



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



Departamento de Ciencias Sociosanitarias  
Área de Toxicología  
Facultad de Veterinaria

El Búho real (*Bubo bubo*) como especie biomonitorea de contaminantes ambientales persistentes en el Sureste de España



The Eagle Owl (*Bubo bubo*) as biomonitor of persistent environmental pollutants in southeastern Spain

Memoria que presenta la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> Pilar Gómez Ramírez, para optar al grado de Doctor en Veterinaria con mención de “Doctorado Europeo”.

Murcia, Junio de 2011



*Since negligence of the environment - which has resulted in lots of harm to the human community - came about by ignorance of the very special importance of the environment, I think it is very important first of all to instill this knowledge within human beings.*

*Dalai Lama*



I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
II.1. BIOMONITORIZACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES .....	13
II.1.1. Las aves como biomonitores de contaminación ambiental .....	15
II.1.2. Utilidad de los pollos en biomonitorización .....	16
II.1.3. Biomarcadores.....	16
II.2. CONTAMINANTES AMBIENTALES OBJETO DE ESTUDIO .....	20
II.2.1. Contaminantes orgánicos persistentes .....	21
II.2.1.1. Insecticidas organoclorados .....	21
II.2.1.2. Bifenilos policlorados (PCBs).....	33
II.2.1.3. Retardantes de llama bromados.....	35
II.2.1.4. Cinética de los compuestos organohalogenados.....	37
II.2.1.5. Factores que afectan a la toxicidad de los compuestos organohalogenados.....	40
II.2.1.6. Efectos tóxicos de los compuestos organohalogenados sobre las aves.	42
II.2.1.7. Interpretación de las concentraciones de compuestos organohalogenados en aves .....	50
II.2.2. Metales pesados.....	71
II.2.2.1. Cadmio .....	73
II.2.2.2. Plomo.....	74
II.2.2.3. Zinc .....	76
II.2.2.4. Cobre .....	77
II.2.2.5. Factores que afectan a la toxicidad de los metales en aves.....	77
II.2.2.6. Efectos tóxicos de los metales en las aves .....	81
II.2.2.7 Interpretación de las concentraciones de metales en aves. ....	86
II.2.3. Rodenticidas anticoagulantes .....	97
II.2.2.1. Warfarina y derivados hidroxycumarínicos.....	99
II.2.2.2. Derivados de la indandiona .....	102
II.2.2.3. Cinética de los rodenticidas anticoagulantes .....	103
II.2.2.4. Mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes .....	104



II.2.2.5. Factores que afectan a la toxicidad de los rodenticidas anticoagulantes.	105
II.2.2.6. Efectos tóxicos de los rodenticidas anticoagulantes en aves	107
II.2.2.7. Interpretación de las concentraciones de rodenticidas anticoagulantes	108
III. MATERIAL Y MÉTODOS	113
III.1. ESPECIE DE ESTUDIO	114
III.2. ÁREA DE ESTUDIO	120
III.3. METODOLOGÍA DE MUESTREO	123
III.4. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN SANGRE	125
III.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA $\delta$ -ALAD EN SANGRE	130
III.6. DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN SANGRE	120
III.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS EN HUEVOS NO ECLOSIONADOS	134
III.8. DETERMINACIÓN DE RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES	140
III.9. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO SANGUÍNEO	145
III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	146
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
IV.1. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A METALES (Cd, Pb, Cu y Zn) EN SANGRE DE POLLOS DE POLLOS DE BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA	150
IV.1.1 Evaluación de las concentraciones de metales en sangre de pollos de Búho real	150
IV.1.2. Evaluación de la exposición a metales en una zona contaminada por una antigua explotación minera	152
IV.1.3. Correlaciones entre metales	156
IV.1.1 Inhibición de la actividad $\delta$ -ALAD en pollos de Búho real nacidos en una antigua zona minera	157
IV.2. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN SANGRE DE POLLOS DE BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA	160
IV.2.1. Niveles de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real	160



IV.2.2. Evolución espacio-temporal de los residuos de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real .....	167
IV.3. RESIDUOS DE COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS EN HUEVOS NO ECLOSIONADOS DE BÚHO REAL: TENDENCIAS ESPACIO-TEMPORALES Y EVALUACIÓN DEL RIESGO .....	175
IV.3.1. Niveles de insecticidas organoclorados en huevos no eclosionados de Búho real .....	177
IV.3.2. Niveles de PCBs en huevos no eclosionados de Búho real.....	181
IV.3.3. Niveles de PBDEs en huevos no eclosionados de Búho real .....	184
IV.3.4. Tendencias temporales y espaciales de los compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados de Búho real .....	185
IV.3.5. Interpretación de las concentraciones y evaluación del riesgo .....	190
IV.4. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES EN BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA.....	194
IV.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS Y SU RELACIÓN CON LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES PERSISTENTES.....	197
IV.5.1. Estudio de las correlaciones entre parámetros bioquímicos sanguíneos y los niveles de metales pesados en sangre de pollos de Búho real .....	205
IV.5.2. Estudio de las correlaciones entre parámetros bioquímicos sanguíneos y los niveles de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real...	206
V. CONCLUSIONS .....	210
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	214
VII. RESUMEN .....	283
VII. EXTENDED SUMMARY .....	288



## **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



La liberación al medio de grandes cantidades de multitud de sustancias químicas derivadas de las actividades humanas representa uno de los mayores problemas al que los seres vivos nos enfrentamos. Estas sustancias complejas, a menudo resistentes a los procesos naturales de degradación, pueden llegar interactuar con los seres vivos y las fases inertes de los ecosistemas, provocando la aparición de efectos indeseables en los mismos. Gracias a la capacidad del medio para absorber y remediar la contaminación ambiental, los seres vivos tienden a adaptarse y sobrevivir ante esta situación. Sin embargo, cuando la contaminación sobrepasa esta capacidad del medio, aparecen los síntomas de degradación y degeneración tales como la desertificación, el efecto invernadero, la lluvia ácida, los declives poblacionales y la extinción de especies, etc. Dichos efectos no se limitan a las zonas próximas a las fuentes de emisión, ya que muchas de estas sustancias pueden ser transportadas a largas distancias alcanzando zonas donde estos compuestos no han sido utilizados. Este es el caso de los contaminantes orgánicos persistentes que, debido a sus características físico-químicas, pueden trasladarse desde zonas templadas a otras más frías, llegando a alcanzar los polos terrestres.

