método para distintas aplicaciones (Monteiro *et al.*, 2022; Ninga *et al.*, 2022; Taylor y Sapozhnikova, 2022).

1.6.1 Método QuEChERS para el análisis de COPs en fauna silvestre

El análisis de residuos de COPs en tejidos de fauna silvestre es otra de las aplicaciones del método de gran utilidad en la práctica de la medicina veterinaria forense y la toxicología ambiental, como herramienta de diagnóstico y biomonitorización (procedimiento para evaluar la carga corporal de sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas en los seres vivos). Las muestras biológicas utilizadas normalmente son matrices complejas en su composición con cierto contenido graso, y el método QuEChERS original fue diseñado para analizar frutas y verduras, por lo que los esfuerzos siempre han ido encaminados a conseguir adaptarlo a muestras con estas características que complican la purificación de las mismas. La muestra biológica más común para el análisis es la sangre, al poderse tomar de un animal vivo o muerto, pero se puede utilizar cualquier otro tejido de elección, como otros fluidos, pelos, plumas, etc. Por ejemplo, Rial-Berriel *et al.* (2020) consiguieron determinar un total de 306 tóxicos (40 COPs, junto con plaguicidas, fármacos y conservantes) en sangre de aves rapaces. En toxicología humana también se ha usado este método directamente en sangre (Plassmann *et al.*, 2015), así como en leche materna (Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019). Los estudios en toxicología Forense Humana son fuente de conocimiento para aplicación a la veterinaria y viceversa, ya que las matrices y los compuestos a analizar son prácticamente iguales. Ocurre de la misma manera con la aplicación en muestras alimentarias de origen animal (Deribe *et al.*, 2011; Surma *et al.*, 2014) o incluso de origen vegetal, pero con alto contenido en grasa (Chung y Chen, 2011). De hecho, la toxicología Alimentaria fue el campo de aplicación original de este método y donde más estudios se han ido realizando hasta que se han ido diversificando los campos de aplicación. En toxicología Forense Veterinaria cuando el animal ha muerto, el hígado suele ser el órgano de preferencia para determinar la presencia de tóxicos (Kinsella *et al.*, 2010).

Objetivos

A la vista de lo expuesto anteriormente, los **objetivos principales** que se persiguen con la realización de la presente esta tesis doctoral son dos:

- 1 Analizar la casuística de las intoxicaciones en fauna silvestre acontecidas en Extremadura durante los 17 años comprendidos entre 2002 y 2018 (ambos inclusive), así como la valoración del uso de cebos envenenados en el medio natural extremeño durante ese mismo período.
- 2 Validar la aplicación del método QuEChERS para el análisis de plaguicidas en hígado de aves como herramienta de análisis toxicológico en tejidos animales.

A partir de estos, y para llegar a su consecución, se plantean los **objetivos secundarios** que se citan a continuación:

- 1 Establecer los distintos tipos de cebos envenenados, así como los compuestos que son usados en ellos, durante el periodo considerado.
- 2 Determinar las especies de fauna silvestre que se han visto afectadas por este tipo de incidentes, realizando el estudio epidemiológico correspondiente, para establecer la evolución temporal (interanual y por estaciones) y geográfica de las intoxicaciones en Extremadura.
- 3 Valorar el impacto del uso de cebos envenenados en las especies animales protegidas de interés en Extremadura.
- 4 Valorar la metodología QuEChERS en muestras reales de hígados de aves silvestres: cigüeña blanca, milano real y buitre leonado para valorar los niveles de estos compuestos.

Bibliografía

- A** Adler, F.W.E. 1944. Chemical analysis of organs from lead-poisoned Canada geese. *J. Wildl. Manage.* 8, 83-85.
- Aguilera-Luiz, J.M., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., Frenich, A.G. 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1205, 10-16.
- Aguilera-Luiz, M.M., Martínez Vidal, J.L., Romero-González, R., Frenich, A.G. 2012. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 132, 2171-2180.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Spectrom. Rev.* 25, 838-865.
- Amelin, V., Abramenkova, O. 2017. Food safety assurance using methods of chemical analysis. *J. Anal. Chem.* 72 (1), 1-46.
- Amelin, V.G., Avdeeva, N.M. 2018. Determination of penicillins G and V in vegetables and fruits by exact masses of ions of protonated adducts with methanol by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight high resolution mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 73, 22-928.
- Amendola, G., Pelosi, P., Barbini, D.A. 2015. Determination of pesticide residues in animal origin baby foods by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health. B* 50 (2), 109-120.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* 86 (2), 412-31.
- Aulerich, R.J., Ringer, R.K. 1977. Current status of PCB toxicity to mink and effect on their reproduction. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 279-292.
- B** Ballesteros, S. 1997. Intoxicaciones en la fauna silvestre. En: *Actas del I Congreso Internacional de Medio Ambiente y Veterinaria: ponencias y comunicaciones*, Mérida, España, pp. 213-228.
- Beasley, V. 2009. ‘One toxicology’, ‘ecosystem health’ and ‘one health’. *Vet. Ital.* 45 (1), 97-110.

- Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 93-100.
- Berny, P., Vilagines, L., Cugnasse, J.M., Mastain, O., Chollet, J.Y., Joncour, G., Razin, M. 2015. Vigilance Poison: Illegal poisoning and lead intoxication are the main factors affecting avian scavenger survival in the Pyrenees (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 71-82.
- Beyer, W.N., Storm, G. 1995. Ecotoxicological damage from zinc smelting at Palmerton, Pennsylvania. En: Hoffman, D.J., Rattner B.A., Burton G.A. Jr., Cairns, J. Jr. (Eds), *Handbook of Ecotoxicology*, 2ª ed. Lewis Publishing Inc., Boca Raton, FL, pp. 596-608.
- BOE de 10 de marzo de 1983. Instrumento de Ratificación de 7 de junio de 1982 del Convenio sobre la contaminación atmosférica transfronteriza a gran distancia, hecho en Ginebra el 13 de noviembre de 1979. Disponible en: [https://www.boe.es/eli/es/ai/1979/11/13/\(1\)](https://www.boe.es/eli/es/ai/1979/11/13/(1)). BOE de 21 de mayo de 2021. Enmiendas a los Anexos A y B del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, adoptadas en Ginebra el 10 de mayo de 2019, mediante las decisiones SC-9/4, SC-9/11 y SC-9/12. Disponible en: [https://www.w.boe.es/eli/es/ai/2019/05/10/\(2\)](https://www.w.boe.es/eli/es/ai/2019/05/10/(2)).
- Bouwman, H., Bornman, R., van den Berg, H., Kylin, H. 2013. DDT: fifty years since Silent Spring. En: Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation, Chapter 11. *Environment and Health Environmental Scenarios. EEA Report No 1/2013*, Agencia Europea del Medio Ambiente, Luxemburgo, pp. 240-259.
- Bozo, L., Fernández, M., López, M., Rosa Gil, Suárez, P. 2007. Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 32 (1), pp. 8-14.
- Brown, P., Charlton, A., Cuthbert, M., Barnett, L., Ross L., Green, M., Gillies, L., Shaw, K., Fletcher, M. 1996. Identification of pesticide poisoning in wildlife. *J. Chromatography A* 754 (1-2), 463-478.
- Bruzzoniti, M.C., Checchini, L., De Carlo, R.M., Orlandini, S., Rivoira, L., Del Bubba M. 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (17), 4089-116.
- Bucheli, T., Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- C** Calvert, H. 1876. Pheasant poisoning by swallowing shot. *The Field* 47, p.189.
- Cano, I.M., Taboada, F.G., Naves, J., Fernández-Gil, A., Wiegand, T. 2016. Decline and recovery of a large carnivore. Environmental change and long-term trends in an endangered brown bear population. *Proc. Royal Soc. B* 283, 1843.
- Capó, M.A. 2002. Bioindicadores y biomarcadores. *Biomonitores. Biosensores. Indicadores biológicos. Animal centinela. Bioensayos en medio ambiente.* En:

- McGraw-Hill Profesional (Ed.) Principios de Ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente (pp. 128-139). Madrid, España.
- Carson, R.L. 1962. *Silent Spring*. Boston, MA: Houghton Mifflin.
- Chiari, M., Cortonovis, C., Vitale, N., Zanoni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., Caloni, F. 2017. Pesticide incidence in poisoned baits: a 10-years report. *Sci. Total Environ.* 601-602, 285-292.
- Chung, S.W.C., Chen, B.L.S. 2011. Determination of organochlorine pesticide in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J. Chromatogr. A* 33, 5555-5567.
- Chung, H., Lee, Y., Rahman, M.M., Abd El-Aty, A.M., Lee, H., Kabir, M.H., Kim, S.W., Park, B., Kim, J., Hacımuftüoğlu, F. Nahar, N., Shin, H., Shim, J. 2017. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. *Sci. Total Environ.* 605-606, 322-331.
- Coburn, D. R., DeWitt, J. B., Derby Jr., J. V., Ediger, E. 1950. Phosphorus poisoning in waterfowl. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 39, 151-158.
- Coburn, D. R., Metzler, D. W., Treichler, R. 1951. A study of absorption and retention of lead in waterfowl in relation to clinical evidence of lead poisoning. *J. Wildl. Manage.* 15, 186-192.
- Colborn, T., Dumanski, D., Myers, J.P. 1996. *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence and survival? A scientific detective story*. Dutton Publishing, New York.
- Cozza, K., Fico, R., Battistini, M.L., Rogers, E. 1996. The damage conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biol. Conserv.* 78, 329-336.
- D** Decisión 2004/129/CE. 2004. Decisión de la Comisión de 30 de enero de 2004 relativa a la no inclusión de determinadas sustancias activas en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan estas sustancias. *Diario Oficial de la Unión Europea* n° L 037 de 10/02/2004.
- Decisión 2003/199/CE. 2003. Decisión del Consejo de 18 de marzo de 2003 relativa a la no inclusión del aldicarb en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. *Diario Oficial de la Unión Europea* n° L 076 de 22/03/2003.
- Decisión 2007/416/CE. 2007. Decisión de la Comisión de 13 de junio de 2007 relativa a la no inclusión del carbofurano en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia. *Diario Oficial de la Unión Europea* n° L 156 de 16/06/2007.

- De la Bodega-Zugasti, D., 2014. Uso ilegal de cebos envenenados. Investigación y análisis jurídico. SEO/Birdlife-Proyecto Life+VENENO, Madrid.
- De la Bodega, D., Cano, C., Mínguez, E. 2020. El veneno en España. Evolución del envenenamiento de fauna silvestre (1992-2017). WWF y SEO/BirdLife. Madrid. Disponible en: https://www.wwf.es/nuestro_trabajo/especies_y_habitats/veneno/?55122/El-veneno-en-Espana-Evolucion-del-envenenamiento-de-fauna-silvestre-1997-2017.
- Depledge, M., Aagaard, A., Gyorkos, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 19-27.
- Deribe, E., Rosseland, B. O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., Norli, H.R., Eklo, O.M. 2011. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from lake Koka, Ethiopia: The influence of lipid content and trophic position. *Sci. Total Environ.* 410-411 (0), 136-145.
- De Roma, A., Miletti, G., D'Alessio, N., Marigliano, L., Bruno, T., Gallo, P., Binato, G., Esposito, M. 2018. Inspective toxicological survey of the poisoned baits bites. *Forensic Sci. Int.* 287, 108-112.
- De Solla, S.R. 2015. Exposure, bioaccumulation, metabolism and monitoring of persistent organic pollutants in terrestrial wildlife. En: Alae M. (Ed.) *Dioxin and Related Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 49 (pp. 203-252). Pub.: Springer, Cham.
- Di Giulio, R., Benson, W.H. 2002. Interconnections between human health and ecological integrity. SETAC Press, Pensacola, FL.
- Directiva 76/403/CEE del Consejo, de 6 de abril de 1976, relativa a la gestión de los policlorobifenilos y policloroterfenilos. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 108 de 26/04/1976.
- Directiva 76/769/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 262 de 27/09/1976.
- Directiva 85/467/CEE del Consejo, de 1 de octubre de 1985, que modifica por sexta vez (bifenilos policlorados/terfenilos policlorados) la Directiva 76/769/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 269 de 11/10/1985.
- Dömötöróvá, M., Matisová, E. 2008. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis. *J. Chrom. A* 1207, 1-16.
- Dulsat-Masvidal, M., Lourenço, R., Lacorte, S., D'Amico, M., Albayrak, T., Andevski,

J., Aradis, A., Baltag, E., Berger-Tal, O., Berny, P., Chosh, Y., Duke, G., Espín, S., García-Fernández, A.J., Gómez-Ramírez, P., Hallgrímsson, G.T., Jaspers, V., Johansson, U., Kovacs, A., Krone, O., Leivits, M., Martínez-López, E., Mateo, R., Movalli, P., Sánchez-Virosta, P., Shore, R.F., Valkama, J., Vrezec, A., Xirouchakis, S., Walker, L.A., Wernham, C. 2021. A review of constraints and solutions for collecting raptor samples and contextual data for a European Raptor Biomonitoring Facility. *Sci. Total Environ.* 793, 148599.

E Eurostat. 2017. Pesticide Sales Statistics (Consultado en enero 2020). Disponible en: <http://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/ddn-20200603-1>.

F Facorro, R., Llompart, M., Dagnac, T. 2020. Combined (d)SPE-QuEChERS extraction of mycotoxins in mixed feed rations and analysis by high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Toxins (Basel)*. 12 (3), 206.

Fisher, A.K. 1893. Report on the ornithology of the Death Valley expedition of 1891, comprising notes on the birds observed in southern California, southern Nevada, and parts of Arizona and Utah. En: Fisher AK, Stejneger L, Gilbert CH, Riley CV, Stearns REC, Merriam CH, Palmer TS (Eds.) *The Death Valley Expedition: a biological survey of parts of California, Nevada, Arizona, and Utah. Parte II. North American Fauna no. 7.* US Department of Agriculture, Division of Ornithology and Mammalogy, Washington, DC, pp. 7-158.

G García-Fernández, A.J., María-Mojica, P., Martínez-López, E., Romero, D., Navas, I., Hernández-García, A., Gómez-Ramírez, P. 2006. Aspectos clínicos y forenses del envenenamiento de aves silvestres: diferencias entre aldicarb y estricnina. *Rev. Toxicol.* 23, 44-48.

García-Fernández, A.J., Calvo, J.F., Martínez-López, E., María-Mojica, P., Martínez, J.E. 2008. Raptor ecotoxicology in Spain: a review on environmental persistent contaminants. *AMBIO-J. Hum. Environ.* 37, 432-439.

García, C., Gotah, A. 2017. Application of QuEChERS for determining xenobiotics in foods of animal origin. *J. Anal. Methods Chem.* 7 (2), 2603067.

George, J.L., Fear, D.E.H. 1966. Pesticides in the Antarctic. In: Moore NW (ed). *Pesticides in the environment and their effects on wildlife.* *J. Appl. Ecol.* 3 (Suppl), 155-167.

Giesy, J.P., Kannan, K. 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1339-1342.

Gil-Sánchez, J.M., Aguilera-Alcalá, N., Moleón, M., Sebastián-González, E., Margalida, A., Morales-Reyes, Z., Durá-Alemañ, C.J., Oliva-Vidal, P., Pérez-García, JM, Sánchez-Zapata, J.A. 2021. Biases in the Detection of intentionally poisoned animals: public health and conservation implications from a field experiment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (3), 1201.

- Gilbertson, M., Kubiak, T., Ludwig, J., Fox, G. 1991. Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick edema disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 33, 455-520.
- Giorgi, M., Meucci, V., Loni, R., Soldani, G., Mengozzi, G. 2002. Intoxications in veterinary medicine (in Italian). *Obiettivi e Documenti veterinari* 6, 57-62.
- Giorgi, M., Mengozzi, G. 2011. Malicious animal intoxications: poisoned baits. *Vet. Med-Czech.*, 56 (4), 173-179.
- Glaser, L.C.: Organophosphorus carbamate pesticides, En: Friend M., Franson J.C., (eds): *Field Manual of Wildlife Diseases-General Field Procedures and Diseases of Birds*. Reston, VA, U.S. Geological Survey, 1999.
- González-Curbelo, M.Á., Varela-Martínez, D.A., Riaño-Herrera, D.A. 2022. Pesticide-Residue Analysis in Soils by the QuEChERS Method: A Review. *Molecules* 27 (13), 4323.
- Graham, K., Beckerman, A.P., Thirgood, S. 2005. Human-predator-prey conflicts: ecological correlates, prey losses and patterns of management. *Biol. Conserv.* 122, 159-171.
- Grilo, A., Moreira, A., Carrapiço, B., Belas, A., São Braz, B. 2021. Epidemiological study of pesticide poisoning in domestic animals and wildlife in Portugal: 2014-2020. *Front. Vet. Sci.* 7, 616293.
- Grinell, G.B. 1894. Lead poisoning. *Forest and Stream* 42 (6), 117-118.
- Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubles, S., Vandembroucke, V., Berny, P. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Vet. J.* 183, 260-265.
- Guo, C., Wang, M., Xiao, H., Huai, B., Wang, F., Pan, G., Liao, X., Liu, Y. 2016. Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1027, 110-118.
- H** Han, L.J., Sapozhnikova, Y., Lehotay, S.J. 2016. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography. *Food Control* 66, 270-282.
- Hayes, W.J. Jr. 1991. Introduction. En: Hayes, W.J. Jr., Lewis, E.R. Jr. (Eds.) *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Press, San Diego, California, EEUU pp. 1-37.
- He, Z., Wang, Y., Xu, Y., Liu, X. 2018. Determination of antibiotics in vegetables using QuEChERS-based method and liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Food Anal. Methods* 11, 2857-2864.
- Hernández-Moreno, D.; Míguez-Santiyán, M.P.; Oropesa-Jiménez, A.L.; Soler Rodríguez, F.; van Wyk, J.H.; Pérez-López, M. 2016. Bifenilos policlorados y disrupción

endocrina en la fauna salvaje. *Observatorio Medioambiental* 19: 91-109.

Hernout, B.V., Arnold, K.E., McClean, C.J., Grimm, V., Boxall, A.B. 2011. Predicting the threats of chemicals to wildlife: what are the challenges? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7; 499-501.

Hill, E.F., Fleming W.J. 1982. Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 27-38.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. SETAC Special Publication Series. Boca Raton, FL: Lewis Publishing, Inc., pp. 347.

I Ibáñez-Pernía, Y., Hernández-Moreno, D., Pérez-López, M., Soler-Rodríguez, F. 2022. Use of poisoned baits against wildlife. A retrospective 17-year study in the natural environment of Extremadura (Spain). *Environ. Pollut.* 303: 119098.

J Jensen, S. 1966. Report of a new chemical hazard. *New Sci.* 32, 612.

Jensen, J., Johnels, A.G., Olsson, M., Otterland, G. 1969. DDT and PCBs in marine animals from Swedish waters. *Nature* 224, 247-250.

Jeong, I-S., Kwak, B-M, Ahn, J-H., Jeong, S-H. 2012. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. *Food Chem.* 133, 473-481.

Jessup, D.A., Leighton, F.A. 1996. Oil pollution and petroleum toxicity to wildlife. En: Fairbrother A, Locke LN, Hoff GL (eds) *Non infectious diseases of wildlife*, 2ª ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 141-156.

Jin, J.Y., Zhang, J., Zhao, W., Zhang, W., Wang, L., Zhou, J., Li, Y. 2017. Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 221, 1298-1307.

K Kaczensky, P. 1999. Livestock-carnivore conflicts in Europe. A Selection of Papers from the Eleventh International Conference on Bear Research and Management, Graz, Austria, September 1997 and Gatlinburg, Tennessee, April 1998, 11, 59-72.

Keith, J.O. 1996. Residue analyses: how they were used to assess the hazards of contaminants to wildlife. En: Beyer, W.N., Heins, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (Eds.). *Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations*. SETAC Special Publications Series. Lewis Publishing Inc., Boca Raton, Florida, EEUU pp. 1-47.

Kendall, R. 2016. *Wildlife Toxicology: where we have been and where we are going*. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 6, 1.

Kinsella, B., Whelan, M., Cantwell, H., McCormack, M., Furey, A., Lehotay, S.J., Danaher, M. 2010. A dual validation approach to detect anthelmintic residues in

bovine liver over an extended concentration range. *Talanta*, 83, 14-24.

Kodavanti, P.R.S., Royland, J.E., Sambasiva Rao, K.R.S. 2014. Toxicology of Persistent Organic Pollutants, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.

Koeman, J.H., van Genderen, H. 1966. Some preliminary notes on residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in birds and mammals in the Netherlands. *J. Appl. Ecol.* 3, 99-106.

Konak, U.I., Certel, M., Sik, B., Tongur, T. 2017. Development of an analysis method for determination of sulfonamides and their five acetylated metabolites in baby foods by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (Orbitrap-MS). *J. Chromatogr. B* 1057, 81-91.

Kubiak, T.J., Harris, J.H., Smith, L.M., Schwartz, T.R., Stalling, D.L., Trick, J.A., Sileo, L., Docherty, D.E., Erdman, T.C. 1989. Microcontaminants and reproductive impairment of the Forster's tern on Green Bay, Lake Michigan—1983. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 706-726.

Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., Yamaguchi, A. 1972. Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial and of polychlorinated biphenyl. *Environ. Health Perspect.* 1, 119-128.

L Lehotay, S., Chen, Y. 2018. Hits misses in research trends to monitor contaminants

in foods. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (22), 5331-5351.

Lehotay, S. 2022. The QuEChERSER Mega-Method. *LCGC North America.* 40 (1), 13-19.

Livingstone, D. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195-211.

Lombardo-Agui, M., Gamiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., Garcia-Campana, A.M. 2011. Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1218, 4966-4971.

Luzardo, O.P., Ruiz-Suárez, N., Henríquez-Hernández, L.A., Valerón, P.F., Camacho, M., Zumbado, M., Boada, L.D. 2014. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. *Sci. Total Environ.* 472, 146-153.

M Margalida, A. 2012. Baits, budget cuts: a deadly mix. *Science* 338, 192.

Margalida, A., Colomer, M.A., Oro, D. 2014. Man-induced activities modify demographic parameters in a long-lived species: effects of poisoning and health policies. *Ecol. Appl.* 24 (3), 436-444.

Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-Lopez, M., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J. 2008. Relationship of the toxicity of pesticide

- formulations their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 396-402.
- Martínez Vidal, J.L., Garrido Frenich, A., Aguilera-Luiz, M.M., Romero-González, R. 2010. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2777-2790.
- Márquez, C., Vargas, J.M., Villafuerte, R., Fa, J.E. 2013. Understanding the propensity of wild predators to illegal poison baiting. *Anim. Conserv.* 16 (1), 118-129.
- Márquez, C., Vargas, J.M., Fa, J.E. 2012. Risk mapping of illegal poisoning of avian and mammalian predators. *J. Wildl. Manage.* 77 (1), 75-83.
- Mateo-Tomás, P., Olea, P.P., Sánchez-Barbudo, I.S., Mateo, R. 2012. Alleviating human-wildlife conflicts: identifying the causes and mapping the risk of illegal poisoning of wild fauna. *J. Appl. Ecol.* 49, 376-385.
- Mayfield, D.B., Fairbrother, A. 2012. Efforts to Standardize Wildlife Toxicity Values Remain Unrealized. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 114-123.
- Mazzoli, M., Graipel, M.E., Dunstone, N. 2002. Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biol. Conserv.* 105 (1), 43-51.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R. 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Boca Raton, FL: Lewis Publisher, Inc.
- Mech, L.D., Harper, E.K., Meier, T.J., Paul, W.J. 2000. Assessing factors that may predispose Minnesota farms to wolf depredations on cattle. *Wildlife Soc. Bu.* 28 (3), 623-629.
- Meng, M., He, Z., Xu, Y., Wang, L., Peng, Y., Liu, X. 2017. Simultaneous extraction and determination of antibiotics in soils using a method based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 40, 3214-3220.
- Mineau, P., Fletcher, M.R., Glaser, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliott, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T., Porter, S.L. 1999. Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, US and UK. *J. Raptor Res.* 33, 1-37.
- Mineau, P., Tucker, K.R. 2002. Improving detection of pesticide poisoning in birds. *J. Wildlife Rehab. Part 1* 25 (2), 4-13.
- Miniero, R., Iamiceli, A.L., De Felip, E. 2015. Persistent Organic Pollutants. En: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Pub:Elsevier: Amsterdam, Países Bajos.
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica). 2019. Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y del Reglamento (CE) N°850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Actualización 2019. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/>

- actualizacion2019pnadecop_tcm30-508025.pdf [Consulta: julio 2022].
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica). 2022a. Convenio de Bonn o Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/convenciones-internacionales/ce-conv-int-bonn.aspx> [Consulta: julio 2022].
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica). 2022b. Convenio de Berna o Convenio relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/convenciones-internacionales/ce-conv-int-berna.aspx> [Consulta: julio 2022].
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica). 2022c. Información sobre la estrategia de cebos envenenados. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/publicaciones/pbl-fauna-flora-estrategias-lucha-venenos.aspx> [Consulta: julio 2022].
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica). 2022d. Convenio de Ginebra de 1979 sobre contaminación atmosférica transfronteriza a gran distancia. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/normativa/Convenio-Ginebra.aspx> [Consulta: julio 2022].
- Monteiro, S.H., Lehotay, S.J., Sapozhnikova, Y., Ninga, E., Moura Rade, G.C.R., Lightfield, A.R. 2022. Validation of the QuEChERSER mega-method for the analysis of pesticides, veterinary drugs, environmental contaminants in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 39 (4), 699-709.
- Motas-Guzmán, M., María-Mojica, P., Romero, D., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J. 2003. Intentional poisoning of animals in southeastern Spain: a review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. Vet. Hum. Toxicol. 45 (1), 47-50.
- Musarurwa, H., Chimuka, L., Pakade, V.E., Tavengwa, N.T. 2019. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. J. Food Compos. Anal. 84, 103314.
- Nadal, M., Marquès, M., Mari, M., Domingo, J.L. 2015. Climate change and environmental concentrations of COPs: A review. Environ. Res. 143 (A), 177-185.
- Nakajima, T., Sasamoto, T., Hayashi, H., Kanda, M., Takeba, K., Kanai, S., Kusano, T., Matsushima, Y., Takano, I. 2012. Screening assay of residual antibiotics in livestock samples by LC-MS/MS. Food Hyg. Saf. Sci. 53, 91-97.
- Nakayama, S.M.M., Morita, A., Ikenaka, Y., Mizukawa, H., Ishizuka, M. 2019. A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. J. Vet. Med. Sci. 81, 298-313.

- Ninga, E., Lehotay, S.J., Sapozhnikova, Y., Lghtfield, A.R., Strahan, G.D., Monteiro, S.H. 2022. Analysis of pesticides, veterinary drugs, environmental contaminants in goat and lamb by the QuEChERSER mega-method. *Anal. Methods*. 14, 2761-2770.
- Norstrom, R.J., Simon, M., Moisey, J., Wakeford, B., Weseloh, D.V. 2002. Geographical distribution (2000) temporal trends (1981–2000) of brominated diphenyl ethers in Great Lakes herring gull eggs. *Environ. Sci. Tech.* 36, 4783–4789.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633.
- OMS. 1991. Environmental Health Criteria 121. Aldicarb. World Health Organization, Geneva.
- Pajewska-Szmyt, M., Sinkiewicz-Darol, E., Bernatowicz-Łojko, U., Kowalkowski, T., Gadzala-Kopciuch, R., Buszewski, B. 2019. QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of polychlorinated biphenyls in breast milk from Polish women. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 30988–30999.
- Pantano, L., La Scala, L., Olibrio, F., Galluzzo, F.G., Bongiorno, C., Buscemi, M.D., Macaluso, A., Vella, A. 2021. QuEChERS LC–MS/MS Screening method for mycotoxin detection in cereal products and spices. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 3774.
- Parab, S.R., Amritkar, P.N. 2012. Development and validation of a procedure for determination of sulfonamide residues in pasteurized milk using modified QuEChERS method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 95, 1528-1533.
- Parsons, K.C., Schmidt, S.R., Tarbill, G., Tucker, K.R. 2005. Sublethal Effects of exposure to cholinesterase-inhibiting pesticides: humans and vertebrate wildlife. Final Report. Manomet Center for Conservation Sciences Manomet, The Massachusetts Environmental Trust and The Massachusetts Toxics Use Reduction Institute.
- Pedersen, V., Linnell, J.D.C., Andersen, R., Andrén, H., Lindén, M., Segerström, P. 1999. Winter lynx *Lynx lynx* predation on semidomestic reindeer *Rangifer tarandus* in northern Sweden. *Wildlife Biol.* 5(4), 203-211.
- Phillips, J.C., Lincoln, F.C. 1930. American waterfowl, their present situation and the outlook for their future. Houghton Mifflin, New York.
- Plassmann, M., Schmidt, M., Brack, W., Krauss, M. 2015. Detecting a wide range of environmental contaminants in human blood samples-combining QuEChERS with LC-MS and GC-MS methods. *Ana. Bioanal. Chem.* 407 (23), 7047-7054.
- Pszczolińska, K., Michel, M.J. 2016. The QuEChERS approach for the determination of pesticide residues sin soil samples: an overview. *AOAC Int.* 99 (6), 1403-1414.

- R** Rattner, B.A. 2009. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18 (7), 773-783.
- Rattner, B. A., Scheuhammer A. M., Elliott J. E. 2011. History of wildlife toxicology and the interpretation of contaminant concentrations in tissues. En: Beyer, W.N., Meador, J.P. (Eds.), *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*. 2ª edición. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 9-44.
- Rejczak, T., Tuzimski, T. 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem. J.* 13 (1), 980-1010.
- Reynolds, J.C., Tapper, S.C. 1996. Control of mammalian predators in game management and conservation. *Mamm. Rev.* 26 (2/3), 127-156.
- Rial-Berriel, C., Acosta-Dacal, A., Zumbado, M., Luzardo, O.P. 2020. Micro QuEChERS-based method for the simultaneous biomonitoring in whole blood of 360 toxicologically relevant pollutants for wildlife. *Sci. Total Environ.* 736, 139444.
- Rocha, D.G., Santos, F.A., Gomes, A.A., Faria, A.F. 2016. Validation of a LC-MS/MS multiresidue methodology based on a QuEChERS approach for the determination of fluoroquinolones, sulfonamides and trimethoprim in poultry and porcine kidney according to the normative instruction 24/2009-MAPA. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 76-86.
- Rudakov, O.B., Rudakova, L.V., Selemeney, V.F. 2018. Acetonitrile as tops solvent for liquid chromatography and extraction. *J. Anal. Chromatogr. Spectrosc.* 1, 1-19.
- Ruiz-Suárez, N., Boada, L.D., Henríquez-Hernández, L.A., González-Moreo, F., Suárez-Pérez, A., Camacho, M., Zumbado, M., Almeida-González, M., Del Mar Travieso-Aja, M., Luzardo, M. 2015. Continued implications of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). *Sci. Total Environ.* 505, 1093-1099.
- S** Sadler, R., Connell, D. 2012. Global Distillation in an Era of Climate Change. En: Puzyn, T. (Eds.), *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update* (pp. 191-216). Pub: IntechOpen, Londres, Reino Unido.
- Salvia, M.V., Cren-Olive, C., Vulliet, E. 2013. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1315, 53-60.
- Schwaiger, B., König, J., Lesueur, C. 2017. Development and validation of a multi-class UHPLC-MS/MS method for determination of antibiotic residues in dairy products. *Food Anal. Methods* 11, 1417-1434.

- SETAC. 2021. SETAC's mission, vision, principles and values. [https://www.setac.org/page/Mission]. [Consulta: abril2021].
- Soler, F., Oropesa, A.L., Pérez, M. 2006. Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. *Rev. Toxicol.* 23 (1), 35-38.
- Soterton, N., Tapper S., Smith, A. 2009. Hen harriers and red grouse: economic aspects of red grouse shooting and the implications for moorland conservation. *J. Appl. Ecol.* 46, 955-960.
- Stansley, W. 1993. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 315-321.
- Stubbings, J.G., Bigwood, T. 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta* 637, 68-78.
- Surma, M.K., Sadowska-Rociek, A.B., Ceslik, E.J. 2014. Evaluation of the QuEChERS method with GC-MS detection for the determination of organochlorine pesticides in food of animal origin. *Food Anal. Methods* 7, 366-376.
- T** Tadeo, J.L., Pérez, R.A., Albero, B., García-Valcárcel, A.I., Sánchez-Brunete, C. 2012. Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residue in soil. *J. AOAC* 95 (5), 1258-1271.
- Taylor, R. B., Sapozhnikova, Y. 2022. Comparison and validation of the QuEChERSER mega-method for determination of per-and polyfluoroalkyl substances in foods by liquid chromatography with high-resolution and triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim Acta* 1230, 340400.
- Thirgood, S.J., Redpath, S.M., Newton, I., Hudson, P. 2000. Raptors and red grouse: conservation conflicts and management solutions. *Conserv. Biol.* 14, 95-104.
- Thirgood, S.J., Redpath, S.M. 2008. Hen harriers and red grouse: science, politics and human-wildlife conflict. *J. Appl. Ecol.* 45, 1550-1554.
- Tren, R., Bate, R. 2001. *Malaria and the DDT Story*. The Institute of Economic Affairs in Association with Profile Books Ltd. Londres, Reino Unido.
- Truhaut, R. 1977. *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 1, 151-173.
- U** UNEP. 2010. Expert group on the assessment of the production and use of DDT and its alternatives for disease vector control. Report of the third expert group meeting on DDT, UNEP/POPS/DDT-EG.3/3, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 12 Nov 2010. 23 pp. Disponible en: <http://chm.pops.int/Programmes/DDT/Meetings/DDTEG32010/tabid/1108/mctl/ViewDetails/EventModID/1421/>

[EventID/116/xmid/4037/language/en-US/Default.aspx](#)

Urbaniak, M. 2013. Biodegradation of PCDD/PCDF and dl- PCB. En: Chamy R., Rosenkran F. (Eds.). Biodegradation - Engineering Technology. INTECH Publisher, Rijeka, Croacia pp. 73-100.

V Villar-Pulido, J.M., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J.F., Martos, N.R., Molina-Díaz, A. 2011. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Talanta* 85, 1419-1427.

Villafuerte, R., Viñuela, J., Blanco, J.C. 1998. Extensive predator persecution caused by population crash in a game species: the case of red kites and rabbits in Spain. *Biol. Conserv.* 84, 181-188.

W Wania, F., Mackay, D. 1996. The global fractionation of persistent organic pollutants. NILU: TR 10/96. Norwegian Institute for Air Research, Kjeller-Norway.

Wetmore, W.S. 1919. Lead Poisoning in Waterfowl, *The Auk* 36 (4), 605.

Wilkowska, A., Biziuk, M. 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.* 125, 803-812.

Wobeser, G., Bollinger, T., Leighton, F.A., Blakley, B., Mineau, P. 2004. Secondary poisoning of eagles following intentional poisoning of coyotes with anticholinesterase pesticides in western Canada. *J. Wildl. Dis.* 40 (2), 163-172.

WWF. 2018. M. Grooten, R.E.A. Almond (Eds.), *Living Planet Report-2018: Aiming Higher*, World Wildlife Fund, Gland, Switzerland.

Y Yu, X., Liu, H., Pu, C., Chen, J., Sun, Y., Hu, L. 2018. Determination of multiple antibiotics in leafy vegetables using QuEChERS-UHPLC-MS/MS, *J. Sep. Sci.* 41, 713-722.

Z Zhang, H., Deng, Y., Zheng, J., Zhang, Y., Yang, L., Liao, C., Su, L., Zhou, Y., Gong, D., Chen, L., Luo, A. 2019. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. *TrAC Trends in Analyt. Chem.* 118, 517-537.

Zylstra, S.J. 1994. A new program for biomonitoring status and trends in the environment. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 3, 81-85.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

**2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA
EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL
PERIODO DE 2002 A 2018**

**3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA
LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE
EXTREMADURA (2002 - 2018)**

**4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS
PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES
SILVESTRES**

5. CONCLUSIONES GENERALES

2

Casuística de intoxicaciones de fauna en Extremadura (España) durante el periodo de 2002 a 2018

2. Casuística de intoxicaciones de fauna en Extremadura (España) durante el período de 2002 a 2018

2.1. Resumen

Actualmente las intoxicaciones en fauna silvestre son una realidad a nivel internacional. La región de Extremadura (España) goza de una importante riqueza faunística y de hábitats que es todo un referente a nivel europeo. En este trabajo se describe la metodología de trabajo llevada a cabo para el estudio de casos de intoxicaciones en el medio natural, las sustancias implicadas y las especies afectadas por las mismas durante el período comprendido entre el año 2002 y 2018.

Durante este período, se recibieron un total de 779 casos sospechosos de intoxicación, que incluían 955 individuos de 59 especies animales diferentes. En 423 casos (54,30% del total) se confirmó la intoxicación como causa de la muerte del animal. Se vieron implicados individuos de 34 especies diferentes, siendo las más afectadas el buitre leonado (*Gyps fulvus*), perro doméstico (*Canis familiaris*), milano real (*Milvus milvus*) y buitre negro (*Aegypius monachus*) (suponiendo el 18,68%, 16,78%, 15,13% y 10,40% de los casos positivos, respectivamente).

De entre las 40 sustancias tóxicas que fueron identificadas, el predominio de los compuestos carbamatos y organofosforados fue claro, al aparecer en más del 89% de los casos, predominando de manera individual y con amplia diferencia el carbofurano y el aldicarb, seguido del clorfenvinfós. A pesar de que los compuestos organofosforados aparecieron en un menor número de casos, presentaron sin embargo una mayor variedad, con 15 organofosforados diferentes identificados en el total de casos frente a los 8 carbamatos diferentes identificados. Otros compuestos también encontrados pertenecieron a grupos tan variados como los antifúngicos, las benzodiazepinas, los barbitúricos, los piretroides y la estricnina.

2.2. Palabras clave

Plaguicidas; Intoxicación; Aves rapaces; Fauna silvestre

2.3. Introducción

Una de las causas más preocupantes de mortalidad de la fauna, tanto silvestre como doméstica, es la vinculada a las intoxicaciones por el uso de plaguicidas, lo cual se han documentado desde las primeras décadas del siglo XX en numerosos países (Phillips y Lincoln, 1930; Strong, 1938; Wigglesworth, 1945; Livingston, 1952). Estas intoxicaciones pueden deberse a accidentes tras un correcto uso de los plaguicidas, a abusos o al uso ilegal de dichos productos como venenos (envenenamientos) (De Snoo *et al.*, 1999; Berny, 2007; Martínez-Haro *et al.*, 2006, 2008; Guitart *et al.*, 2010). Las intoxicaciones debidas a un uso legal y correcto de plaguicidas son escasas (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a), pero en esta categoría también se pueden incluir las asociadas a un uso legal pero inadecuado de los mismos, sobre todo por la aplicación de cantidades que exceden las recomendadas o autorizadas. Sin embargo, la mayor parte de las intoxicaciones se producen por la utilización ilegal de compuestos químicos (venenos) para la elaboración de cebos envenenados con la finalidad de matar animales (Motas-Guzmán *et al.*, 2003; De la Bodega *et al.*, 2020); tanto las sustancias utilizadas como los métodos y materiales de elaboración de los cebos evidencian la intencionalidad criminal de los mismos (Ibáñez-Pernía *et al.*, 2022). Estos envenenamientos suelen estar relacionados con los daños ocasionados por la fauna silvestre en las cosechas, el ganado o la caza (De la Bodega *et al.*, 2020). Además, debido a la existencia de cadáveres de animales intoxicados/envenenados en el campo por las causas descritas anteriormente se producen intoxicaciones secundarias en especies necrófagas (carroñeras) como consecuencia de su ingestión (Wobeser *et al.*, 2004; Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012b).

Desde que diferentes países autorizaron el uso, la venta y la utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, que incluyen los compuestos organofosforados (OF) y carbamatos (CB) (Mineau *et al.*,

1999; Rattner *et al.*, 2011), los datos sobre casos de intoxicaciones agudas en fauna fueron aumentando progresivamente (Mineau *et al.*, 1999) de manera que poco a poco se convirtieron en la principal causa de intoxicaciones agudas en fauna silvestre, especialmente en aves (Franson y Smith, 1999; Mineau *et al.*, 1999; Buij *et al.*, 2022). En general, la mayoría de plaguicidas sintéticos que se utilizan en la actualidad afectan al sistema nervioso de aquellos organismos contra los que se dirigen (insectos), pero también afectan al de los mamíferos y las aves, dejando de ser selectivos y actuando contra especies para las que no han sido diseñados o autorizados.

Los plaguicidas anticolinesterásicos son compuestos de baja persistencia en el ambiente que afectan a la transmisión de los impulsos nerviosos al inhibir la acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que se encarga de completar la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (ACh). La intoxicación resulta por tanto en una acumulación de ACh en las sinapsis nerviosas; de manera que se produce una transmisión ininterrumpida de impulsos nerviosos que acaba en parálisis respiratoria y asfixia (Fairbrother, 1996). Las aves son especialmente sensibles al efecto tóxico de estas sustancias (Hill, 1995). Además, los anticolinesterásicos son los plaguicidas más utilizados a nivel mundial, lo que facilita la exposición masiva de la fauna silvestre a los mismos y, al ser de baja persistencia, las intoxicaciones suelen estar asociadas a aplicaciones específicas o intoxicaciones intencionadas (Grue *et al.*, 1997). Todo ello explica que las aves sean las más afectadas por la exposición a compuestos anticolinesterásicos en todo el mundo; por ejemplo, en Estados Unidos se ven especialmente afectadas las passeriformes, las aves acuáticas y las rapaces (Glaser, 1999), mientras que en Europa las especies más afectadas dependen de cada país (Guitar *et al.*, 2010), siendo el buitre leonado y el milano real las más perjudicadas por estas sustancias en España. En concreto, en la región de Extremadura cobra especial importancia el riesgo que suponen estos compuestos debido a su importancia ornitológica a nivel europeo; su territorio alberga las mayores concentraciones de aves amenazadas, el 35% de los taxones de especies protegidas europeas, y el 75% de su

superficie está considerada como “Área Importante para la Conservación de las Aves y Biodiversidad en España” (IBA) y cuenta con 71 “Zonas de Especial Protección para las Aves” (ZEPA) que cubren 1,1 millones de hectáreas suponiendo el 26,5% de territorio extremeño (MITECO, 2022).

Tradicionalmente, las muertes causadas por plaguicidas se asocian a su uso para el control de plagas en cultivos y bosques, zonas ajardinadas de áreas urbanas, y/o zonas ganaderas, sin olvidar su aplicación malintencionada y deliberada con el objetivo de envenenar a la fauna (Fairbrother, 1996; Glaser, 1999). Las aves rapaces, las carroñeras y los mamíferos carnívoros pueden sufrir intoxicaciones al consumir cualquier tipo de cebo que haya sido envenenado maliciosamente (normalmente de material cárnico), si bien también son víctimas de intoxicaciones secundarias tras ingerir pequeñas aves o mamíferos que han estado en contacto o consumido el veneno previamente. No hay que olvidar que en la Unión Europea (UE), si bien el uso de plaguicidas ha aumentado claramente en los últimos 50 años, el número o variedad de productos ha disminuido debido a las normativas legales que determinan las sustancias admitidas y su correcta aplicación a través de la Directiva 91/414 de julio de 1991 (Berny, 2007); este hecho ha ido determinando qué sustancias se han ido viendo implicadas en las intoxicaciones de la fauna silvestre de las últimas décadas. En EEUU., estos aspectos están regulados por la Agencia de Protección Ambiental (US-EPA) que lleva a cabo la evaluación de los efectos de los plaguicidas sobre la salud de la fauna silvestre, lo que posteriormente se utiliza como criterio para la comercialización de los productos (EPA, 1992). Diferentes instituciones en varios países han funcionado como fuente de información a la hora de evaluar la importancia de este tipo de incidentes (por ejemplo, los *Canadian Cooperative Wildlife Health Centers* en Canadá; el *Fish and Wildlife Service*, la *Environmental Protection Agency* y el *National Wildlife Health Center* en EEUU.; el Sistema Nacional de Vigilancia Sanitaria de la Fauna Silvestre o SAGIR en Francia; diferentes laboratorios de toxicología veterinaria en España, etc.). Además, se han creado programas específicos para

la investigación y seguimiento de las intoxicaciones de fauna silvestre. Tal es el caso del *Wildlife Incident Investigation Scheme* (WISS) en el Reino Unido; mientras que en España juega un papel fundamental la “Estrategia Nacional Contra el Uso Ilegal de Cebos Envenenados en el Medio Natural”, que se complementa con estrategias y acciones que están desarrollando diferentes gobiernos regionales, sin olvidar otras iniciativas llevadas a cabo por asociaciones ambientalistas como el “Programa Antídoto” (De la Bodega *et al.*, 2020). Estos esfuerzos cobran especial relevancia en una región como Extremadura, que se caracteriza por una amplia variedad de espacios naturales bien conservados, lo que permite reunir en esta comunidad la mayor concentración a nivel europeo de aves amenazadas, convirtiendo a Extremadura en uno de los territorios europeos de mayor protección e interés ornitológico.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en 17 años (2002-2018) de los análisis toxicológicos realizados por el Servicio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (España) sobre las muestras recibidas de casos sospechosos de intoxicaciones en fauna (tanto accidentales como intencionales) ocurridos en el medio natural de Extremadura; cabe destacar que se trata del laboratorio de referencia en la región para el análisis de sospechas de intoxicación en fauna.

2.4. Material y métodos

2.4.1. Recepción y tratamiento inicial de las muestras

Las muestras recibidas en nuestro laboratorio, y que se incluyen en este estudio, correspondían a animales (principalmente fauna silvestre, pero también animales domésticos) encontrados en el medio natural (y, ocasionalmente, en el área urbana) bajo sospecha de muerte por intoxicación en la región de Extremadura (España), que posee un área de 41634 km² y una población de 1063987 habitantes (25,5 habitantes/km²) (INE, 2020). Del total de su superficie, 11024,1 km² (26,5%) son Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) y 9341,2 km² (22,4%) son Zonas Especiales de Conservación (ZEC)

(Decreto 110/2015). De acuerdo a lo establecido para un adecuado seguimiento del proceso, los animales fueron recogidos en el medio natural por Agentes Medioambientales del Gobierno Regional o por el SEPRONA (Servicio de Protección de la Naturaleza de la Guardia Civil) durante sus labores de inspección del medio natural o tras denuncias ciudadanas.

Posteriormente, fueron remitidos a la entidad establecida en el protocolo, el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “Los Hornos”, ubicado en Sierra de Fuentes (Cáceres, España), perteneciente al gobierno regional, donde personal veterinario cualificado se encargaba de realizar la necropsia a cada animal para determinar la causa de su muerte (en la mayoría de los casos se desconocía la clínica y su valoración, ya que normalmente se encontraban ya cadáveres). Ante la sospecha de que pudiera tratarse de un caso de intoxicación, las muestras correspondientes eran extraídas y remitidas refrigeradas junto con un Acta de Entrega con todos los detalles relativos al caso.

En cadáveres, las muestras de preferencia remitidas eran el tracto digestivo (buche, estómago), el hígado y el cerebro; cuando el mal estado de estas muestras no permitía su extracción y remisión, se enviaba el cadáver completo al tratarse normalmente de animales pequeños. Por el contrario, si el animal llegaba con vida al Centro, las muestras de preferencia eran vómito, lavado gástrico o sangre. En el caso de que se viesan implicadas abejas (*Apis mellifera*), dado que las intoxicaciones pueden ocurrir como resultado de la ingestión o de la absorción a través de la superficie corporal, los análisis se realizaban sobre una muestra del conjunto de los individuos completos remitidos.

Se consideraba como un “caso” aquel incidente ocurrido en una determinada localización y fecha y que podía englobar más de una muestra y/o individuo. Una vez recibidas las muestras en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, eran registrados todos los datos relativos a las mismas (número de registro asignado, fecha y lugar de recogida) y cada muestra era sometida a un detallado examen visual que, junto con la historia clínica del caso y la información

de la necropsia, determinaron los análisis toxicológicos a realizar en cada caso.

2.4.2. Análisis toxicológico

Si el análisis visual y los datos no indicaban lo contrario, sobre todas las muestras se realizaba un análisis toxicológico que consistía en un *screening* que abarcaba las sustancias tóxicas más comúnmente involucradas en intoxicaciones intencionales y accidentales de la fauna (Soler *et al.*, 2006; Martínez-Haro *et al.*, 2008). Dado que en ellas pueden estar implicados una amplia variedad de compuestos que abarcan diferentes grupos químicos con amplios rangos de polaridad como en el caso de los organofosforados (OF), carbamatos y herbicidas, se seleccionaron y aplicaron métodos analíticos multiresiduo para la determinación de los diferentes grupos de plaguicidas; de lo contrario, para ciertos compuestos individuales, como el metaldehído y la estricnina, se utilizaron métodos cualitativos y cuantitativos específicos. Los procedimientos de extracción, purificación y detección de plaguicidas, considerados adecuados para el propósito de nuestra investigación, fueron validados en nuestro laboratorio y variaron en el tiempo. La extracción se realizó utilizando solventes específicos para cada grupo de plaguicidas.

Se llevó a cabo el análisis químico cromatográfico para la detección y cuantificación de los siguientes grupos de plaguicidas:

- **Carbamatos:** aldicarb, bendiocarb, carbofurano, carbaril, metiocarb, metomilo, oxamilo, pirimicarb y propoxur.
- **Organofosforados:** acefato, azinfós-metil, cadusafós, clorfenvinfós, clormefós, clorpirifós-etil, clorpirifós-metil, cumafós, diazinona, diclorvós, dimetoato, disulfotón, etión, etoprofós, fenamifós, fenitrotión, fentión, fonofós, heptenofós, isofenfós, malatión, metidatión, metamidofós, mevinfós, monocrotofós, ometoato, paratión-etil, paratión-metil, fentoato, forato, fosalona, fosmet,

pirimifós-etil, pirimifós-metil, profenosfós, sulfotep, terbufós, tetraclorvinfós y triclorfón.

- **Organoclorados:** aldrín, DDT, dieldrín, endrín, endosulfán, heptacloro, hexaclorobenceno, lindano y metoxicloro.
- **Piretroides:** ametrina, bifentrina, ciflutrín, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, lambda cialotrina, permetrina, fenotrina, tau-fluvalinato y tetrametrina.
- **Rodenticidas anticoagulantes:** brodifacum, bromadiolona, clorofacinona, coumatetralilo, difacinona, difenacum, difetialona, flocumafén y warfarina.
- **Otros:** estricnina, α -clorarosa y metaldehído.

Se utilizaron estándares multirresiduo de plaguicidas adquiridos a Sigma-Aldrich, Dr. Ehrenstorfer y ChemService para la identificación y cuantificación de estos plaguicidas tal y como se describe más adelante.

A las muestras de cerebro recibidas en buen estado se les realizaba el respectivo análisis bioquímico para determinar la actividad de la enzima AChE mediante la técnica colorimétrica de Ellman *et al.* (1961) modificada por Hill y Fleming (1982). La inhibición se evaluó comparando con los valores fisiológicos obtenidos previamente en nuestro laboratorio para algunas especies y/o realizando reactivaciones enzimáticas *in vitro* (Stanley, 1993) mediante dilución en tampón (lo que demuestra el efecto tóxico de los carbamatos, al ser inhibidores reversibles de la AChE) y con la adición del reactivador 2-PAM (que demuestra el efecto tóxico de los organofosforados, ya que son inhibidores irreversibles de la AChE). De esta manera, además de cuantificar el tóxico en los tejidos, se podía demostrar el efecto tóxico de los plaguicidas anticolinesterásicos, apoyando así los resultados de los hallazgos químicos. Los casos que incluían muestras donde no se encontró presencia de plaguicidas y donde los cerebros presentaban baja actividad de la enzima AChE y reactivaciones significativas, se registraron como positivos a compuestos anticolinesterásicos no identificados.

En general, el análisis de la gran mayoría de las muestras requería un proceso de limpieza de los extractos después de la extracción del tóxico con solventes. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas dependiendo del tipo de compuesto tóxico. Inicialmente, esta purificación de los extractos se realizó mediante extracción en fase sólida (cartuchos SPE, Florisil y C18) según Stahr (1991). Posteriormente, se empezó a aplicar la metodología propuesta por Brown *et al.* (1996, 2005) utilizando cromatografía de permeación en gel (GPC) con columna de vidrio rellena con Bio-Beads S-X3 como fase estacionaria y n-hexano/acetato de etilo (1:1, v/v) como fase móvil (bombeado por una bomba Merck-Hitachi HPLC Pump L-7100 y recogido en un colector Waters Fraction Collector). Durante los últimos 3 años del estudio, se aplicó la metodología propuesta por Luzardo *et al.* (2014) para el proceso de extracción y purificación que consistía en una extracción general sólido-líquido seguida por el proceso de purificación (centrifugación por congelación, sola o seguida de GPC con Bio-Beads S-X3 en muestras muy sucias).

2.4.3. Análisis instrumental

Durante los primeros años, se utilizó la cromatografía en capa fina (TLC) (método cualitativo) como paso inicial (detección) del análisis de plaguicidas anticolinesterásicos. Los extractos y los estándares de plaguicidas se aplicaron en placas de gel de sílice G60 usando un muestreador semiautomático (Camag Linomat IV) y se revelaron rociando acetilcolinesterasa sobre la placa (Zoun y Spierenburg, 1989). Posteriormente, los resultados eran confirmados por técnicas cromatográficas más específicas y sofisticadas.

Para la determinación semicuantitativa de los tóxicos en los extractos se utilizaron las siguientes técnicas cromatográficas:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); Shimadzu UFLC System compuesto por una bomba LC 20AD y un automuestreador SIL-20AHT acoplado a un detector de diodos (HPLC-DAD);

Shimadzu SPD-M20A) y un detector de fluorescencia (HPLC-FL; Shimadzu RF-10AXL),

- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (trampa de iones) (HPLC-MS); UHPLC 3000 Ultimate Bruker Daltonics System con automuestreador Thermo y un detector Ion Trap Amazon SL MS,
- Cromatografía de gases capilar (GC); Agilent 6890N con muestreador automático 7683-G2614A) acoplado a un detector de nitrógeno fósforo (GC-NPD) y un detector de captura de electrones (GC-ECD),
- Cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas en modo de impacto de electrones (GC-MS); Shimadzu GC-2010 acoplada a detector MS-QP2010 Plus y automuestreador AOC-20i en modo de barrido completo.

El uso de GC-MS permitió la búsqueda de compuestos desconocidos cuando se realizó un análisis cualitativo de los picos (pico por pico). La comparación del espectro del pico con una librería de espectros de masas (Shimadzu Pesticide y NIST 11) permitió la identificación del compuesto y su posterior cuantificación con un estándar apropiado. Esto permitió la identificación de nuevos plaguicidas (atrazina, etoxiquina, imidacloprid, metalaxil, tiram y triflumuron) y fármacos (fenobarbital) que no estaban incluidos previamente en el análisis.

Mediante el uso de detectores de masas, la identificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando su tiempo de retención y los datos del espectro de masas del barrido completo para cada compuesto.

Las técnicas cromatográficas utilizadas en el análisis de los extractos para cada grupo de plaguicidas fueron las siguientes: TLC para plaguicidas anticolinesterásicos (screening) y estricnina; GC-ECD y GC-MS para organoclorados y piretroides, GC-NPD y GC-MS para organofosforados; HPLC-DAD y HPLC-MS para carbamatos;

HPLC-DAD/FL y HPLC-MS para raticidas anticoagulantes; GC-MS para metaldehído y α -cloralosa; HPLC-MS para estricnina.

También se utilizaron métodos colorimétricos cuando fue necesario. Así, inicialmente se aplicó el método descrito por Saldaña *et al.* (1981) para el análisis de la estricnina, y en el caso del metaldehído, se realizó una extracción con cloroformo (Jones y Charlton, 1999) previa a la detección colorimétrica (Smith, 1987).

2.4.4. Control de calidad de datos

Para monitorear el funcionamiento instrumental y el rendimiento de la columna en el análisis cromatográfico, se verificaron las soluciones estándar de la mezcla de trabajo al comienzo de la sesión analítica. En cada lote analítico se analizó un control negativo (blanco) y en cada muestra se añadió trifenilfosfato (TPP) antes de la extracción como patrón interno (IS). La recuperación media de plaguicidas en los diferentes métodos semicuantitativos estuvo en el rango de 65-85% y los límites de cuantificación estuvieron en el rango de 0,01 a 0,5 mg/kg.

2.5. Resultados

Durante los 17 años de análisis, nuestro laboratorio recibió 779 casos que incluían un total de 955 individuos pertenecientes a 59 especies diferentes. Bajo la denominación de “caso” nos referimos a un suceso de posible intoxicación ocurrido en un lugar determinado y en un momento determinado, y que puede incluir uno o varios individuos, especies y sustancias involucradas. Con el término “individuo” nos referimos a cada animal que se recibe y que está involucrado en un caso en concreto. La causa de muerte por intoxicación se confirmó en 423 casos (54,30% del total) (Tabla 1 y Figura 2). En este tipo de casos, es posible clasificar la causa de la muerte como intoxicación intencionada (envenenamiento) o como intoxicación accidental en

base a diversos criterios: los niveles de plaguicidas detectados y la situación legal de los mismos; los datos de campo reportados por los agentes medioambientales que tomaron las muestras; los síntomas y hallazgos de la necropsia realizada en el centro de recuperación, y particularmente el hallazgo de posibles cebos en contenido digestivo; el examen detallado bajo lupa en nuestro laboratorio (sobre todo la observación de material microgranular extraño) y finalmente evaluando toda esa información junto con los mecanismos de acción y toxicidad de los productos detectados (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a). Sin embargo, en nuestro caso no fue posible realizar de forma definitiva dicha clasificación, más allá de la casuística, por no disponer de todos los datos de campo y sintomatología. En este sentido es sabido gracias a estudios anteriores (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a) que en el conjunto de las Comunidades Autónomas españolas la intencionalidad en los casos de intoxicaciones de fauna silvestre es prácticamente total (78-100%), en similitud con países como Reino Unido, pero a diferencia de otros países como Canadá y EEUU donde rondan el 65-75%.

Durante nuestro estudio, en los 423 casos de intoxicación, resultaron envenenados 540 individuos de 34 especies diferentes, principalmente silvestres (24 especies de aves y 4 especies de pequeños mamíferos), con excepción de 6 especies domésticas (Tablas 1 y 2). De acuerdo con el Catálogo Español de Especies Amenazadas, en 59 casos estuvieron implicados ejemplares de especies catalogadas como vulnerables (buitre negro, aguilucho cenizo, alimoche común y águila perdicera) y en 75 casos se vieron implicados individuos de especies en peligro de extinción (milano real, águila imperial ibérica y lince ibérico). En 133 casos aparecieron 12 especies incluidas en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial.

El número de casos e individuos afectados por los principales compuestos tóxicos y las especies animales implicadas más frecuentemente se indican en las Tablas 1 a 3. La prevalencia del grupo de los carbamatos y organofosforados es obvia, apareciendo en más del 89% de los casos positivos. Los casos en los que no se detectó presencia

de plaguicidas, pero los cerebros presentaron baja actividad de la enzima AChE con reactivaciones significativas (>25%), se catalogaron como “positivos a compuesto anticolinesterásico no identificado”, circunstancia que se dio en 18 casos (Tabla 3). Conviene destacar que no siempre se detectan residuos de plaguicidas en el contenido digestivo de aves rapaces que presentan inhibición de la AChE (Greig-Smith, 1991). Esto es debido a que esta enzima cerebral en las aves es especialmente estable a la temperatura y a la descomposición post-mortem (Priyono y Leighton, 1991; Smith *et al.*, 1995), mientras que existe la posibilidad de que aparezcan falsos resultados negativos en el análisis químico de plaguicidas anticolinesterásicos en el contenido digestivo, lo que no implica que no haya ocurrido alguna intoxicación (Mineau y Tucker, 2002).

La Figura 1 muestra la evolución anual de la aparición de las principales sustancias, mostrando la importancia invariable del aldicarb y carbofurano a lo largo de los años. En la Figura 2 se observa la correlación en distribución mensual de los casos positivos frente a los recibidos como sospechosos en nuestro laboratorio.

Tabla 1. Número de casos e individuos (entre paréntesis) implicados en relación al compuesto tóxico detectado y a la especie animal.

COMPUESTO	ESPECIE ANIMAL (*)																
	BL	P	BN	MR	MN	G	Z	BR	O	AC	J	AE	AIC	CG	PR	CB	All
Carbofurano	27 (27)	9 (9)	15 (15)	20 (20)	9 (10)	1 (1)	16(16)	8 (8)	5(5)	-	3 (3)	-	6 (6)	3 (3)	-	1 (1)	6 (6)
Aldicarb	6 (6)	46 (51)	2 (2)	18 (18)	12 (12)	20(20)	4 (4)	1 (1)	-	4 (4)	3 (3)	-	-	-	-	1 (1)	1 (1)
Clorfenvinfos	15 (15)	-	9 (9)	2 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)
Clorpirifós	2 (2)	1 (1)	-	1 (1)	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fentió	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7 (114)	-	-	-	-	-
AntiChE	6 (6)	2 (2)	3 (3)	3 (3)	1 (1)	-	1 (1)	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbaril	10 (10)	-	1 (1)	1 (1)	-	-	2 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenamifós	1 (1)	4 (4)	3 (3)	3 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (3)	-	-
Diazinona	1(1)	-	1 (1)	3 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)	-
Estricnina	-	2 (2)	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metaldehído	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)	-
Fenoxicarb	-	-	-	-	-	-	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiodicarb	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diazepam	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paratió	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metamidofós	-	1 (1)	1 (1)	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetrametrin	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coumafós	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flunixin	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketamina	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pentobarbita I	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimetoato	-	-	-	5 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cantaridina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)	-
Bromadiolona	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Monocrotofós	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofacinona	-	-	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxamilo	-	-	-	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	72 (72) ³	67 (72)	39 (39) ²	58 (58) ¹	22 (23) ³	24 (24)	25(25)	10(10) ⁰	5 (5)	4 (4) ²	6 (6)	7 (114) ³	6 (6) ²	3 (3)	3 (3)	5 (5) ³	8 (8) ¹

(*)

BL: buitre leonado (*Gyps fulvus*);
P: perro (*Canis lupus familiaris*);
BN: buitre negro (*Aegypius monachus*);
MR: milano real (*Milvus milvus*);
MN: milano negro (*Milvus migrans*);
G: gato (*Felis silvestris catus*);
Z: zorro rojo o común (*Vulpes vulpes*);
BR: busardo ratonero (*Buteo buteo*);
O: oveja (*Ovis aries*);
AC: aguilucho cenizo (*Circus pygargus*);
J: jineta (*Genetta genetta*);
AE: abejaruco europeo (*Merops apiaster*);
AIC: alimoche común (*Neophron percnopterus*);
CG: cuervo grande (*Corvus corax*); PR: pavo real (*Pavo cristatus*);
CB: cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*);
All: águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).

^{1,2,3} Casos con especies clasificadas como "especies en peligro de extinción"¹, "especies vulnerables"² y "especies bajo protección especial"³ según el Real Decreto 139/11 en el "Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y Catálogo Español de Especies Amenazadas".

Tabla 2. Número de casos e individuos (entre paréntesis) afectados por la mezcla de tóxicos en las distintas especies animales.

COMPUESTO	ESPECIE ANIMAL (*)								
	BL	P	BN	MR	MN	Z	Pa	All	G
Aldicarb+carbofurano+clorfenvinfós	-	-	1 (1)	1 (1)	-	-	-	-	-
Dimetoxón+ dimetoato+fentión	5 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorpirifós+endosulfán ($\alpha+\beta$)	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-
Clorpirifós +endosulfán+metomilo	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-
Fenobarbital+clorpirifós	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-
Aldicarb+carbofurano	1(1)	1 (1)	-	3 (3)	1 (1)	1 (1)	-	-	1 (1)
Clorfenvinfós + clorpirifós +diazinona	1 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbofurano+malatión	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-
Diazinona+ clorfenvinfós	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-
Clorfenvinfós +clorpirifós	-	-	-	-	-	-	1 (1)	-	-
Metiocarb+imidacloprid+metalaxil	-	-	-	-	-	-	4 (4)	-	-
Carbofuran+clorfenvinfós	-	-	-	-	-	-	-	2 (2)	-
Bromadiolona+brodifacoum	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	-
Clorpirifós+sulfotep	-	-	-	-	-	-	1 (4)	-	-
Clorpirifós +aldicarb	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-
Carbofurano+oxamilo	-	-	4 (4)	-	-	1 (1)	-	-	-
Clorpirifós+carbofurano+molinato+cipermetrina	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-
TOTAL	7 (7) ³	4 (4)	8 (8) ²	6 (6) ¹	1 (1) ³	2 (2)	6 (9)	2 (2) ¹	1 (1)

(*)

BL: buitre leonado (*Gyps fulvus*);
P: perro (*Canis lupus familiaris*);
BN: buitre negro (*Aegyptius monachus*);
MR: milano real (*Milvus milvus*);
MN: milano negro (*Milvus migrans*);
Z: zorro rojo o común (*Vulpes vulpes*);
Pa: paloma bravía (*Columba livia*);
All: águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).
G: gato (*Felis silvestris catus*);

^{1,2,3} Casos con especies clasificadas como "especies en peligro de extinción"¹, "especies vulnerables"² y "especies bajo protección especial"³ según el Real Decreto 139/11 en el "Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y Catálogo Español de Especies Amenazadas".

Otras especies implicadas en casos puntuales fueron: paloma (*Columba spp.*): 2 (2) clorfenvinfós; águila real (*Aquila chrysaetos*)³: 2 (2) aldicarb y 2 (2) carbofurano; águila perdicera (*Aquila fasciata*)²: 1 (1) aldicarb y 1 (1) carbofurano; tórtola turca (*Streptopelia decaocto*): 1 (1) tiodicarb y 1 (1) fonofós; erizo común (*Erinaceus europaeus*): 1 (1) rodenticida no identificado; oca común (*Anser anser*): 1 (2) dimetoato; abejas (*Apis mellifera*): 1 fentiión; rabilargo asiático (*Cyanopica cyanus*)³: 1 (1) fentiión; águila culebrera (*Circaetus gallicus*)³: 1 (1) carbofurano; azor común (*Accipiter gentilis*)³: 1 (1) carbofurano; aguilucho pálido (*Circus cyaneus*)³: 1 (1) carbofurano; urraca común (*Pica pica*): 1 (1) clorpirifós; garza bueyera (*Bubulcus ibis*)³: 1 (1) anticolinesterásico no identificado; cárabo común (*Strix aluco*)³: 2 (2) bromadiolona; lince ibérico (*Lynx pardinus*)¹: 1 (1) bromadiolona.

Tabla 3. Número de casos en los que ha aparecido cada sustancia, situación legal actual (prohibido-P; no prohibido-NP; no regulado) (Comisión Europea, 2023; MAPA, 2023; Ministerio de Sanidad, 2023), número de individuos o ejemplares afectados por la misma y grupo químico al que pertenece.

	Situación legal actual	Casos (nº)	Individuos afectados (nº)
Carbofurano ¹	P	135	136
Aldicarb ¹	P	121	126
Clorfenvinfos ²	P	29	29
Anticolinesterásico no identificado	--	18	18
Carbaril ¹	P	14	14
Fenamifós ²	P	14	14
Fentiión ²	P	9	116
Clorpirifós ²	P	6	6
Diazinona ²	P	6	6
Dimetoato ²	P	6	7
Estricnina ⁵	P	3	3
Metamidofós ²	P	3	3
Bromadiolona ¹²	NP	3	3
Tiodicarb ¹	P	2	2
Metaldehído	NP	2	2
Coumafós ²	P	1	1
Monocrotofós ²	P	1	1
Paratión ²	P	1	1
Fenoxicarb ¹	P	1	1
Tetrametrina ³	P	1	1
Diazepam ⁴	NP	1	1
Flunixin ¹⁰	NP	1	1
Ketamina ¹¹	NP	1	1

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Grupos químicos: carbamato¹; organofosforado²; piretroide³; benzodiazepina⁴; alcaloide⁵; nicotinoide⁶; anilida⁷; organoclorado⁸; barbitúrico⁹, antiinflamatorio no esteroideo¹⁰, anestésico¹¹, rodenticida anticoagulante¹².

	Situación legal actual	Casos (n°)	Individuos afectados (n°)
Pentobarbital ⁹	NP	1	1
Cantaridina	NR	1	1
Clorofacinona ¹²	NP	1	1
Oxamilo ¹	P	1	1
Fonofós ²	P	1	1
Rodenticida no identificado	---	1	1
Aldicarb+ carbofurano	P+P	8	8
Carbofurano+ oxamilo	P+P	5	5
Dimetoxón (metabolito) ² + dimetoato+ fentiión	P+P	5	5
Metiocarb ² + imidacloprid ⁶ + metalaxil ⁷	P+P+NP	4	4
Carbofurano + clorfenvinfós	P+P	2	2
Aldicarb + carbofurano + clorfenvinfós	P+P+P	2	2
Clorpirifós + metomilo ¹ + endosulfán ⁸	P+P+P	1	1
Clorpirifós + endosulfán ⁸	P+P	1	1
Fenobarbital ⁹ + clorpirifós	NP+P	1	1
Carbofurano + malatión ²	P+P	1	1
Diazinona+ clorfenvinfós	P+P	1	1
Clorfenvinfós + clorpirifós	P+P	1	1
Clorfenvinfós + clorpirifós + diazinona	P+P+P	1	1
Bromadiolona+ brodifacoum ¹²	NP+NP	1	1
Clorpirifós + aldicarb	P+P	1	1
Clorpirifós + sulfotep ²	P+P	1	4
Clorpirifós + carbofurano+ molinato ¹ + cipermetrina ³	P+P+P+NP	1	1

Figura 1. Evolución anual del número de casos en los que aparecieron los principales tóxicos: aldicarb, carbofurano, clorfenvinfós, carbaril y fenamifós.

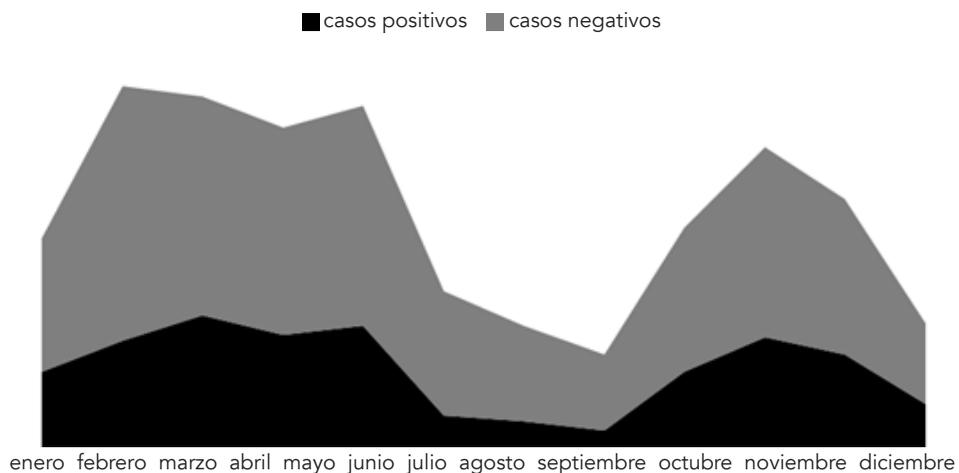
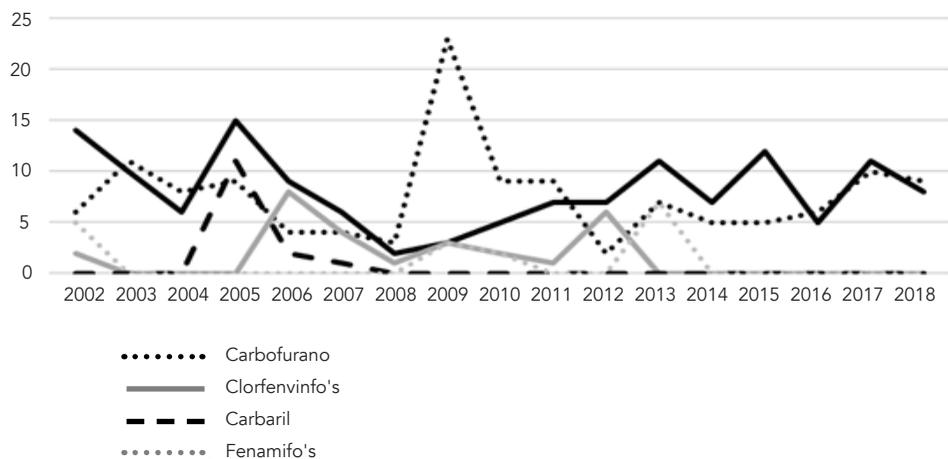


Figura 2. Distribución mensual del número de casos recibidos y positivos.



2.6. Discusión

Como reflejan las Tablas 1 y 2, las aves en general se revelaron como el grupo más afectado por las intoxicaciones, siendo las especies necrófagas y rapaces las más frecuentemente afectadas, seguidas por pequeños carnívoros, lo que coincide con otros estudios, (Soler *et al.*, 2006; Berny, 2007; Guitart *et al.*, 2010; Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a; De la Bodega *et al.*, 2020; Buij *et al.*, 2022; Olea *et al.*, 2022; Valverde *et al.*, 2022). Han sido 12 las especies afectadas que están incluidas por el Real Decreto 139/2011 en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y 7 las especies que están catalogadas como “vulnerables” o “en peligro de extinción” en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (Tablas 1 y 2), lo que pone en evidencia la amenaza que suponen las intoxicaciones para la conservación de la fauna silvestre (Buij *et al.*, 2022; Olea *et al.*, 2022). A nivel global, las intoxicaciones (accidentales e intencionadas) afectan al 78% de las especies de buitres, viéndose especialmente afectado el buitre leonado en sus áreas de distribución como son las cuencas mediterráneas y del mar Negro, así como la península ibérica y Francia (Plaza *et al.*, 2019); su población en España (en torno a 31.000 parejas reproductoras) supone el 90% de la población europea (Del Moral y Molina, 2018) y en estudios similares a nivel nacional y regional también aparece a la cabeza de las especies más afectadas (Soler *et al.*, 2006; De la Bodega *et al.*, 2020), Igualmente es bien sabido que las intoxicaciones son una de las principales causas de muerte del buitre negro en España, y representan un grave riesgo para su conservación en regiones como Extremadura, donde se encuentran las principales colonias de buitre negro del país (Soler *et al.*, 2006). Según el último censo publicado (Del Moral, 2017), la población de buitres negros en la península ibérica ascendió a 2546 parejas. Estudios previos afirman que el aumento del uso ilegal de plaguicidas en Europa podría afectar directamente a su dinámica poblacional, ya que los ejemplares adultos (reproductores) son las principales víctimas, habiéndose indicado que el uso ilegal de carbofurano, aldicarb y estricnina ha sido, durante las

últimas décadas, la mayor amenaza para esta especie en la Península (Hernández y Margalida, 2008).

El 90% de la población mundial de milano real se distribuye entre España, Francia y Alemania (Hagemeijer y Blair, 1997), siendo considerada una especie en peligro de extinción a nivel mundial. En nuestro estudio se encuentra entre las tres especies más afectadas por los venenos (Tablas 1 y 2), al igual que lo observado en Francia (Berny y Gaillet, 2008). Debido a que son animales tanto cazadores como carroñeros se sienten, junto con las especies de buitres, fácilmente atraídos por cebos cárnicos envenenados. De manera general, las especies con hábitos carroñeros son especialmente sensibles, por lo que una cantidad significativa de biodiversidad está potencialmente amenazada por las intoxicaciones intencionadas (Olea *et al.*, 2022). En el estudio de Tenan *et al.* (2012) sobre las consecuencias del veneno en la población de milanos reales de la isla de Mallorca (España) se advierte de que uso ilegal de venenos es la principal causa de muerte del milano real y que redujo su crecimiento poblacional en un 20%. Mateo-Tomás *et al.* (2020) demostraron la relación directa de las muertes individuales por intoxicación con las tendencias poblacionales, vinculando los datos de campo a una escala espacio-temporal muy amplia, y sugiriendo el potencial del monitoreo a gran escala y a largo plazo para comprender los efectos de los venenos sobre las poblaciones y la conservación de la biodiversidad.

El alimoche (*Neophron percnopterus*) sufrió intoxicación únicamente por carbofurano en 6 casos, por lo que no es una especie gravemente afectada en nuestro estudio, a diferencia de otros que han demostrado que las intoxicaciones son una de las principales causas de muerte del alimoche en España; concretamente, Hernández y Margalida (2009) registraron 294 individuos afectados en un periodo de 17 años.

Otra especie de ave rapaz de vital importancia en España al estar catalogada como “en peligro de extinción” es el águila imperial ibérica, siendo además la especie de ave rapaz más amenazada de Europa y de la que el 99% de su población reproductora mundial se

encuentra en España. Con un censo de 821 parejas reproductoras en todo el territorio nacional en 2022, Extremadura contaba con 75 de las mismas (MITECO, 2023). Por tanto, cada caso de intoxicación acontecido en nuestro país afecta directamente a la supervivencia de la especie. Han sido 10 los ejemplares envenenados, en los que se ha detectado mayoritariamente carbofurano y clorfenvinfós, solos o en combinación.

Las intoxicaciones secundarias de águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) y águila real con plaguicidas anticolinesterásicos en el noroeste de Estados Unidos muestran la amenaza que estos compuestos suponen para estas aves (Wobeser *et al.*, 2004). Mineau *et al.* (1999) y Glaser (1999) concluyeron que estas dos especies de aves rapaces eran destacadas víctimas del abuso de plaguicidas en Estados Unidos. De hecho, se estima que entre 1965 y 2002, el 3% de las águilas calvas (*Haliaeetus leucocephalus*) examinadas por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de EEUU. y entre 1975 y 1992, el 12% de los ratoneros de cola roja (*Buteo jamaicensis*) fueron víctimas de intoxicaciones por plaguicidas anticolinesterásicos, considerándose estos datos una subestimación debido a las limitaciones analíticas de décadas pasadas (Porter, 1993; Franson *et al.*, 1995; 1996; Mineau *et al.*, 1999).