Algunos de estos contaminantes ambientales se encuentran en el medio ambiente desde el origen de la Tierra. No obstante, la actividad humana, sobre todo a partir de la Revolución Industrial, ha dado lugar a una mayor exposición de los seres vivos y la aparición de nuevas sustancias cuyos efectos a largo plazo no siempre son conocidos. En el caso de los metales y los compuestos organohalogenados, diversos estudios demuestran que su exposición crónica puede causar alteraciones sobre el sistema endocrino, reproductivo y nervioso de los animales, las cuales se han relacionado con declives poblacionales de un número importante de especies (Jiménez *et al.*, 2005). Este hecho provocó la prohibición de la mayoría de estos compuestos, lo que se tradujo en una disminución de los residuos en el medio y los tejidos de los animales (Bustnes *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a elevada persistencia y capacidad para bioacumularse y biomagnificarse a través de la cadena trófica, las concentraciones ambientales pueden ser todavía lo suficientemente elevadas como para suponer un riesgo medioambiental.

Por este motivo, y con el fin de satisfacer el creciente interés general de conocer los niveles de contaminantes ambientales presentes en el medio ambiente y los efectos



que pueden causar a largo plazo sobre los seres vivos se llevan a cabo los programas de monitorización ambiental (García-Fernández y María-Mojica, 2000). Cuando se miden las concentraciones de los contaminantes en tejidos biológicos o se evalúan los efectos relacionados con la exposición en seres vivos, hablamos de biomonitorización. El uso de los animales como centinelas viene de tiempos remotos. Ya en época de los romanos, los mineros de carbón sabían que las aves eran más sensibles que los mamíferos al monóxido de carbono, por lo que se solían utilizarlas para alertar del riesgo inminente. De hecho, en 1916, la Oficina de Minas de EEUU recomendaba en concreto los canarios para este propósito.

Entre las ventajas del uso de animales para evaluar el grado de contaminación se encuentra el hecho de que permite correlacionar los niveles de contaminantes presentes en fluidos, tejidos y secreciones de estos animales con los presentes en el medio. Además, el estudio de este tipo de muestras permite obtener datos sobre los posibles efectos adversos sobre los animales y, si los animales estudiados pertenecen a la parte alta de la cadena trófica, se obtiene una información más real del riesgo de exposición en el hombre, así como de los efectos sobre su salud (García-Fernández y María-Mojica, 2000).

Las aves rapaces, incluidas las nocturnas, se consideran buenas indicadoras de la calidad del hábitat y de las posibles alteraciones medioambientales. Esto se debe a que, debido a su posición elevada en la cadena trófica, son sensibles a los efectos de los contaminantes ambientales, especialmente de aquellos compuestos bioacumulables y biomagnificables a través de la cadena trófica. Por este motivo, y porque en general estas aves han sido infrautilizadas en este tipo de estudios, algunos autores sugieren la necesidad de continuar y mejorar los estudios de biomonitorización en estas especies.

La información obtenida de estos estudios de monitorización en rapaces puede ser utilizada en los procedimientos de evaluación de riesgos regulados por el Reglamento 1907/2006 REACH de la Unión Europea (Duke, 2008). Este Reglamento, que consiste en un sistema integrado de registro, evaluación, autorización y registro de sustancias y preparados químicos, pretende garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, los resultados obtenidos en la





monitorización en rapaces pueden además desencadenar la evaluación de otras que pudieran pasar inadvertidas (Duke, 2008).

La medición directa de los contaminantes en tejidos y fluidos animales permite conocer adecuadamente el grado de exposición, absorción y acumulación de estos compuestos. Sin embargo mediante la monitorización de las respuestas biológicas que estos contaminantes producen se obtiene una información más directa de las alteraciones y posibles consecuencias toxicológicas. Entre los cambios fisiológicos o biomarcadores relacionados con contaminantes ambientales, dos han sido los más frecuentemente utilizados; por un lado, la inhibición de la ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa (enzima que interviene en la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina) del eritrocito tras la exposición a plomo y, por otro lado, la disminución del grosor de cáscara del huevo por la exposición crónica a p,p'-DDE. Puesto que los efectos adversos sobre algunos órganos como el hígado o el riñón pueden traducirse en alteraciones de determinados parámetros bioquímicos, el estudio detallado de estos parámetros permite evaluar de manera indirecta el estado de salud general de los individuos y relacionar los residuos de contaminantes con alteraciones bioquímicas de los organismos. El incremento de conocimiento en esta materia podría ser de interés en la búsqueda de biomarcadores de exposición a estos compuestos.

Otro tipo de compuestos tóxicos que suponen un riesgo para las aves, especialmente para las que se alimentan de roedores como el Búho real, son los rodenticidas anticoagulantes. Mientras que en España los datos sobre niveles de rodenticidas en aves silvestres se refieren a casos de intoxicación aguda por sospecha de envenenamiento (María-Mojica *et al.*, 1998) o tras la aplicación masiva intencionada para la erradicación de plagas (Olea *et al.*, 2009), estudios previos en Reino Unido y EEUU demuestran una elevada frecuencia de detección, incluso en animales sin sintomatología asociada, por lo que actualmente se han incluido en programas de biomonitorización (Stone *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2010b). Dado que en nuestra zona de estudio el Búho real es una especie relativamente abundante que en ocasiones habita ambientes humanizados asociados a zonas de cultivo donde este tipo de biocidas pueden aplicarse, el estudio continuado de los niveles de rodenticidas en esta especie sería recomendable, pudiendo servir como indicador del tipo de compuestos que se están aplicando en la zona.