Debido a este impacto de los compuestos anticolinesterásicos en aves rapaces, Fairbrother (1996), Mineau *et al.* (1999) y Wobeer *et al.* (2004) consideraron que su análisis sistemático debía convertirse en una parte del diagnóstico diferencial sin tener en cuenta las condiciones en las que se hubieran encontrado los animales.

Los factores relevantes para que las aves rapaces se vean afectadas por plaguicidas tóxicos son sus hábitos alimentarios (consumo de insectos y lombrices, captura de presas debilitadas por intoxicaciones, así como comer la carroña de víctimas de intoxicaciones), su presencia habitual en las zonas agrícolas, el hecho de que se consideren una plaga dañina por parte de ciertos sectores económicos y su comportamiento gregario (Mineau *et al.*, 1999). No hay que olvidar que habitualmente

diferentes grupos de sustancias tienen un mayor impacto en determinados tipos de aves en tipos de hábitats específicos (Ballesteros, 1997), por lo que no es de extrañar que en nuestro estudio las aves rapaces hayan sido las más afectadas al existir en Extremadura extensas áreas con actividad ganadera y cinegética.

Los carnívoros domésticos (perro, *Canis lupus familiaris*, y gato, *Felis silvestris catus*) fueron uno de los grupos más afectados, representando el 22,70% de los casos positivos, lo que coincide con los datos obtenidos con otros estudios (Guitart *et al.*, 1999; Motas-Guzmán *et al.*, 2003; Berny *et al.*, 2010; Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a; Caloni *et al.*, 2018; Rial-Berriel *et al.*, 2021). Sin embargo, los carnívoros silvestres pequeños a medios (zorro, jineta y lince) estuvieron presentes sólo en el 8,75%. Estos resultados se atribuyen a que en el medio rural lo habitual es que perros y gatos no suelen estar encerrados en los domicilios e, incluso, viven en no pocas ocasiones asilvestrados; por ello suelen tener el mismo acceso tanto a los tóxicos utilizados en el ámbito doméstico como a los utilizados en el medio natural y que también afectan a la fauna silvestre. Por ello, son especies con un riesgo acrecentado de sufrir intoxicaciones. Concretamente, en nuestro estudio el perro fue la especie más afectada y los insecticidas anticolinesterásicos fueron los más implicados, al igual que en el resto de Europa (Berny *et al.* en 2010). Sin embargo, Caloni *et al.* (2016) en un estudio retrospectivo de revisión de los casos sospechosos de intoxicación por plaguicidas en animales domésticos reportados al Centro de Control Antiveneno de Milán (Italia) entre enero de 2011 y diciembre de 2013 indican que las piretrinas y piretroides fueron los compuestos más implicados en las llamadas, con una disminución de casos relacionados con plaguicidas prohibidos en la UE en el periodo de estudio, incluyendo aldicarb, carbofurano, endosulfán y paraquat. En nuestro caso, no encontramos diferencias entre los compuestos que afectaban a las especies domésticas y a las silvestres, a diferencia de lo reportado por Bertero *et al.* (2020), que indican que si bien los insecticidas son los principalmente implicados en las intoxicaciones de ambas categorías, las especies domésticas se vieron más afectadas

por los organoclorados, mientras que en las silvestres prevalecieron los inhibidores de la acetilcolinesterasa. Además, compuestos como la estricnina y el metaldehído, causa frecuente de intoxicaciones en animales domésticos, no tuvieron el mismo impacto en los silvestres, con solo unos pocos casos reportados.

En Europa, los datos disponibles de cada país están sesgados en gran medida por el origen de las muestras (Berny, 2007). En Francia, las especies cinegéticas (entre ellas, especies de aves) son las más afectadas porque el sistema de derivación de muestras depende de los cazadores, mientras que en el Reino Unido cualquier ciudadano puede remitir los casos al WIIS (*Wildlife Incident Investigation Scheme*), siendo también las aves rapaces las especies más afectadas. España, por el sistema de gestión regional, tampoco está exenta de estos posibles sesgos entre las CC.AA. (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a). Por tanto, existen ciertas limitaciones que están condicionadas por las pautas y circunstancias a la hora de remitir un caso: aparte de los comentados en líneas anteriores o el estado de conservación de las muestras o los medios económicos, existen otras circunstancias como por ejemplo que una especie doméstica es más habitualmente remitida a un veterinario clínico o que siempre será más llamativo y es más probable que sea remitido un individuo muerto de una especie protegida que de una especie común como un gorrión o una paloma. Este tipo de condicionantes tendrán un impacto en los resultados registrados (Brown *et al.*, 1996). Estudios recientes están enfocados a disminuir estos sesgos condicionados por las circunstancias de los muestreos, como el desarrollado por Olea *et al.* (2022), quienes simularon la posibilidad de envenenamiento mediante la colocación de cebos trampa sin tóxico y su monitoreo con cámaras para estimar el alcance real de las intoxicaciones intencionadas y determinar el número real de especies y de individuos que se ven expuestos. El objetivo final era tener más conocimiento de los tipos cebos consumidos por cada especie, el tamaño del cebo y el hábitat en que ha sido colocado. A pesar de todo este tipo de inquietudes, en nuestro estudio pudimos determinar la muerte por intoxicación en más del 54% del total de casos remitidos.

Los casos que han sido registrados previamente en España son determinantes para entender el origen de este tipo de prácticas maliciosas, ya que el uso de tóxicos para envenenar fauna estuvo tradicionalmente ligado a dos actividades como son la caza y la ganadería para el control de depredadores y plagas consideradas “nocivas”. De hecho, el control de depredadores mediante venenos fue una práctica permitida de manera generalizada hasta 1970, siendo su culmen la aprobación del Decreto del Ministerio de Agricultura de 11 de agosto de 1953 por el que se declara obligatoria la organización de Juntas Provinciales de Extinción de Animales Dañinos y Protección a la Caza (BOE nº 261, de 18 de septiembre de 1953). Éstas aparecieron asociadas a la actividad cinegética y cuyas funciones consistían en organizar los planes de lucha contra las alimañas, suministrar los venenos, premiar a aquéllos que colaborasen en el exterminio de animales “dañinos”; como ejemplo, en las tablas que se muestran a continuación (tomadas de Corbelle y Rico, 2008) se pueden ver los animales eliminados y premiados por las mismas entre 1954 y 1962:

Cuadro 4
Animales cazados por los alimañeros, 1954-1962. (en unidades)

	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	Total
Lobos	64	122	269	231	220	235	134	148	47	1.470
Zorros	288	2.712	5.782	6.306	8.539	8.386	8.827	10.345	2.569	53.754
Comadreja		12	135	233	471	605	709	249	61	2.475
Garduñas	10	8	121	49	32	51	46	43	1	361
Gatos	55	248	368	517	514	656	462	551	108	3.479
Jinetas		176	723	522	577	572	684	966	36	4.256
Linces	11	7	19	29	33	19	21	13	1	153
Nutrias		3	22	4	12	41	13	4	5	104
Tejones	31	37	283	224	385	123	54	184	18	1.339
Turones	1	336	469	439	684	936	554	855	30	4.304

Fuente: Dirección General de Montes, Caza y Pesca fluvial, Sección de caza. *Juntas provinciales de extinción de animales dañinos y protección a la caza y relación estadística de alimañas capturadas y premiadas por las Juntas, 1954-1962*. Archivo de la Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Fondo Documental del Monte, sección Caza, nº 150.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Cuadro 5
Aves y reptiles atrapados por los alimañeros, 1954-1962. (en unidades)

	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	Total
Águila real		26	101	155	84	67	348	425	1	1.207
Águila(s)	194	263	415	499	428	647	866	390	107	3.809
Aguiluchos		34	173	149	215	202	116	345	123	1.357
Alcotanes		324	783	713	591	875	501	429		4.216
Buitres							1	1		2
Buhos	59	10	473	47	69	81	133	117	49	1.038
Cuervos		606	832	2.630	10.378	4.212	4.128	23.472	6163	52.421
Chovas		114	99	22	362	513	1.168			2.278
Gavilanes	7	11	59	1	42	17	66	31		234
Grajos		306	544	1.525	1.162	4.753	2.372	1.768	2270	14.700
Halcones	17	11	22		5	218	1	1.770		2.044
Milanos		388	869	1.569	2.098	2.901	1.193	1.080	63	10.161
Urracas	69	3.958	6.838	4.239	6.021	17.700	12.970	51.494	1677	104.966
Otras aves		7.514	45.185	108.556	95.892	35.942	42.888	4.199	347	340.523
Culebras		1.952	260	197	2.496	1.658	1.849	2.484	166	11.062
Lagartos		4.756	1.254	1.902	1.012	3.463	3.159	3.017	170	18.733
Víboras		2	65	18						85

Fuente: Dirección General de Montes, Caza y Pesca fluvial, Sección de caza. *Juntas provinciales de extinción de animales dañinos y protección a la caza y relación estadística de alimañas capturadas y premiadas por las Juntas, 1954-1962.* Archivo de la Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Fondo Documental del Monte, sección Caza, cª 152.

Cuadro 6
Pollos y huevos capturados y presentados a la Junta de Extinción de Teruel que no fueron incluidos en las estadísticas. (en unidades)

	Pollos			Huevos		
	Águila	Otras rapaces	Córvidos	Águilas	Otras rapaces	Córvidos
1959	22	22	291	-	-	259
1960	42	240	1.100	14	93	2.981
1961	160	114	993	16	29	1.595
1962	8	38	939	-	-	1.331
Total	232	414	3.323	30	122	6.166

Fuente: *Estado comparativo en la relación de animales dañinos capturados y justificados ante esta Comisión de trabajo en las campañas de 1959, 1960, 1961 y 1962.* Archivo de la Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Fondo Documental del Monte, sección Caza, cª 85.

Llama la atención que aparecen especies que hoy en día están clasificadas como amenazadas, por lo que es fácil concluir que estas regulaciones han contribuido a los problemas de conservación actuales.

En 1970, la Ley 1/1970, de 4 de abril, de Caza incluyó pequeños cambios como el abandono de la clasificación de animales “dañinos” y la prohibición del uso de venenos sin autorización para eliminar fauna. La legislación fue modificándose poco a poco en esta línea hasta la restricción del uso de productos altamente tóxicos (solo se permitió su uso por personal autorizado), y la instauración del registro completo de las ventas de manera obligatoria. Finalmente, en 1989 se prohibió totalmente el uso de venenos para el control de depredadores (Ley 4/1989, de 27 de marzo, para la Conservación de Espacios Naturales y Flora y Fauna Silvestres) y se creó el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas, garantizando la protección de algunas especies. Esto se ha extendido hasta nuestros días con la creación del “Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y Catálogo Español de Especies Amenazadas” por el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero,) regulado por la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. La penalización definitiva de estas prácticas llegaría con la Ley Orgánica 10/1195, de 23 de noviembre, del Código Penal. A pesar de todo, los diferentes estudios indican que el uso del veneno todavía se considera una opción fácil, rápida, accesible y eficaz para este tipo de prácticas delictivas.

Los datos recogidos en España en décadas anteriores, también muestran que la mayoría de los casos de intoxicación en fauna fueron provocados por insecticidas (Martínez-Haro *et al.*, 2008), al igual que en los más recientes (Rial-Berriel *et al.*, 2021). La explicación a este hecho podría ser que se trata de productos de fácil acceso, quizá por la existencia de grandes stocks de los productos almacenados en zonas tradicionalmente agrícolas, y que son más fáciles y seguro de manipular (las presentaciones comerciales que se encuentran tienen frecuentemente presentación granular) que otros químicos que suelen

tener presentaciones líquidas o en polvo (Shafer *et al.*, 1973; Hill y Camardese, 1984). Este hecho se refleja en nuestro estudio al observar que la mayor frecuencia de casos en los que intervinieron el aldicarb (cuyo uso fue restringido en 2003) y el carbofurano (prohibido en 2008) experimentó un marcado repunte en los años inmediatamente posteriores a sus respectivas prohibiciones (Figura 1). Este último hecho evidencia el cambio de finalidad de la agrícola a su uso ilegal para envenenamientos intencionados. Estos hallazgos cobran una mayor relevancia en una región con un entorno natural como el que posee Extremadura (España) y que, además, ha mantenido sus prácticas agrícolas tradicionales, las dehesas y la baja densidad poblacional, lo que la ha convertido en un ecosistema de alta calidad para los asentamientos de aves (Valdés, 2008). Su importancia radica en que alberga las mayores concentraciones de aves amenazadas, el 35% de los taxones de especies protegidas europeas, y en que el 75% de su superficie está considerada como “Área Importante para la Conservación de las Aves y Biodiversidad en España” (IBA) y cuenta con 71 “Zonas ZEPA que cubren 1,1 millones de hectáreas suponiendo el 26,5% de territorio extremeño (MITECO, 2022). Estas características convierten a la región en uno de los territorios de mayor interés ornitológico a nivel europeo. Tradicionalmente, las aves rapaces se han considerado una amenaza para la ganadería y la caza; sin embargo, en la actualidad el turismo ornitológico ha logrado convertirse en una fuente fundamental de ingresos para el desarrollo social y económico de la región, abarcando el 25% del turismo ornitológico español (Hernández-Mogollón *et al.*, 2011).

También se debe tener en cuenta que estos compuestos (insecticidas) se utilizan con frecuencia porque son muy eficaces en este tipo de prácticas criminales debido a su alta toxicidad por vía oral (DL50<10 mg/kg) (Schafer *et al.*, 1973; Hill y Camardese, 1984) y por la alta concentración de las sustancias activas en las presentaciones comerciales. En su estudio, Martínez-Haro *et al.* (2008) apoyan esta idea y muestran que la frecuencia de las intoxicaciones deliberadas con una sustancia depende principalmente de la DL50 de los preparados comerciales (la

mayoría de los casos registrados se deben a unos pocos plaguicidas con una DL50 extremadamente baja), lo que también confirma que existe cierto conocimiento a nivel popular sobre la eficacia de las diferentes sustancias como veneno. Por tanto, el estudio revela que la frecuencia del uso de cada pesticida en la agricultura no es el factor de más peso para determinar su implicación en los casos de intoxicación, como sería lógico pensar, aunque la disponibilidad de cada compuesto según la actividad agrícola predominante en la zona también tiene un peso importante (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a). La alta toxicidad de estos compuestos ha sido la causa de un gran número de muertes de fauna a lo largo de los años (ya sean accidentales, por un uso inadecuado, o intencionales); de hecho, este impacto en las poblaciones de fauna silvestre derivó en la restricción en el uso de aldicarb y carbofurano en la Unión Europea y en los Estados Unidos (Mineau *et al.*, 1999). Precisamente por su potencial peligrosidad en especies no objetivo (especialmente aves), estas sustancias dejaron de formar parte de la lista de plaguicidas autorizados en la Unión Europea según la Directiva 91/4141/CEE. El uso de productos fitosanitarios que contienen aldicarb fue restringido en España en 2003 en determinados cultivos y fue totalmente prohibido en el año 2007 (Directiva 2003/199/CE). El uso de carbofurano se prohibió un año después, en 2008 (Directiva 2007/416/CE). En la Figura 1 se puede observar el predominio del aldicarb en las intoxicaciones ocurridas entre 2003 y 2007, lo que coincide con los años inmediatamente posteriores a la restricción en su uso; lo mismo sucede con el carbofurano a partir del año 2008. Martínez-Haro *et al.* (2008) concluyeron también que los preparados comerciales con tan alta toxicidad facilitan las intoxicaciones al ser necesaria una cantidad muy baja para conseguir los efectos letales, ya que una gran cantidad de tóxico provocaría la repulsión del cebo por parte de los animales o la no ingestión del tóxico en caso de que ésta fuese accidental. Por ello, indica como medidas eficaces para prevenir intoxicaciones el reducir el contenido de sustancia activa en los preparados comerciales, incluir sustancias repelentes o, incluso, algún emético para reducir la absorción del tóxico.

Al igual que en nuestro estudio, los compuestos inhibidores de la colinesterasa son los más frecuentemente registrados como causantes de intoxicaciones de animales silvestres tanto en otros países como en España (Guitart *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2014; Bertero *et al.*, 2020; Herrero-Villar *et al.*, 2021; Grilo *et al.*, 2021; De Lange *et al.*, 2021; Rial-Berrier *et al.*, 2021; Buij *et al.*, 2022). Más concretamente, destacan el aldicarb y el carbofurano (Berny, 2007; Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012a). En Hungría, por ejemplo, se observó un claro repunte en los casos de intoxicaciones de fauna silvestre por carbofurano a partir de 2007 (Lehel *et al.*, 2010). Se han publicado datos similares sobre la situación en los Estados Unidos (Fleischli *et al.*, 2004).

Si bien los rodenticidas anticoagulantes también cobran importancia en este tipo de casos en Europa (Berny, 2007; Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012b; Bertero *et al.*, 2020; Herrero-Villar, 2021), este hecho no se reflejó en nuestro estudio debido a que en nuestra zona de muestreo (región de Extremadura) no se habían realizado campañas de control de roedores en campo durante el período del estudio. En España, los casos que se publican sobre intoxicaciones por raticidas anticoagulantes no son frecuentes, pero sí responden a casos de colocación de cebos para el control de plagas de roedores de marcados ciclos poblaciones en las áreas agrícolas; en 2007 se produjo un claro aumento de casos por el uso masivo de bromadiolona y clorofacinona para luchar contra el topillo campesino (*Microtus arvalis*) en zonas de cultivos agrícolas en la región de Castilla y León. Por ello, Sánchez-Barbudo *et al.* (2012b) detectaron un porcentaje de intoxicaciones en las que los rodenticidas provocaron la muerte de animales silvestres muy similar a los datos registrados en Norteamérica, donde las especies más afectadas fueron las aves granívoras (exposición primaria) y aves rapaces (exposición secundaria). En Francia también se han reportado casos como resultado de la aplicación de rodenticidas anticoagulantes para el control de plagas de roedores (Berny y Gaillet, 2008). Christensen *et al.* (2012) realizaron una revisión de casos documentados sobre exposiciones secundarias a raticidas anticoagulantes de especies silvestres no diana observando altas tasas de exposición a estos rodenticidas en rapaces en

áreas de gestión intensiva en Dinamarca en las que podrían ocasionar efectos adversos sobre la reproducción y, finalmente, en el estatus poblacional de algunas especies de rapaces nocturnas y diurnas.

No se debe olvidar que se excluyen de este estudio los efectos subletales que pueden provocar las sustancias tóxicas utilizadas en los cebos envenenados, como alteraciones en su termorregulación, cambios de comportamiento y alteraciones reproductivas que pueden tener un impacto negativo en las poblaciones silvestres (Franson y Smith, 1999). Aun así, se ha demostrado que la mortalidad de individuos adultos provocada por el contacto directo con sustancias tóxicas tiene un efecto más devastador en la dinámica poblacional de aves rapaces que los efectos reproductivos indirectos, siendo la causa más probable de la disminución poblacional de varias especies y de la falta de recolonización de determinadas zonas (Noer y Secher, 1990; Elliot y Avery, 1991; Antoniou *et al.*, 1996; Real y Mañosa, 1997; Whitfield *et al.*, 2004; Hernández y Margalida, 2008).

La estricnina, considerada como un veneno habitual en la eliminación de depredadores y utilizada ocasionalmente en envenenamientos deliberados tras su prohibición en 1994 por la Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo 1994/03824, de 4 de febrero (Motas-Guzmán *et al.*, 2003; Martínez-López *et al.*, 2006; Martínez-Haro, 2008), no figura en nuestro estudio como un tóxico de especial relevancia, por lo que se podría deducir que su uso en este tipo de prácticas ha disminuido en gran medida en Extremadura; tal disminución ya fue señalada por Berny en 2007 en su estudio sobre casos en diferentes países europeos. Sánchez-Barbudo *et al.* (2012a) sí que detectaron cierta importancia de la estricnina en los casos ocurridos en España, especialmente en la región de Asturias. Su conclusión fue que existían diferencias en los compuestos implicados en las intoxicaciones entre las distintas regiones españolas, lo que ha sido también indicado por WWF en su informe “El veneno en España. Evolución del envenenamiento de fauna silvestre 1992– 2017” (De la Bodega *et al.*, 2020), donde se constata un mayor uso de la estricnina en las comunidades autónomas

del norte de España (Galicia y Asturias), frente a una aparición ocasional en el resto. De hecho, en la Resolución de 12 de mayo de 2023, de la Consejería de Medio Rural y Cohesión Territorial, por la que se aprueba la Estrategia contra el Uso Ilegal de Veneno en el Principado de Asturias (BOPA núm. 103 de 31 de Mayo de 2023) se indica que el producto más utilizado para el envenenamiento ilegal de fauna silvestre en Asturias es la estricnina (detectada en el 41,4% de los cebos analizados). Bertero et al. (2020) encontraron una presencia constante de la estricnina en los casos de intoxicación en Italia hasta 2009, momento en que se empezó a observar una tendencia a la disminución.

El fenobarbital y el pentobarbital son dos fármacos pertenecientes al grupo de los barbitúricos que aparecieron en dos casos afectando a un ejemplar de milano real y de perro. Si bien en nuestro estudio su incidencia es menor, no debería restarse importancia a estos compuesto en cuanto al impacto que actualmente tienen sobre la fauna silvestre (se les considera contaminantes emergentes), ya que en un estudio reciente llevado a cabo por Herrero-Villar *et al.* (2021) entre 2004 y 2020 observaron la tendencia al alza de los casos de intoxicación de fauna silvestre por barbitúricos, especialmente de aves carroñeras al consumir los cadáveres de especies ganaderas que han sido eutanasiadas. En su estudio se vio predominantemente afectado el buitre leonado y, al igual que en el nuestro, el milano real y el perro también sufrieron intoxicaciones por barbitúricos.

El fentiión es el compuesto organofosforado que provocó la muerte al mayor número de individuos (5 buitre leonados, 114 abejarucos, 1 rabilargo asiático y un grupo de abejas) (Tablas 1 y 2). El elevado número de abejarucos afectados hace referencia a 4 casos distintos acaecidos en agosto de 2006, en los que se encontraron 114 cadáveres de abejarucos (*Merops apiaster*) en el medio natural de Extremadura, donde la apicultura es una práctica amplia y tradicional. Los análisis mostraron que las mayores cantidades de fentiión estaban presentes en sus patas, a través de las cuales había penetrado al organismo tras haber

estado en contacto con varios objetos (cuerdas, ramas, ferralla y objetos de plástico) impregnados con fentiión intencionadamente y que las aves usaron como posadero de manera habitual; además, los abejarucos golpean a las abejas de la que se alimentan contra el posadero para matarlas, pudiendo haberlas impregnado de fentiión (esta vía de entrada del tóxico a las aves explicaría la detección del mismo en el contenido gástrico de las aves).

Está claro que el propósito principal era provocar una intoxicación por exposición dérmica. Por tanto, estos casos demuestran que los venenos no solo se utilizan contra los grandes depredadores del ganado; en Europa el envenenamiento de los abejarucos es una práctica que llevan a cabo algunos apicultores, de la misma forma que los viticultores utilizan venenos contra los conejos (*Oryctolagus cuniculus*), considerándolos en ambos casos como amenazas para sus explotaciones (Martínez-Haro *et al.*, 2006; Mateo, 2010). El fentiión aparece como el segundo compuesto más utilizado como veneno en la región de Murcia (España) en un estudio realizado por Jerez *et al.* (2007), donde apuntan a una tendencia creciente de su uso para estos fines, idea que también es apoyada por Flieschli *et al.* (2004). Las abejas, que en nuestro estudio se vieron afectadas también por el fentiión, son animales especialmente vulnerables a la aplicación de plaguicidas, por lo que se les debe prestar especial atención en este tipo de estudios (Fletcher *et al.*, 1994). Importantes programas internacionales como el WIIS han incluido a las abejas de forma rutinaria en sus investigaciones durante décadas (Brown *et al.*, 1996).

Es llamativa la detección de casos con presencia de una mezcla de tóxicos, que se detectaron en un 8,75% de los casos, afectando a un 7,40% de los individuos de 9 especies diferentes, algunas tan sensibles en términos de conservación como el milano real y el águila imperial ibérica (en peligro de extinción), el buitre negro (especie vulnerable) o el buitre leonado y el milano negro (especies bajo protección especial); también se vieron afectados pequeños/medianos carnívoros como el perro, el zorro o el gato y otras aves como la paloma bravía (Tabla

2). En otro estudio realizado en las Islas Canarias (España) durante algunos años coincidentes con los del presente estudio, también se reflejó el hallazgo del uso de mezclas de tóxicos para la preparación de cebos, concluyéndose una tendencia al alza en los últimos años al reducirse el uso de aldicarb y carbofurano a favor de mezclas de varias sustancias de menor toxicidad (Rial-Berriel *et al.*, 2021). En nuestro estudio responden a casos puntuales que no responden a ninguna tendencia concluyente, ya que los compuestos implicados siguen el mismo patrón que en los casos con un solo compuesto implicado, siendo los compuestos carbamatos y organofosforados los más comúnmente implicados, con casos puntuales en los que aparecen otros grupos químicos como nicotinoides, organoclorados, barbitúricos o rodenticidas anticoagulantes (Tabla 3).

La distribución mensual de los casos (Figura 2) muestra un repunte a finales de invierno-primavera y principios de otoño. Esos períodos coinciden con la época de reproducción de muchas especies de aves e, incluso, con dos de las principales temporadas en las que realizan sus rutas migratorias. La temporada migratoria al inicio de la primavera es el comienzo de la época de reproducción de la mayoría de las aves afectadas por las intoxicaciones (SEO, 2012). Un patrón muy similar de distribución mensual se dio en Canadá en un registro de 20 años de intoxicaciones con compuestos anticolinesterásicos en fauna silvestre (Wobeser *et al.*, 2004), y también en el estudio de Buij *et al.* (2022) en 22 países europeos durante 20 años y en España en diferentes estudios (Jerez *et al.*, 2007; Motas-Guzmán *et al.*, 2003). En Francia, en el trabajo de Berny y Gaillet (2008) marzo y diciembre destacan como meses de mayor incidencia en casos de intoxicaciones. Hernández y Margalida (2009) observaron un pico en el número de muertes de alimoche (*Neophron percnopterus*) por intoxicación en los meses de mayo y junio (52,1% de los casos registrados en España en un periodo de 17 años), coincidiendo con la época de cría.

2.6. Conclusiones

Con el análisis detallado de los datos expuestos en el presente estudio centrado en intoxicaciones agudas de fauna en el medio natural, se demuestra que estos sucesos producidos por plaguicidas afectan a un amplio abanico de especies, muchas de ellas muy vulnerables en cuanto a su estado de conservación. Aunque los productos químicos se pueden permitir bajo ciertas condiciones de uso, los pesticidas, como los insecticidas no selectivos y los rodenticidas, a menudo se usan de manera indebida accidental o intencionadamente e, incluso, provocar intoxicaciones secundarias tras consumir presas debilitadas por los venenos. Se revela también en este estudio que las sustancias mayoritariamente implicadas están prohibidas desde hace años (especialmente aldicarb y carbofurano), por lo que es necesario un mayor control de los posibles excedentes que pudiesen quedar tras su prohibición e, incluso, su posible introducción en España desde otros países en los que estén permitidos. Es, por tanto, innegable que las intoxicaciones, especialmente las intencionadas, son uno de los factores más graves que amenazan la conservación de la vida silvestre y la biodiversidad a nivel europeo y mundial, especialmente en lugares que poseen una destacable riqueza faunística y albergan poblaciones únicas a nivel internacional como es el caso de la región de Extremadura, cuya importancia se ha explicado en párrafos anteriores.

La sensibilización social y la participación pública son elementos clave para hacer frente a esta amenaza, siendo necesaria la cooperación entre la administración y todas las partes implicadas con actividad en el medio natural como agentes ambientales, ganaderos, agricultores o cazadores. Es esperanzador que toda la información arrojada por los diferentes estudios desarrollados a nivel global durante las últimas décadas, haya servido para que en los últimos años surjan muchas iniciativas nacionales y transfronterizas para unir a los sectores responsables en el abordaje de este problema para su vigilancia y prevención. Se evidencia así la importancia de la monitorización de

envenenamientos como herramienta de valoración del daño ecológico de los compuestos, repercutiendo en el mantenimiento o la denegación del uso de esos compuestos por parte de las autoridades administrativas correspondientes. Es, por tanto, necesario seguir avanzando en esta línea de actuación de todas las partes implicadas para conseguir evitar y minimizar el impacto de esta problemática sobre la vida silvestre y sus hábitats.

2.7. Bibliografía

- A** Antoniou, V., Zantapoulus, N., Skartsi, D., Tsoukali-Papadopoulou, H. 1996. Pesticide poisoning of animals of wild fauna. *Vet. Hum. Toxicol.* 38, 212–213.
- Ballesteros, S. 1997. Intoxicaciones en la fauna silvestre. En: *Actas del I Congreso Internacional de Medio Ambiente y Veterinaria: ponencias y comunicaciones*, Mérida, España, pp. 213-228.
- B** Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *J. Vet. Pharmacol. and Ther.* 30, 93-100.
- Berny, P., Gaillet, J.R. 2008. Acute poisoning of Red Kites (*Milvus milvus*) in France: Data from the SAGIR network. *J. Wildl. Dis.* 44 (2), 417-426.
- Berny, P., Caloni, F., Croubels, S., Sachana, M., Vanderbroucke, V., Davanzo, F., Guitart, R. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Vet. J.* 183, 255-259.
- Bertero, A., Chiari, M., Vitale, N., Zanoni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., Caloni, F. 2020. Types of pesticides involved in domestic and wild animal poisoning in Italy. *Sci. Total Environ.* 707, 136129.
- Brown, P., Charlton, A., Cuthbert, M., Barnett, L., Ross, L., Green, M., Gillies, L., Shaw, K., Fletcher, M. 1996. Identification of pesticide poisoning in wildlife. *J. Chromatogr. A* 754 (1-2), 463-78.
- Berny, P., Croubels, S., Sachana, M., Guitart, R. 2018. Epidemiology of animal poisonings in Europe, En: Gupta R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology*. Elsevier, pp. 45-46.
- C** Christensen, T.K., Lassen, P., Elmeros, M. 2012. High exposure rates of anticoagulant rodenticides in predatory bird species in intensively managed landscapes in Denmark. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 437–444.
- Comisión Europea. 2023. EU pesticides database. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_es [Consulta: noviembre 2023].
- Corbelle Rico, E., Rico Boquete, E. 2008. La actividad de las Juntas de Extinción de Animales Dañinos en España, 1944-1968. En: *Ayer en discusión: temas clave de historia contemporánea hoy*, Nicolás, M.E., González Martínez, C. (Ed.), Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones, pp. 11-21.
- D** De Lange, E., Milner-Gulland, E., Yim, V., Leng, C., Phann, S., & Keane, A. 2021. Using mixed methods to understand sensitive wildlife poisoning behaviours in northern Cambodia. *Oryx* 55 (6), 889-902.

- De la Bodega, D., Cano, C., Mínguez, E. 2020. El veneno en España. Evolución del envenenamiento de fauna silvestre (1992-2017). WWF y SEO/BirdLife. Madrid. Disponible en: https://www.wwf.es/nuestro_trabajo/especies_y_habitats/veneno/?55122/El-veneno-en-Espana-Evolucion-del-envenenamiento-de-fauna-silvestre-1997-2017.
- Del Moral, J. C., Molina, B. (Eds.) 2018. El buitre leonado en España, población reproductora en 2018 y método de censo. SEO/BirdLife. Madrid.
- De Snoo, G.R., Scheidegger, N.M.I., De Jong, F.M.W. 1999 Vertebrate wildlife incidents with pesticides: A European survey. *Pestic. Sci.* 55, 47-54.
- Del Moral, J.C. 2017. El buitre negro en España, población reproductora en 2017 y método de censo. SEO/Bird Life. Madrid.
- E** Elliott, G.D., Avery, M.I. 1991. A review of reports of Buzzard persecutions 1975–89. *Bird Study* 38, 52–56.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1992. Framework for ecological risk assessment, US EPA/630/R-92/001, U.S. Environmental Protection Agency. U.S. Government Printing Office, Washington DC, USA.
- F** Fairbrother, A. 1996. Cholinesterase-inhibiting pesticides. En: Fairbrother, A., Locke, L.N., Hoff, G.L. (Eds): *Noninfectious Diseases of Wildlife*, 2ª Ed. Iowa State University Press, Ames, IA, EEUU, pp. 52-60.
- Fleischli, M.A., Franson, J.C., Thomas, N.J., Finley, D.L., Riley, W. 2004. Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: a retrospective summary of national Wildlife Health Center records from 1980 to 2000. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 542-550.
- Fletcher, M.R., Greig-Smith, P.W., Stevenson, J.H. 1994. En: *Proceedings Fifth International Symposium on the Hazards of Pesticides to Bees*, Wageningen, The Netherlands.
- Franson, J. C., Sileo, L., Thomas, N. J. 1995. Causes of eagle deaths. En: *Our Living Resources: A Report to the Nation on the Distribution, Abundance, and Health of U.S. Plants, Animals, and Ecosystems*, National Biological Service, Washington D.C., EEUU, p. 68.
- Franson, J. C., Thomas, N. J., Smith, M. R., Robbins, A. H., Newman, S., McCartin, P. C. 1996. A retrospective study of postmortem findings in red tailed hawks. *J. Raptor Res.* 30 (1), 7–14.
- Franson, J.C., Smith, M.R. 1999. Poisoning of wild birds from exposure to anticholinesterase compounds and lead: diagnostic methods and selected cases. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 8 (1), 3-11.
- G** García-Fernández, A.J., Calvo, J.F., Martínez-López, E., María-Mojica, P., Martínez, J.E. 2008. Raptor ecotoxicology in Spain: a review on environmental persistent contaminants. *Ambio* 37, 432-439.

- Glaser, L.C. 1999. Organophosphorus and carbamate pesticides. En: Friend, M., Franson, J.C., (Ed.) *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds* (pp. 287-293). Pub.: U.S. Geological Survey, Madison, WI, USA. Golden, N.H., Rattner, B.A. 2003. Ranking terrestrial vertebrate species for utility in biomonitoring and vulnerability to environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 67-136.
- Grilo, A., Moreira, A., Carrapiço, B., Belas, A., São Braz, B. 2021. Epidemiological study of pesticide poisoning in domestic animals and wildlife in Portugal: 2014–2020. *Front. Vet. Sci.* 7, 616293.
- Grue, C.E., Gibert, P.L., Seeley, M.E. 1997. Neurophysiological and behavioural changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.* 37, 369-388.
- Guitart, R., Manosa, S., Guerrero, X. 1999. Animal poisoning: the 10- year experience of a veterinary analytical toxicology laboratory. *Vet. Hum. Toxicol.* 41 (5), 331-335.
- Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubles, S., Vandenbroucke, V., Berny, P. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Vet. J.* 183, 260-265.
- Greig-Smith, P.W. 1991. Use of cholinesterase measurements in surveillance of wildlife poisoning in farmland. En: Mineau, P. (Ed.). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 127-150.
- H Hagemeyer, E.J.M., Blair, M.J. 1997. *The EBCC Atlas of European Breeding Birds: Their Distribution and Abundance*, T&A.D. Poyser, London, England.
- Hernández, M., Margalida, A. 2008. Pesticide abuse in Europe: effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. *Ecotoxicology* 17, 264–272.
- Hernández, M., Margalida, A. 2009. Poison-related mortality effects in the endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 415–423.
- Hernández Mogollón, J.M., Campón Cerro, A.M., García Durán, J.M. 2011. Propuestas para el desarrollo y comercialización del turismo ornitológico en Extremadura. *Cuadernos de Turismo* 28, 93-119.
- Herrero-Villar, M., Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Taggart, M.A., Mateo, R. 2021. Increasing incidence of barbiturate intoxication in avian scavengers and mammals in Spain. *Environ. Pollut.* 284, 117452.
- Hickey, J.J., Anderson, D.W. 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science* 162, 271-273.
- Hill, E.F., Fleming, W.J. 1982. Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 27-38.

- Hill, E.F., Camardese, M.B. 1984. Toxicity of anticholinesterase insecticides to birds: technical grade versus granular formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 8, 551-563.
- Hill, E.F. 1995. Organophosphorus and carbamate pesticides. En: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. Jr. (Ed.). *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, FL, USA, pp. 243-274.
- Ibáñez-Pernía, Y., Hernández-Moreno, D., Pérez-López, M., Soler-Rodríguez, F. 2022. Use of poisoned baits against wildlife. A retrospective 17-year study in the natural environment of Extremadura (Spain). *Environ. Pollut.* 303:119098.
- Jerez, S., Motas, M., Almela, R.M., Clavel, C., Bayón, A. 2007. Envenenamientos e intoxicaciones de fauna silvestre y doméstica en la región de Murcia durante el bienio 2005-2006. *Anales de Veterinaria de Murcia* 23, 65-74.
- Lehel, J., Laczay, P., Déri, J., Darin, E.G., Budai, P. 2010. Model study on the clinical signs and residue concentrations of sublethal carbofuran poisoning in birds. *J. Wildl. Dis.* 46 (4), 1274-1278.
- Livingston, M.L. 1952. Parathion poisoning. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 120, 27.
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Cardiel, I., Reglero, M.M., Guitart, R. 2006. Intoxicaciones por plaguicidas anticolinesterásicos en fauna cinegética y sus depredadores silvestres. *Rev. Toxicol.* 23, 40-44.
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-Lopez, M., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J. 2008. Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 396-402.
- Martínez-López, E., Romero, D., María-Mojica, P., Navas, I., Gerique, C., Jiménez, P., García-Fernández, A.J. 2006. Detection of strychnine by gas chromatography-mass spectrometry in the carcass of a Bonelli's eagle (*Hieraetus fasciatus*). *Vet. Rec.* 159, 182-183.
- Mateo, R. 2010. Toxicology and wildlife conservation in Europe: The inadequacy of current EU regulations. *Vet. J.* 183, 241-242.
- Mateo-Tomás, P., Olea, P.P., Mínguez, E., Mateo, R., Viñuela, J. 2020. Direct evidence of poison-driven widespread population decline in a wild vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117 (28), 16418-16423.
- Mineau, P., Fletcher, M.R., Glaser, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliott, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T., Porter, S.L. 1999. Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, US and UK. *J. Raptor Res.* 33, 1-37.
- Mineau, P., Tucker, K. R. 2002. Improving detection of pesticide poisoning in birds. *J. Wildl. Rehabil., Part 1* 25 (2), 4-13.

- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2023. Registro de Productos Fitosanitarios. Disponible en: <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb> [Consulta: enero 2023].
- Ministerio de Sanidad. 2023. Registro de plaguicidas no agrícolas o biocidas. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/productos.do?tipo=plaguicidas> [Consulta: enero 2023].
- MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico). 2023. El águila imperial ibérica se recupera: cuenta con 841 parejas reproductoras en la península Ibérica. Grupo de trabajo de la especie en España y Portugal. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/2023/03/el_aguilaimperialibericaserecuperacuentacon841parejasreproducto.html [Consulta: noviembre 2023]
- Motas-Guzmán, M., María-Mojica, P., Romero, D., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J. 2003. Intentional poisoning of animals in southeastern Spain: a review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. *Vet. Hum. Toxicol.* 45(1), 47-50.
- N** Noer, H., Secher, H. 1990. Effects of legislative protection on survival rates and status improvements of birds of prey in Denmark. *Dan. Rev. Game Biol.* 14, 1-63.
- O** Olea, P.P., Fernández-García, M., López-Bao, J. V., Viñuela, J., Valente e Santos, J. P., Rodríguez-Pérez, J., Sotelo, L., Cortizo, C., Sazatornil, V., Planella Bosch, A., Gutiérrez, I., Pereira, P., Luna Aguilera, S. J., Rivas, Ó., Suárez, E., Lema, F. J., del Rey, M. G., Martínez-Delgado, A., Mateo-Tomás, P. 2022. Unraveling the real magnitude of illegal wildlife poisoning to halt cryptic biodiversity loss. *Biol. Conserv.* 273, 109702.
- P** Pérez-López, M., Nóvoa-Valiñas, M.C., García-Fernández, M.A., Melgar-Riol M.J. 2004. Two years' activity of the Veterinary Toxicology Attention Service of Lugo, Spain. *Vet. Human Toxicol.* 46(1), 47-49.
- Phillips, J.C., Lincoln, F.C. 1930. American waterfowl, their present situation and the outlook for their future. New York: Houghton Mifflin Co. Boston, USA.
- Plaza, P.I., Martínez-López, E., Lambertucci, S.A. 2019. The perfect threat: Pesticides and vultures. *Sci. Total Environ.* 687, 1207-1218.
- Porter, S. L. 1993. Pesticide poisoning in birds of prey. En: Redig, P. T., Cooper, J. E., Remple, J. D, Hunter, D.B. (Eds.). *Raptor biomedicine*. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN, USA.
- Prijono, W.B., Leighton, F.A. 1991. Parallel measurement of brain acetylcholinesterase and the muscarinic cholinergic receptor in the diagnosis of acute, lethal poisoning by anti-cholinesterase pesticides. *J. Wildl. Dis.* 27, 110-115.
- R** Ratcliffe, D.A. 1967. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. *Nature* 215, 208-210.
- Rattner, B. A., Scheuhammer, A. M., Elliott, J. E. 2011. History of wildlife toxicology

- and the interpretation of contaminant concentrations in tissues. En: Nelson Beyer, W., James P., Meador. (Eds.) *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*, 2ª Ed. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Real, J., Mañosa, S. 1997. Demography and conservation of Western European Bonelli's Eagle *Hieraetus fasciatus* populations. *Biol. Conserv.* 79, 59–66.
- Rial-Berriel, C., Acosta-Dacal, A., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Rodríguez-Hernández, Á., Macías-Montes, A., Boada, L.D., Travieso-Aja, M.d.M., Martín-Cruz, B., Suárez-Pérez, A., Cabrera-Pérez, M.A., Luzardo O.P. 2021. Epidemiology of animal poisonings in the Canary Islands (Spain) during the Period 2014–2021. *Toxics* 9, 267.
- S** Saldaña, L., Alonso, C., Carbonell, G. 1981. Identificación analítica de venenos utilizados en el exterminio de alimañas y aves perjudiciales a la agricultura. *Anales INIA, Serie Agrícola* 15, 145-149.
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Mateo, R. 2012a. Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica en España: diferencias entre Comunidades Autónomas. *Rev. Toxicol.* 29, 20-28.
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Mateo R. 2012b. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci. Total Environ.* 420, 280–288.
- Schafer Jr., E.W., Brunton, R.B., Lockyer, N.F., De Grazio, J.W. 1973. Comparative toxicity of seventeen pesticides to the quelea, house sparrow, and red-winged blackbird. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 154-157.
- Stahr H.M. 1991. *Analytical Methods in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Smith, M.R., Thomas, N.J., Hulse, C. 1995. Application of brain cholinesterase reactivation to differentiate between organophosphorus and carbamate pesticide exposure in wild birds. *J. Wildl. Dis.* 31(2), 263-267.
- Soler, F., Oropesa, A.L., Pérez, M. 2006. Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. *Rev. Toxicol.* 23 (1), 35-38.
- Stansley, W. 1993. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 315–321.
- Strong, L. 1938. Insect and pest control in relation to wildlife. En: *Proceeding of the 3rd North America Wildlife Conference*, American Wildlife Institute, Washington, DC, USA.
- T** Tenan, S., Adrover, J., Muñoz Navarro, A., Sergio, F., Tavecchia, G. 2012. Demographic consequences of poison-related mortality in a threatened bird of prey. *PLoS ONE* 7(11), e49187.
- V** Valdés, I. 2008. Extremadura: paraíso para las aves. *El Periódico Extremadura*, pp. 12-13.

Valverde, I., Espín, S., Gómez-Ramírez, P., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A.J., Berny, P. 2022. Developing a European network of analytical laboratories and government institutions to prevent poisoning of raptors. *Environ. Monit. Assess.* 194 (2), 113.

W Whitfield, D.P., Fielding, A.H., McLeod, D.R.A., Haworth, P.F. 2004. Modelling the effects of persecution on the population dynamics of golden eagles in Scotland. *Biol. Conserv.* 119, 319–333.

Wigglesworth, V.B. 1945. DDT and the balance of nature. *The Atlantic Monthly* 176, 107-113.

Wobeser, G., Bollinger, T., Leighton, F.A., Blakley, B., Mineau, P. 2004. Secondary poisoning of eagles following intentional poisoning of coyotes with anticholinesterase pesticides in western Canada. *J. Wildl. Dis.* 40 (2), 163-172.

Z Zoun, P.E.F., Spierenburg, Th.J. 1989. Determination of cholinesterase-inhibiting pesticides and some of their metabolites in cases of animal poisoning using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 462, 448-453.

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

3

Uso de cebos envenenados contra la fauna silvestre en el medio rural de Extremadura (2002 - 2018)

3. Uso de cebos envenenados contra la fauna silvestre en el medio natural de Extremadura (2002-2018)

3.1. Resumen

Este estudio presenta los resultados obtenidos en el análisis toxicológico de los diferentes tipos de cebos encontrados en Extremadura y que fueron remitidos al laboratorio del Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (España) durante un periodo de 17 años (2002-2018). Estos cebos eran materiales sospechosos encontrados en el medio natural de la región de Extremadura (oeste de España), donde la colocación de este tipo de elementos supone un problema que debe ser valorado y abordado debido a que la región combina una amplia actividad ganadera y cinegética con una importante riqueza de fauna silvestre (especialmente aves rapaces).

Se analizaron un total de 246 cebos elaborados con distintos materiales, incluidos 32 productos químicos que se vieron implicados en 183 casos; tras su recepción en el laboratorio, fueron clasificados según el material utilizado para su preparación y, posteriormente, según la sustancia tóxica encontrada. En general, los más comunes fueron los constituidos por material cárnico (56,3% de los casos), claramente diseñados para eliminar a los depredadores carnívoros o carroñeros considerados “molestos” para la actividad ganadera y la cinegética. Debe destacarse que también fueron detectados cebos por contacto (7,6%), que consistían en diferentes objetos que serían usados como posaderos para aves, impregnados con el plaguicida fentión para que éste actuase por vía dérmica. En relación a las sustancias encontradas, los compuestos anticolinesterásicos (organofosforados y carbamatos) fueron las sustancias más comúnmente utilizadas para la preparación de cebos (detectados en el 85,3% de los cebos positivos). Es también

destacable que el 8% de los cebos positivos estaban preparados con más de una sustancia tóxica cada uno.

Por tanto, debido a los tipos de compuestos tóxicos y los materiales utilizados para preparar los cebos, este estudio demuestra que el uso malicioso de sustancias altamente tóxicas en el medio ambiente contra la vida silvestre es un problema vigente y representa un riesgo grave para las diferentes especies.

3.2. Palabras clave

Cebos; plaguicidas; envenenamientos intencionales; fauna silvestre

3.3. Introducción

Los envenenamientos intencionales contra la fauna silvestre a través de cebos envenenados son un problema a nivel internacional (Motas-Guzmán *et al.*, 2003; Berny, 2007; Giorgi y Mengozzi, 2011; Margalida, 2012; Márquez *et al.*, 2013; Margalida *et al.*, 2014; Ruiz-Suárez *et al.*, 2015; Chiari *et al.*, 2017). Algunos autores apuntan al conflicto entre humanos y depredadores salvajes como origen del problema (Mateo-Tomás *et al.*, 2012) al compartir ambos los mismos intereses hacia ciertos recursos limitados del medio natural que entrañan un valor, como las especies cinegéticas, las ganaderas o los cultivos (Cozza *et al.*, 1996; Reynolds y Tapper, 1996; Kaczensky, 1999; Pedersen *et al.*, 1999; Mech *et al.*, 2000; Mazzoli *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2005; Thirgood y Redpath, 2008; Sotherton *et al.*, 2009; Cano *et al.*, 2016). El conflicto gana especial relevancia cuando esos recursos tienen o suponen un interés económico e involucra a depredadores de especies que se encuentran bajo protección legal (Thirgood *et al.*, 2000), dando lugar a persecuciones injustificadas contra estas especies provocando importantes perjuicios a sus poblaciones (Villafuerte *et al.*, 1998). Por tanto, las especies depredadoras que se alimentan de especies cinegéticas y que pueden atacar al ganado o alimentarse de cultivos suelen ser el objetivo de los envenenamientos. Cabe destacar que esta

situación también alcanza otras actividades como la apicultura o la colombicultura, sin olvidar que las mascotas también se ven afectadas tanto accidental como intencionadamente (Bodega-Zugasti, 2014; Cano *et al.*, 2016). El envenenamiento es un método de eliminación masivo y no selectivo que busca causar la muerte en un breve espacio de tiempo, siendo muy complicada la cuantificación y el control de los daños que produce en el área afectada.

Considerando su localización geográfica y su diversidad ambiental, España posee uno de los conjuntos de hábitats naturales más favorables para la fauna silvestre de toda Europa. Sin embargo, los envenenamientos son considerados como una de las principales causas de mortalidad de la fauna silvestre (Mateo-Tomás *et al.*, 2020; De la Bodega *et al.*, 2020), al igual que en otros países europeos con características ambientales similares (Guitart *et al.*, 2010; Berny *et al.*, 2015; Chiari *et al.* 2017; De Roma *et al.*, 2018; Ntemiri *et al.*, 2018; Bertero *et al.*, 2020; Di Blasio *et al.*, 2020), por lo que la presencia de este tipo de preparaciones letales en el medio natural debe ser evaluada para conocer su impacto ecológico. En España, el uso de veneno para la caza y la pesca es una infracción penal sancionada por la ley, por su impacto en la conservación de la especie y su carácter masivo y no selectivo (España, Ley 42/2007).

Todo lo anterior ha dado lugar a que en las últimas décadas se hayan puesto en marcha diferentes campañas contra este tipo de delitos en las que participan tanto el sector público como el privado. Estas iniciativas nos han permitido recopilar datos para evaluar la magnitud del problema y la efectividad de diferentes estrategias para enfrentarlos, así como planificar medidas futuras. Al mismo tiempo, existe la controversia sobre la efectividad y conveniencia del uso de venenos de forma controlada para hacer frente al control de plagas. Sin embargo, se ha demostrado que acaba teniendo efectos dañinos para diferentes especies de vida silvestre (Viñuela *et al.*, 2010; Viñuela, 2019). Específicamente, en Extremadura, que es una región con un alto valor medioambiental para la biodiversidad en España, también existe

el problema de los envenenamientos de fauna silvestre (Soler *et al.*, 2006), lo que llevó a la publicación de la ‘Estrategia extremeña contra el uso ilegal de cebos envenenados en el medio natural por el Gobierno (Junta de Extremadura), que incluye acciones penales y administrativas contra el uso de cebos envenenados. El intercambio de información y la mejora del conocimiento sobre este tema también constituyen un eje fundamental en la puesta en marcha de esta iniciativa (Extremadura, Orden de 27 de marzo de 2015).

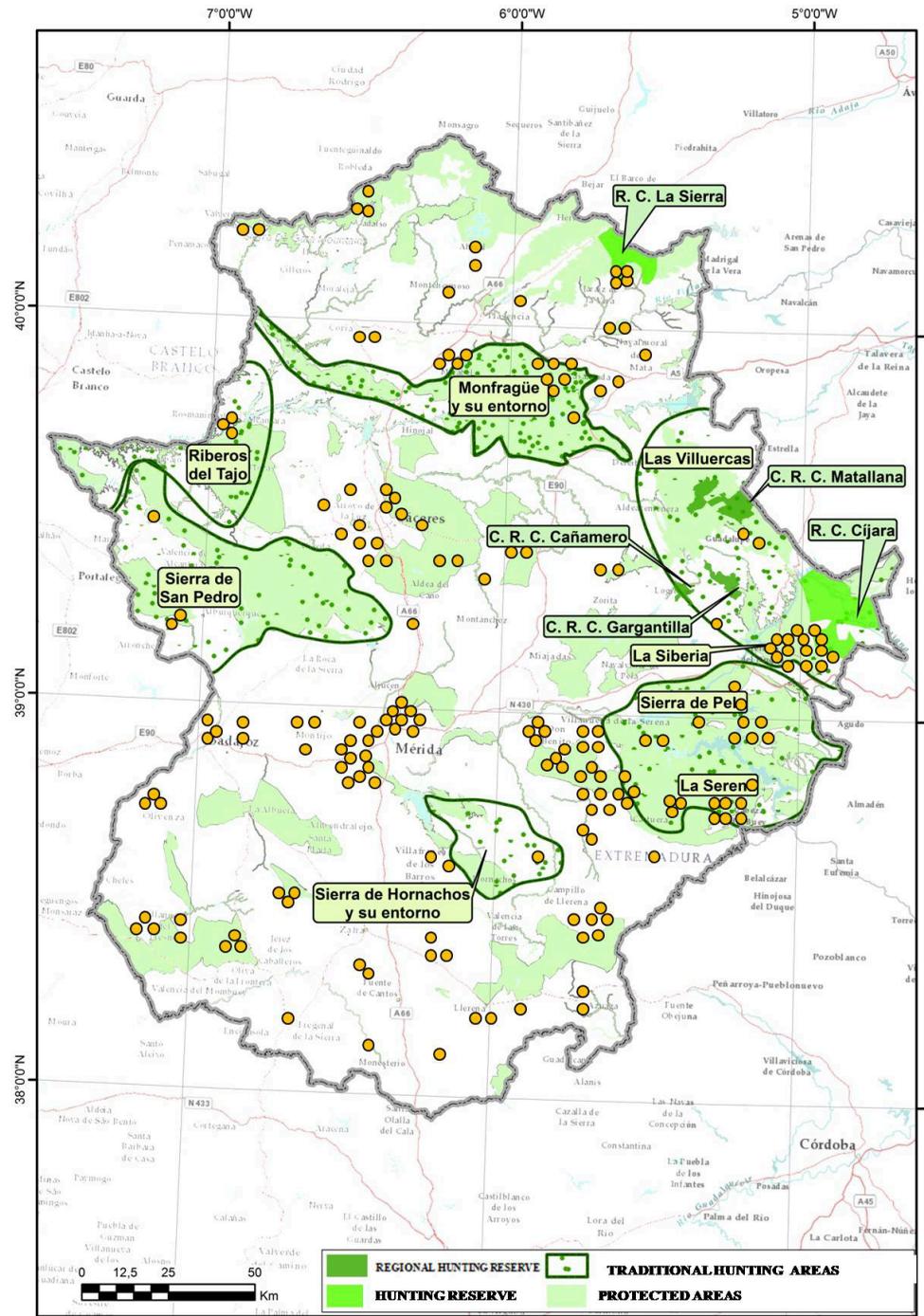
Además de las regulaciones legales generadas por diferentes gobiernos, el Plan de Acción Europeo de 2015 para prevenir los envenenamientos ilegales de la vida silvestre de la Comisión Europea incluyó una lista completa de sugerencias para mejorar el control sobre las sustancias legales que pueden ser utilizadas como venenos y hacerlas menos accesibles. Además, la COST Action *European Raptor Biomonitoring Facility* (CA16224), en la que participa nuestro grupo de investigación en toxicología, está promoviendo la puesta en marcha de una red de laboratorios dedicados a la toxicología forense veterinaria en Europa para mejorar la comunicación entre ellos para prevenir los envenenamientos de fauna silvestre (Valverde *et al.*, 2022).

A continuación, se presenta la recopilación de los datos obtenidos en el análisis toxicológico de los diferentes tipos de cebos remitidos al Laboratorio de Diagnóstico Toxicológico de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (Universidad de Extremadura, España) en un período de 17 años (2002-2018). Todos ellos fueron materiales sospechosos encontrados en el medio natural de Extremadura donde estas malas prácticas son un asunto importante a considerar, ya que en la región se desarrolla una extensa actividad ganadera y cinegética, conviviendo con una amplia variedad y riqueza en fauna silvestre (Figura 1). Aunque la mayor parte de la superficie de la región está considerada como coto cinegético (más del 80% son fincas cerradas), al mismo tiempo, incluye 160 zonas de la Red Natura 2000 de espacios protegidos que se distribuyen en 1.264.288 Ha, suponiendo el 30,3% de la superficie extremeña (Rengifo y Sánchez, 2016). Además, cabe destacar que

Extremadura es una de las regiones que alberga poblaciones de las aves rapaces más amenazadas del mundo, como el buitre negro *Aegypius monachus*, el alimoche *Neophron percnopterus*, el águila imperial española *Aquila adalberti* y el milano real *Milvus milvus*.

Existen numerosos trabajos sobre la epidemiología de las intoxicaciones tanto en animales domésticos como en silvestres (Antoniou *et al.*, 1996; Franson *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996; Mineau *et al.*, 1999; Berny, 2007; Berny *et al.*, 2010; Guitart *et al.*, 2010; Caloni *et al.*, 2018; Gupta, 2018 son algunos ejemplos) y, sin embargo, son pocos los estudios sobre los tipos de cebos envenenados que se utilizan para ejecutarlas de manera intencional (Giorgi y Mengozzi, 2011; Margalida, 2012; Chiari *et al.*, 2017). Debido a la falta de información sobre el uso de cebos envenenados en Extremadura y siendo ésta una región rica en biodiversidad que cuenta con importantes poblaciones de especies muy susceptibles a los peligros de este tipo de prácticas, se decidió recoger en este trabajo los resultados de los análisis realizados a los cebos recibidos en nuestro laboratorio desde el año 2002 hasta 2018. El objetivo principal de este estudio fue recopilar información sobre los tipos de cebos que se han detectado en las últimas décadas para envenenar fauna, los materiales y las sustancias con los que han sido preparados, y los sistemas de aplicación utilizados según las especies diana. Los resultados serán de interés para la administración pública, la comunidad científica y los organismos reguladores, puesto que estas prácticas criminales continúan siendo una amenaza para la fauna en un medio natural tan rico y sensible como el existente en Extremadura, esta información puede servir como reflejo de otros entornos naturales tanto nacionales como internacionales.

Figura 1. Distribución geográfica de los casos positivos detectados en este estudio en la región de Extremadura entre 2002 y 2018.



3.4. Material y métodos

3.4.1. Área de estudio y toma de muestras.

Todos los resultados reflejados en este estudio se obtuvieron de nuestra base de datos de posibles cebos envenenados encontrados en el medio natural de Extremadura (Figura 1), que posee un área de 41.634 km² y una población de 1.063.987 habitantes (25,5 habitantes/km², baja densidad comparada con la media española de 94 habitantes/ km²) (INE,2020). Según lo establecido para un adecuado seguimiento del proceso, la recogida fue realizada en campo por Agentes Medioambientales del gobierno regional o por el SEPRONA (Servicio de Protección de la Naturaleza) durante sus labores de inspección del medio natural o tras denuncias ciudadanas. Posteriormente, eran remitidos al Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “Los Hornos” situada en Sierra de Fuentes (Cáceres, España), donde el personal cualificado valoraba cada uno de los casos. En caso de existir sospecha de que se tratase de un cebo envenenado, el propio personal del centro remitía al laboratorio las muestras oportunas junto con un Acta de Entrega en el que se especificaban todos los detalles del mismo.

Un “cebo” hace referencia a cada muestra individual. También fueron analizadas sustancias químicas encontradas tal cual (sin formar parte de ninguna preparación) en el medio natural (por ejemplo, a la entrada de madrigueras, junto a colmenas, etc.), en explotaciones ganaderas o en propiedades privadas que por su localización podían resultar sospechosas de haber sido utilizadas para la elaboración de cebos envenenados o haber sido utilizadas directamente para tal fin. Un “caso” es aquel incidente ocurrido en una determinada localización y fecha y que podía englobar más de un cebo o sustancia;

3.4.2. Examen de las muestras

Una vez recibidas las muestras en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, eran registrados todos los datos

relativos a las mismas (número de registro asignado, tipo de cebo, fecha y lugar de recogida). Los diferentes cebos fueron clasificados de acuerdo al material usado para su preparación. A cada muestra se le realizó un examen visual detallado con una lupa para evaluar la naturaleza del material utilizado para la preparación del cebo (restos de cadáveres, carne, embutidos, pescado, restos de alimentos enlatados, etc.) y la evidencia de la presencia de alguna sustancia química (olores, gránulos, sustancias coloreadas o inusuales, pellets o de otro tipo, por ejemplo) en la superficie o mezclado con el material de preparación. En estos últimos casos, el material sospechoso era separado directamente del cebo para facilitar el análisis toxicológico. Por ejemplo, se analizaron rodenticidas anticoagulantes al encontrar material pastoso (céreo) o granos de cereal de color rojo o azul, metaldehído al encontrar pellets azules o verdes y aldicarb o carbofurano al encontrar microgránulos negros o violetas respectivamente. Si este análisis específico era negativo, entonces se analizaban para los restantes grupos de tóxicos.

3.4.3. Análisis toxicológico

El análisis toxicológico consistía en un *screening* que abarcaba las sustancias tóxicas más comúnmente involucradas en envenenamientos intencionales y accidentales de la fauna. Incluso cuando el examen visual del cebo y las circunstancias del caso no sugerían un riesgo de existir un tóxico, se llevaba a cabo de forma rutinaria el análisis de plaguicidas anticolinesterásicos (carbamatos y organofosforados) con todas las muestras, ya que a menudo están involucrados en los envenenamientos intencionales debido a su facilidad de manejo, especialmente las presentaciones granulares, y son los venenos más frecuentemente detectados en Extremadura (Soler *et al.*, 2006).

Cuando se analizan los cebos envenenados, los compuestos químicos se encuentran a una concentración tan alta que los límites de detección o cuantificación no adquieren gran importancia. En estos casos, la detección de grandes concentraciones (>mg/kg) de estas sustancias es

suficiente para identificarlo como cebo envenenado (con el propósito de eliminar fauna silvestre o doméstica). Debido a la degradación de algunos compuestos tóxicos por las condiciones físicas o químicas del medio ambiente donde se encuentra el cebo, no se pueden aplicar los rigurosos estándares habituales de validación de un método para el análisis de residuos, y muchas mediciones de residuos deben considerarse como semicuantitativas. El principal requisito cuando al analizar un cebo envenenado, es la identificación del compuesto implicado, más que cuantificarlo con precisión. Los métodos no pueden validarse para todos los tipos de muestras y los límites de detección/cuantificación pueden variar, aunque los procedimientos deben ser suficientemente robustos para hacer frente a todas las eventualidades (Brown *et al.*, 2005).

Se llevó a cabo el análisis químico para determinar la presencia de los siguientes grupos de plaguicidas:

- Carbamatos: aldicarb, bendiocarb, carbofurano, carbaril, metiocarb, metoxil, oxamilo, pirimicarb y propoxur.
- Organofosforados: acefato, azinfós-metil, cadusafós, clorfenvinfós, clormefós, clorpirifós-etil, clorpirifós-metil, cumafós, diazinona, diclorvós, dimetoato, disulfotón, etión, etoprofós, fenamifós, fenitrotión, fentión, fonofós, heptenofós, isofenfós, malatión, metidatión, metamidofós, mevinfós, monocrotofós, ometoato, paratión-etil, paratión-metil, fentoato, forato, fosalona, fosmet, pirimifós-etil, pirimifós-metil, profenosfós, sulfotep, terbufós, tetraclorvinfós y triclorfón.
- Organoclorados: aldrín, DDT, dieldrín, endrín, endosulfán, heptacloro, hexaclorobenceno, lindano y metoxicloro.
- Piretroides: ametrina, bifentrina, ciflutrín, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, lambda cialotrina, permetrina, fenotrina, tau-fluvalinato y tetrametrina.
- Rodenticidas anticoagulantes: brodifacoum, bromadiolona, clorofacinona, coumatetralil, difacinona, difenacoum, difetialona, flocumafén y warfarina.

- Otros: estricnina, α -clorarosa y metaldehído.

Se utilizaron patrones cromatográficos de plaguicidas obtenidos de Sigma-Aldrich, Dr. Ehrenstorfer y ChemService para la identificación y cuantificación de estos plaguicidas, tal y como se describe más adelante.

3.4.4. Procesado de las muestras

Dado que los cebos sospechosos de estar envenenados pueden estar compuestos por una amplia variedad de compuestos que abarcan diferentes grupos químicos, desde los organoclorados no polares (OCs) hasta los amplios rangos de polaridad de los organofosforados (OFs), carbamatos y herbicidas, se seleccionaron y aplicaron métodos analíticos multiresiduo para la determinación de los diferentes grupos de plaguicidas; por el contrario, para ciertos compuestos individuales, como el metaldehído y la estricnina, se utilizaron métodos cualitativos individuales. Los procedimientos de extracción, purificación y detección de plaguicidas, considerados adecuados para el propósito de nuestra investigación, fueron validados en nuestro laboratorio y variaron en el tiempo. La extracción se realizó utilizando solventes específicos para cada grupo de plaguicidas.

Los cebos suelen tener el veneno en su superficie exterior y, por tanto, la cantidad presente suele ser muy grande (en relación a lo habitual en los análisis de residuos). Cuando el compuesto sospechoso (microgránulos, polvo u otros formulados comerciales...) se podía separar fácilmente de la superficie sin arrastrar material interferente, se disolvía una pequeña cantidad del mismo en el solvente adecuado y después se diluía en el mismo solvente para su posterior análisis sin necesidad de mayor proceso de extracción y limpieza. Si el resultado del análisis era negativo, se repetía el análisis a una concentración 100 veces mayor (Brown *et al.*, 2005).

En general, el análisis de la gran mayoría de los cebos requería un proceso de limpieza de los extractos después de la extracción del tóxico

con solventes. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas dependiendo del tipo de compuesto tóxico. Inicialmente, la limpieza se realizó mediante la extracción en fase sólida (cartuchos SPE, Florisil y C18) según Sthar (1991). Posteriormente, se empezó a aplicar la metodología propuesta por Brown *et al.* (1996, 2005) utilizando cromatografía de permeación en gel (GPC) con columna de vidrio rellena con Bio-Beads S-X3 como fase estacionaria y n-hexano/acetato de etilo (1:1, v/v) como fase móvil (impulsada por una bomba Merck-Hitachi HPLC Pump L-7100 y recogido en un colector Waters Fraction Collector). Durante los últimos 3 años del estudio, se aplicó la metodología propuesta por Luzardo *et al.* (2014) para el proceso de extracción y purificación que consistía en una extracción general sólido-líquido seguida por el proceso de purificación (centrifugación en congelación, sola o seguida de GPC con Bio-Beads S-X3 en muestras muy sucias).

3.4.5. Análisis instrumental

El análisis de los extractos se llevó a cabo en nuestro laboratorio utilizando diversas técnicas cromatográficas, ya que el equipo analítico fue cambiando a lo largo del período de investigación.

Durante los primeros años, se utilizó la cromatografía en capa fina (TLC) (método cualitativo) como paso inicial (*screening*) del análisis de plaguicidas anticolinesterásicos. Los extractos y los patrones de plaguicidas se aplicaron en placas de gel de sílice G60 usando un muestreador semiautomático (Camag Linomat IV) y posteriormente se revelaron aplicando acetilcolinesterasa en espray sobre la placa (Zoun y Spierenburg, 1989). Posteriormente, los resultados eran confirmados por técnicas cromatográficas más específicas y sofisticadas.

Para la determinación semicuantitativa de los tóxicos en los extractos se utilizaron las siguientes técnicas cromatográficas:

- cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Shimadzu UFLC System compuesto por una bomba LC 20AD y un automuestreador SIL-20AHT) acoplado a un detector de

diodos (HPLC–DAD; Shimadzu SPD-M20A) y un detector de fluorescencia (HPLC–FL; Shimadzu RF-10AXL),

- cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (trampa de iones) (HPLC-MS; UHPLC 3000 Ultimate Bruker Daltonics System con automuestreador Thermo y un detector Ion Trap Amazon SL MS),
- cromatografía de gases capilar (GC; Agilent 6890N con muestreador automático 7683-G2614A) acoplado a un detector de nitrógeno fósforo (GC-NPD) y un detector de captura de electrones (GC-ECD),
- cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas de impacto de electrones (GC-MS; Shimadzu GC-2010 acoplada a detector MS-QP2010 Plus y automuestreador AOC-20i) en modo de barrido completo.

El uso de GC-MS permitió la búsqueda de compuestos desconocidos cuando se realizó un análisis cualitativo de los picos (pico a pico). La comparación del espectro del pico con una librería de espectros de masas (Shimadzu Pesticide y NIST 11) permitió la identificación del compuesto y su posterior cuantificación con un patrón apropiado. Esto permitió la identificación de nuevos plaguicidas (atrazina, etoxiquina, imidacloprid, metalaxil, tiram y triflumuron) y fármacos (fenobarbital) que no estaban incluidos previamente en el análisis.

Mediante el uso de detectores de masas, la identificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando su tiempo de retención y los datos del espectro de masas del barrido completo para cada compuesto.

Las técnicas cromatográficas utilizadas en el análisis de los extractos para cada grupo de plaguicidas fueron las siguientes: TLC para estricnina y plaguicidas anticolinesterásicos; GC-ECD y GC-MS para organoclorados y piretroides, GC-NPD y GC-MS para organofosforados; HPLC-DAD y HPLC-MS para carbamatos; HPLC-DAD/FL y HPLC-MS para raticidas anticoagulantes; GC-MS para metaldehído y α -cloralosa; HPLC-MS para estricnina.

También se utilizaron métodos colorimétricos cuando fue necesario. Así, se aplicó el método descrito por Saldaña *et al.* (1981) para el análisis de la estricnina. En el caso del metaldehído, la extracción con cloroformo (Jones y Charlton, 1999) se siguió de detección colorimétrica (Smith, 1987).

3.4.5. Control de calidad de datos

Todos los procedimientos descritos anteriormente se probaron a medida que se desarrollaban. Como se indicó anteriormente, los métodos no se pueden validar para todos los tipos de muestras, y los límites de determinación/cuantificación pueden variar y no son de gran importancia en nuestro caso, pero los procedimientos deben ser lo suficientemente robustos para hacer frente a la mayoría de las eventualidades (Brown *et al.*, 2005).

Para monitorear el funcionamiento instrumental y el rendimiento de la columna en el análisis cromatográfico, se verificaron las soluciones patrón de la mezcla de trabajo al comienzo de la sesión analítica. En cada lote analítico se analizó un control negativo (blanco) y en cada muestra se añadió trifenilfosfato (TPP) antes de la extracción como patrón interno (IS). La recuperación media de plaguicidas en los diferentes métodos semicuantitativos estuvo en el rango de 65-85% y los límites de cuantificación estuvieron en el rango de 0,01 a 0,5 mg/kg.

3.5. Resultados

3.5.1. Tipos de cebos

Entre 2002 y 2018 se analizaron 246 muestras, de las que 197 resultaron positivas (Figuras 2 y 3). En la tabla 1 se muestra el número de casos en los que apareció cada tipo de cebo, destacando que 12 casos/16 cebos incluían más de un tipo de cebo (8,1/8,5% de los casos/cebos). El número medio de cebos totales por caso fue de 1,34.

Figura 2.

Distribución anual de la frecuencia en el número de cebos positivos.

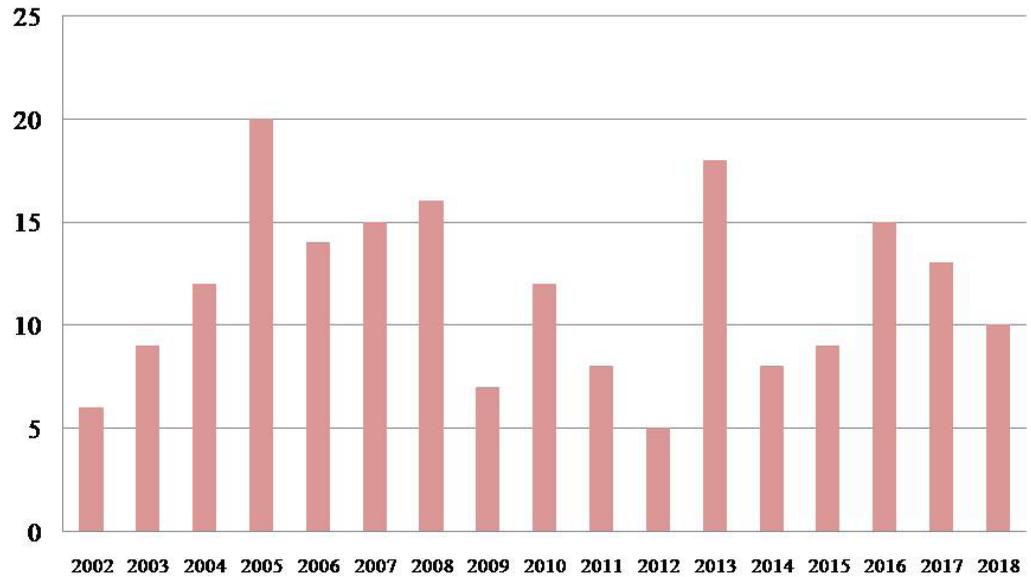
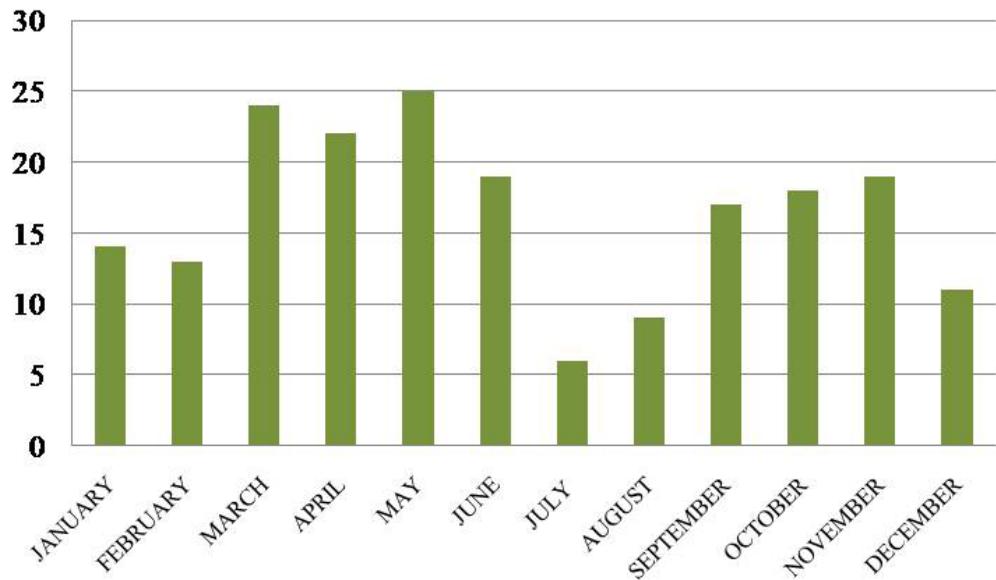


Figura 3.

Distribución mensual de la frecuencia en el número de cebos positivos.



El caso con mayor número de muestras consistió en 10 cebos comerciales con el rodenticida anticoagulante brodifacoum colocados en el suelo, seguido numéricamente por un caso con seis piezas de carne fresca. En relación al tipo de cebo, la tabla muestra que la mayoría de los cebos envenenados estaban constituidos por carne (56,3% de los cebos), en diferentes formatos: a) el 30,9% de los cebos estaban preparados con trozos de carne fresca con restos de huesos y/o piel; b) el 14,2% fueron de carne seca y embutidos curados (productos típicos españoles consistentes en carnes grasas curadas y condimentadas, que permanecen inalterables en el medio durante mucho tiempo) (Figura 4); c) e 4,6% constituidos por restos de vísceras o de placenta de partos recientes; d) el 6,6% eran canales completas de animales cubiertos o rellenos de veneno (los animales utilizados eran pequeños, como conejos, palomas, codornices y corderos recién nacidos).

Figura 4.
Preparación de embutido curado con granúlos de aldícarb.



Productos químicos o sustancias, es decir, sustancias que no son vendidas para ser usadas en forma de cebo (principalmente plaguicidas agrícolas en forma de gránulos, soluciones concentradas o presentación en polvo) pero que son usadas maliciosamente con el propósito de envenenar fauna, supusieron un 16,2% de las muestras. Estas sustancias granulares o en polvo, fueron colocadas directamente en el medio natural (a la entrada de madrigueras o alrededor de colmenas) sin ningún soporte alimentario o fueron encontradas en explotaciones ganaderas o propiedades privadas y sospechosas de haber sido utilizadas para preparar cebos.

De manera general, los cebos encontrados estaban destinados a actuar mediante su ingestión y provocar así el envenenamiento, pero curiosamente un 7,6% fueron diseñados para envenenar por contacto al ser posaderos para aves impregnados con fentiión, compuesto tóxico por vía dérmica. Consistían en objetos variados como cuerdas, ramas de árbol, ferralla y objetos de plástico (Figura 5).

Figura 5. Barra de plástico impregnada con fentiión que fue utilizada como posadero en las inmediaciones de un grupo de colmenas.



El 10,1% de las muestras eran cebos comerciales que contenían rodenticidas anticoagulantes ya formulados y diseñados para actuar como cebos tóxicos contra mamíferos por ingestión, y el 5,6% de los cebos fueron preparados con restos de comida humana cocinada como croquetas, empanadas o carne cocinada. También fueron analizados cebos preparados con pescado (1 cebo) y restos de langosta (2 cebos), suponiendo un 1,5% del total; el mismo porcentaje supusieron 3 muestras de semillas de cereal recubiertas por plaguicidas y diseñadas para ser sembradas, pero que fueron colocadas en la superficie a modo de cebo envenenado. Dos muestras (1%) consistían en restos vegetales (hierba y paja) impregnados con tóxico.

Tabla 1. Tipos de cebos envenenados (positivos en análisis) según el material de preparación y presentación.

TIPOS DE CEBO	CEBOS: n (%)	CASOS: n
Trozos de carne fresca	61 (30.9%)	43
Sustancias químicas comerciales	32 (16.2%)	13
Embutidos y carne seca curada	28 (14.2%)	15
Cebos comerciales (rodenticidas)	21 (10.1%)	9
Objetos impregnados (posaderos)	15 (7.6%)	12
Cadáveres de pequeños animales	13 (6.6%)	5
Restos de comida humana cocinada	11 (5.6%)	7
Vísceras (órganos y placenta)	9 (4.6%)	6
Semillas recubiertas	3 (1.5%)	3
Pescado y marisco	3 (1.5%)	2
Restos vegetales	2 (1.0%)	1
TOTAL	197 (100%)	141

3.5.2. Sustancias detectadas

En la tabla 2 se muestran las sustancias detectadas en los cebos positivos y el número de cebos que contienen cada sustancia, así como el número de casos en los que aparecen; los cebos que resultaron negativos a los análisis también aparecen cuantificados. Estas sustancias se encontraban mezcladas con el material de preparación, recubriéndolo o rellenándolo, y los compuestos anticolinesterásicos aldicarb y carbofurano (ambos pertenecientes al grupo de los plaguicidas carbamatos) fueron los encontrados con más frecuencia, apareciendo al menos uno de ellos en el 64,5% (127 de 197) del total de muestras (cebos) positivas: 43 cebos (21,8%) contenían aldicarb, 25 cebos (12,7%) contenían carbofurano, 38 (19,3%) cebos aparecieron con gránulos de aldicarb directamente sobre su superficie (Figura 4) y 14 (7,1%) con gránulos de carbofurano; en 5 cebos (2,5%) aparecieron ambas sustancias y 2 presentaron aldicarb junto con alguna otra sustancia (el organoclorado lindano en uno de estos cebos y el organofosforado fenamifós en el otro). Los compuestos del grupo de los carbamatos metomilo y oxamilo fueron detectados solamente en 1 muestra cada uno (0,5%), aunque cabe destacar aquí que Biancardi et al. (2022) apuntan a una tendencia al alza al uso de oxamilo en la elaboración de cebos envenenados en los últimos años en Italia.

Compuestos anticolinesterásicos del grupo de los plaguicidas organofosforados fueron identificados en 38 muestras (19,3%) (33 con presencia de un único organofosforado y 5 en las que aparecieron mezclados con otros compuestos). El fentión fue el compuesto organofosforado que apareció en más muestras, con un total de 15 (7,6%), y, como particularidad, siempre impregnado en objetos colocados como posaderos cerca de colmenas para envenenar abejarucos (*Merops apiaster*). Otros compuestos organofosforados encontrados ocasionalmente fueron clorpirifós (en 10 cebos, un 5,1% del total), fenamifós (en 8 cebos, un 4,1%), malatión (en 4 cebos, un 2%) y monocrotofós y clorfenvinfós en 1 cebo cada uno (un 0,5%).

La conclusión clara que se puede extraer de los dos párrafos anteriores es la altísima frecuencia del uso de los compuestos anticolinesterásicos (tanto del grupo de los carbamatos como del de los organofosforados) para la elaboración de cebos envenenados, ya que prácticamente el 85% de los cebos positivos contenían al menos uno de estos compuestos.

Los rodenticidas anticoagulantes fueron los siguientes compuestos encontrados con más frecuencia, apareciendo en 21 muestras (10,1%) que contenían un solo rodenticida y 4 (2%) muestras en las que aparecieron varios. El brodifacoum fue el más frecuentemente detectado, apareciendo en un total de 14 muestras (7,1%) (en 4 de ellas combinado con otros anticoagulantes), seguido por la bromadiolona, que fue detectada en 9 cebos (6 contenían solo bromadiolona y en 3 cebos estaba mezclada con brodifacoum); por último, 2 cebos contenían difenacoum (1 de ellos mezclado con brodifacoum).

A lo largo de los años también fueron detectados otros tóxicos que aparecieron de manera puntual: 2 cebos (1%) contenían fenobarbital, otros 2 contenían estriquina; y varios compuestos aparecieron solamente en 1 cebo (0,5%) cada uno: etoxiquina y los piretroides cipermetrina y deltametrina. La Figura 6 muestra la tendencia en cuanto al uso de las principales sustancias entre 2002 y 2018.

Cabe destacar en este punto que además de los 5 cebos que estaban preparados con una combinación de aldicarb y carbofurano (mencionados en párrafos anteriores), 11 cebos más (5,6%) contenían una mezcla de sustancias tóxicas. De manera que una mezcla de clorpirifós, metomilo y endosulfán (Figura 7) fue detectada en 3 cebos, al igual que la mezcla de bromadiolona y brodifacoum (anteriormente mencionada). Varias mezclas fueron encontradas de manera puntual en un solo cebo cada una: aldicarb y lindano; fenamifós y aldicarb; metiocarb, imidacloprid, metalaxil, tiram y atrazina; brodifacoum y difenacoum; y, por último, cipermetrina, clorfenvinfós, clorpirifós y fenitrotión.

Tabla 2. Sustancias detectadas y número de cebos/casos en las que aparecieron.

SUSTANCIA	CEBOS: n (%)	CASOS: n
Ninguna sustancia detectada (negativos)	49 (19.9%)	42
Aldicarb	43 (17.5%)	31
Aldicarb (microgránulos)	38 (15.4%)	26
Carbofurano	25 (10.2%)	22
Carbofurano (microgránulos)	14 (5.7%)	9
Fentión	15 (6.1%)	12
Brodifacoum	10 (4.1%)	1
Fenamifos	7 (2.8%)	7
Bromadiolona	6 (2.4%)	4
Aldicarb + carbofurano	5 (2.0%)	3
Clorpirifós	4 (1.6%)	1
Malatión	4 (1.6%)	3
Bromadiolona + brodifacoum	3 (1.2%)	2
Clorpirifós + metomilo + endosulfán	3 (1.2%)	2
Triflumuron	2 (0.8%)	2
Fenobarbital	2 (0.8%)	1
Estricnina	2 (0.8%)	1
Clorpirifós (+sulfotep)	2 (0.8%)	2
Metomilo	1 (0.4%)	1
Difenacoum	1 (0.4%)	1
Etoxiquina	1 (0.4%)	1
Metaldehído	1 (0.4%)	1
Oxamilo	1 (0.4%)	1
Monocrotofós	1 (0.4%)	1
Deltametrina	1 (0.4%)	1
Aldicarb + lindano	1 (0.4%)	1
Fenamifós + aldicarb	1 (0.4%)	1
Metiocarb + imidacloprid + metalaxil + tiram + atrazina	1 (0.4%)	1
Brodifacoum + difenacoum	1 (0.4%)	1
Cipermetrina + clorfenvinfós + clorpirifós + fenitrotiónn	1 (0.4%)	1
TOTAL	246 (100%)	183

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Figura 6. Evolución de la frecuencia de uso de los principales tóxicos entre 2002 y 2018.

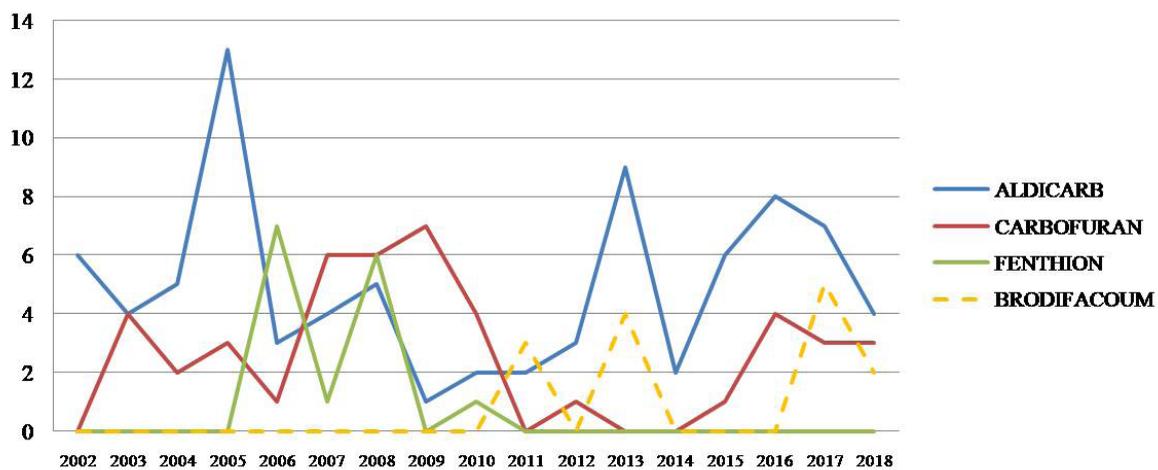


Figura 7. Cebo de restos cárnicos en el que fue detectada una mezcla de clorpirifós, metomilo y endosulfán.



3.6. Discusión

Extremadura cuenta con un excepcional patrimonio ambiental y riqueza faunística, y al mismo tiempo se desarrollan de manera muy extendida dos actividades muy arraigadas como son la ganadería y la caza (Figura 1); la convergencia de estos factores en un mismo territorio se relaciona de manera inequívoca con el uso intencional de venenos contra la fauna silvestre, especialmente contra especies depredadoras (Reynolds y Tapper, 1996; Villafuerte *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2012; De Roma *et al.*, 2018).

La distribución mensual de cebos positivos a lo largo de los 17 años (Figura 3) demuestra que los picos de mayor incidencia se presentan en primavera y otoño, coincidiendo con los periodos de mayor actividad ganadera, más recursos naturales de alimento para el ganado y la fauna, y/o con actividad cinegética. En cuanto a la vida silvestre, estos períodos también coinciden con la temporada de reproducción de la mayoría de las aves y con las principales temporadas de migración.

Estas singularidades llevan a considerar la susceptibilidad de la región a sufrir este tipo de casos con mayor frecuencia que otros territorios. Y este aspecto se ve reflejado en los resultados obtenidos en este estudio; el alto porcentaje de cebos envenenados encontrados preparados con material cárnico (trozos de carne fresca, embutidos, cadáveres de animales o vísceras) y la clara participación humana en su elaboración, evidencia la intencionalidad de estas prácticas y su propósito de actuar contra especies carnívoras y/o necrófagas. Las especies que habitualmente son víctimas del uso intencional de venenos contra la fauna son las aves rapaces, las aves necrófagas y los mamíferos carnívoros (Márquez *et al.*, 2013; Berny *et al.*, 2015; Márquez *et al.*, 2016; Di Blasio *et al.*, 2020; Olea *et al.*, 2022), pudiendo sufrir por esta causa descenso de sus poblaciones (Márquez *et al.*, 2012) y una alteración de su área de distribución (Mateo-Tomás *et al.*, 2012).

El uso tan generalizado de cebos cárnicos es una prueba de que son efectivos contra las “especies diana”; además, son fáciles de manipular y elaborar, suponen un bajo coste económico y son resistentes a la degradación ante condiciones climatológicas adversas siendo duraderos en el tiempo (especialmente los elaborados con embutidos). A diferencia de otros estudios similares (Giorgi y Mendozzi, 2011), en nuestro caso no se encontró una relación directa entre las características del material usado como cebo (alto contenido en grasa, cocinado o crudo, etc.) y el veneno involucrado en el mismo, excepto en el caso del fentión, que apareció en diferentes casos, pero siempre impregnado en objetos como palos, barras, ramas, cuerdas o cables colocados como posaderos para aves en zonas dedicadas a la apicultura (Figura 5). Aves como los abejarucos (*Merops apiaster*) son consideradas “enemigos” para esta actividad ganadera por ser cazadores habituales de las abejas para alimentarse y criar a sus pollos, además de espantarlas con su canto, alterando su comportamiento; para ello, suelen posarse en grupo en las inmediaciones de las colmenas y es este comportamiento el que lleva a los criminales a colocar los posaderos impregnados con veneno en esas zonas. El fentión es fácilmente absorbible por la piel y actuará a través de las patas. Casos de similares características han sido registrados en otras regiones españolas (Cano *et al.*, 2016).

Las sustancias comerciales enviadas a nuestro laboratorio habían sido encontradas en el medio natural al ser abandonadas tras su utilización para la preparación de cebos envenenados, o en instalaciones (almacenes, granjas...) donde se sospechaba que se habían estado elaborando los mismos.

Los restos de comida humana cocinada son un material habitualmente utilizado para la elaboración de cebos envenenados (Giorgi y Mendozzi, 2011); suelen aparecer recubiertos, impregnados o rellenos con el veneno, siendo una matriz económica, de fácil manejo y muy palatable. Suele tratarse de comida estropeada o sobrantes que son utilizados para tal fin, normalmente material cárnico, pero apareciendo también otros alimentos como el pescado o el marisco.

Las semillas de cereal recubiertas con plaguicidas de uso permitido que aparecieron en un caso fueron colocadas de manera malintencionada en la superficie del terreno (no enterradas) para que fuesen consumidas directamente. En otros dos casos, sin embargo, a pesar de haber sido enterradas durante su siembra, este proceso no se realizó apropiadamente facilitando su consumo de manera accidental. En este punto conviene recordar que los envenenamientos han sido tradicionalmente clasificados en sucesos accidentales (con sustancias permitidas por mala aplicación o uso) y en sucesos criminales (con sustancias permitidas o prohibidas a través de cebos elaborados y colocados con intención de envenenar) (Mineau, 2002; Berny, 2007; Martínez-Haro *et al.*, 2008).

Un 80% de los cebos analizados fueron positivos a algún compuesto tóxico, indicando un alto nivel de eficacia por parte de agentes forestales bien entrenados a la hora de encontrar cebos envenenados en el medio natural. Recientemente, un estudio sobre intoxicaciones con cebos envenenados del noroeste de Italia encontrados entre 2012 y 2017, demostró que, de media, un 40,4% de los mismos (294 de un total de 728) resultaron positivos a alguna sustancia tóxica (fluctuando este porcentaje entre el 32,1% y un 45,6% a lo largo de estos años) (Di Blasio *et al.*, 2020).

Al igual que en estudios similares realizados en España (Sánchez-Barbudo *et al.*, 2012) y en otros países europeos, nuestros resultados revelan que los insecticidas son los plaguicidas más habitualmente implicados en los casos de cebos envenenados (Tabla 2). Y de entre los insecticidas, los compuestos anticolinesterásicos fueron los detectados más frecuentemente, tal como también indican otros estudios de ámbito europeo (Guitart *et al.*, 1999; Motas-Guzmán *et al.*, 2003; Guitart *et al.*, 2010; Giorgi y Mengozzi, 2011; Ruiz-Suárez *et al.*, 2015; Chiari *et al.*, 2017; Bertero *et al.*, 2020), particularmente los de presentación granular (muy fácilmente manipulables) y muy alta toxicidad (muy letales) (Berny, 2007; Martínez-Haro *et al.*, 2008). En Estados Unidos Fleischi *et al.* (2004) revisaron los datos de mortandad

del U.S. Geological Survey National Wildlife Health Center (NWHC) registrados desde 1980 hasta el año 2000 para identificar casos de envenenamientos de fauna silvestre por plaguicidas, atribuyendo a los envenenamientos por anticolinesterásicos el 0,96 % del total de las muertes de aves. Sin embargo, en un estudio más reciente realizado en el sur de Italia durante un periodo de 5 años (De Roma *et al.*, 2018) se encontró una tendencia diferente en el tipo de tóxicos utilizados en los cebos envenenados. El molusquicida metaldehído fue el más frecuentemente detectado (63,9%), seguido de los insecticidas organoclorados (29,2%, principalmente el endosulfán), los insecticidas organofosforados (11,1%) y los rodenticidas anticoagulantes (9,7%). Otros rodenticidas como la estricnina y el fosforo de zinc aparecieron en 1 solo caso.

Los rodenticidas anticoagulantes de segunda generación (SGARs) fueron el segundo mayor grupo en frecuencia de detección (Tabla 2), coincidiendo con otros estudios similares (Giorgi y Mengozzi, 2011; Chiari *et al.*, 2017). Sin embargo, no jugaron un papel de primera magnitud en el total de resultados obtenidos, a diferencia de otros estudios también similares como el de Guitart *et al.* (1999), Motas-Guzmán *et al.* (2003), Berny (2007), Bille *et al.* (2016) y Chiari *et al.* (2017), que detectaron una alta prevalencia en el uso de los SGARs en intoxicaciones intencionadas. Al igual que en nuestro estudio, los compuestos más implicados fueron bromadiolona, brodifacoum y difenacoum debido a su extendido y generalizado uso como rodenticidas. Los SGARs son tóxicos a baja dosis y tras una sola ingestión (Petterina y Biancardi, 2001; Berny, 2007), lo que incrementa el riesgo tanto en intoxicaciones primarias como secundarias (Chiari *et al.*, 2017) aunque su persistencia en campo puede verse afectada por diferentes factores (Sage *et al.*, 2007). Cabe mencionar que en los últimos años se ha reabierto en España el debate sobre el uso de estos compuestos como parte de las medidas para el control de plagas como la del topillo (*Microtus alvalis*) en Castilla y León. Estas medidas incluían el uso de productos que contenían clorofacinona (a través de granos de cereal tratados la misma) en 2007 y bromadiolona (a través de granos de

cereal tratados y matrices sólidas ceras) en 2013; como consecuencia, estas medidas causaron graves daños a diferentes especies de aves, liebres y carnívoros, entre otras (Viñuela *et al.*, 2010; Viñuela *et al.*, 2014).

Por otra parte, en nuestro estudio llama la atención que en un 8,1/8,5% de los casos/cebos aparecieron implicados varios compuestos en la misma muestra (resultados muy similares a los que encontraron en su trabajo Chiari *et al.* en el norte de Italia en 2017 en el que un 9,3% de los cebos analizados contenían más de un tóxico).

La estricnina se vio implicada solamente en 2 cebos, suponiendo una prevalencia mínima, yendo en concordancia con los resultados publicados por De Roma *et al.* (2018) en Italia. Según los trabajos publicados, las intoxicaciones por estricnina son muy variables en frecuencia de un lugar a otro respondiendo a diferentes factores (Blakley, 2009), y en el último informe sobre envenenamientos de fauna silvestre en España (De la Bodega *et al.*, 2020) se afirma que la estricnina se utiliza principalmente en el norte de España, siendo residual en otras zonas del país (concordando con nuestros resultados). Los fármacos como el fenobarbital (detectado en 2 cebos) se consideran actualmente contaminantes emergentes en relación al impacto sobre la fauna silvestre, principalmente en aves carroñeras debido al consumo de cadáveres de ganado que ha sido eutanasiado. También se han encontrado de manera puntual en cebos en estudios similares al nuestro (Wells *et al.*, 2020; Herrero-Villar *et al.*, 2021).

A lo largo de los años, la tendencia en el uso de las principales sustancias para elaborar cebos muestra un repunte del aldicarb y carbofurano durante los años inmediatamente posteriores a su prohibición (2003 y 2008 respectivamente) (Figura 6), demostrando su intencionalidad delictiva. El uso de fentión se relaciona con una concentración aislada de casos con características específicas y el uso de brodifacoum comienza a aparecer en los últimos años del estudio (coincidiendo con otros estudios mencionados anteriormente).

Un estudio recientemente publicado (Olea *et al.*, 2022) en el que se ha estudiado de manera empírica el daño potencial de los cebos ilegales, arroja unos resultados que complementan todo lo anteriormente comentado sobre la eficacia de los cebos. Además de la sustancia implicada en la elaboración del mismo, el número de especies y de individuos afectados también dependerá del peso del cebo y del hábitat en que sea colocado. Como ejemplo, demuestran que triplicar el tamaño de un cebo daría como resultado que un 21% más de especies consumirían ese cebo, mientras que el número de individuos afectados aumentaría entre un 41 y un 62%, dependiendo del hábitat. El estudio también nos permite conocer que los cebos colocados en hábitats abiertos (es decir, arbustos bajos intercalados con pastizales) afectan a más individuos que los cebos colocados en bosques y matorrales altos, probablemente porque especies altamente gregarias acceden fácilmente a los cadáveres ubicados en áreas abiertas.

Por todo lo mencionado en páginas anteriores, se evidencia en este tipo de prácticas criminales una clara intencionalidad de actuar contra especies diana como carnívoros, rapaces y carroñeros usando como vía de envenenamiento los cebos comestibles, pero también contra otras especies concretas como los abejarucos europeos (*Merops apiaster*) usando cebos o materiales que faciliten la absorción del veneno por vía dérmica (Figura 5).

Es sabido que los envenenamientos son el método más generalizado para matar depredadores en todo el mundo (Márquez *et al.*, 2012). En España, ya en 1993 Blanco y Villafuerte publicaron que muchos cazadores consideraban a los depredadores como la principal causa de las mermas en las poblaciones de conejos y algunos aceptaban el uso de métodos ilegales para matarlos. Posteriormente, Villafuerte *et al.* (1998) concluyeron que no existía correlación entre el número de conejos y la abundancia de sus depredadores y que había una opinión generalizada entre los cazadores de que había “demasiados milanos reales (*Milvus milvus*) en España”. Es obvio que la colocación intencional de cebos envenenados es una amenaza para la fauna y

puede acarrear consecuencias de gran alcance a nivel local y planetario (Fleischli *et al.*, 2004; Guitart *et al.*, 2010; Mateo-Tomás *et al.*, 2012). Los cebos envenenados pueden provocar la merma o la extinción de las poblaciones de carnívoros salvajes como el lobo (*Canis lupus*) (Ripple *et al.* 2014), el lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Rodríguez y Delibes, 1990) o el gato montés (*Felis silvestris*) (Lozano y Malo, 2012). Las intoxicaciones provocadas por esta actividad ilegal han sido descritas como la mayor amenaza para la conservación de diferentes especies de aves rapaces de Europa y Asia como, por ejemplo, del alimoche común (*Neophron percnopterus*) (Hernández y Margalida, 2009). Es más, los cebos envenenados han sido identificados como el principal factor limitante en la expansión de poblaciones reintroducidas de algunas rapaces como el milano real y el águila real (*Aquila chrysaetos*) en Escocia (Whitfield *et al.*, 2008; Smart *et al.*, 2010). Recientemente Mateo-Tomás *et al.*, (2020) publicaron un trabajo indicando que ha existe una relación directa durante los últimos 20 años entre el descenso de las parejas reproductoras de milano real en España y la frecuencia de casos de envenenamientos en fauna, demostrando que el aumento de los envenenamientos de milanos reales en una zona conlleva una disminución de la población reproductora de la especie aumentando el riesgo de extinción local.

Si bien se han llevado a cabo diferentes intentos para luchar contra el uso de cebos envenenados como la “Convención sobre la Conservación de Especies Migratorias de Animales Silvestres” para la protección de especies migratorias y sus hábitats, no existe actualmente un marco legal a nivel internacional para penalizar estas prácticas. A nivel europeo, la “Convención del Consejo de Europa sobre la Conservación de la Vida Silvestre y los Hábitats Naturales Europeos” (1979) o “convenio de Berna”, fue el primer acuerdo internacional para proteger las especies y sus hábitats y reunir los criterios de los países para decidir cómo actuar frente a la conservación de la naturaleza. La Directiva 2009/147/EC relativa a la conservación de las aves silvestre y la Directiva 92/43/EEC relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres son los actuales marcos legales

de la Unión Europea para aplicar las disposiciones contenidas en el Convenio de Berna.

En España la primera regulación legal sobre el uso de venenos para el control de depredadores del ganado (como el lobo) se remonta a casi 200 años de antigüedad. En el siglo XIX el Real Decreto del 3 de mayo de 1834 promovía y financiaba el uso de venenos para eliminar especies “dañinas” para la ganadería, y las posteriores regulaciones legales continuaron fomentando el uso de venenos para controlar a los depredadores con la autorización de la administración estatal. Estas medidas de gestión promovieron la persecución de especies que hoy en día están catalogadas como amenazadas o en peligro de extinción. En la década de los 70 y los 80 ya se castigaba legalmente el uso de algunos venenos. Finalmente, la Ley 4/1989 de 27 de marzo prohibía la tenencia, uso y comercialización de métodos masivos y no selectivos para matar animales y también se creó el “Catálogo Nacional de Especies Amenazadas”. En 1995, la Ley Orgánica 10/1995 de 23 de noviembre (Código Penal) ya penalizó el uso de venenos para la caza y pesca por ser un método no selectivo y en 2007 la Ley 42/2007 de 13 de diciembre estableció la prohibición de todos los procedimientos masivos y no selectivos para capturar o matar animales.

Posteriormente el sistema de monitoreo llamado “Programa ANTÍDOTO” se instauró en España en 1998 (De la Bodega *et al.*, 2020) para proporcionar información clara sobre el impacto de las sustancias tóxicas sobre la fauna silvestre a un amplio nivel espacial y temporal; además, diferentes administraciones regionales desarrollaron normas legales contra estas prácticas criminales. En concreto, en Extremadura están reguladas por la Ley 8/1998, de 26 de junio, de Conservación de la Naturaleza y de Espacios Naturales de Extremadura y por la Ley 14/2010, de 9 de diciembre de Caza de Extremadura. Además, este marco legal incluye estrategias y planes desarrollados tanto a nivel nacional como regional para prevenir y perseguir este delito, como por ejemplo la “Estrategia Extremeña Contra el Uso Ilegal de Cebos Envenenados en el Medio Natural” que abarca cinco puntos cruciales

(Extremadura. Orden de 27 de marzo de 2015): 1. El aumento y la fluidez en el intercambio de información y mejora del conocimiento; 2. Desarrollo y ejecución de operativos específicos encaminados a la prevención y disuasión; 3. La investigación y persecución del delito; 4. Actuaciones penales y administrativas; y 5. Otras actuaciones complementarias de las anteriores.

Estas restricciones legales y demás medidas para luchar contra estas prácticas están permitiendo que las especies se recuperen gradualmente, pero también están resucitando viejos conflictos económicos y ambientales, los cuales pueden agravarse en las zonas compartidas por una importante actividad cinegética, de ganadería extensiva y de gran diversidad de fauna silvestre que incluye especies depredadoras (Virgós y Travaini, 2005; Márquez *et al.*, 2012).

3.7. Conclusiones

Este estudio proporciona, por primera vez, datos epidemiológicos actualizados y útiles sobre el uso de cebos envenenados en Extremadura (España), una región con un valor ecológico muy alto para la biodiversidad en Europa y donde conviven la agricultura, la ganadería y la caza. Los plaguicidas anticolinesterásicos son los compuestos más frecuentemente utilizados para elaborar cebos envenenados, siendo los carbamatos aldicarb y carbofurano los más implicados, mostrando una clara intencionalidad de envenenamiento de especies objetivo y no objetivo (rapaces, carnívoros y otros). Su uso puede provocar una disminución, o afectar a la distribución, de varias especies amenazadas que habitan en Extremadura, incluidos mamíferos como el lince ibérico-*Lynx pardinus* (la especie de felino más amenazada del mundo) y el lobo ibérico-*Canis lupus signatus*, así como aves como el águila imperial ibérica (una de las aves más raras y amenazadas del mundo), milano real, buitre negro-*Aegypius monachus*, cigüeña negra-*Ciconia nigra* o águila perdicera-*Aquila fasciata*). Esto es consecuencia de un conflicto duradero entre humanos y depredadores, que ha sido respaldado legal y culturalmente en España durante décadas. Incluso si estas prácticas criminales están prohibidas, no existe un marco legal que pueda abordarse a nivel internacional. En zonas donde confluyen importante actividad cinegética, ganadería extensiva y una rica fauna de aves rapaces y mamíferos carnívoros, estos conflictos han resurgido al mismo tiempo que las restricciones legales y los esfuerzos contra estas malas prácticas intentan ser efectivos. La incidencia de cebos envenenados es extremadamente preocupante, y las acciones (medidas legales y educativas a nivel mundial) para reducir esta práctica ilegal y su impacto ambiental aún son urgentes. Nuestros hallazgos pueden ser útiles para mejorar las medidas de prevención y control.

3.8. Bibliografía

- A** Antoniou, V., Zantapoulus, N., Skartsi, D., Tsoukali-Papadopoulou, H. 1996. Pesticide poisoning of animals of wild fauna. *Vet. Hum. Toxicol.* 38, 212-213.
- B** Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 93-100.
- Berny, P., Caloni, F., Croubels, S., Sachana, M., Vandembroucke, V., Davanzo, F., Guitart, R. 2009. Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Vet. J.* 183 (3), 255-259.
- Berny, P., Vilagines, L., Cugnasse, J.M., Mastain, O., Chollet, J.Y., Joncour, G., Razin, M. 2015. Vigilance Poison: Illegal poisoning and lead intoxication are the main factors affecting avian scavenger survival in the Pyrenees (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 71-82.
- Bertero, A., Chiari, M., Vitale, N., Zanoni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., Caloni, F. 2020. Types of pesticides involved in domestic and wild animal poisoning in Italy. *Sci. Total Environ.* 707, 136129.
- Biancardi, A., Aimo, C., Piazza, P., Lo Chiano, F., Rubini, S., Baldini, E., Vertuani, S., Manfredini, S. 2022. Acetylcholinesterase (AChE) Reversible inhibitors: the role of oxamyl in the production of poisoned baits. *Toxics.* 10 (8), 432.
- Bille, L., Toson, M., Mulatti, P., Dalla Pozza, M., Capolongo, F., Casarotto, C., Ferrè, N., Angeletti, R., Gallochio, F., Binato, G. 2016. Epidemiology of animal poisoning: An overview on the features and spatio-temporal distribution of the phenomenon in the north-eastern Italian regions. *Forensic Sci. Int.* 266, 440-448.
- Blakley, B.R. 2009. The association of bait formulation of strychnine with poisonings in nontarget species in Saskatchewan from 1975 to 2007. *Can. Vet. J.* 50, 1186-1188.
- Blanco, J. C., Villafuerte, R. 1993. Factores ecológicos que influyen sobre las poblaciones de conejos. Incidencia de la enfermedad hemorrágica. Informe técnico. MITECO. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies-amenazadas/vertebrados/conejo_incidencia.asp.
- Bodega-Zugasti, D. 2014. Illegal use of poisoned baits: Legal analysis and investigation. SEO/Birdlife-Proyecto Life+VENENO project, Madrid.
- Brown, P., Charlton, A., Cuthbert, M., Barnett, L., Ross, L., Green, M., Gillies, L., Shaw, K., Fletcher, M. 1996. Identification of pesticide poisoning in wildlife. *J. Chromatogr. A* 754 (1-2), 463-478.
- Brown, P.M., Turnbull, G., Charman, S., Charlton, A.J.A., Jones, A. 2005. Analytical methods used in the United Kingdom

wildlife incident investigation scheme for the detection of animal poisoning by pesticides, *J. AOAC Int.* 88, 204–220.

- C** Caloni, F., Berny, P., Croubels, S., Sachana, M., Guitart, R. 2018. Epidemiology of animal poisonings in Europe. En: Gupta R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology*. Elsevier, pp. 45-46.
- Cano, I.M., Taboada, F.G., Naves, J., Fernández-Gil, A., Wiegand, T. 2016. Decline and recovery of a large carnivore. Environmental change and long-term trends in an endangered brown bear population. *Proc. Royal Soc. B* 283 (1843), 20161832.
- Chiari, M., Cortonovis, C., Vitale, N., Zanoni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., Caloni, F. 2017. Pesticide incidence in poisoned baits: a 10-years report. *Sci. Total Environ.* 601-602, 285-292.
- Cozza, K., Fico, R., Battistini, M.L., Rogers, E. 1996. The damage conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biol. Conserv.* 78, 329–336.
- D** De la Bodega, D., Cano, C., Mínguez, E. 2020. El veneno en España. Evolución del envenenamiento de fauna silvestre (1992-2017). WWF y SEO/BirdLife. Madrid. Disponible en: https://www.wwf.es/nuestro_trabajo/especies_y_habitats/veneno/?55122/El-veneno-en-Espana-Evolucion-del-envenenamiento-de-fauna-silvestre-1997-2017.
- De Roma, A., Miletti, G., D'Alessio, N., Marigliano, L., Bruno, T., Gallo, P., Binato, G., Esposito, M. 2018. Inspective and toxicological survey of the poisoned baits and bites. *Forensic Sci. Int.* 287, 108-112.
- Di Blasio, A., Bertolini, S., Gili, M., Avolio, R., Leogrande, M., Ostorero, F., Ru, G., Dondo, A., Zoppi, S. 2020. Local context and environment as risk factors for acute poisoning in animals in northwest Italy. *Sci. Total Environ.* 709, 136016.
- E** España, 2007. Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad.
- España, 1989. Ley 4/1989, de 27 de marzo, de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestre. *Boletín Oficial del Estado*, 28 de marzo de 1989, 74, 8262-8269.
- España, 1995. Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, de los Delitos Relativos a la Ordenación del Territorio y el Urbanismo, la Protección del Patrimonio Histórico y el Medio Ambiente. *Boletín Oficial del Estado*, 24 de noviembre de 1995, 281, 33987-34058.
- España, 2010. Ley Orgánica 5/2010, de 22 de junio, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. *Boletín Oficial del Estado*, 23 de junio de 2010, 152, 54811-54883.
- España, 2007. Ley 42/2007, de 13 de diciembre, de Patrimonio Natural y Biodiversidad. *Boletín Oficial del Estado*, 14 de diciembre de 2007, 299, 51275-51327.
- España, 1998. Ley 8/1998, de 26 de junio, de Conservación de la Naturaleza y de Espacios

Naturales de Extremadura. Boletín Oficial del Estado, 27 de junio de 1998, 200, 28606-28628.

EU Action Plan. 2015. A proposal for a EU Action Plan to prevent illegal poisoning of wildlife. In: II European Workshop on Environmental Crime: Illegal Poisoning of Wildlife. Barcelona. pp. 1–25.

Extremadura, 2010. Ley 14/2010, de 9 de diciembre, de caza de Extremadura. Diario Oficial de Extremadura, de 15 de diciembre de 2010, 239, 29572-29634.

Extremadura, 2015. Orden de 27 de marzo de 2015 por la que se aprueba la Estrategia Extremeña contra el uso ilegal de cebos envenenados en el medio natural. Diario Oficial de Extremadura, 8 de abril de 2015, 66, 10625-10635.

F Fleischli, M.A., Franson, J.C., Thomas, N.J., Finley, D.L., Riley Jr., W. 2004. Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: A retrospective summary of National Wildlife Health Center records from 1980 to 2000. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 542-550.

Franson, J.C., Thomas, N.J., Smith, M.R., Robbins, A.H., Newman, S., McCartin, P.C. 1996. A retrospective study of post-mortem findings in red tailed hawks. *J. Raptor Res.* 30 (1), 7-14.

G Gil-Sánchez, J.M., Aguilera-Alcalá, N., Moleón, M., Sebastián-González, E., Margalida, A., Morales-Reyes, Z., Durán-Aleman, C.J., Oliva-Vidal, P., Pérez-García,

J.M, Sánchez-Zapata, J.A. 2021. Biases in the detection of intentionally poisoned animals: Public health and conservation implications from a field experiment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 1201.

Giorgi, M., Mengozzi, G. 2011. Malicious animal intoxications: poisoned baits. *Vet. Med-Czech.* 56 (4), 173-179.

Graham, K., Beckerman, A.P., Thirgood, S. 2005. Human-predator-prey conflicts: ecological correlates, prey losses and patterns of management. *Biol. Conserv.* 122, 159–171.

Guitart, R., Manosa, S., Guerrero, X., Mateo, R. 1999. Animal poisoning: 10-year experience of a veterinary analytical toxicology laboratory. *Vet. Hum. Toxicol.* 41 (5), 331-335.

Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubels, S., Vandenbroucke, V., Berny, P. 2010. Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Vet. J.* 183, 260-265.

Gupta, R. 2018. Epidemiology of animal poisonings in Asia, in: Gupta R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology*. Elsevier, pp. 613-626.

H Hernández, M., Margalida, A. 2009. Poison-related mortality effects in the endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 415-423.

Herrero-Villar, M., Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Taggart, M.A., Mateo, R. 2021. Increasing incidence of barbiturate intoxication in avian scavengers and

mammals in Spain. *Environ. Pollut.* 284, 117452.

- I** INE (Instituto Nacional de Estadística), 2020. Población por comunidades y ciudades autóctonas y tamaño de los municipios. Disponible en: <http://www.ine.es> (Accessed 01/06/2021).
- J** Jones, A., Charlton, A. 1999. Determination of metaldehyde in suspected cases of animal poisoning using gas chromatography– ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47 (11), 4675-4677.
- K** Kaczensky, P. 1999. Livestock–carnivore conflicts in Europe. A selection of papers from the Eleventh International Conference on Bear Research and Management, Graz, Austria, September 1997 and Gatlinburg, Tennessee, April 1998, 11, 59-72.
- L** Lahmar, R., Berny, P., Mahjoub, T., Ben Youssef, S. 2019. Animal pesticide poisoning in Tunisia. *Front. Vet. Sci.* 6, 369.
- Lozano, J., Malo, A.F. 2012. Conservation of European wildcat (*Felis silvestris*) in Mediterranean environments: a reassessment of current threats. En: Williams, G.S. (Ed.), *Mediterranean ecosystems: dynamics, management conservation*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, pp. 1-31.
- Luzardo, O.P., Ruiz-Suarez, N., Valeron, P.F., Camacho, M., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Boada, L.D. 2014. Methodology for the identification of 117 pesticides commonly involved in the poisoning of wildlife using GC–MS-MS and LC–MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 38 (3), 155-163.
- M** Margalida, A. 2012. Baits, budget cuts: a deadly mix. *Science* 338, 192.
- Margalida, A., Colomer, M.A., Oro, D. 2014. Man-induced activities modify demographic parameters in a long-lived species: effects of poisoning and health policies. *Ecol. Appl.* 24 (3), 436-444.
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-Lopez, M., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2008. Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 396-402.
- Márquez, C., Vargas, J.M., Villafuerte, R., Fa, J.E. 2013. Understanding the propensity of wild predators to illegal poison baiting. *Anim. Conserv.* 16 (1), 118-129.
- Márquez, C., Vargas, J.M., Fa, J.E. 2012. Risk Mapping of Illegal Poisoning of Avian and Mammalian Predators. *J. Wildl. Manag.* 77 (1), 75-83.
- Mateo-Tomás, P., Olea, P.P., Sánchez-Barbudo, I.S., Mateo, R. 2012. Alleviating human–wildlife conflicts: identifying the causes and mapping the risk of illegal poisoning of wild fauna. *J. Appl. Ecol.* 49, 376-385.
- Mateo-Tomás, P., Olea, P. P., Mínguez, E., Mateo, R., Viñuela, J. 2020. Direct evidence of poison-driven widespread population decline in a wild vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (28), 16418–16423.