## **OBJETIVOS**

### **1. Evaluación de la exposición a metales (Cd, Pb, Cu y Zn) en sangre de pollos de Búho real del Sureste de España**

- 1.1. Conocer los niveles de exposición a cadmio, plomo, cobre y zinc en pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España.
- 1.2. Evaluar la influencia de la contaminación por metales en los individuos nacidos en una antigua zona minera o sus alrededores y los posibles efectos adversos asociados.

### **2. Evaluación de la exposición a insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real del Sureste de España**

- 2.1. Conocer el grado de exposición a 14 insecticidas organoclorados en los pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España.
- 2.2. Evaluar la utilidad de estas muestras como indicador de variaciones temporales en los niveles debidos a las restricciones legales o cambios en las prácticas agrícolas.

### **3. Residuos de compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados de Búho real: Tendencias espacio-temporales y evaluación del riesgo**

- 3.1. Evaluar los niveles de contaminantes organohalogenados presentes en huevos no eclosionados de Búho real recogidos entre 2004 y 2009.
- 3.2. Estimar la tendencia de la variación espacio-temporal de los niveles de compuestos organohalogenados en la zona de estudio.
- 3.3. Establecer posibles relaciones de la exposición a compuestos organohalogenados con el fracaso reproductivo.



#### **4. Evaluación de la exposición a rodenticidas anticoagulantes en Búho real del Sureste de España**

- 4.1. Conocer el grado de exposición a rodenticidas anticoagulantes en el Búho real del Sureste de España mediante la puesta a punto de una nueva técnica sencilla, rápida y poco costosa.
- 4.2. Relacionar dichos residuos con los productos presentes en el mercado español y estimar los riesgos asociados a los residuos encontrados.

#### **5. Estudio de parámetros sanguíneos y su relación con los contaminantes ambientales persistentes**

- 5.1. Proporcionar información sobre los valores de distintos parámetros bioquímicos sanguíneos como indicadores del estado de salud de los individuos de Búho real.
- 5.2. Buscar posibles relaciones entre la exposición a contaminantes ambientales y las variaciones de los parámetros bioquímicos.



## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## II.1. BIOMONITORIZACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES

Los programas de monitorización ambiental se llevan a cabo con el fin de satisfacer el creciente interés general de conocer los niveles de contaminantes ambientales presentes en el medio ambiente y los efectos que pueden causar a largo plazo sobre los seres vivos (García-Fernández y María-Mojica, 2000). Dichos programas consisten en la recolección repetida de datos durante un periodo de tiempo con el fin de determinar tendencias en los parámetros medioambientales (Chapman *et al.*, 1987).

La monitorización de parámetros químicos y físicos en aire, agua, tierra y sedimentos nos puede indicar la magnitud de la contaminación en un lugar determinado, pero gracias a la biomonitorización, es decir, la medición de concentraciones de un contaminante en tejidos o de los efectos relacionados con su exposición en seres vivos, podremos conocer además la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos (Beeby, 2001).

De forma general, los organismos a través de los cuales se estudia el impacto de las sustancias químicas se denominan biomonitores o monitores biológicos. Algunos autores como Beeby (2001) matizan algunas diferencias y definen especies **monitoras** como aquellas cuyas alteraciones en sus funciones o rendimiento indican el impacto causado por los tóxicos; especies **indicadoras** como aquellas cuya ausencia o presencia indican la magnitud de la contaminación; y especies **centinelas** como aquellas capaces de acumular contaminantes en sus tejidos sin sufrir sus efectos adversos. Según esta clasificación, podemos referirnos al Búho real como especie monitora.

Según el National Research Council (1991), para que una especie sea considerada una buena especie centinela debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ofrecer respuesta a los agentes o grupo de agentes objeto de medida: Si se trata de especies extremadamente sensibles, el rápido descenso en sus poblaciones puede ser una alarma para los investigadores, mientras que si las especies estudiadas son más resistentes al cambio, los animales pueden ser capturados periódicamente para medir los residuos y evaluar efectos



subletales (reproductivos, inmunes, neurológicos). Por ello la especie debe ser longeva para que pueda acumular las concentraciones capaces de provocar efectos adversos.

- Habitar en un territorio o rango de influencia que abarque el área de monitorización: Cuando se pretende evaluar pequeñas áreas con la intención de encontrar el punto de origen de contaminación, no se podrá utilizar una especie cuyo área de campeo abarque largas distancias y visite la zona de estudio ocasionalmente o visite otras zonas contaminadas. Por este motivo se precisan animales que habiten pequeñas áreas, como es el caso de los roedores, los reptiles y las aves no migradoras.
- Ser fácilmente censadas y capturadas: Gracias a estas características se podrá llevar a cabo otros tipos de monitorización al permitir indicar la localización del animal, sus desplazamientos, comportamiento, etc.
- Existir un tamaño de población suficiente y una densidad adecuada: Diversos motivos desaconsejan la utilización de especies raras o en peligro. Se trata de poblaciones cuyos individuos no se localizan con facilidad, se pueden ver expuestos a distintos factores de estrés que enmascaren los efectos de los contaminantes y además su estado de protección legal puede impedir su manejo y la toma de muestras.

Además, según Moore (1966), se debe escoger una especie cuya edad de los individuos muestreados se pueda determinar fácilmente por inspección visual. Cuando se requiera evaluar el grado de contaminación reciente se escogerán animales jóvenes o de vida corta, mientras que para conocer el grado de bioacumulación, animales más longevos serán de elección.

Aún cuando se identifique una especie como buena biomonitora, existe el problema de relacionar los residuos detectados con los efectos biológicos (Forbes y Forbes, 1994).

La correcta interpretación de las concentraciones encontradas en los tejidos de animales silvestres nos proporcionará información acerca de la contaminación presente en el medio en el que habitan, sus hábitos alimenticios o el grado de biomagnificación del contaminante en cuestión. Sin embargo son pocos los autores que cuestionan si las



concentraciones encontradas afectan la salud de esos animales (Beyer, 1996). El hecho de que los contaminantes puedan ejercer efectos adversos a distintos niveles del organismo simultáneamente, que los animales suelen estar expuestos en la naturaleza a distintas combinaciones de contaminantes y que la misma concentración de un mismo compuesto pueda causar distintos efectos en función de la especie, la edad o el estado fisiológico del individuo son algunos factores que dificultan la interpretación de resultados (Beyer, 1996). El estudio de determinados efectos asociados a la exposición a determinadas sustancias junto con la información obtenida en estudios de laboratorio puede paliar las dificultades de esta interpretación.

### **II.1.1. Las aves como biomonitores de contaminación ambiental**

El valor de las aves en los estudios de biomonitorización de contaminantes ambientales ha sido ampliamente reconocido, y la existencia de numerosos programas de este tipo establecidos por instituciones gubernamentales son la prueba de ello (Becker, 2003).

La inclusión de este grupo de animales en los programas de biomonitorización se ve favorecida por una serie de características comunes. En general, las aves son animales relativamente fáciles de identificar, suficientemente estudiados y conocidos, sobre todo en cuanto a su ecología y comportamiento, lo cual permite obtener datos de vigilancia fácilmente incorporables a un programa de biomonitorización. Además los niveles de contaminantes presentes en sus fluidos, tejidos y secreciones se pueden correlacionar con los niveles del medio y su estudio proporciona información acerca de los posibles efectos patológicos que pudieran producir los microcontaminantes sobre estos individuos. A su vez los datos recopilados pueden resultar fundamentales en el diseño de nuevos programas de biomonitorización cada vez más eficaces (Furness, 1993).

Entre las aves, el grupo de las rapaces se consideran especies adecuadas para la monitorización de contaminantes bioacumulables y biomagnificables como los metales y los compuestos organohalogenados debido a su elevada posición en la cadena trófica y capacidad para bioacumular e integrar contaminantes a lo largo del tiempo (Furness, 1993).



## II.1.2. Utilidad de los pollos en biomonitorización

Numerosas investigaciones recientes han utilizado pollos como indicadores de contaminación local en sus estudios de biomonitorización ambiental (Scharenberg, 1991; Frank y Lutz, 1999; van Wyk *et al.*, 2001). Por un lado, la toma de muestras de pollos resulta más eficiente y menos costosa que la de adultos o la de suelo. Además, el alimento consumido por los pollos en desarrollo es obtenido normalmente de zonas cercanas al nido y, por tanto, se atribuye a la ingesta limitada por el área de campeo de los padres durante un periodo claramente definido. Por otro lado, los niveles en pollos tienden a ser menos variables que en adultos porque los pollos suelen ser alimentados con dietas selectas muy energéticas, y la posible especialización en la dieta de adultos se compensa al ser ambos progenitores los que alimentan a los pollos. Por estos motivos, y sobre todo en especies que tienden a reutilizar los nidos o zona de cría y posaderos, este tipo de biomonitorización permite estudiar las diferencias en la exposición a contaminantes entre años (Frank y Lutz, 1999).

El pequeño inconveniente podría encontrarse en la cuantificación de las cantidades de contaminantes transferidos por la madre en huevo, pero es probable que se trate de una proporción insignificante puesto que la masa del huevo representa sólo un 2-8 % de la masa corporal en pollos desarrollados (Furness, 1993).

## II.1.3. Biomarcadores

Mientras que la medición directa de los niveles de contaminantes en tejidos y fluidos animales refleja adecuadamente el grado de exposición, absorción y acumulación de metales y otros contaminantes ambientales, la monitorización de las respuestas biológicas que se producen proporciona una información más directa de las alteraciones y posibles consecuencias toxicológicas (Vanparys *et al.*, 2008). Estos cambios fisiológicos se denominan biomarcadores o marcadores biológicos y son el resultado de una alteración inducida por un xenobiótico en los componentes celulares o bioquímicos o en los procesos, estructuras o funciones medibles en un sistema biológico o su muestra (National Research Council, 1987).





### **Biomarcadores de exposición**

La medición directa de las concentraciones de un xenobiótico o sus metabolitos en cualquier tejido o fluido de cualquier organismo nos indica el grado de impregnación y permite hipotetizar el tipo y grado de exposición y sus posibles consecuencias para la salud. Ésto no quiere decir que una misma concentración de contaminantes en el mismo tejido de animales diferentes sea indicativa del mismo tipo de exposición (Moriarty, 1999), de lo que se deriva la importancia del conocimiento previo de la cinética del compuesto que se va a evaluar y de la medición del mismo en los tejidos que participan en mayor grado de esa cinética (García-Fernández, 1994).

Cuando el contaminante o sus metabolitos pueden cuantificarse en muestras no cruentas como orina, heces, sangre, huevos o leche o bien en muestras de tejidos obtenidos en necropsia o biopsia, los biomarcadores de exposición resultan idóneos en la monitorización. En ese caso las muestras no cruentas son las más deseables porque pueden ser empleadas para determinaciones múltiples a lo largo del tiempo, lo que aumenta la utilidad del biomarcador al proporcionar más información y reducir la variabilidad (Peakall, 1992).