- Mazzoli, M., Graipel, M.E., Dunstone, N. 2002. Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biol. Conserv.* 105 (1), 43-51.
- Mech, L.D., Harper, E.K., Meier, T.J., Paul, W.J. 2000. Assessing factors that may predispose Minnesota farms to wolf depredations on cattle. *Wildl. Soc. Bull.* 28 (3), 623-629.
- Mineau, P., Fletcher, M.R., Glaser, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliott, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T., Porter, S.L. 1999. Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, US and UK. *J. Raptor Res.* 33, 1-37.
- Mineau, P. 2002. Estimating the probability of bird mortality from pesticide spray on the basis of the field study records. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 67-76.
- Motas-Guzmán, M., María-Mojica, P., Romero, D., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J. 2003. Intentional poisoning of animals in southeastern Spain: a review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. *Vet. Hum. Toxicol.* 45 (1), 47-50.
- N** Ntemiri, K., Saravia, V., Angelidis, C., Baxevani, K., Probonas, M., Kret, E., Mertzanis, Y., Iliopoulos, Y., Georgiadis, L., Skartsi, D., Vavylis, D., Manolopoulos, A., Michalopoulou, P., Xirouchakis, S.M. 2018. Animal mortality and illegal poison bait uses in Greece. *Environ. Monit. Assess.* 190 (8), 488.
- O** Olea, P.P., Fernández-García, M., López-Bao, J. V., Viñuela, J., Valente e Santos, J. P., Rodríguez-Pérez, J., Sotelo, L., Cortizo, C., Sazatornil, V., Planella Bosch, A., Gutiérrez, I., Pereira, P., Luna Aguilera, S.J., Rivas, Ó., Suárez, E., Lema, F.J., del Rey, M. G., Martínez-Delgado, A., Mateo-Tomás, P. 2022. Unraveling the real magnitude of illegal wildlife poisoning to halt cryptic biodiversity loss. *Biol. Conserv.* 273, 109702.
- P** Pedersen, V., Linnell, J.D.C., Andersen, R., Andrén, H., Lindén, M., Segerström, P. 1999. Winter lynx *Lynx lynx* predation on semidomestic reindeer *Rangifer tarandus* in northern Sweden. *Wildlife Biol.* 5 (4), 203-211.
- Petterino, C., Biancardi, P. 2001. Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet. Hum. Toxicol.* 43, 353-360.
- R** Rengifo, J.I., Sánchez, J.M. 2016. Caza y espacios naturales protegidos en Extremadura. *Investig. Geogr.* 65, 57-73.
- Reynolds, J.C., Tapper, S.C. 1996. Control of mammalian predators in game management and conservation. *Mamm. Rev.* 26 (2/3), 127-156.
- S** Saldaña, L., Alonso, C., Carbonell, G., 1981. Identificación analítica de venenos utilizados en el exterminio de alimañas y aves perjudiciales a la agricultura. *Anales INIA Serie Agrícola.* 15, 145-149.
- Ripple W.J., Estes, J.A., Beschta, R.L., Wilmers, C.C., Richie, E.G., Hebblewhite, M., Berger, J., Elmhagen, B., Letnic, M.,

- Nelson, M.P., Schmitz, O.J., Smith, D.W., Wallach, A.D., Wirsing, A.J. 2014. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* 343 (6167), 1241484.
- Rodríguez, A., Delibes, M. 1990. El lince ibérico en España: distribución y problemas de conservación. Serie Técnica del Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Ruiz-Suárez, N., Boada, L.D., Henríquez-Hernández, L.A., González-Moreo, F., Suárez-Pérez, A., Camacho, M., Zumbado, M., Almeida-González, M., Del Mar Travieso-Aja, M., Luzardo, M. 2015. Continued implications of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). *Sci. Total Environ.* 505, 1093-1099.
- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Lucot, E., Barbier, B., Rieffel, D., Berny, P., Giraudoux, P. 2007. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? *Environ. Pollut.* 148, 372-379.
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Mateo, R. 2012. Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y domésticas en España: diferencias entre Comunidades Autónomas. *Rev. Toxicol.* 29, 20-28.
- Smart, J., Amar, A., Sim, I.M.W., Etheridge, B., Cameron, D., Christie, G., Wilson, J.D. 2010. Illegal killing slows population recovery of a re-introduced raptor of high conservation concern – The red kite *Milvus milvus*. *Biol. Conserv.* 143, 1278-1286.
- Smith, R.A. 1987. The determination of volatile carbonyl compounds in diagnostic samples. *Vet. Hum. Toxicol.* 29 (3), 244-245.
- Soler, F., Oropesa, A.L., Pérez, M. 2006. Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. *Rev. Toxicol.* 23 (1), 35-38.
- Stahr, H.M., 1991. Analytical Methods in Toxicology. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Shoterton, N., Tapper S., Smith, A. 2009. Hen harriers and red grouse: economic aspects of red grouse shooting and the implications for moorland conservation. *J. Appl. Ecol.* 46, 955-960.
- T** Thirgood, S.J., Redpath, S.M. 2008. Hen harriers and red grouse: science, politics and human-wildlife conflict. *J. Appl. Ecol.* 45, 1550-1554.
- Thirgood, S.J., Redpath, S.M., Newton, I., Hudson, P. 2000. Raptors and red grouse: conservation conflicts and management solutions. *Conserv. Biol.* 14, 95-104.
- V** Valverde, I., Espín, S., Gómez-Ramírez, P., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A.J., Berny, P. 2022. Developing a European network of analytical laboratories and government institutions to prevent poisoning of raptors. *Environ. Monit. Assess.* 194, 113.

Villafuerte, R., Viñuela, J., Blanco, J.C. 1998. Extensive predator persecution caused by population crash in a game species: the case of red kites and rabbits in Spain. *Biol. Conserv.* 84, 181-188.

Viñuela, J., Luque, J.J., Fargallo, J.A., Olea, P., Paz, A., Mougeot, F. 2010. Conflictos entre la agricultura y la biodiversidad. Las plagas de topillos en Castilla y León. En: *Agricultura Familiar en España 2010*, pp. 199-206. Unión de Pequeños Agricultores y Ganaderos. Madrid.

Viñuela, J. 2019. Las plagas de topillo campesino en Castilla y León: el conflicto con las especies cinegéticas y la conservación de la biodiversidad. *Foresta* 73. 84.

W Wells, K., Butterworth, A., Richards, N. 2020. A review of secondary pentobarbital poisoning in scavenging wildlife, companion animals and captive carnivores. *J. Vet. Forensic Sci.* 1, 1-15.

Whitfield, D.P., Fielding, A.H., McLeod, D.R.A., Haworth, P.F. 2008. A conservation framework for golden eagles: implications for their conservation and management in Scotland. *Scottish Natural Heritage Commissioned Report No.193 (ROAME No. F05AC306)*.

Z Zoun, P.E.F., Spierenburg, T.J. 1989. Determination of cholinesterase-inhibiting pesticides and some of their metabolites in cases of animal poisoning using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* 462, 448-453.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

4

Adaptación del método QuEChERS para el análisis de OCs y PCBs en aves silvestres

4. Adaptación del método QuEChERS para el análisis de OCs y PCBs en aves silvestres

4.1. Resumen

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) se han relacionado con graves anomalías en las poblaciones de fauna silvestre, obligando a su regulación a nivel internacional. Si bien gracias a estas medidas se ha conseguido la disminución progresiva de la carga corporal de estos compuestos en todo el mundo, las concentraciones siguen siendo altas. La evolución de los niveles de estos contaminantes en aves es un buen reflejo de los cambios en su biodisponibilidad ambiental, permitiendo identificar las tendencias de las concentraciones ambientales para evaluar la efectividad de las medidas de control internacional; ello muestra la gran relevancia del estudio de los niveles de los COPs en la actualidad. Para su análisis, los métodos multiresiduo (MMR) han sido los de elección de manera generalizada, pero ninguno ha llegado a ser considerado como “el ideal” para tal fin pues todos ellos son laboriosos y requieren bastante tiempo. En este contexto, y para solventar estas deficiencias, surgió la idea del método QuEChERS, descrito por primera vez por Anastassiades et al. en 2003. En el presente estudio, el uso del método QuEChERS como método de extracción y purificación de plaguicidas para su posterior análisis por GC-MS fue adaptado y validado para el análisis de 19 COPs, concretamente 11 organoclorados (OCs) (α HCH, β HCH, γ HCH, δ HCH, heptacloro, aldrín, heptacloro epóxido, DDE, DDD, endosulfán sulfato y DDT) y 8 bifenilos policlorados (PCBs) (congéneres 28, 52, 101, 118, 153, 138, 180 y 169), en muestras de hígado de ave. La linealidad fue $\geq 0,9$ y la precisión $< 20\%$ (entre 0,63% y 19,35%) para un rango de concentraciones de 1 a 100 ng/g. Los límites de detección (LOD) variaron entre 0,20 y 2,03 ng/g para los plaguicidas OCs y entre 0,93 y 4,49 ng/g para los PCBs. Los límites de cuantificación (LOQ) estuvieron entre 0,67 y 6,78 ng/g para los OCs y entre 3,11 y 14,97 ng/g para los PCBs. Se calculó el efecto

matriz, siendo ligeramente negativo para α HCH, heptacloro y aldrín, y ligeramente positivo en el resto de compuestos. Posteriormente, se aplicó el método sobre 60 hígados de aves silvestres pertenecientes a tres grupos tróficos diferentes: 20 individuos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), 20 de milano real (*Milvus milvus*) y 20 de buitre leonado (*Gyps fulvus*), encontrados muertos en el medio natural de Extremadura (España). Se detectó (valores >LOD) una media de 11 compuestos por muestra. Se observó una considerable dispersión de los resultados para cada compuesto y en cada especie, así como la existencia de valores extremos. Por ello, a efectos comparativos, se consideró la mediana de cada grupo, en vez de la media aritmética, por ser una medida más robusta bajo estas condiciones. Las medianas obtenidas de cada compuesto en cigüeña blanca oscilaron entre un mínimo de 0,77 ng/g de PCB28 y un máximo de 51,13 ng/g de DDE; en milano real entre 0,75 ng/g de PCB28 y 227,00 ng/g de DDE; y en buitre leonado entre 0,76 ng/g de PCB118 y 63,20 ng/g de DDE, coincidiendo en las 3 especies los valores máximos para el DDE, que se detectó en el 100% de las muestras. Por otro lado, siete de los compuestos (δ HCH, heptacloro, PCB52, aldrín, endosulfán sulfato, DDT y PCB169) no se detectaron en más del 50% de las muestras y, por tanto, los resultados no se procesaron estadísticamente. El milano real presentó las medianas de mayor valor en todos los compuestos excepto en el β HCH (mayor valor en buitre leonado), en el DDD (mayor valor en cigüeña) y el PCB28 (mayor valor en buitre leonado). El aldrín fue el compuesto con menor frecuencia de detección. Estadísticamente, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de la mayoría de los compuestos entre especies, excepto en 5 compuestos (DDE, DDD, PCB153, PCB138 y PCB180), constatando que las rapaces (milano real y buitre leonado) acumulan más COPs que las especies oportunistas (cigüeña blanca).

4.2. Palabras clave

QuEChERS; COPs; plaguicidas organoclorados; PCBs; hígado; aves

4.3. Introducción

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs), también conocidos por su acrónimo en inglés POPs (*Persistent Organic Pollutants*), son compuestos orgánicos de síntesis que incluyen a los bifenilos policlorados (PCBs), los plaguicidas organoclorados (OCs) y otros residuos derivados de actividades industriales como dioxinas y furanos.

Su origen se remonta al s. XIX. En 1874 se sintetizó por primera vez el compuesto organoclorado DDT (diclorodifeniltricloroetano) y, 65 años después, en 1939, Paul Müller descubrió su actividad insecticida (Carson, 1962); tras la Segunda Guerra Mundial se generalizó su uso agrícola como insecticida, incrementándose durante las siguientes décadas por todo el mundo (Hayes, 1991). Los OCs fueron utilizados de manera generalizada en la agricultura y el control de insectos para prevenir la propagación de enfermedades a mediados S. XX. En los EE.UU. su uso se duplicó entre 1960 y 1980 (Benbrook, 2002). El desarrollo industrial llevó en la segunda mitad del s. XX a que el origen y la utilización de todos los COPs hayan girado en torno a tres campos principales: como productos fitosanitarios, como productos de uso industrial y aquellos emitidos de forma no intencional en procesos de combustión (industrial o, en menor medida, natural como incendios forestales o erupciones volcánicas).

Dada la generalización de su utilización y la gran preocupación por la amenaza que han venido suponiendo los COPs para el medio ambiente, en 2001 se firmó el principal acuerdo internacional (Convenio de Estocolmo) para proteger la salud humana y el medioambiente de los efectos nocivos de los COPs, restringiendo y, en última instancia, eliminando su producción, utilización, comercialización, liberación y almacenamiento, intencionados o no intencionados. Este Convenio se aplicó en la Unión Europea mediante el *Reglamento (CE) 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004*, y, en 2006, la *Decisión 2006/507/CE del Consejo, de 14 de octubre de 2004*, le otorgó la aprobación jurídica. En 2007 se aprobó en España el Plan Nacional

de Aplicación (PNA) (MMA, 2007) para la aplicación del Convenio de Estocolmo, que fue actualizado mediante la *Resolución de 10 de abril de 2013, de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural*. El Convenio ha ido incorporando los diferentes contaminantes para su regulación a lo largo de los años, de manera que la comercialización de los mismos se encuentra controlada o prohibida.

Los COPs son, en general, muy resistentes a la degradación (fotolítica, biológica o química) una vez llegan al medio ambiente, por lo que persisten en él largos periodos de tiempo. También tienden a acumularse gradualmente en los tejidos grasos de los organismos vivos (bioacumulación) (Holden, 1966; Jones y de Voogt, 1999; Burreau *et al.*, 2004; Deribe *et al.*, 2011) y a aumentar su concentración en los tejidos al ir subiendo niveles en la cadena trófica (biomagnificación) (Mackay y Fraser, 2000; Rognerud *et al.*, 2002; Burreau *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2007). Otra característica que poseen es que pueden dispersarse a largas distancias en el organismo de especies migratorias, pero también en estado libre semivolatilizado a través del ambiente. Normalmente se originan/usan en zonas industrializadas y se transportan/difunden por la atmósfera pues la temperatura favorece su volatilización, pudiéndose encontrar en cualquier parte del planeta donde no han sido utilizados ni producidos. Esto es altamente preocupante por la amenaza que suponen para la fauna y el ser humano (Wania y Mackay, 1993; Simonich y Hites, 1995; Blais *et al.*, 1998; Rosseland *et al.*, 1999; Rognerud *et al.*, 2002; Nøst *et al.*, 2018).

En relación a la fauna silvestre, se ha documentado que desde 1974 las poblaciones se han visto reducidas en un 60% en todo el mundo (WWF, 2018) debido a diferentes causas antropogénicas y, entre ellas, la penetración y persistencia de compuestos químicos en la naturaleza (Hernout *et al.*, 2011; Rial-Berriel *et al.*, 2020). Uno de los grupos químicos más estudiados en la vida silvestre es precisamente el de los COPs ya que se ha relacionado con la disminución de las poblaciones o anomalías en especies de peces, aves y mamíferos (Luzardo *et al.*, 2014). Los esfuerzos de la comunidad internacional para regular estos

compuestos han conseguido la disminución progresiva de la carga corporal de COPs en la vida silvestre en todo el mundo (Nizzetto *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2014; Hung *et al.*, 2016; West *et al.*, 2017; Kucklick *et al.*, 2022; Elliott *et al.*, 2023) aunque las concentraciones siguen siendo altas, sobre todo en los depredadores de niveles tróficos altos. Como la velocidad de degradación metabólica de COPs en la fauna silvestre, aunque baja, es más rápida que la de degradación ambiental de los mismos, las variaciones de la concentración en los organismos son un buen indicador de su biodisponibilidad ambiental, permitiendo identificar las tendencias en los niveles ambientales para evaluar la efectividad de las medidas de control internacional. Cabe destacar que, tras casi 40 años desde la prohibición de su uso, los PCBs siguen siendo los COPs más abundantes encontrados en los tejidos de fauna silvestre, seguidos de cerca por los OCs (de Solla, 2015). Por todas estas razones, el estudio de los niveles de COPs en fauna silvestre continúa siendo imprescindible para seguir gestionando todos los problemas generados.

El análisis de estos compuestos ha presentado siempre el inconveniente de la complejidad de las matrices, particularmente de aquéllas que tienen mayor contenido en lípidos, como son ciertos tejidos orgánicos de los animales (hígado, sistema nervioso, tejido graso). En estos tejidos siempre se ha utilizado algún solvente orgánico, individual o en mezcla, para extraer los compuestos, siendo necesario eliminar las impurezas del extracto, para lo cual se han utilizado distintas opciones (purificación líquido-líquido, extracción en fase sólida, en columna o dispersiva, cromatografía de permeación en gel, con ácido sulfúrico, etc) (Gilbert-López *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2022).

En los últimos años se está imponiendo en los laboratorios analíticos la metodología QuEChERS, que surgió para la extracción y purificación de una amplia variedad de plaguicidas en frutas y verduras de la mano de Anastassiades *et al.* en 2003. El acrónimo hace referencia a las palabras en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe* (rápido, simple, barato, efectivo, robusto y seguro), las cuales definen las ventajas aportadas por el método. De manera

general, consiste en un método de análisis multirresiduo rápido y muy poco laborioso que combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo (ACN) de la muestra homogeneizada, seguida de una partición líquido-líquido al adicionar sales como el sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$) y NaCl. Posteriormente, sobre el extracto resultante se lleva a cabo simultáneamente la eliminación del agua y su limpieza mediante dSPE con una mezcla de $MgSO_4$ y adsorbentes, básicamente amina primaria secundaria (PSA), C18 o carbón negro grafitizado para eliminar muchas impurezas como ácidos orgánicos, pigmentos polares y azúcares que pueden interferir en la identificación de los plaguicidas. Tras mezcla y centrifugación, el extracto queda preparado para su análisis cromatográfico (GC-MS o LC-MS), si bien los mejores resultados se dan cuando se usan detectores triple cuadrupolo (MS/MS) ya que permiten una buena sensibilidad sin la necesidad de una purificación importante del extracto a analizar. Dadas las ventajas que supone frente a los métodos tradicionales, tal y como su propio nombre indica, en cuanto al ahorro de mano de obra, tiempo y material, y buenos resultados, no han dejado de publicarse adaptaciones del mismo para diferentes tipos de matrices y analitos, con aplicaciones tanto en toxicología alimentaria o ambiental como en toxicología forense humana y veterinaria. La muestra biológica más común en estas últimas disciplinas para su análisis es la sangre al poderse tomar del animal vivo o muerto. Por ejemplo, Rial-Berriel *et al.* (2020) consiguieron determinar un total de 306 tóxicos (entre ellos 40 COPs) en sangre de aves rapaces, y más recientemente hasta 353 compuestos en suero de camello y humano (Rial-Berriel *et al.*, 2023). En toxicología humana también se ha usado directamente en muestras de sangre (Plassmann *et al.*, 2015), así como de leche materna (Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019) o hígado (Usui *et al.*, 2014). Los estudios en toxicología forense humana son fuente de conocimiento para aplicación a la veterinaria y viceversa ya que las matrices y los compuestos a analizar son prácticamente iguales. Ocurre de la misma manera con la aplicación en muestras alimentarias de origen animal (Deribe *et al.*, 2011; Surma *et al.*, 2014) o incluso de origen vegetal, pero con alto

contenido en grasa (Chung y Chen, 2011). De hecho, la toxicología alimentaria fue el campo de aplicación original de este método y donde más estudios se han ido realizando hasta que se han ido diversificando los campos de aplicación. En toxicología forense veterinaria cuando el animal ha muerto, el hígado suele ser el órgano de preferencia para determinar la presencia de tóxicos (Kinsella *et al.*, 2010; Saint-Hilaire *et al.*, 2018; Schanzer *et al.*, 2021). Considerando por tanto que el análisis de COPs en matrices complejas como el hígado es un campo de absoluta actualidad, en el presente trabajo se marcó como objetivo el adaptar la metodología QuEChERS para la extracción/purificación de OCs y PCBs en hígado de ave para su posterior determinación mediante GC/MS. Con el fin de evaluar la aplicabilidad del método, posteriormente se analizaron 60 muestras de hígado de distintas aves silvestres, pertenecientes a 3 niveles tróficos diferentes, recogidas en el medio natural para valorar sus concentraciones de OCs y PCBs.

4.4. Material y métodos

4.4.1. Solventes y reactivos

Como solventes, se utilizó acetonitrilo (ACN) (Carlo Erba, calidad para análisis de residuos), tetrahidrofurano (THF) (Scharlab, grado HPLC), acetona (Scharlab, calidad para análisis de residuos), éter de petróleo 40-60° (Scharlab, calidad para análisis de residuos), n-hexano (Scharlab, calidad para análisis de residuos) e isooctano (Scharlab, calidad para análisis de residuos).

Las sales utilizadas fueron MgSO_4 anhidro (Scharlab, >98%), ClNa (Scharlab, calidad para análisis de residuos), Na_2SO_4 anhidro (Scharlab, calidad para análisis de residuos), citrato sódico dibásico (Sigma, para análisis, >99%) y citrato sódico tribásico dihidratado (Sigma, para análisis, >99%).

Se usó ácido sulfúrico H_2SO_4 (Scharlab, 95-97% reagent grade).

4.4.2. Patrones

Los patrones de los compuestos clorados utilizados en este trabajo fueron:

- Aldrín, α HCH, β HCH, lindano, δ HCH, 4,4'-DDT, dieldrín, α -endosulfán, β -endosulfán, endosulfán sulfato, endrín, endrín aldehído, heptacloro, heptacloro epóxido (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en hexano:tolueno (50:50). EPA 625/CLP Pesticide Mix (SUPELCO 47914).
- 4,4'-DDE (100 mg, SUPELCO 35487).
- 4,4'-DDD (250 mg, SUPELCO 35486).
- Clordano (mezcla de isómeros) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en isooctano (SUPELCO 48065-U).
- PCB28, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180 (10 ng/ μl en isooctano) (Dr. Ehrenstorfer PCB-Mix 3).
- PCB 169: 10 ng/ μl en isooctano (Dr. Ehrenstorfer).
- PCB 143: 10 ng/ μl en isooctano (usado como patrón interno) (Dr. Ehrenstorfer).

A partir de estos reactivos se prepararon las distintas mezclas de patrones en función de las necesidades. Como patrón interno fue utilizado PCB 143. Tras su preparación, todos ellos se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en refrigeración a 4°C durante su uso.

4.4.3. Equipos utilizados

Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo de cromatografía de gases Shimadzu GC-2010 equipado con detector de espectrometría de masas (GC/MS) GCMS-QP2010 Plus, automuestreador AOC-20s y autoinyector AOC-20i, trabajando con las siguientes condiciones:

- Detector de masas en modo de ionización química negativa (CNI)

- Columna: SLB 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) de Supelco
- Gas portador: Helio
- Gas de reacción: Metano
- Flujo de columna: 0,89 ml/min
- Modo de control del flujo: Velocidad lineal
- Flujo total: 21,6 ml/min
- Sampling time: 1 min
- Volumen inyectado: 1 μ l
- Temperatura del detector: 200 °C
- Temperatura del inyector: 275 °C
- Temperatura de la interface: 300 °C
- Temperatura de la columna:

RAMPA (°C/MIN)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)
0	100	1
60	200	0
3	230	0
3	250	0
30	300	0
0	300	10

Los resultados fueron procesados con el software *GCMS Postrun Analysis*.

Otro equipamiento usado durante la preparación de las muestras ha sido:

- centrífuga Digicen 21R.
- homogeneizador UltraTurrax IKA T18Basic con vástago dispersor S18N-19G.
- agitador rotatorio IKA TYrayster digital

4.4.4. Puesta a punto del método

Para el estudio de validación del método se adquirieron hígados de pollo (*Gallus gallus domesticus*) en una cadena alimentaria de consumo humano y se mantuvieron en refrigeración a 4°C para ser utilizados como matriz de análisis libre de compuestos clorados (hígado blanco o HB).

· Optimización previa del proceso de extracción y purificación QuEChERS sobre HB

Para el proceso de extracción y purificación se utilizó como referencia el método desarrollado en el trabajo de Norli *et al.* (2011) sobre la aplicación del método QuEChERS en la extracción de COPs en tejidos grasos de salmón y que usa una mezcla de ACN:THF (75:25) como solvente de extracción y un paso de congelación del extracto y posterior exposición a CaCl₂ como forma de eliminación de lípidos. Las fases de este método de extracción y purificación son:

- homogeneizar 5 g de muestra con 10 ml de agua Milli-Q y 10 ml de disolvente,
- añadir una mezcla de 4 g de MgSO₄, 1g de ClNa, 0,5 g de citrato sódico dibásico y 1 gr de citrato sódico tribásico, agitar y centrifugar para la separación de fases,
- trasvasar 6 ml de la fase orgánica (disolvente) a un tubo de ensayo, congelar (-24 °C 2 horas), filtrar a un tubo conteniendo 1 g de CaCl₂, agitar y volver a centrifugar,
- y, finalmente, trasvasar el extracto a un tubo de centrífuga conteniendo 900 mg de MgSO₄ y 150 mg de PSA para su posterior agitación y centrifugación, consiguiendo así el extracto final que se analizaría por cromatografía gaseosa.

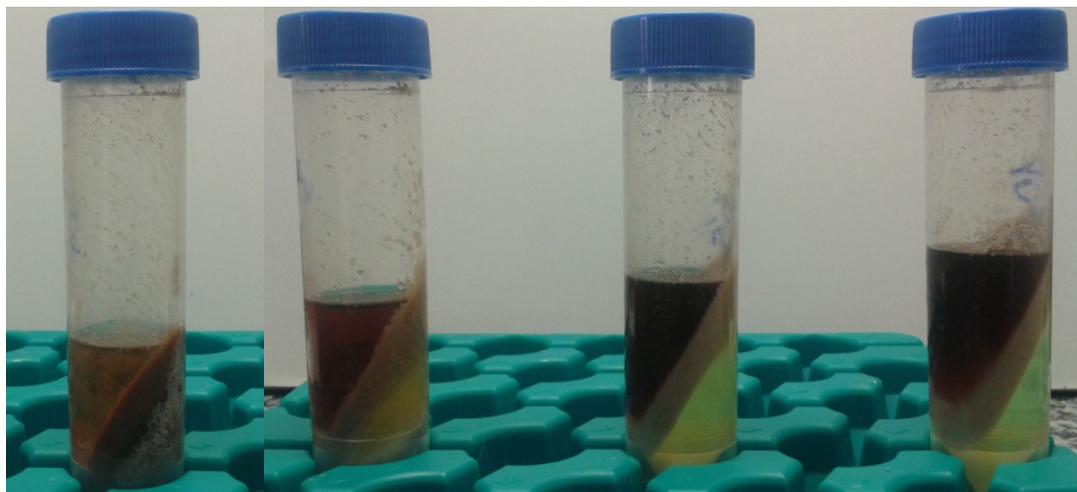
1. Modificación en la extracción (volúmenes de agua y solventes).

Durante la optimización del proceso para llegar al método final, se evaluaron sobre el HB dos estrategias en la fase de extracción:

- disminuir la cantidad de agua ultrapura añadida inicialmente (0, 3, 6,5 o 10 ml) a la muestra de hígado (5 gr) en el proceso de homogeneizado, y
- el uso de dos solventes de extracción distintos para cada uno de esos homogeneizados con distintas proporciones de agua: 10 ml de ACN solo y 10 ml de una mezcla de ACN: THF en proporción 75:25.

En concreto, este procedimiento se aplicó de la siguiente forma: en tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 ml se añadieron alícuotas de 5 gr de muestra ya homogeneizada, a las que se adicionaron los distintos patrones de compuestos clorados para conseguir concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 ng/g, dejándolas toda la noche en refrigeración. Al día siguiente, se añadía el patrón interno PCB143 y las diferentes cantidades de agua a cada muestra (0, 3, 6,5 o 10 ml), y 10 ml de ACN o de la mezcla ACN:THF (75:25), agitando intensamente durante 1 minuto a mano. Posteriormente, se añadían 4 g de $MgSO_4$, 1 g de $ClNa$, 0,5 g de citrato sódico dibásico y 1 gr de citrato sódico tribásico dihidrato y se procedía a su agitación con un agitador rotatorio durante 10 minutos, tras lo cual se centrifugaba a 4500 rpm durante 5 minutos (Figura 1). El sobrenadante fue transferido a un tubo de centrifuga tipo Falcon de 15 ml conteniendo 1 g de $CaCl_2$ y, tras agitación, es centrifugado de nuevo a 4500 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se trasvasó 1 ml a un vial de 2 ml conteniendo 300 mg de $MgSO_4$, 50 mg de PSA y 50 mg de C18 (éste fue añadido para mejorar la purificación, aunque no se hubiese usado en el trabajo de Norli *et al.* en 2011). Tras agitación manual enérgica durante 1 minuto se centrifugó y el sobrenadante fue trasvasado a un vial de 1 ml para análisis cromatográfico.

Figura 1. De izquierda a derecha, extractos tras la extracción con ACN y diferentes cantidades de agua añadidas (0/3/6,5/10 ml).



2. Modificación en la purificación (clean-up sulfúrico)

Debido a la problemática presentada con los compuestos coextractivos (como se explica en Resultados y Discusión), se optó por realizar una purificación alternativa de los extractos con H_2SO_4 , método usado en nuestro laboratorio de forma rutinaria con anterioridad, basado en el publicado por Veierov y Aharonson (1980). Tiene el inconveniente de que algunos de los compuestos clorados (endosulfán, endrín, endrín aldehído y dieldrín) son destruidos por el H_2SO_4 por lo que tienen que ser descartados del análisis.

Para ello, se tomaron alícuotas de 5 g de HB a las que se adicionó 75 μ l del estándar interno (PCB 143) y 100 μ l de cada mezcla de patrones de compuestos clorados para obtener distintas concentraciones en hígado (0, 1, 10, 25, 50 y 100 ng/g) que se dejaron toda una noche en refrigeración. Se volvió a repetir todo el proceso anterior de extracción con las distintas proporciones de agua y con ambos tipos de solventes (ACN y ACN:THF). Tras la separación de fases con las sales

QuEChERS, cada uno de los extractos obtenidos se dividió en dos alícuotas de 5ml:

- una de ellas se purificó con PSA-C18, se evaporó el solvente con corriente de N_2 , se reconstituyó con 5 ml de hexano, y posteriormente se purificó con H_2SO_4 , y serviría para comprobar si la purificación PSA-C18 mejoraría la purificación con H_2SO_4 ,
- con la otra alícuota se evaporó el solvente con corriente de N_2 , se reconstituyó con 5 ml de hexano, y posteriormente se purificó con H_2SO_4 .

En ambos casos, el extracto de hexano se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 200 μ l de isooctano para el análisis cromatográfico.

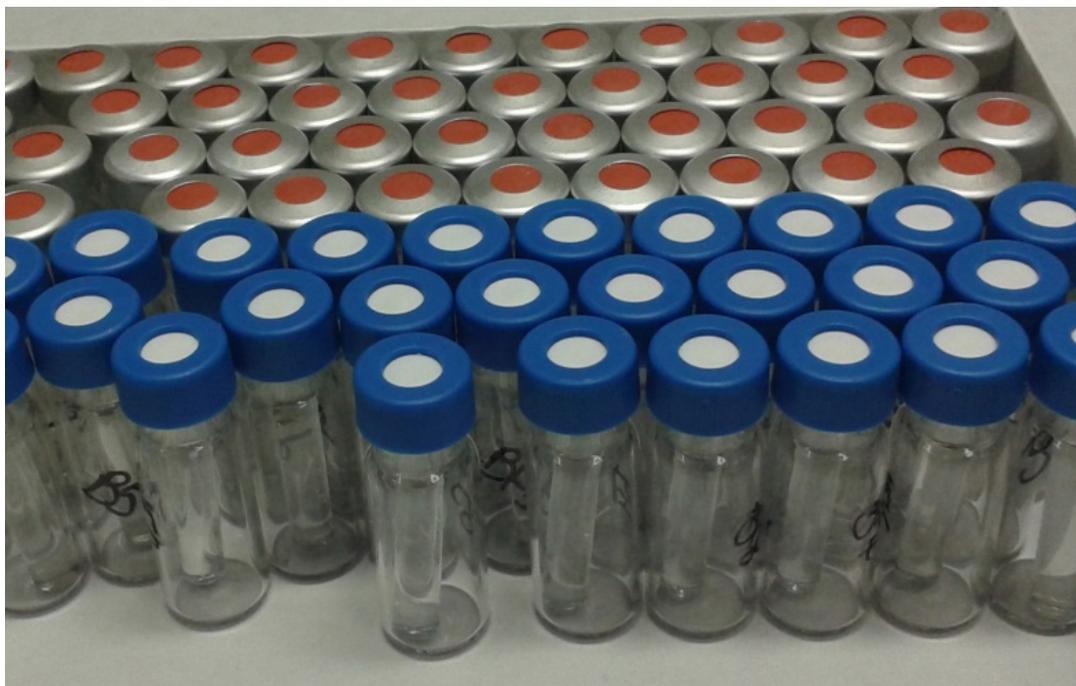
· Método analítico final

Tras los ensayos previos se estableció como método final el siguiente:

- **Preparación de la muestra y extracción/partición.** A 5 g de hígado triturado se le añaden 75 μ l del patrón interno PCB143 y 10 ml de ACN para ser homogeneizado en UltraTurrax durante 30 segundos. Al homogeneizado se le añade una mezcla de sales (4 g de $MgSO_4$, 1 g de ClNa, 0,5 g de citrato sódico dibásico y 1 g de citrato sódico tribásico dihidrato) y se procede a su agitación con un agitador rotatorio durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se toman 5 ml del sobrenadante y se pasan a un tubo de vidrio roscado de 10 ml en el que se secan con corriente de nitrógeno para ser después rediluido en 5 ml de hexano.
- **Purificación.** En el mismo tubo de vidrio de 10 ml se procede a la purificación añadiendo 2 ml de H_2SO_4 gota a gota tras lo cual se agita en agitador rotatorio. Si el extracto hexánico no ha quedado transparente se retira el H_2SO_4 con pipeta Pasteur de vidrio y se repite este paso cuantas veces sea necesario. Una vez que el extracto hexánico queda totalmente transparente se trasvasa con pipeta de

vidrio a otro tubo de vidrio donde se evapora a sequedad de nuevo con corriente de N_2 para ser reconstituido finalmente con 200 μ l de isooctano e, inmediatamente, introducidos en un inserto dentro de un vial de 2 ml para su posterior análisis cromatográfico (Figura 3).

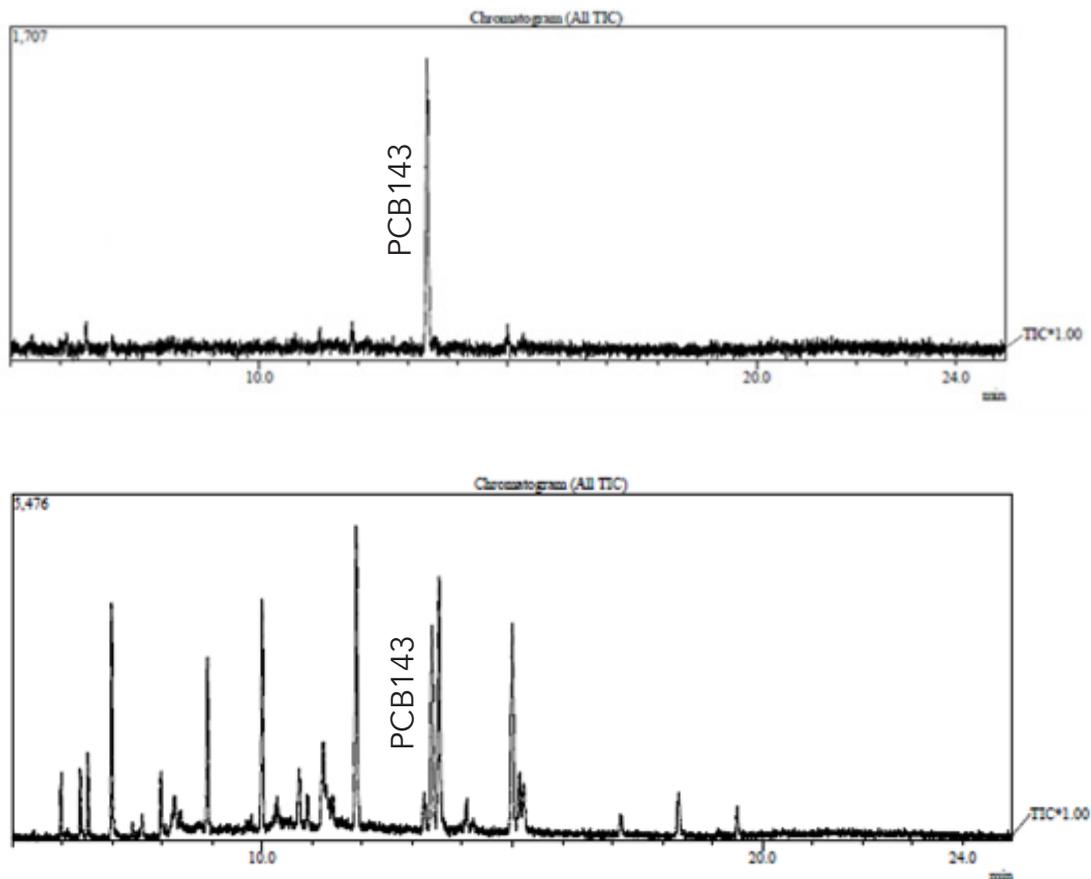
Figura 2. Extractos finales en viales de 2 ml con insertos de 200 μ l conteniendo los extractos reconstituidos con isooctano para su inyección en el equipo de cromatografía.



Como se observa en la Figura 3, se verificó que el hígado blanco estaba libre de compuestos clorados, por lo que podía ser utilizado en la validación del método.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Figura 3. Cromatograma de extractos de hígado comercial de pollo (blanco). Arriba: blanco adicionado únicamente con PCB143 (50 ng/g). Abajo: blanco adicionado con PCB143 (50 ng/g) y con un patrón mix de compuestos clorados a 10 ng



· Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones detalladas anteriormente. Los tiempos de retención para cada uno de los compuestos clorados se detallan en la siguiente tabla (Tabla 1):

	COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MINUTOS)	
PLAGUICIDAS	α HCH	5,99	
	β HCH	6,37	
	γ HCH (lindano)	6,53	
	δ HCH	7,01	
	Heptacloro	7,98	
	Aldrín	8,89	
	Heptacloro epóxido	9,98	
	DDE	11,91	
	DDD	13,58	
	Endosulfán sulfato	14,9	
	DDT	15,12	
	PCBS	PCB28	7,63
		PCB52	8,36
PCB101		10,89	
PCB118		13,28	
PCB153		14,12	
PCB138		15,28	
PCB169		19,48	
PCB180		18,37	

· Parámetros de validación del método analítico final

La **linealidad** de un método analítico se refiere a su capacidad para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en un rango de concentraciones determinado. El número de puntos y el rango de concentraciones del analito son seleccionados y están determinados por la aplicación del método. Para la evaluación de este parámetro se realizaron curvas de calibrado utilizando muestras de HB enriquecidas con patrones de plaguicidas a 5 niveles de concentración diferentes (1, 10, 25, 50 y 100 ng/g) repitiendo cada una, a su vez, tres veces, de acuerdo con lo indicado en la guía SANTE/12682/2019 para la validación de métodos analíticos (Comisión Europea, 2019). Posteriormente, se calculó la ecuación de la recta para cada compuesto. La regresión lineal de los datos fue determinada por el coeficiente de correlación lineal (de Pearson) y el criterio de aceptación de la linealidad fue de un coeficiente de correlación $r \geq 0,9$ (raíz cuadrada del coeficiente de determinación o R^2 de cada recta de calibrado).