Los huevos se han utilizado con éxito en la evaluación de la exposición a compuestos organohalogenados en numerosos estudios (Donaldson *et al.*, 1999; Norstrom, 2002; Jaspers *et al.*, 2005; Martínez-López *et al.*, 2007; van den Steen *et al.*, 2009; Morrissey *et al.* 2010). Su utilidad se basa en la suposición de que las concentraciones de dichas sustancias en los huevos reflejan las concentraciones en el adulto, ya que durante la producción de huevos se produce un aumento de la síntesis de lípidos y movilización de los lípidos almacenados que serán transferidos al huevo. Además se trata de muestras fáciles de obtener y almacenar, con composición constante, cuya obtención se restringe a la época de cría. Este último hecho conlleva poca variabilidad en los niveles de contaminantes. Por estos motivos, los huevos de aves han sido utilizados en el análisis de contaminantes ambientales persistentes para evaluar el riesgo en multitud de especies de aves (Wiesmüller *et al.*, 2002). El inconveniente de este tipo de muestras es que motivos legales y éticos no permiten la recolección de huevos viables, lo cual puede limitar el número de muestras disponibles (Martínez-López *et al.*, 2007). Este tipo de huevos suelen ser producidos por parejas



jóvenes, aves con defectos o afectadas por sustancias tóxicas, por lo que las concentraciones de organoclorados que contienen suelen ser atípicas (Becker, 2003). Además, normalmente los niveles son mayores en los últimos huevos puestos. Este hecho es debido, al parecer, a que el contenido en los primeros huevos procede de la dieta, mientras que las reservas corporales contribuyen en mayor medida a los últimos huevos (Mineau, 1982). Sin embargo, siempre teniendo en consideración estos hechos, según algunos estudios, los niveles encontrados en los huevos no eclosionados son similares a los que llegan a desarrollarse y eclosionar (Furness, 1993).

Tanto la sangre como el plasma y el suero sanguíneo han sido utilizados con éxito para la evaluación de la exposición a compuestos organohalogenados y metales, tanto en la especie humana como en las aves, incluso utilizando volúmenes de muestra muy pequeños (García-Fernández *et al.*, 1997; Rivera-Rodríguez *et al.*, 2007; Jakszyn *et al.*, 2009, Martínez-López *et al.*, 2009; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). El estudio de este tipo de muestras en biomonitorización con aves supone una alternativa a los huevos u otros tipos de tejidos más críticos (Custer y Custer, 1995). Como resultado se obtiene una fotografía de los niveles de contaminantes que refleja, por un lado, la exposición a corto plazo (ingesta diaria inmediata) y, por el otro, fenómenos fisiológicos, como la movilización de reservas para producir huevos o aumento de volumen sanguíneo al inicio de la muda (Furness, 1993; García-Fernández *et al.*, 1995; Martínez-López *et al.*, 2009).

Los niveles de metales en sangre son un reflejo de la absorción directa inmediata por el alimento consumido en menos de una semana antes de la toma de muestra, así como por movilización desde tejidos internos y la eliminación por heces, plumas, huevos o acumulación en tejidos (Braune y Gaskin, 1987). En el caso de los pollos, la movilización es mínima debido al corto periodo de exposición, por lo que el aporte procede principalmente de la dieta (Burger y Gochfeld, 1995).

### ***Biomarcadores de efecto***

Por definición se trata de cualquier alteración bioquímica o fisiológica cuantificable que se produce como consecuencia de la exposición a los contaminantes.



### Enzimas del metabolismo de aminoácidos

Dos enzimas transaminasas, la aspartato transaminasa o AST (antes conocida como *transaminasa glutámico-oxalacética* o GOT), y la alanina transaminasa o ALAT anteriormente conocida como *transaminasa glutámico-pirúvica* (GPT) son de especial importancia clínica. Dado que se trata de enzimas intracelulares, sus niveles en suero suelen ser bajos pero aumentarán considerablemente ante un daño tisular serio. Estas enzimas se localizan principalmente en la mitocondria, en lugar del citosol, por lo que la liberación total sólo se producirá cuando las membranas celulares y mitocondriales estén dañadas.

La enzima de la que se dispone mayor cantidad de información es, sin duda, la AST. La liberación de esta enzima al torrente sanguíneo se considera un indicador de daño de los hepatocitos, más que de cambios en la función hepática. Gran número de sustancias provocan un aumento en los niveles de esta enzima. La gran excepción son los metales pesados, ya que se han observado distintas respuestas. Respecto a la ALAT, sus niveles aumentan en aves expuestas a plomo, probablemente debido a un daño renal (Rozman *et al.*, 1974).

### Enzimas del metabolismo de carbohidratos

La enzima mejor estudiada es la lactato deshidrogenasa (LDH), encargada de regular la conversión del piruvato a ácido láctico. El aumento en los niveles de esta enzima suele correlacionarse con la exposición a compuestos organohalogenados (Peakall, 1992).

En ratas expuestas a distintos organoclorados (DDT, clordano, heptacloro y endrin), Kacew y Singhal (1974) observaron un aumento del 50% de la glucosa sérica y una disminución del 60% del glicógeno hepático respecto a los controles además de un aumento de la actividad de cuatro enzimas que intervienen en la gluconeogénesis (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxikinasa, fructosa 1,6-difosfatasa y G-6-P-fosfatasa).



### Ácido $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa ( $\delta$ -ALAD)

La inhibición de la  $\delta$ -ALAD del eritrocito como consecuencia de la absorción del plomo persistirá durante semanas o meses después de la exposición, en función de las concentraciones de plomo presentes en el organismo (Dieter y Finley, 1978; Pain, 1987).

La especie es un factor que puede influir en el grado de inhibición enzimática, al igual que en los efectos patológicos consecuentes. Aparentemente las aves acuáticas pueden tolerar cierta reducción de la actividad  $\delta$ -ALAD del eritrocito sin mostrar signos de anemia (disminución del hematocrito o concentración de la hemoglobina). Además esta anemia puede aparecer en estas especies después de una severa (mayor del 75%) inhibición de la actividad  $\delta$ -ALAD en casos de intoxicación aguda (Pain y Rattner, 1988) o una inhibición ligera prolongada durante el tiempo.

### Patrón de congéneres de PCBs

Recientemente se ha sugerido que el estudio del patrón de congéneres de PCBs en las muestras biológicas puede servir como biomarcador de efecto de estos compuestos (van der Brink *et al.*, 2000). Esto se debe a que la fracción de PCBs metabolizables se correlaciona negativamente con la exposición a PCBs, reflejando la inducción de enzimas que metabolizan estos compuestos, como la CYP1A1 (van der Brink *et al.*, 2000). La inducción de la actividad de la enzima se considera un biomarcador sensible de los efectos relacionados con la activación del receptor Ah (arilo-hidrocarburo) por los PCBs y otros compuestos “tipo dioxina” (Bosveld y van der Berg, 1994). Por tanto, la disminución de la fracción de PCBs metabolizables puede reflejar la inducción de esas enzimas.

## **II.2. CONTAMINANTES AMBIENTALES OBJETO DE ESTUDIO**

Los seres vivos se ven expuestos en su ambiente, a multitud de elementos y compuestos tóxicos. Por su amplia distribución, muchos de ellos se consideran contaminantes ambientales que pueden afectar negativamente a la salud de los individuos expuestos. Precisamente, debido a los efectos que han ocasionado sobre las poblaciones de aves silvestres, los compuestos organoclorados en primer lugar, y



seguidamente los metales, los rodenticidas anticoagulantes y más recientemente los compuestos bromados retardantes de llama son los principales contaminantes analizados en los estudios de biomonitorización (Henny y Elliott, 2007) y también objeto de estudio de la presente memoria.

### **II.2.1. Contaminantes orgánicos persistentes**

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) constituyen un grupo de compuestos con características físico-químicas comunes que les confieren las propiedades de lipofilia, persistencia a la degradación, tendencia a la bioacumulación en el medio ambiente y los organismos, toxicidad y transporte atmosférico a largas distancias. Esto es debido a que los enlaces que se forman entre el carbono y los átomos de elementos halógenos son muy estables a la hidrólisis, por lo que cuanto mayor sea el número de halógenos sustituidos, mayor será la resistencia a la degradación biológica o fotolítica. Además, aquellos átomos unidos a un anillo aromático (benceno) son más estables a la hidrólisis que cuando se unen a estructuras alifáticas.

Dentro del gran grupo de hidrocarburos halogenados, los compuestos organoclorados son los más importantes, de los cuales estudiaremos los insecticidas organoclorados y bifenilos policlorados.

#### **II.2.1.1. Insecticidas organoclorados**

El primer insecticida organoclorado, el DDT, fue sintetizado en 1874 por Zeidler. El descubrimiento de sus propiedades insecticidas en 1939 por Müller y su gran eficacia en el control de plagas que afectaban a la salud humana durante la II Guerra Mundial supuso un éxito en el campo de la salud pública (Dikshith, 1991). Sin embargo el principal uso de los insecticidas organoclorados ha sido básicamente agrícola. Fue durante el auge de la agricultura intensiva de la posguerra cuando obtuvieron gran popularidad debido a que, a pesar de ser enormemente tóxicos para los insectos, la toxicidad por contacto en humanos y otros vertebrados era aparentemente baja. A esto se añadía su bajo coste y estabilidad (Furness, 1993), hecho que estimuló la síntesis y desarrollo de nuevos compuestos (Hayes, 1991). Los insecticidas organoclorados se incluyen actualmente entre los principales contaminantes ambientales ya que, como



consecuencia de las actividades humanas, actualmente se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en ecosistemas acuáticos como en terrestres (Herrera *et al.*, 1996; van Wyk *et al.*, 2001).

Desgraciadamente, dada su naturaleza química y elevada persistencia tanto en el medio como en los seres vivos, la mayoría de estas sustancias han causado efectos colaterales perniciosos. Dichos efectos, sobre todo los producidos por compuestos ciclodiénicos, no fueron evidentes al principio debido a su modo de aplicación directa en cubiertas de semillas en lugar de la dispersión mediante aerosoles (Furness, 1993). Sin embargo en los años posteriores se evidenció gran número de incidentes relacionados con la acumulación de residuos, mortalidad, disminución del éxito reproductivo e incluso desaparición de poblaciones silvestres (Moriarty, 1990; Peterle, 1991). El impacto de estos compuestos es tal que algunos autores consideran que probablemente ningún otro grupo de contaminantes de origen antropogénico ha exigido un coste tan elevado al medio ambiente como lo han hecho los insecticidas organoclorados (Blus, 2003). De hecho se consideran los compuestos que mayor perjuicio han causado a las aves de presa y a todo tipo de fauna silvestre (Newton *et al.*, 1993).

La creciente preocupación por los efectos adversos sobre el medio ambiente y, en especial, la aves silvestres condujo a severas restricciones en el uso del DDT en muchos países a principios de los 70 (Gips, 1987). Estas prohibiciones han favorecido la recuperación de las poblaciones afectadas (Bibby y Natrass, 1986; Rebecca y Bainbridge, 1998). Sin embargo un gran número de estos compuestos, y en concreto el DDT, se usan todavía en la actualidad en algunos países (Convenio de Estocolmo, 2011).

### **Compuestos difenilalifáticos**

El dicloro-difenil-tricloroetano o DDT (Figura II.1) es un compuesto poco volátil, insoluble en agua pero soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos apolares y aceites de petróleo. El DDT técnico empleado en las formulaciones se encuentra en mezcla de varios isómeros, siendo el isómero p,p'-DDT (p,p'-diclorodifenil-1,1,1, tricloroetano) el más abundante. Como consecuencia del descubrimiento del DDT se



procedió a la síntesis de numerosos análogos efectivos (el DDD, el metoxicloro, el dicofol y el clorobenzilato), pero menos tóxicos para mamíferos que el DDT (Yu, 2008).