La **precisión** indica la repetibilidad de los resultados al analizar la misma cantidad de compuesto repetidas veces sobre la misma muestra bajo condiciones constantes. Se estudió valorando la dispersión (coeficiente de variación o CV expresado en porcentaje) entre los resultados obtenidos en las tres repeticiones realizadas para cada concentración de compuestos clorados en el HB. Se ha considerado una precisión menor del 20% como criterio de aceptación en la guía SANTE/12682/2019 (Comisión Europea, 2019).

Se calculó el **límite de detección (LOD)** del método como la concentración en ng/g del analito a la que la relación señal/ruido del blanco es 3:1; del mismo modo, se calculó el **límite de cuantificación (LOQ)** como la concentración a la que dicha relación es 10:1. Para ello, se utilizó el *Software GC MS Postrun Analysis* que está incorporado en el sistema cromatográfico empleado aplicado sobre el cromatograma relacionado con la menor de las concentraciones detectadas en el estudio de linealidad.

· Método de cuantificación final (método del estándar interno con calibración en matriz)

Se determinó el **efecto matriz** (EM) para cada plaguicida obteniendo los valores a partir de la recta de calibrado de los patrones añadidos en concentraciones conocidas en disolvente y en HB (matriz), estableciendo después la relación de la pendiente de la recta de calibrado en disolvente con la recta de calibrado del HB (matriz) mediante la ecuación (Pano-Farias *et al.*, 2017):

$$\%EM = (\text{pendiente curva matriz} / \text{pendiente curva disolvente}) * 100$$

Si las pendientes de la curva de calibración en disolvente y de la curva de matriz pareada son iguales, entonces no habrá efecto matriz y el coeficiente de pendiente será 1, lo que significa que la señal de un compuesto en la matriz y en el disolvente es exactamente la misma. Un valor de efecto matriz superior a 100% indica un aumento de señal cuando se analiza el analito en la matriz. Cuando el valor es inferior a 100%, significa que la señal del analito en la matriz es menor o se encuentra suprimida, en comparación con el analito en el disolvente. De acuerdo a las directrices de la guía SANTE 12682/2019 de la Comisión Europea (2019) para la validación de métodos de análisis para residuos de plaguicidas en alimentos y piensos, un EM aceptable debe ser $100 \pm 20\%$; resultados por fuera de ese rango serán compensados al utilizar un estándar interno para la obtención de resultados, como es el caso de este trabajo. Además, son aceptados si no tienen un impacto negativo en la precisión.

Por ello, en este trabajo se ha optado por el uso del estándar interno añadiendo a todas las muestras el estándar interno PCB143 para obtener una concentración constante (50 ng/g). Este PCB143 fue escogido para tal fin al ser un compuesto de la misma naturaleza que los compuestos a analizar, no influir en el volumen de inyección del extracto en el cromatógrafo, no estar presente de manera natural en las muestras a analizar, aparecer su pico en la misma área del cromatograma

que el del resto de compuestos y no reaccionar con las muestras ni con los compuestos a analizar. De esta manera, se analizó en las mismas condiciones que el resto de compuestos. En las muestras de HB para obtener las rectas de calibrado, se estableció el valor medio del área de los picos del PCB 143 obtenidos en todas las inyecciones. Este valor permitió calcular un factor de corrección a todas las áreas de los compuestos tanto en HB como en muestras reales, obteniéndose un área corregida de cada uno. La cuantificación final se hizo aplicando el valor del área corregida de cada compuesto a la ecuación lineal de su recta de calibrado.

De esta forma, al usar el método de cuantificación con estándar interno no fue necesario la realización de estudios de **recuperación**, ya que se asume que es del 100%. Incluso se evitaron los posibles errores por cambio de volumen del extracto final por evaporación o por pérdida de parte del mismo, ya que siempre se mantiene en el extracto la proporción de la concentración de los compuestos con respecto al estándar interno PCB 143.

4.4.5. Aplicación del método final

· Hígados de aves silvestres

Tras la puesta a punto del método analítico, éste se aplicó para el análisis de OCs y PCBs en 60 muestras de hígados de 3 especies de aves correspondientes a 3 niveles tróficos diferentes (cigüeña blanca *Ciconia ciconia* como consumidor secundario, milano real *Milvus milvus* como consumidor terciario y buitre leonado *Gyps fulvus* como carroñero). Las aves fueron encontradas muertas en el medio natural extremeño y recogidas por agentes medioambientales del Gobierno Regional o por el SEPRONA (Servicio de Protección de la Naturaleza de la Guardia Civil).

Posteriormente, fueron entregadas al Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “Los Hornos”, ubicado en Sierra de Fuentes (Cáceres, España), donde personal especializado se encargó de realizar la necropsia y, ante la sospecha de que pudiera tratarse de un caso de intoxicación,

los hígados fueron extraídos y enviados a nuestro laboratorio junto con un Registro de Entrega con todos los detalles relativos al caso.

- **Determinación del porcentaje de grasa (lípidos) en hígado**

Como fase preliminar al estudio analítico de los contaminantes, se determinó el porcentaje de grasa presente en cada uno de los hígados enviados, incluyendo el hígado de pollo comercial (HB) de forma gravimétrica (Jaspers *et al.*, 2013). Para ello, se homogeneizaba 1 g de hígado con 5 ml de éter de petróleo para después centrifugarlo a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante (éter) era traspasado a una barqueta de aluminio previamente pesada, y tras 24h a temperatura ambiente se terminó de evaporar el solvente a 105 °C durante 1 hora en estufa. Tras sacarla de la estufa y recuperar la temperatura ambiente, se volvía a pesar para calcular la cantidad de grasa extraída.

- **Estudio estadístico descriptivo y comparativo.**

Debido a la considerable dispersión de los resultados obtenidos para cada compuesto y en cada especie, así como a la existencia de valores extremos, se consideró la mediana (Me) de las concentraciones para cada compuesto y cada especie en vez de la media aritmética por ser una medida más robusta bajo estas condiciones. Como herramienta estadística se usó el *Software R*[®]; como los resultados no seguían una distribución normal, los grupos (especies) fueron comparados con el método no paramétrico de Kruskal-Wallis y los valores *p* menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. En los casos en que el valor obtenido estaba por debajo del LOD (<LOD), se usó como valor estadístico ½ LOD.

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Desarrollo del método

En los extractos resultantes en las dos estrategias iniciales desarrolladas en la fase de extracción (con distintas proporciones de agua y con los

dos tipos de solventes) no se apreciaron picos de compuestos clorados a la concentración añadida de 50 ng/g e inferiores por lo que se decidió concentrarlos a 100 µl bajo corriente de N₂. En todos estos extractos se produjo una saturación del detector del cromatógrafo debido a la gran cantidad de compuestos coextractivos que no habían sido purificados.

Tras la posterior inclusión en el proceso de purificación de los extractos del lavado con H₂SO₄, el análisis cromatográfico de ambos tipos de extractos mostró que no hubo diferencias importantes en la extracción tanto debidas a la adición de agua o sin ella como por el uso de los dos tipos de solventes usados (ACN solo o su mezcla con THF). De esta forma, se optó por simplificar el proceso de extracción sin la adición de agua a la muestra, y usando como solvente únicamente ACN.

No hubo diferencia respecto a la inclusión o no del paso de la purificación QuEChERS (PSA+C18), observándose que la problemática de los compuestos coextractivos desaparecía tras el lavado con H₂SO₄. Además, permitía concentrar el extracto 25x, favoreciendo la cuantificación de compuestos clorados a concentraciones más bajas. Así, finalmente se optó por la opción menos costosa, realizar la purificación directamente lavando con H₂SO₄ y concentrando posteriormente el extracto.

4.5.2. Validación del método final

Linealidad y precisión

Tras la triple repetición de cada muestra de HB enriquecida con patrones de plaguicidas a 5 niveles de concentración diferentes (1, 10, 25, 50 y 100 ng/g), se calculó la ecuación de la recta para cada **compuesto (Gráfico 1)**. **El cumplimiento del criterio de aceptación de la linealidad (coeficiente de correlación $r \geq 0,9$) se refleja a continuación en la Tabla 2, junto con los valores precisión**, que igualmente cumplen con el criterio de aceptación de CV<20%.

Tabla 2. Valores de linealidad (r) y precisión (CV, %) obtenidos tras el análisis por triplicado de cada concentración de patrones en muestras de HB.

COMPUESTO	LINEALIDAD (r)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN CV (%)				
		1ng/g	10ng/g	25ng/g	50ng/g	100ng/g
αHCH	0,99	14,65	3,75	12,05	3,61	1,62
βHCH	0,99	10,22	3,50	8,22	15,80	11,61
γHCH	0,98	7,99	4,30	8,43	10,30	15,22
δHCH	0,99	6,35	2,08	3,56	14,01	5,92
Heptacloro	0,99	5,25	9,82	5,35	6,34	9,43
Aldrín	0,99	19,35	5,98	4,03	13,93	9,85
Heptacloro epóxido	0,99	8,40	15,15	7,40	5,80	4,04
DDE	0,99	7,16	3,34	3,02	5,39	5,86
DDD	0,99	6,31	1,25	6,55	1,07	1,77
Endosulfán sulfato	0,97	6,64	2,66	5,18	5,50	3,21
DDT	0,98	1,55	4,41	3,03	7,64	1,62
PCB28	0,98	--	9,61	3,23	6,72	7,22
PCB52	0,99	--	2,42	8,03	13,19	4,34
PCB101	0,99	13,92	11,51	9,48	4,43	2,99
PCB118	0,99	--	10,17	2,59	0,80	3,32
PCB138	0,99	10,93	5,23	9,16	5,16	4,17
PCB153	0,99	7,65	8,76	3,62	2,72	2,42
PCB169	0,99	--	5,11	7,27	1,53	0,63
PCB180	0,99	--	1,61	1,91	1,05	5,01

4.5.2. Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Los LOD y LOQ obtenidos para cada compuesto, se reflejan a continuación en la Tabla 3.

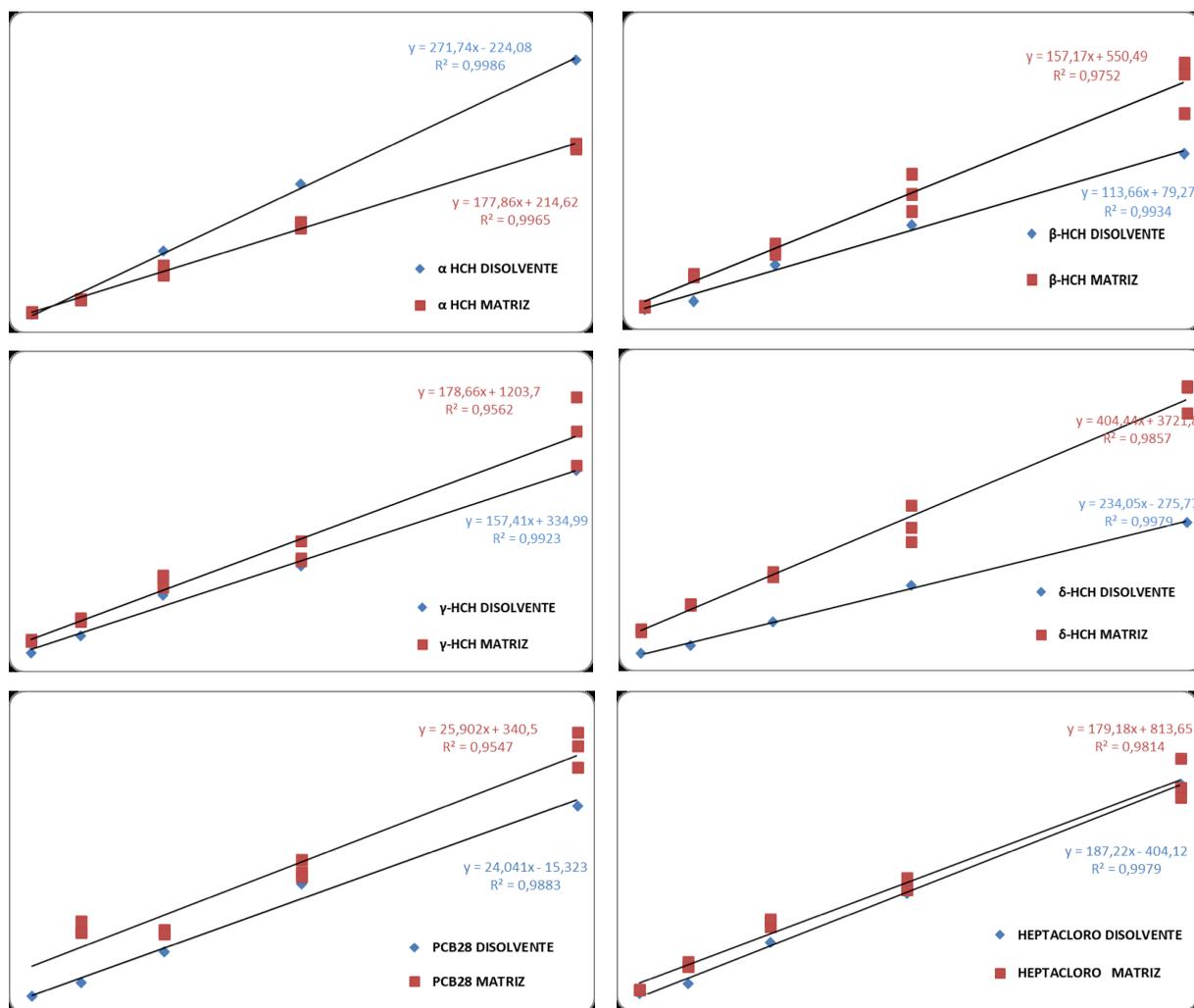
Tabla 3. LOD y LOQ para cada compuesto.

COMPUESTO	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
αHCH	0,79	2,63
HCH	1,95	6,5
γHCH	1,50	5,00
δHCH	0,86	2,87
Heptacloro	0,49	1,62
Aldrín	2,03	6,78
Heptacloro epóxido	1,22	4,05
DDE	0,20	0,67
DDD	0,80	2,68
Endosulfán sulfato	0,62	2,05
DDT	0,43	1,42
PCB28	0,93	3,11
PCB52	1,50	4,99
PCB101	4,49	14,97
PCB118	1,52	5,08
PCB138	1,72	5,74
PCB153	2,75	9,18
PCB169	3,89	12,97
PCB180	1,01	3,38

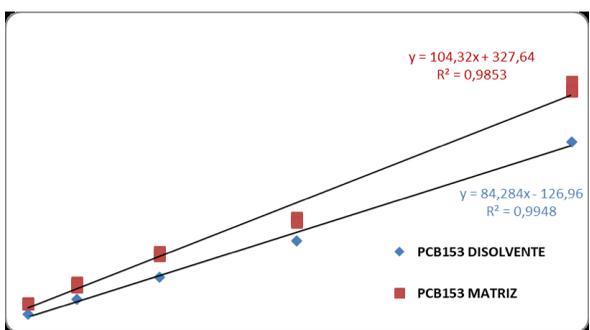
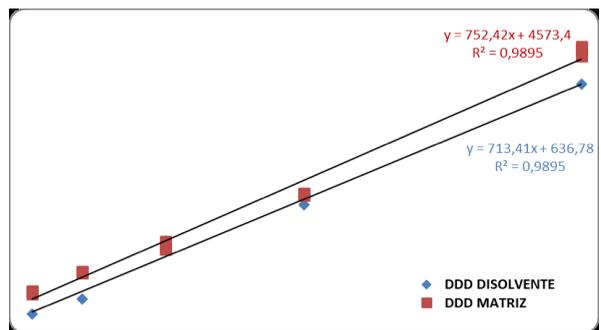
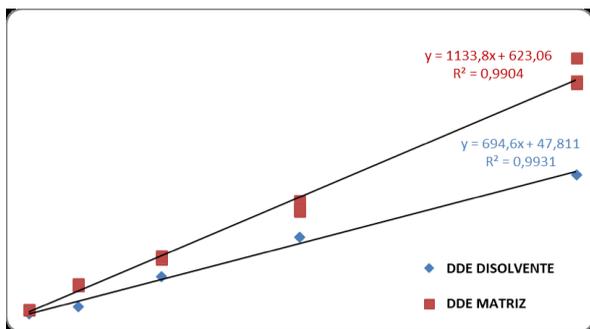
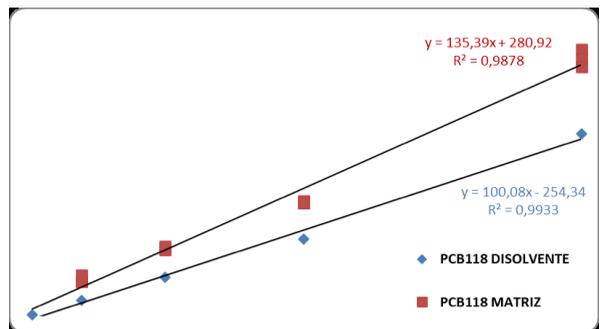
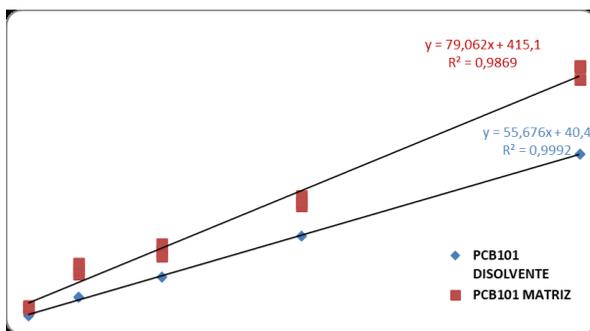
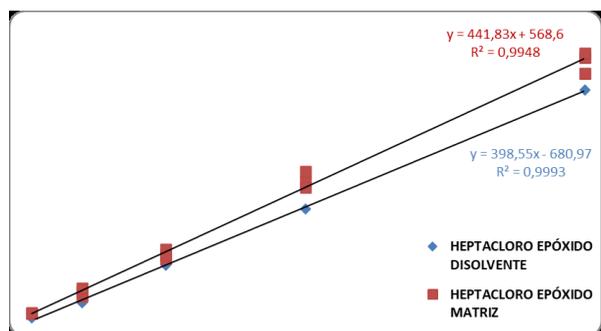
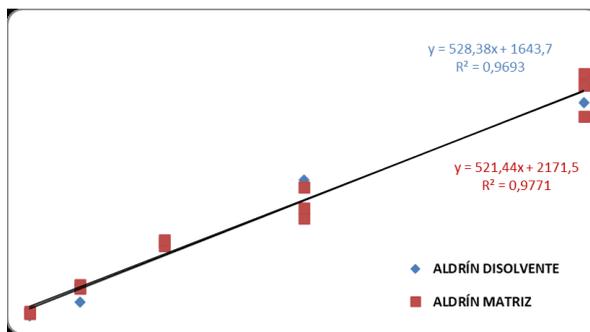
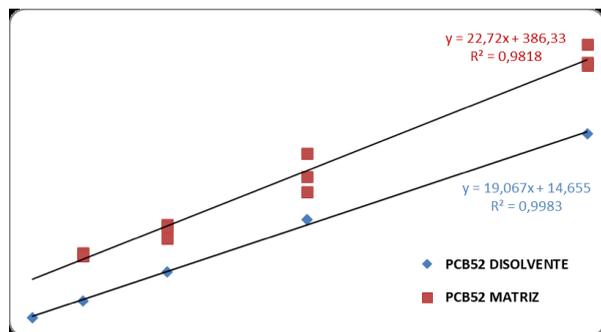
Determinación del efecto matriz (EM)

Se determinó el EM para cada plaguicida (**Tabla 4**), cuyos valores se calcularon a partir de la recta de calibrado de los patrones añadidos en concentraciones conocidas en disolvente y en HB (matriz) (Gráfico 1):

Gráfico 1. Rectas de calibrado de cada compuesto para las distintas concentraciones en disolvente y en HB (matriz), ecuación y coeficiente de determinación (R2) de cada una.



SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO



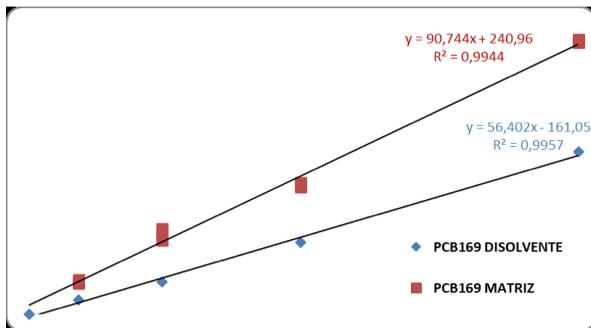
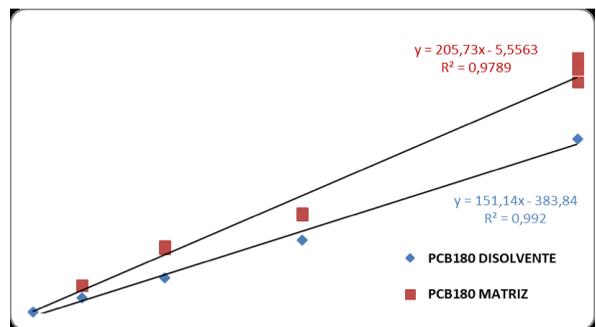
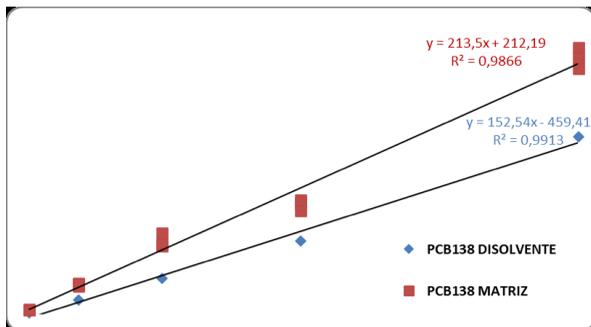
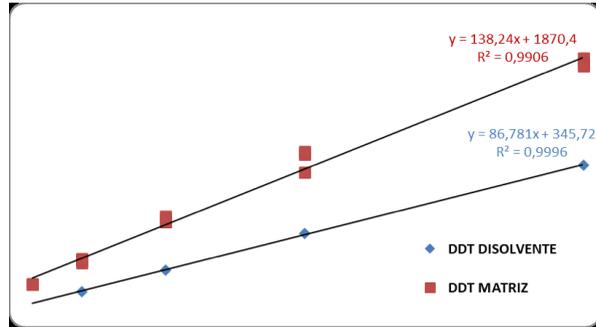
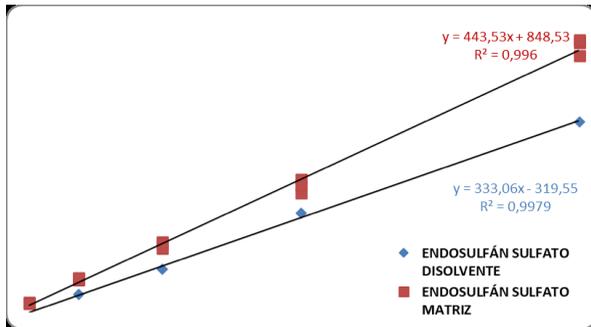


Tabla 4. Efecto matriz calculada para cada compuesto.

COMPUESTO	EFFECTO MATRIZ (%)
α HCH	65,45
β HCH	138,28
γ HCH	113,50
δ HCH	172,80
Heptacloro	95,71
Aldrín	98,68
Heptacloro epóxido	110,49
DDE	163,23
DDD	105,47
Endosulfán sulfato	134,16
DDT	159,30
PCB28	107,74
PCB52	119,16
PCB101	142,00
PCB118	135,28
PCB138	139,96
PCB153	123,77
PCB169	160,89
PCB180	136,12

La respuesta instrumental para todos los analitos se vio aumentada debido al EM en todos los compuestos excepto en el caso del α HCH, del heptacloro y del aldrín.

4.5.3. Análisis de OCs y PCBs en hígado de aves silvestres

Cabe destacar que uno de los efectos principales derivados de la purificación con ácido sulfúrico fue que ciertos plaguicidas clorados (endosulfán α y β , dieldrín, endrín, endrín aldehído y clordano) acabaron siendo destruidos por el mismo y, por tanto, no pueden

ser analizados por este método (Hernández-Hernández *et al.*, 1987; Waliszewski *et al.*, 2008).

Tras la puesta a punto y validación del método, como fase preliminar al estudio analítico de los contaminantes, se obtuvo el porcentaje de grasa del hígado de pollo comercial (blanco) y de los hígados de las 3 especies de aves ya indicadas. El primero tuvo un contenido medio en lípidos del 3,20% frente a los valores inferiores obtenidos en las muestras de hígados de aves silvestres (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido lipídico (%) en hígados de aves silvestres: cigüeña blanca (CB), milano real (MR) y buitre leonado (BL).

	CB	MR	BL
N° de muestras	20	20	20
Rango	0,34-1,84	1,24-2,36	0,60-3,01
Media (%)	1,19	1,68	1,47
Error estándar de la media	0,11	0,07	0,14
Mediana	1,12	1,63	1,52
Coef. de Variación (%)	42,72	19,38	42,84

Posteriormente, se identificaron y cuantificaron los residuos de OCs y PCBs en los hígados. Los compuestos analizados fueron 19 COPs: los plaguicidas organoclorados α HCH, β HCH, γ HCH, δ HCH, heptacloro, aldrín, heptacloro epóxido, DDE, DDD, endosulfán sulfato (metabolito del endosulfán) y DDT, así como los PCBs 28, 52, 101, 118, 153, 138, 180 y 169 (Tablas 6 y 7).

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Tabla 6. Estadísticos descriptivos (mediana, media y su error estándar, rango de concentraciones y coeficiente de variación -CV) obtenidos para cada especie de ave estudiada de los compuestos clorados cuya frecuencia de detección de valores superiores al LOD (>LOD) fue superior al 50%. Se indican también (superíndices) las parejas donde el estudio estadístico reveló diferencias significativas.

COMPUESTO	Parámetro	Cigüeña blanca n=20	Milano real n=20	Buitre leonado n=20
α HCH	Mediana (ng/g)	1,40 ^b	2,35	2,24
	Media \pm DE (ng/g)	2,50 \pm 0,54	6,90 \pm 3,31	9,41 \pm 3,82
	Rango (ng/g)	<LOD - 9,18	<LOD - 68,12	<LOD - 69,17
	CV (%)	95,91	214,87	181,49
	>LOD (%)	80	90	95
β HCH	Mediana (ng/g)	10,99	22,53	49,63
	Media \pm DE (ng/g)	42,28 \pm 14,53	62,26 \pm 17,35	264,05 \pm 133,49
	Rango (ng/g)	<LOD - 215,31	2,00-269,75	<LOD - 2199,79
	CV (%)	153,66	124,63	226,09
	>LOD (%)	80	100	95
γ HCH	Mediana (ng/g)	6,07	7,89	3,71
	Media \pm DE (ng/g)	6,18 \pm 0,98	9,89 \pm 1,97	5,62 \pm 1,35
	Rango (ng/g)	<LOD - 16,87	<LOD - 25,74	<LOD - 22,86
	CV (%)	70,79	89,26	107,97
	>LOD (%)	80	75	65
Heptacloro epóxido	Mediana (ng/g)	18,29 ^b	24,45 ^b	2,58
	Media \pm DE (ng/g)	271,36 \pm 166,30	34,94 \pm 10,37	9,80 \pm 4,54
	Rango (ng/g)	<LOD - 3166,46	<LOD - 174,59	<LOD - 89,00
	CV (%)	274,06	132,78	207,26
	>LOD (%)	90	85	60
DDE	Mediana (ng/g)	51,13 ^a	227,00 ^b	63,20
	Media \pm DE (ng/g)	200,56 \pm 60,02	314,21 \pm 66,46	169,44 \pm 44,39
	Rango (ng/g)	6,17- 845,33	31,12 - 954,79	5,30 - 557,74
	CV (%)	133,84	94,59	117,17
	>LOD (%)	100	100	100

DDD	Mediana (ng/g)	9,85 ^a	3,19	3,74
	Media ± DE (ng/g)	13,25 ± 3,07	4,45 ± 0,85	27,02 ± 11,18
	Rango (ng/g)	1,00 - 58,60	<LOD - 14,37	<LOD - 161,40
	CV (%)	103,75	84,98	210,18
	>LOD (%)	100	90	80
PCB28	Mediana (ng/g)	0,77	0,75	1,96
	Media ± DE (ng/g)	4,84 ± 2,08	2,77 ± 0,88	3,60 ± 1,41
	Rango (ng/g)	<LOD - 41,26	<LOD - 14,08	<LOD - 27,66
	CV (%)	192,30	141,38	176,49
	>LOD (%)	50	50	55
PCB101	Mediana (ng/g)	2,25	8,15	4,34
	Media ± DE (ng/g)	14,54 ± 3,51	15,16 ± 4,09	17,86 ± 5,27
	Rango (ng/g)	<LOD - 66,86	<LOD - 78,06	<LOD - 86,49
	CV (%)	107,99	120,63	131,95
	>LOD (%)	50	70	50
PCB118	Mediana (ng/g)	2,07	6,98 ^b	4,41
	Media ± DE (ng/g)	18,70 ± 10,18	10,95 ± 3,10	9,22 ± 4,33
	Rango (ng/g)	<LOD - 201,31	<LOD - 66,28	<LOD - 86,42
	CV (%)	243,55	126,64	210,18
	>LOD (%)	70	70	50
PCB138	Mediana (ng/g)	5,66 ^a	27,28 ^b	1,87
	Media ± DE (ng/g)	50,40 ± 28,95	35,53 ± 20,12	24,30 ± 11,21
	Rango (ng/g)	<LOD - 550,81	4,67 - 146,33	<LOD - 189,31
	CV (%)	256,85	93,38	206,44
	>LOD (%)	80	100	60
PCB153	Mediana (ng/g)	15,56 ^{a,b}	55,97 ^b	4,13
	Media ± DE (ng/g)	113,32 ± 57,33	81,70 ± 20,12	67,88 ± 36,26
	Rango (ng/g)	2,67 - 1088,25	<LOD - 389,85	<LOD - 681,99
	CV (%)	226,26	110,15	238,92
	>LOD (%)	100	95	55
PCB180	Mediana (ng/g)	8,94 ^a	36,04 ^b	2,66
	Media ± DE (ng/g)	82,40 ± 43,36	48,70 ± 11,15	52,24 ± 27,33
	Rango (ng/g)	<LOD - 827,84	5,99 - 204,80	<LOD - 463,30
	CV (%)	236,36	102,34	233,94
	>LOD (%)	95	100	70

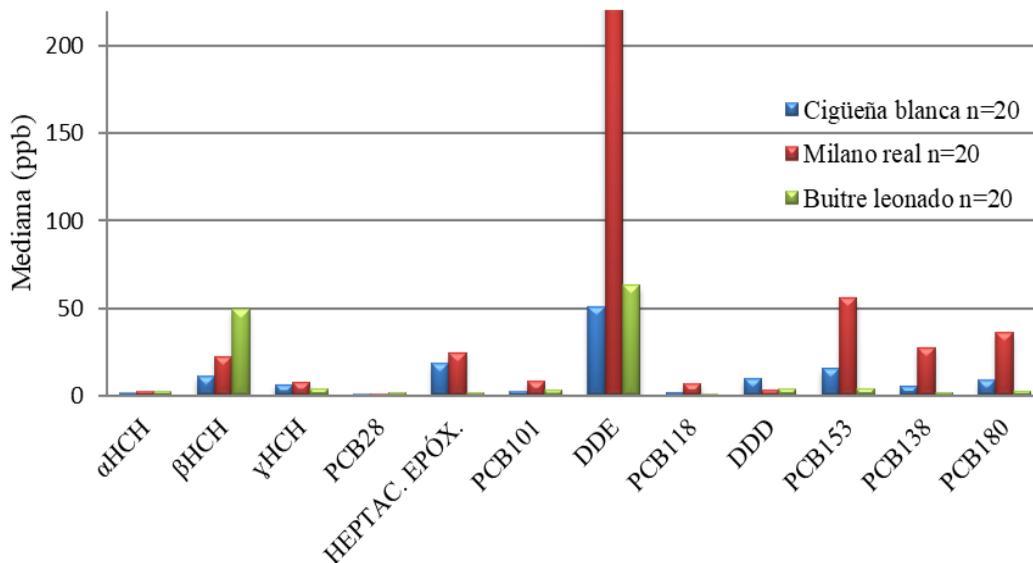
ap<0,05 vs. milano real; bp<0,05 vs. buitre leonado.

Tabla 7. Rangos de concentraciones (ng/g) obtenidos para cada especie de ave estudiada de los compuestos clorados cuya frecuencia de detección de valores superiores al LOD (>LOD) fue inferior al 50%.

COMPUESTO	PARÁMETRO	CIGÜEÑA BLANCA n=20	MILANO REAL n=20	BUITRE LEONADO n=20
δHCH	Rango (ng/g)	<LOD - 1,70	<LOD - 19,86	<LOD - 64,71
	>LOD (%)	10,00	30,00	35,00
Heptacloro	Rango (ng/g)	<LOD - 2,31	<LOD - 16,62	<LOD - 1,49
	>LOD (%)	15,00	30,00	10,00
Aldrín	Rango (ng/g)	<LOD - 260,43	<LOD - 48,04	<LOD - 59,10
	>LOD (%)	20,00	5,00	20,00
Endosulfán sulfato	Rango (ng/g)	<LOD - 12,89	<LOD - 8,18	<LOD - 0,83
	>LOD (%)	30,00	30,00	10,00
DDT	Rango (ng/g)	<LOD - 4,87	<LOD - 52,71	<LOD - 45,85
	>LOD (%)	10,00	40,00	25,00
PCB52	Rango (ng/g)	<LOD - 10,62	<LOD - 15,69	<LOD - 10,19
	>LOD (%)	20,00	35,00	25,00
PCB169	Rango (ng/g)	<LOD - 15,18	<LOD - 6,39	<LOD - 10,91
	>LOD (%)	25,00	25,00	10,00

Debido a la enorme dispersión de los datos, se ha considerado la mediana para el análisis estadístico de los resultados (Gráfico 2) utilizando test no paramétricos. Se observaron diferencias estadísticas entre especies en las concentraciones de 8 de los compuestos, indicados en la tabla (^a $p < 0,05$ y ^b $p < 0,05$). Las diferencias observadas se dan entre las concentraciones de DDE, DDD, PCB153, PCB138 y PCB180 en cigüeña blanca y milano real; entre las concentraciones de αHCH, heptacloro epóxido y PCB153 en cigüeña blanca y buitre leonado; y entre las concentraciones de heptacloro epóxido, DDE, PCB118, PCB153, PCB138 y PCB180 en milano real y buitre leonado.

Gráfico 2. Mediana (ng/g) de las concentraciones de cada compuesto obtenidas en cada especie.



El único compuesto que se detectó en el 100% de los hígados analizados fue el DDE, metabolito del DDT, lo que era de esperar dada su persistencia en los tejidos biológicos, siendo uno de los compuestos más detectados en los seres vivos. El DDD, también metabolito del DDT, tuvo una frecuencia de detección del 90%. El segundo compuesto más detectado fue el βHCH (92%), que se caracteriza por ser igualmente uno de los compuestos clorados de mayor resistencia a los procesos de degradación biótica y abiótica del grupo de los HCHs, encontrándose el αHCH en el 88% de las muestras y el δHCH (lindano) en el 73% de ellas.

La frecuencia media de detección de estos compuestos con valores >LOD fue mayor en las muestras de hígado de milanos (85,42%) y de cigüeñas blancas (81,25%) que en los buitres leonados (69,58%). Igualmente, los milanos mostraron unos valores medios de la mediana (35,22 ng/g) superiores a los de los buitres (12,04 ng/g) y cigüeñas (11,08 ng/g), si bien el valor medio de las concentraciones medias fue

ligeramente menor (52,29 ng/g) que el de los buitres (55,04 ng/g) y de las cigüeñas (68,36 ng/g). La dispersión de los datos (CV) fue menor en los milanos (119,64%) que en las cigüeñas (174,61%) y los buitres (187,34%) debido a la existencia en estas dos últimas especies de valores muy extremos en algunos compuestos (2199,79 ng/g de β HCH en un buitre, 3166,46 ng/g de heptacloro epóxido en una cigüeña y 1088,25 ppb de PCB153 en otra cigüeña distinta). Todo ello indica que el milano real tiene mayores índices de contaminación que los buitres y cigüeñas.

En 7 de los compuestos analizados, se detectaron concentraciones <LOD en más del 50% de las muestras (frecuencia de detección) por lo que no fueron analizados estadísticamente (Tabla 6). La frecuencia de detección de estos 7 compuestos en valores superiores al LOD fue baja, variando entre el 5 y el 40%. El menos frecuente de todo el estudio fue el aldrín, que sólo se detectó en 1 de las 20 muestras de milano real analizadas.

En el conjunto global de este estudio, se detectó (valor >LOD) una media de 11 compuestos clorados distintos en cada muestra analizada.

Los rangos de concentraciones obtenidas para todos los compuestos están en línea con los indicados en otros estudios europeos muy similares que estudiaban otras especies de aves. Es el caso del de Tomza-Marciniak *et al.* (2019), en el que analizaron residuos de PCBs en hígado de pato, o el de Naso *et al.* (2003) en el que analizaron la mayoría de los compuestos de nuestro estudio en hígado de distintas especies de aves de diferentes niveles tróficos. En este último estudio, sin embargo, no encontraron diferencias significativas en los niveles de plaguicidas OCs ni entre especies individuales ni entre especies agrupadas por hábitos alimentarios. Sí se observó cierta tendencia de las especies carnívoras, frente a las omnívoras e insectívoras a tener mayores concentraciones de DDE, tal como ocurre en nuestro estudio. Los niveles de PCBs que obtuvieron fueron mayores en especies omnívoras oportunistas y carnívoras que en insectívoras, existiendo diferencias significativas.

Se ha señalado que la capacidad metabólica de las aves frente a estos compuestos es menor que en otros organismos, por lo que con una exposición similar a COPs, la acumulación sería más rápida y, por tanto, acabaría siendo mayor (Walker, 1990). Incluso entre las diferentes especies de aves existen importantes diferencias en la capacidad de metabolización, ya que los hábitos alimentarios están directamente relacionados con las diferencias interespecíficas de la actividad de enzimas Oxidasa de Función Mixta (MFO), como queda demostrado en el trabajo de Fossi *et al.* (1995). Las especies omnívoras oportunistas presentan mayor actividad de enzimas MFO, lo que les otorga una mejor capacidad de adaptación en ambientes con alta polución al poder modular la respuesta enzimática al nivel y tipo de contaminantes a los que están expuestos. Las especies de hábitos depredadores presentan menor actividad de enzimas MFO y mayor tendencia de acumulación de compuestos OCs (Fossi *et al.*, 1995) existiendo, en general, una correlación estadística significativa entre el “índice de omnívoro” (Libralato, 2013) y la actividad de desintoxicación de enzimas MFO. Esto podría ser una razón que explique los bajos niveles de compuestos encontrados en cigüeña blanca frente a milano real.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

Tabla 8. Media y rango de resultados obtenidos en este estudio¹, comparados con los rangos obtenidos en hígado de milano real y buitre leonado por Van Drooge et al. (2008)² y Hela et al. (2006)³.

COMPUESTO	CIGÜEÑA BLANCA	MILANO REAL	BUITRE LEONADO
αHCH	2,50 [$< LOD - 9,18$] ¹	6,90 [$< LOD - 68,12$] ¹	9,41 [$< LOD - 69,17$] ¹ [$< LOD - 17,4$] ³
βHCH	42,28 [$< LOD - 215,31$] ¹	62,26 [2,00- 269,75] ¹ [$< LOD - 26,1$] ²	264,05 [$< LOD - 2199,79$] ¹ [$< LOD - 33,7$] ² [$< LOD - 3,95$] ³
δHCH	[$< LOD - 1,70$] ¹	[$< LOD - 19,86$] ¹	[$< LOD - 64,71$] ¹ [$< LOD - 7,08$] ³
γHCH	6,18 [$< LOD - 16,87$] ¹	9,89 [2,00- 25,74] ¹ [$< LOD - 42,5$] ²	5,62 [$< LOD - 22,86$] ¹ [$< LOD - 51,9$] ² [$< LOD - 2,37$] ³
Heptacloro epóxido	271,36 [$< LOD - 3166,46$] ¹	34,94 [$< LOD - 174,59$] ¹	9,80 [$< LOD - 89,00$] ¹ [No detectado] ³
Heptacloro	[$< LOD - 2,31$] ¹	[$< LOD - 16,62$] ¹ [$< LOD - 17,3$] ²	[$< LOD - 1,49$] ¹ [$< LOD - 46,3$] ² [$< LOD - 28,6$] ³
Endosulfán sulfato	[$< LOD - 12,89$] ¹	[$< LOD - 8,18$] ¹	[$< LOD - 0,83$] ¹ [No detectado] ³
Aldrín	[$< LOD - 260,43$] ¹	[$< LOD - 48,04$] ¹	[$< LOD - 59,10$] ¹ [No detectado] ³
DDE	200,56 [6,17-845,33] ¹	314,21 [31,12- 954,79] ¹ [228-1528] ²	169,44 [5,30- 557,74] ¹ [16-2285] ² [170,31-191,06] ³
DDD	13,25 [1,00-58,60] ¹	4,45 [$< LOD - 14,37$] ¹	27,02 [$< LOD - 161,40$] ¹ [3,42-19,37] ³
DDT	[$< LOD - 4,87$] ¹	[$< LOD - 52,71$] ¹	[$< LOD - 45,85$] ¹ [9,70-12,89] ³
PCB28	4,84 [$< LOD - 41,26$] ¹	2,77 [$< LOD - 14,08$] ¹	3,60 [$< LOD - 27,66$] ¹ [0,43-67,60] ³
PCB52	[$< LOD - 10,62$] ¹	[$< LOD - 15,69$] ¹	[$< LOD - 10,19$] ¹ [0,37-2,68] ³
PCB101	14,54 [$< LOD - 66,86$] ¹	15,16 [$< LOD - 78,06$] ¹	17,86 [$< LOD - 86,49$] ¹ [$< LOD - 2,80$] ³
PCB118	18,70 [$< LOD - 201,31$] ¹	10,95 [$< LOD - 66,28$] ¹	9,22 [$< LOD - 86,42$] ¹ [$< LOD - 69,5$] ³
PCB138	50,40 [$< LOD - 550,81$] ¹	35,53 [4,67-146,33] ¹	24,30 [$< LOD - 189,31$] ¹ [$< LOD - 3,9$] ³

PCB153	113,32 [2,67-1088,25] ¹	81,70 [< LOD – 389,85] ¹	67,88 [< LOD – 681,99] ¹ [9,36-22,70] ³
PCB169	[< LOD-15,18] ¹	[< LOD-6,39] ¹	[< LOD –10,91] ¹
PCB180	82,40 [< LOD-827,84] ¹	48,70 [5,99 – 204,80] ¹	52,24 [< LOD – 463,30] ¹ [<LOD-9,09] ³

¹Esta tesis, ²Van Drooge et al. (2008), ³Hela et al. (2006).

Los valores de las medianas para cada compuesto y cada especie (Gráfico 2) evidencian que el compuesto con mayores concentraciones fue el DDE en milano real, que, aunque en menor medida, también fue detectado en todas las muestras de buitre leonado y cigüeña blanca. El DDE, además, fue el único compuesto del estudio que se detectó en el 100% de las muestras analizadas, al igual que lo observado en otros estudios con otras aves en los que también es el que se encuentra en mayores concentraciones (Tanabe *et al.* 1998; Donaldson y Braune, 1999; Herrera *et al.* 2000; Mateo *et al.* 2000; Choi *et al.* 2001a, b; Naso *et al.*, 2003; Hela *et al.*, 2006; Dhananjayan, 2013; Luzardo *et al.*, 2014), lo cual puede explicarse por su alta estabilidad química y alta persistencia en el ambiente y en los organismos.

También son llamativos los valores en milano real de PCB153, siendo éste, además, el PCB que presenta el valor de mediana más alto, coincidiendo con otros estudios similares como son el de Naso *et al.* (2003), van Drooge *et al.* (2008) y Tomza-Marciniak *et al.* (2019). Cabe destacar los altos niveles encontrados de β HCH, así como su alta frecuencia de detección en las 3 especies, coincidiendo con los patrones de contaminación encontrados en estudios similares (Dhananjayan, 2013; Luzardo *et al.*, 2014); estos datos pueden explicarse por la peculiaridad de la alta resistencia al metabolismo animal y abiótico de ambos compuestos (Grimm *et al.*, 2015). De hecho, dos de los valores extremos encontrados se corresponden con 2199,79 ng/g de β HCH en un buitre leonado y 1088,25 ng/g de PCB153 en una cigüeña blanca.

El sumatorio de las concentraciones (medias) de PCBs fue de 37,95 ng/g para cigüeña blanca, 137,87 ng/g para milano real y 17,47 ng/g para buitre leonado. Los PCBs con alto grado de cloración 118, 138, 153 y 180 fueron los congéneres con mayores concentraciones encontradas en las 3 especies, al igual que lo encontrado en otros estudios como el de Naso *et al.* (2003) (que estudiaron 12 especies de diferentes niveles tróficos de hábitos carnívoros, omnívoros e insectívoros), Hela *et al.* (2006) (que estudiaron 10 especies de aves rapaces), Luzardo *et al.* (2014) (que estudiaron 6 especies de aves rapaces) y Tomza-Marciniak *et al.* (2019) (que estudiaron 4 especies de patos marinos). Esto no es de extrañar pues, debido a su estructura molecular, este tipo de congéneres muestran mayor grado de bioacumulación en los tejidos de las aves que los de menor grado de cloración (McFarland y Clarke, 1989; Metcalfe y Metcalfe, 1997; Borga *et al.*, 2001). Por el contrario, la menor persistencia de los PCBs 28, 52 y 101 puede explicarse por la mayor capacidad de los organismos para metabolizarlos y excretarlos (Oliver y Niimi, 1988; Walker, 2001; Naso *et al.*, 2003; Grimm *et al.*, 2015). El PCB169 fue el menos frecuentemente detectados, al igual que en el estudio de Luzardo *et al.* (2014) en aves rapaces. En concreto, los que mostraron una mayor frecuencia de detección fueron aquellos de mayor carga en átomos de cloro, siguiendo el siguiente orden: PCB180 (88%) > PCB153 (83%) > PCB138 (80%) > PCB118 (63%) > PCB101 (57%) > PCB28 (52%).

Entre los isómeros del HCH, predomina el β HCH en cuanto a niveles de concentración y frecuencia de detección. El γ HCH o lindano es el siguiente con niveles más altos, pero sin embargo la exposición podría haber habido mayor ya que este isómero es el que más rápidamente se metaboliza y excreta (Walker, 2001); este hecho es muy llamativo ya que, al igual que le ocurre a otros plaguicidas clorados, en la Unión Europea está prohibido para fines agrícolas desde 1979 y para cualquier uso desde 2008 a través de la Directiva 79/117/CEE (1979) y el Reglamento (CE) n°850/2004 (2004). En el estudio de Naso *et al.* (2003), que analizó γ HCH en hígado de aves (12 especies de hábitos carnívoros, omnívoros e insectívoros), ninguna

muestra superó el LOD. En estudios realizados en plumas de aves se detectaron los isómeros α , β y γ HCH en todas las muestras, aunque en rangos menos amplios que los de este estudio, al igual que ocurre con los DDTs y PCBs (Dahmardeh Behrooz *et al.* (2009).

Los resultados obtenidos no indican que haya diferencias significativas evidentes entre especies que se puedan atribuir a algún factor como los hábitos dietéticos de una manera clara. Y, aunque se comparen resultados con estudios similares de otras zonas o países, debe hacerse con cuidado y de manera orientativa por las diferencias intra e inter especies que se han comentado en párrafos anteriores, en los procedimientos estadísticos, la naturaleza de las muestras y características ambientales de la zona de recogida. Los resultados de los trabajos existentes demuestran la variabilidad entre ellos como se puede comprobar en la revisión hecha por Naso *et al.* (2003) de casi una veintena de estudios comparando los resultados de especies iguales y diferentes en varias zonas del mundo. Y aunque en muchos estudios se han encontrado diferencias significativas entre especies, que se atribuyen a los hábitos alimentarios de los distintos niveles tróficos y a las características propias de cada una para metabolizar estos COPs (Walker *et al.*, 1987; Ronis y Walker, 1989; Walker, 1990; Newton *et al.*, 1993; Fossi *et al.*, 1995; Henny, 1998; Hoshi *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 1998; Lopez-Lopez *et al.*, 2001; Herzke *et al.*, 2002; Senthilkumar *et al.*, 2002; Wiesmuller *et al.*, 2002; Kenntner *et al.*, 2003; Luzardo *et al.*, 2014), otros estudios indican que en la acumulación de estos compuestos tienen mayor influencia ciertos factores individuales como el sexo, la edad y la condición corporal (Newton *et al.*, 1981, 1992; Wiewmeyer *et al.*, 1989; Anthony *et al.*, 1993; Elliott y Shutt, 1993; Donaldson y Braune, 1999; Kenntner *et al.*, 2003). También se ha establecido una variación estacional en los residuos que guarda relación con la condición corporal del ave, ya que en épocas de más abundancia de alimentos (y, por tanto, mayor condición corporal) se han encontrado menores niveles de residuos que en épocas de escasez y baja condición corporal (Subramanian *et al.*, 1986; Lambeck *et al.*, 1991; Olafsdottir *et al.*, 1998; Kenntner *et al.*, 2003). Wienburg y

Shore (2004) analizaron, durante 5 años en la totalidad del territorio británico, los factores intra e interespecíficos que determinaron la acumulación de PCBs en 3 especies de diferentes niveles tróficos (gavilán común *Accipiter nisus*, cernícalo vulgar *Falco tinnunculus* y garza real *Ardea cinerea*), demostrando que la condición corporal del individuo fue el factor más influyente en el nivel de acumulación, siendo el momento de la muerte, la edad y el sexo también significativos, pero de menor importancia. Por tanto, la combinación de estos factores fisiológicos determinó más la concentración de residuos de PCBs en el hígado que el factor especie, la capacidad de metabolizar los PCBs o la zona geográfica de exposición.

Teniendo en cuenta todo lo anterior y para tener un conjunto muestral no sesgado por las circunstancias de recogida o incompleto, se plantea interesante la monitorización de estos contaminantes en muestras no invasivas como las plumas, a diferencia del músculo o hígado, que suelen ser los tejidos habituales. Desde hace unos años se viene estudiando la acumulación de OCs en las mismas (Dauwe *et al.*, 2005; Van de Steen *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2015; Aver *et al.*, 2020), habiéndose demostrado la existencia de correlación entre los niveles en plumas con los de hígado y músculo (Jaspers *et al.*, 2007).

El análisis de residuos de COPs en fauna silvestre comenzó su desarrollo en la década de los años 50 del siglo pasado (Heyroth, 1950) enfocado en la detección de residuos de DDT, progresando enormemente hasta la actualidad gracias a la aplicación de la cromatografía de gases por captura de electrones, y perfeccionándose con la espectrometría de masas.

El método QuEChERS se ha revelado en este estudio como una herramienta de extracción y purificación para el análisis de COPs en hígado animal, aprovechando las ventajas que conlleva. El método se utiliza cada vez más para analizar plaguicidas en matrices animales y muestra recuperaciones satisfactorias (Nuapia *et al.*, 2016). En los últimos años, varios estudios lo han aplicado para el análisis de COPs en distintos tejidos animales como en carne de salmón y mejillones

(Cloutier *et al.*, 2017), en sangre o suero de aves rapaces y camellos (Rial-Berriel *et al.*, 2020, 2023), en hígado de bovino, ovino y porcino (Saint-Hilaire *et al.*, 2018) o en hígado de erizos y murciélagos (Schanzer *et al.*, 2021). De los resultados de nuestro estudio podemos establecer que la aplicación del proceso de extracción QuEChERS es adecuada para muestras de aves, pero la purificación no es adecuada cuando el análisis cromatográfico para detectar concentraciones muy bajas (<100 ng/g) se realiza en laboratorios cuyo equipamiento consista en un único detector de masas (GC-MS).

4.6. Conclusiones

El método de extracción y purificación desarrollado y validado en este estudio, y que se ha basado en el método QuEChERS, si bien no es más rápido y sencillo que éste por el uso de ácido sulfúrico en la fase de purificación, sí ha resultado eficaz para el análisis de 19 COPs en hígado de ave mediante el uso de GC con detector simple de masas. Se ha aplicado para determinar esos COPs en hígados de 60 aves pertenecientes a tres especies de distinto nivel trófico de la región de Extremadura (España), observando la presencia (valores >LOD) de una media de 11 compuestos distintos por muestra. Las diferencias en el contenido de contaminantes entre especies no fueron significativas de manera general y no fueron claramente concluyentes para relacionar los niveles de contaminantes con el nivel trófico; además, la variabilidad entre individuos dentro de cada especie fue alta, apareciendo en ocasiones valores extremos dentro de cada grupo. El DDE fue el OC predominante en todas las especies tanto en frecuencia de detección (en el 100% de las muestras) como cuantitativamente, seguido del β HCH. Entre los PCBs, el PCB153 presentó las concentraciones y la frecuencia de detección más alta, cuantificándose en general a niveles

mayores los congéneres con alto nivel de cloración frente a los de nivel de cloración más bajo. Estos patrones de contaminación coinciden con los observados en otros estudios similares, aunque considerando la variabilidad entre unos estudios y otros, junto con las evidencias más recientes sobre los factores que afectan a los niveles de acumulación de estos contaminantes, es necesario reforzar los esfuerzos para aumentar el tamaño muestral de cada especie, reducir la variabilidad de los muestreos (a lo que podría ayudar la recogida de muestras no invasivas como las plumas) y recoger más datos sobre las circunstancias de cada caso (del individuo, la localización o momento de la toma de muestra) con el objetivo de seguir conociendo mejor los factores que influyen en la acumulación de estos contaminantes, poder evaluar la evolución de los mismos en la fauna y poder comparar de una manera más rigurosa unos estudios con otros.

4.7. Bibliografía

- A** Agilent. 2015. Technical Note - Recommended Protocols for Enhanced Matrix Removal - Lipid. Agilent Technologies, Inc, USA (2015).
- Alexander, J, Frøyland, L., Hemre, G.I., Jacobsen, B.K., Lund, E., Meltzer, H.M. 2007. A comprehensive assessment of fish and other seafood in the Norwegian diet. Oslo, Norway: Norwegian Scientific Committee for Food Safety. p. 173.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2), 412-431.
- Anthony, R.G., Garrett, M.G., Schuler, C.A. 1993. Environmental contaminants in bald eagles in the Columbia River estuary. *J. Wildl. Manage.* 57, 10-19.
- Hasan, G.M.M.A., Das A.K., Satter, M.A. 2022. Multi residue analysis of organochlorine pesticides in fish, milk, egg and their feed by GC-MS/MS and their impact assessment on consumers health in Bangladesh. *NFS J.* 27, 28-35.
- Aver, G.F., Espín, S., Dal Corno, R.B., García-Fernández, A.J., Petry, M.V. 2020. Organochlorine pesticides in feathers of three raptor species in southern Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27(6), 5971-5980.
- B** Behrooz, R.D., Esmaili-Sari, A., Ghasempouri, S.M., Bahramifar, N., Covaci, A. 2009. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in feathers of birds from different trophic levels of South-West Iran. *Environ. Int.* 35(2), 285-290.
- Benbrook, C.M. 2002. Organochlorine residues pose surprisingly high dietary risks. *J. Epidemiol. Community Health* 56, 822.
- Bille, L., Toson, M., Mulatti, P., Dalla Pozza, M., Capolongo, F., Casarotto, C., Ferre, N., Angeletti, R., Gallochio, F., Binato, G. 2016. Epidemiology of animal poisoning: an overview on the features and spatio-temporal distribution of the phenomenon in the north-eastern Italian regions. *Forensic Sci. Int.* 266, 440–448.

- Blais, J.M., Schindler, D.W., Muir, D.C.G., Kimpe, L.E., Donald, D.B., Rosenberg, B. 1998. Accumulation of persistent organochlorine compounds in mountains of western Canada. *Nature* 395, 585–588.
- Borga, K., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U. 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environ. Pollut.* 113, 187–198.
- Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R. 2004. Biomagnification of Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere* 55, 1043–1052.
- C** Choi, J.W., Matsuda, M., Kawano, M., Min, B.Y., Wakimoto, T. 2001a. Accumulation profiles of persistent organochlorines in waterbirds from an estuary in Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 353–363.
- Choi, J.W., Matsuda, M., Kawano, M., Wakimoto, T., Iseki, N., Masunaga, S., Hayama, S., Watanuki, Y. 2001b. Chlorinated persistent organic pollutants in black-tailed gulls (*Larus crassirostris*) from Hokkaido, Japan. *Chemosphere* 44, 1375–1382.
- Cloutier, P.L., Fortin, F., Groleau, P.E., Brousseau, P., Fournier, M., Desrosiers, M. 2017. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. *Talanta* 165, 332–338.
- Comisión Europea. 2019. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANTE/12682/2019.
- D** Dauwe, T., Jaspers, V., Covaci, A., Schepens, P., Eens, M. 2005. Feathers as a non-destructive biomonitor for persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 442–449.
- Decisión 2006/507/CE: Decisión del Consejo, de 14 de octubre de 2004, relativa a la firma, en nombre de la Comunidad Europea, del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. *Diario Oficial de la Unión Europea* n° L 209 de 31/07/2006.
- Deribe, E., Rosseland, B.O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., Norli, H.R., Eklo, O.M. 2011. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (COPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: The influence of lipid content and trophic position. *Sci. Total Environ.* 410–411, 136–145.
- Dhananjayan, V. 2013. Accumulation pattern of persistent organochlorine pesticides in liver tissues of various species of birds from India. *Environ. Sci. Pollut.* 20, 3149–3156.
- Directiva 79/117/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1978, relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* n° 33, de 08/02/1979.

Donaldson, G.M., Braune, B.M. 1999. Sex related levels of selenium, heavy metals and organochlorine compounds in American white pelicans (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 110-114.

E Elliott, J.E., Shutt, L. 1993. Monitoring organochlorines in blood of sharp shinned hawks (*Accipiter striatus*) migrating through the Great Lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 241-250.

Elliott, J.E., Kesic, R., Lee, S.L., Elliott, K.H. 2023. Temporal trends (1968-2019) of legacy persistent organic pollutants (POPs) in seabird eggs from the northeast Pacific: Is it finally twilight for old POPs? *Sci Total Environ.* 858 (Pt 3), 160084.

Espin, S., Terraube, J., Arroyo, B., Camarero, P.R., Mateo, R., Liminana, R., Vazquez Pumarino, X., Pinilla, A., Garcia, J.T., Mougeot, F. 2018. Blood concentrations of p,p'-DDE and PCBs in harriers breeding in Spain and Kazakhstan. *Sci. Total Environ.* 624, 1287-1297.

F Fossi, M.C., Massi, A., Lari, L., Marsili, L., Focardi, S., Leonzio, C., Renzoni, A. 1995. Interspecies differences in mixed-function oxidase activity in birds relationship between feeding-habits, detoxication activities and organochlorine accumulation. *Environ. Pollut.* 90, 15-24.

Fox, G.A. 2001. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 6), 853-861.

G Garcia-Heras, M.S., Arroyo, B., Simmons, R.E., Camarero, P.R., Mateo, R., Mougeot, F. 2018. Blood concentrations of PCBs and DDTs in an avian predator endemic to southern Africa: associations with habitat, electrical transformers and diet. *Environ. Pollut.* 232, 440-449.

Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A. 2009. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta* 79 (2), 109-128.

Grimm, F.A., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H.J., Ludewig, G., Hornbuckle, K.C., Duffel, M.W., Bergman, A., Robertson, L.W. 2015. Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Crit. Rev. Toxicol.* 45(3), 245-272.

H Hela, D.G., Konstantinou, I.K., Sakellarides, T.M., Lambropoulou, D.A., Akriotis, T., Albanis, T.A. 2006. Persistent organochlorine contaminants in liver and fat of birds of prey from Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50(4), 603-13.

Henny, C.J. 1998. Organochlorine pesticides, PCBs and mercury in hawk, falcon, eagle and owl eggs from the Lipetsk, Voronezh, Novgorod and Saratov regions, Russia. *J. Raptor Res.* 32, 143-150.

Hernandez-Hernandez, F., Lopez Benet, F.J., Medina Escriche, J., Barbera-Ubeda, J.C. 1987. Sulfuric acid cleanup and KOH-ethanol treatment for confirmation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: application to

- wastewater samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, 727-733.
- Herrera, A., Ariño, A., Conchello, M.P., Lazaro, R., Bayarri, S., Yagüe, C., Peiro, J.M., Aranda, S., Simon, M.D. 2000. Red-legged partridges (*Alectoris rufa*) as bioindicators for persistent chlorinated chemicals in Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 114–120.
- Herzke, D., Kallenborn, R., Nygard, T. 2002. Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: congener-, isomer- and enantiomer specific considerations. *Sci. Total Environ.* 291, 59-71.
- Heyroth, F. F. 1950. The toxicity of DDT. Part II. A survey of the literature, pp. 72–233. Kettering Laboratory, College of Medicine, Univ. Cincinnati, Cincinnati, OH.
- Holden, A.V. 1966. Organochlorine insecticide residues in salmonid fish. *J. Appl. Ecol.* 3, 45–53.
- Hoshi, H., Minamoto, N., Iwata, H., Shiraki, K., Tatsukawa, R., Tanabe, S., Fujita, S., Hirai, K., Kinjo, T. 1998. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in wild terrestrial mammals and birds from Chubu region, Japan: interspecies comparison of the residue levels and compositions. *Chemosphere* 36, 3211-3221.
- Hung, H., Katsoyiannis, A.A., Brorström-Lundén, E., Olafsdottir, K., Aas, W., Breivik, K., Bohlin-Nizzetto, P., Sigurdsson, A., Hakola, H., Bossi, R., Skov, H., Sverko, E., Barresi, E., Fellin, P., Wilson, S. 2016. Temporal trends of Persistent Organic Pollutants (POPs) in arctic air: 20 years of monitoring under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP) *Environ. Pollut.* 217, 52-61.
- J** Jaspers, V.L.B., Voorspoels, S., Covaci, A., Lepoint, G., Eens, M. 2007. Evaluation of the usefulness of bird feathers as a non-destructive biomonitoring tool for organic pollutants: a comparative and meta-analytical approach. *Environ. Int.* 33:328–37.
- Jaspers, V. L. B., Sonne, C., Soler-Rodriguez, F., Boertmann, D., Dietz, R., Eens, M., Rasmussen, L.M. & Covaci, A. 2013. Persistent organic pollutants and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in different tissues of white-tailed eagles (*Haliaeetus albicilla*) from West Greenland. *Environ. Pollut.* 175, 137-146.
- Jones, K.C., de Voogt, P. 1999. Persistent organic pollutants (COPs): state of the science. *Environ. Pollut.* 100, 209–221.
- K** Kenntner, N., Krone, O., Altenkamp, R., Tataruch, F. 2003. Environmental contaminants in liver and kidney of free ranging northern goshawks (*Accipiter gentilis*) from three regions of Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 128-135.
- Kong, D., MacLeod, M., Hung, H., Cousins, I.T. 2014. Statistical analysis of long-term monitoring data for persistent organic pollutants in the atmosphere at 20 monitoring stations broadly indicates declining concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 48 (21), 12492-12499.

Kucklick, J., Boggs, A., Huncik, K., Moors, A., Davis, E., Ylitalo, G., McConnell, M., Makris, C., Wells, R. 2022. Temporal Trends of Persistent Organic Pollutants in Sarasota Bay Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Front. Mar. Sci.* 9, 763918.

L Lambeck, R.H.D., Nieuwenhuize, J., van Liere, J.M. 1991. PCB's in oystercatchers (*Haematopus ostralegus*) from the Oosterschelde and the Western Wadden Sea that died from starvation during severe winter weather. *Environ. Pollut.* 71, 1-16.

Libralato, S. 2013. System Omnivory Index. *Encyclopedia of Ecology* 4. 3472-3477.

Lopez-Lopez, T.J., Alvarez-Pineiro, M.E., Lage-Yusty, M.A., Simal-Lozano, J. 2001. PCBs in three predatory birds from Galicia (NW Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 497-503.

Luzardo, O.P., Ruiz-Suárez, N., Henríquez-Hernández, L.A., Valerón, P.F., Camacho, M., Zumbado, M., Boada, L.D. 2014. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. *Sci. Total Environ.* 472, 146-153.

M Mackay, D., Fraser, A. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ.* 110, 375-91.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), 2012. Introducción al conocimiento y prevención de los Contaminantes

Orgánicos Persistentes. Madrid: Centro de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Secretaría General Técnica. Recuperado de: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/COPs_tcm30-185064.pdf [01/07/2021].

Mateo, R., Carrillo, J., Guitart, R. 2000. p,p'-DDE residues in eggs of European kestrel *Falco tinnunculus* from Tenerife, Canary Islands, Spain. *Bull Environ Contam. Toxicol.* 65, 780-785.

Martínez-López, E., Espín, S., Barbar, F., Lambertucci, S.A., Gómez-Ramírez, P., García-Fernández, A.J. 2015. Contaminants in the southern tip of South America: Analysis of organochlorine compounds in feathers of avian scavengers from Argentinean Patagonia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 83-92.

McFarland, V.A., Clarke, J.U. 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated congeners: Considerations for a congener-specific analysis. *Environ. Health Perspect.* 81, 225-239.

Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D. 1997. The trophodynamics of PCBs, including mono- and non-orthocongeners, in the food web of north-central Lake Ontario. *Sci. Total Environ.* 201, 245-272.

MMA (Ministerio de Medio Ambiente, Subdirección General de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos), 2007. Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento

850/2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes. Recuperado de: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/plannacionaldeaplicacion_tcm30-191965.pdf [01/07/2021].

- N** Naso, B., Perrone, D., Ferrante, M.C., Zaccaroni, A., Lucisano, A. 2003. Persistent organochlorine pollutants in liver of birds of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45(3), 407-414.
- Newton, I., Bogan, J., Marquiss, M. 1981. Organochlorine contamination and age in sparrowhawks. *Environ. Pollut.* 25, 155-160.
- Newton, I., Wyllie, I., Asher, A. 1992. Mortality from the pesticides aldrin and dieldrin in British sparrowhawks and kestrels. *Ecotoxicology* 1, 31-44.
- Newton, I., Wyllie, I., Asher, A. 1993. Long term trends in organochlorine and mercury residues in some predatory birds in Britain. *Environ. Pollut.* 79, 143-151.
- Nizzeto, L., Lohmann, R., Gioia, R., Dachs, J., Jones, K.C. 2010. Atlantic Ocean surface waters buffer declining atmospheric concentrations of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6978-6984.
- Norli, H.R., Christiansen, A., Deribe, E. 2011. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 7234-7241.
- Nuapia, Y., Chimuka, L., Cukrowska, E. 2016. Assessment of organochlorine pesticide residues in raw food samples from open markets in two African cities. *Chemosphere*, 164, 480-487.
- Nøst, T.H., Halse, A.K., Schlabach, M., Bäcklund, A., Eckhardt, S., Breivik, K. 2018.
- L** Low concentrations of persistent organic pollutants (POPs) in air at Cape Verde. *Sci. Total Environ.* 612, 129-137.
- O** Olafsdottir, K., Skirnisson, K., Gylfadottir, G., Johannesson, T. 1998. Seasonal fluctuations of organochlorine levels in the common eider (*Somateria mollissima*) in Iceland. *Environ. Pollut.* 103, 153-158.
- Oliver, B.J., Niimi, A.J. 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 22,388-397.
- P** Pano-Farias, N.S., Ceballos-Magaña, S.G., Muñoz-Valencia, R., Gonzalez, J. 2017. Validation and assessment of matrix effect and uncertainty of a gas chromatography coupled to mass spectrometry method for pesticides in papaya and avocado samples, *J. Food Drug Anal.* 25(3), 501-509.
- R** Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la

- Directiva 79/117/CEE. Diario Oficial de la Unión europea nº 158, de 29/04/2004.
- Resolución de 10 de abril de 2013, de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros de 5 de abril de 2013, por el que se aprueba la actualización del Plan nacional de aplicación del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y del Reglamento (CE) n.º 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CEE. Boletín Oficial del Estado, 30 de abril de 2013, 103, 33385-33386.
- Rial-Berriel, C., Acosta-Dacal, A., Zumbado, M., & Luzardo, O. P. (2020). Micro QuEChERS-based method for the simultaneous biomonitoring in whole blood of 360 toxicologically relevant pollutants for wildlife. *Sci. Total Environ.* 736, 139444.
- Rial-Berriel, C., Ramos-Luzardo, Á., Acosta-Dacal, A., Macías-Montes, A., Fernández-Valerón, P., Henríquez-Hernández, L. A., Zumbado, M., Boada, L.D. Luzardo, O. P. 2023. Validation of a method scope extension for simple biomonitoring of 353 pollutants in serum samples. *Toxics* 11(6), 498.
- Rognerud, S., Grimalt, J.O., Rosseland, B.O., Fernandez, P., Hofer, R., Lackner, R. 2002. Mercury and organochlorine contamination in brown trout (*Salmo trutta*) and arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from highmountain lakes in Europe and the Svalbard Archipelago. *Water Air Soil Pollut.* 2, 209–32.
- Ronis, M.J.J., Walker, C.H. 1989. The microsomal monooxygenases of birds. *Rev. Biochem. Toxicol.* 10, 301-384.
- Rosseland, B.O., Massabuau, J.C., Grimalt, J., Hofer, R., Lackner, R., Rognerud, S. 1999. The ecophysiology and ecotoxicology of fishes as a tool for monitoring and management strategy of high mountain lakes and rivers in acidified areas. *Zoology* 102, 90-100.
- S** Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Bertin, T., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. 2018. Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers. *Food Chem.* 252, 147-153.
- Schanzer, S., Kröner, E., Wibbelt, G., Koch, M., Kiefer, A., Bracher, F., Müller, C. 2021. Miniaturized multiresidue method for the analysis of pesticides and persistent organic pollutants in non-target wildlife animal liver tissues using GC-MS/MS, *Chemosphere* 279, 130434.
- Senthilkumar, K., Iseki, N., Hayama, S., Nakanishi, J., Masunaga, S. 2002. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in livers of birds from Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 244-255.

Simonich, S., Hites, R. 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 269, 1851–1854.

Subramanian, A., Tanabe, S., Hidaka, H., Tatsukawa, R. 1986. Bioaccumulation of organochlorines (PCBs and p, p-DDE) in Antarctic Adelie penguins collected during a breeding season. *Environ. Pollut.* 40, 173-189.

T Tanabe, S., Senthilkumar, K., Kannan, K., Subramanian, A.N. 1998. Accumulation features of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in resident and migratory birds from South India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 387–397.

Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk, B., Witczak, A., Rząd, I., Pilarczyk, R. 2019. PCB residues in the tissues of sea ducks wintering on the south coast of the Baltic Sea, Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26(11):11300-11313.

U Usui, K., Hashiyada, M., Hayashizaki, Y., Igari, Y., Hosoya, T., Sakai, J., Funayama, M. 2014. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. *Forensic Toxicol.* 32, 139-147.

V Van den Steen, E., Covaci, A., Jaspers, V.L.B., Dauwe, T., Voorspoels, S., Eens, M., Pinxten, R. 2007. Experimental evaluation of the usefulness of feathers as a non-destructive biomonitor for polychlorinated biphenyls (PCBs) using silastic implants as a novel method of exposure. *Environ. Int.* 33, 257–264.

van Drooge, B., Mateo, R., Vives, I., Cardiel, I., R Guitart, R. 2008. Organochlorine residue levels in livers of birds of prey from Spain: Inter-species comparison in relation with diet and migratory patterns. *Environ. Pollut.* 153(1), 84-91.

Veierov, D., Aharonson, N. 1980. Improved cleanup of large lipid samples for electron capture gas chromatographic quantitation and gas chromatographic mass spectrometric confirmation of organochlorine residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63(2), 202-207.

Vijayasathy, S., Baduel, C., Hof, C., Bell, I., Del Mar Gomez Ramos, M., Ramos, M.J.G., Kock, M., Gaus, C. 2019. Multi-residue screening of non-polar hazardous chemicals in green turtle blood from different foraging regions of the Great Barrier Reef. *Sci. Total Environ.* 652, 862–868.

W Waliszewski, S. M., Mójica García, X., Infanzón, R. M., Barradas Dermitz, D. M., Carvajal Zarrabal, O. 2008. Uso del ácido sulfúrico en las determinaciones de plaguicidas organoclorados. I. Calidad química-analítica de la precipitación de grasas por el ácido sulfúrico concentrado en muestras con alto contenido de lípidos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24(1), 33-38.

Walker, C.H., Newton, I., Hallam, S.D., Ronis, M.J.J. 1987. Activities and toxicological significance of hepatic microsomal enzymes of the kestrel (*Falco tinnunculus*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 86, 379-382.

- Walker, C.H. 1990. Persistent pollutants in fish-eating sea birds-bioaccumulation, metabolism and effects. *Aquat. Toxicol.* 17, 293-324.
- Walker, C.H. 2001. Organic pollutants—An ecotoxicological perspective. 2^a Ed. Taylor & Francis, London.
- Wania, F., Mackay, D. 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio.* 22, 10–18.
- West, J.E., O’Neill, S., Ylitalo, G. 2017. Time trends of persistent organic pollutants in benthic and pelagic indicator fishes from Puget Sound, Washington, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 207–229.
- Wienburg, C.L., Shore R.F. 2004. Factors influencing liver PCB concentrations in parrowhawks (*Accipiter nisus*), kestrels (*Falco tinnunculus*) and herons (*Ardea cinerea*) in Britain. *Environ. Pollut.* 132(1), 41-50.
- Wiesmuller, T., Sommer, P., Volland, M., Schlatterer, B. 2002. PCDDs/PCDFs, PCBs, and organochlorine pesticides in eggs of Eurasian sparrowhawks (*Accipiter nisus*), hobbies (*Falco subbuteo*), and northern goshawks (*Accipiter gentilis*) collected in the area of Berlin-Brandenburg, Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 486-496.
- Wiemeyer, S.N., Frenzel, R.W., Anthony, R.G., McClellan, B.R., Knight, R.L. 1989. Environmental contaminants in blood of western bald eagles. *J. Raptor Res.* 23, 140-146.

SITUACIÓN DE LOS ENVENENAMIENTOS DE FAUNA EN EXTREMADURA
Y APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN SU DIAGNÓSTICO

RESUMEN

ABSTRACT

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

2. CASUÍSTICA DE INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA (ESPAÑA) DURANTE EL PERIODO DE 2002 A 2018

3. USO DE CEBOS ENVENENADOS CONTRA LA FAUNA SILVESTRE EN EL MEDIO RURAL DE EXTREMADURA (2002 - 2018)

4. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE OCS Y PCBS EN AVES SILVESTRES

5. CONCLUSIONES GENERALES

5

Conclusiones generales

5. Conclusiones generales

- 1** Las principales víctimas de las intoxicaciones (envenenamientos) en el medio natural de Extremadura son las aves, siendo las especies rapaces y necrófagas las más frecuentemente afectadas, seguidas por especies de pequeños carnívoros, coincidiendo con los resultados de otros estudios similares a nivel nacional e internacional.
- 2** En una región con una riqueza faunística única a nivel nacional y europeo como Extremadura, las intoxicaciones afectan de manera importante a especies incluidas en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, representando por tanto un grave riesgo para su conservación y biodiversidad.
- 3** La mayoría de los casos de intoxicación son provocados por insecticidas de uso ya prohibido, principalmente los inhibidores de la colinesterasa, por su accesibilidad, fácil manipulación y capacidad letal.
- 4** Los cebos envenenados son un método frecuentemente utilizado para actuar contra la fauna, y suponen un grave problema a tener en cuenta.
- 5** En su mayoría, los cebos envenenados conllevan una preparación (material comestible recubierto o mezclado con una sustancia tóxica), lo que evidencia su intencionalidad criminal.

- 6 Los cebos preparados con material cárnico y con compuestos inhibidores de la colinesterasa son los más frecuentes, evidenciando su propósito de actuar contra especies carnívoras y/o necrófagas. Se han encontrado otros tipos de preparaciones dirigidas intencionadamente contra otras especies y en situaciones muy específicas.
- 7 Estas prácticas se circunscriben a zonas donde coinciden cierta riqueza faunística y fuerte actividad agrícola, ganadera y/o cinegética, evidenciando que existe un conflicto entre estas actividades humanas y los depredadores silvestres.
- 8 La distribución mensual de cebos positivos demuestra que los picos de mayor incidencia se presentan en primavera y otoño, coincidiendo con los periodos de mayor actividad ganadera, más recursos naturales de alimento para el ganado y la fauna, y/o con actividad cinegética. En cuanto a la vida silvestre, estos períodos también coinciden con la temporada de reproducción y migración de aves.
- 9 El método QuEChERS como método de extracción para el análisis de plaguicidas organoclorados y PCBs en hígado de ave, es un método válido y efectivo que suple las deficiencias de los métodos tradicionales, optimizando el trabajo laboratorial.

- 10 Las diferencias en los niveles de residuos de plaguicidas organoclorados (OCs) y sustancias químicas de origen industrial bifenilos policlorados (PCBs) en hígado de aves de 3 niveles tróficos, sólo se obtuvieron entre las concentraciones de DDE, DDD, PCB153, PCB138 y PCB18 en cigüeña blanca y milano real; entre las concentraciones de α HCH, heptacloro epóxido y PCB153 en cigüeña blanca y buitre leonado; entre las concentraciones de heptacloro epóxido, DDE, PCB118, PCB153, PCB138 y PCB180 en milano real y buitre leonado. Pero de manera general, no fueron significativas y no fueron claramente concluyentes para relacionar los niveles de contaminantes con el nivel trófico.
- 11 Es necesario reforzar los esfuerzos para aumentar los tamaños muestrales, reducir los sesgos de los muestreos (a lo que podría ayudar la recogida de muestras no invasivas como las plumas) y recoger más datos sobre las circunstancias de cada caso, con el objetivo de seguir conociendo mejor los factores que influyen en la acumulación de estos contaminantes, poder evaluar la evolución de los mismos en la fauna y poder comparar de una manera más rigurosa unos estudios con otros.