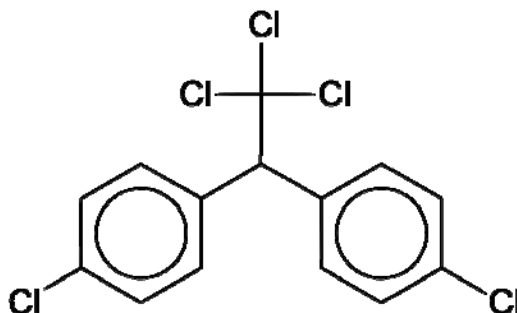


Figura II.1. Estructura química del DDT (fuente Wikimedia Commons)

El DDD o dicloro-difenil-dicloroetano (Figura II.2), también llamado tetraclorodifeniletano o TDE, es un importante metabolito del DDT con acción insecticida, por lo que se incluye como tal en los productos comerciales. Sus propiedades de solubilidad son similares al DDT.

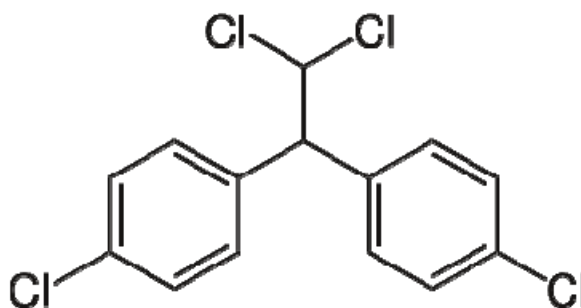


Figura II.2. Estructura química del DDD (fuente Wikimedia Commons)

El DDE o dicloro-difenil-dicloroetileno (Figura II.3), también metabolito del DDT, es resultado de la degradación por hidroclicación del DDT en los seres vivos. También es insoluble en agua y soluble en los disolventes orgánicos, pero no presenta acción insecticida.

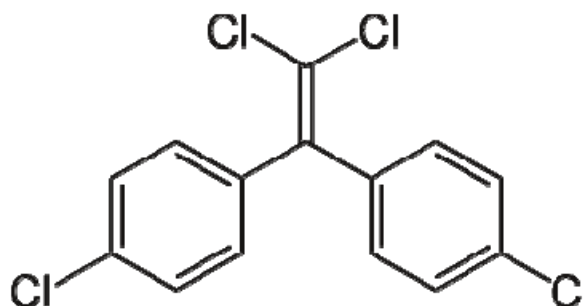


Figura II.3. Estructura química del DDE (fuente Wikimedia Commons)

Tanto el DDT como el DDD y el DDE son compuestos muy persistentes en el medio ambiente que pueden permanecer en el suelo hasta 10-15 años después de su aplicación (Keller, 1970).

El DDT se considera el primer insecticida moderno. Su uso en el campo de la salud pública fue fundamental para la erradicación casi completa del paludismo en ciertos países (WHO, 2001). La aparición de resistencias y efectos crónicos adversos sobre la salud ha dado lugar a que actualmente se sugiera la búsqueda de alternativas para luchar contra los vectores en las zonas afectadas por los parásitos del género *Plasmodium*, responsables de la enfermedad (van der Berg, 2009). En agricultura ha sido usado con eficacia contra coleópteros, lepidópteros, dípteros, himenópteros y otros insectos, fundamentalmente masticadores. Sin embargo su baja eficacia frente a chupadores (pulgones, cochinillas) y ácaros ha conducido a un uso indiscriminado que también ha dado lugar a resistencias en algunas especies, como la araña roja (*Metatetranychus ulmi*).

En base al Convenio de Estocolmo, el uso del DDT está actualmente restringido y sólo se permite en la lucha contra el vector de la malaria en aquellos países afectados, siendo India el principal país consumidor (van der Berg, 2009). A pesar de esta restricción, el DDT ha sido permitido hasta 2008 para la manufactura de dicofol (Di Muccio *et al.*, 1988), un insecticida recomendado para el cultivo de vid, sandías, melones y cítricos (Orden de 1 de Febrero de 2006; Resolución de 28 de Marzo de 2007; Orden de 26 de Noviembre de 2007) autorizado hasta 2009 en Europa (Decisión 2008/764/CE). Todavía en 2008 había registrados en España 34 productos cuya concentración de dicofol oscilaba entre 3 y 43% (MAPA, 2008). Dado que el





dicofol solía contener residuos de DDT y sus metabolitos, la presencia de DDT en el medio ambiente en los últimos años se ha atribuido a la aplicación del dicofol (García-Fernández *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que desde 1991 las formulaciones de dicofol debían contener menos de 0,1% de compuestos difenilalifáticos (Orden de 1 de Febrero de 1991) y en base a los datos de comercialización de dicofol en España, en 2004 se estimó un total de 66 kg/año de DDT derivados de la fabricación de dicofol y el propio uso de este compuesto (Ministerio de Medio Ambiente, 2004).

### **Metoxicloro**

Se trata de otro importante análogo del DDT que, al igual que el DDD, es sólido, blanco y cristalino. Es relativamente menos tóxico para los animales y menos persistente en el medio y en los animales.

El metoxicloro (Figura II.4) se metaboliza rápidamente en aves y por tanto no se acumula en el tejido adiposo (Gardner y Bailey, 1975). Según estudios experimentales en gallinas ponedoras este compuesto se acumula poco en huevos y dosis de 5000 ppm durante 16 semanas no producen alteraciones reproductivas (Lillie *et al.*, 1973). Este insecticida ha sustituido al DDT en varias ocasiones (Wiemeyer, 1996).

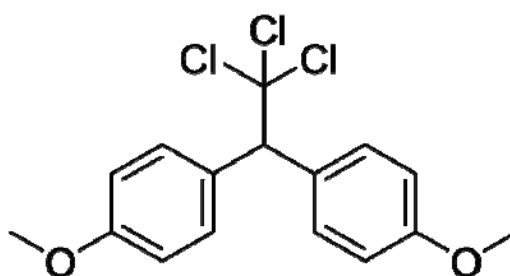


Figura II.4. Estructura química del metoxicloro (fuente Wikimedia Commons)

### **Isómeros hexaclorociclohexanos**

El hexaclorociclohexano (1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaclorociclohexano, HCH), también conocido como hexacloruro de benceno (BHC), fue descubierto simultáneamente en 1942 en Inglaterra y Francia, de forma independiente. El HCH técnico consiste en una



mezcla de 5 isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) (Figura II.5), en la proporción de 65-70% de  $\alpha$ , 6-8% de  $\beta$ , 12-15% de  $\gamma$ , 2-5% de  $\delta$ , 3-7% de  $\epsilon$  y otros en 2-3%, de los cuales sólo el isómero  $\gamma$  posee una marcada actividad insecticida.

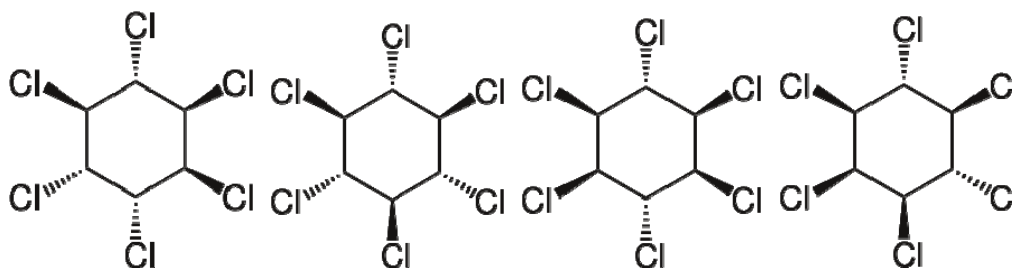


Figura II.5. Estructura química de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  de HCH (fuente Wikimedia Commons).

Una limitación para el uso agrícola de HCH técnico es su tendencia a poseer un desagradable olor a humedad que se transfiere a los alimentos, por lo que se ha utilizado únicamente en cultivos industriales. Dado que el isómero  $\gamma$  purificado, también conocido como lindano, es inodoro e insípido, es el utilizado en cultivos destinados a consumo humano (Yu, 2008). Además el lindano puede ser aplicado en ámbitos diversos, tanto domésticos como agrícolas en el tratamiento de suelos, ya que se degrada rápidamente (Copeland y Chadwick, 1979) y generalmente es menos tóxico pero más efectivo que otros organoclorados aplicados en semillas (Carnaghan y Blaxland 1957; Turtle *et al.*, 1963).

Tras la ingesta, el lindano se metaboliza rápidamente a clorofenoles y clorobencenos, compuestos más hidrosolubles y más fácilmente eliminables, por lo que presenta una vida media en huevos y tejidos de aves más corta que otros insecticidas. Probablemente debido a ello, el lindano no se ha relacionado con problemas de poblaciones de aves silvestres (Blus *et al.*, 1984). Sin embargo, en estudios experimentales si se han observado efectos adversos sobre la reproducción de las aves (Sauter y Steele, 1972).

### **Derivados ciclodiénicos**

Se trata de un importante grupo de hidrocarburos clorados cíclicos que contienen



un puente de metileno interno. Ejemplos de dicho grupo son algunos insecticidas importantes como clordano, heptacloro, aldrin, dieldrin, endrin y endosulfán. Entre ellos encontramos dos pares de estereoisómeros: Aldrin-isodrin y dieldrin-endrin (Dikshith, 1991). Debido a su tensión de vapor relativamente alta y elevada persistencia en suelos, los insecticidas ciclodiénicos fueron importantes agentes para el control de termitas e insectos, pero por esta misma razón su uso se prohibió en muchos países (Directiva 79/117/CEE; Gips 1987). Únicamente el endosulfán ha sido permitido gracias a su menor persistencia (Yu, 2008), aunque también fue prohibido en Europa en el 2007 (Decisión 2005/864/EC).

En este grupo se incluyen clordecone, mirex y toxafeno (que no es estrictamente un ciclodiénico, sino un terpeno). Aldrin y heptacloro pueden metabolizarse por las citocromo P-450 monooxigenasas para convertirse en epóxidos, mucho más estables que sus precursores.

### Aldrin

El aldrin (Figura II.6) tecnológico es un sólido marrón tostado, insoluble en agua, soluble en la mayoría de solventes orgánicos y moderadamente en aceite. Se metaboliza rápidamente en su epóxido, dieldrin (Figura II.7), tanto en animales (Bann *et al.*, 1956; Cohen y Smith, 1961), como en el suelo (Bollen *et al.*, 1958). Por ello la toxicidad del aldrin es básicamente la del dieldrin (Dikshith, 1991), y sólo se detecta en muestras biológicas de reciente exposición. Con frecuencia se ha aplicado asociado a fertilizantes para el tratamiento de suelos.

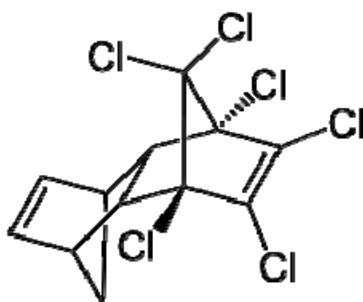


Figura II.6. Estructura química del aldrin (fuente Wikimedia Commons)



### Dieldrin

El epóxido del aldrin es uno de los pesticidas más persistentes que se conocen. De hecho sólo se descompone por tratamientos con ácidos fuertes o largas exposiciones a luz ultravioleta. Presenta características similares al aldrin en cuanto a solubilidad, cualidades físicas y toxicidad. Por ello la conversión del aldrin en este epóxido no provoca cambios en la toxicidad, excepto en los peces, para los que es más tóxico que el aldrin. En general se considera que los mamíferos son más sensibles a la intoxicación por esta sustancia que las aves (Peakall, 1996).

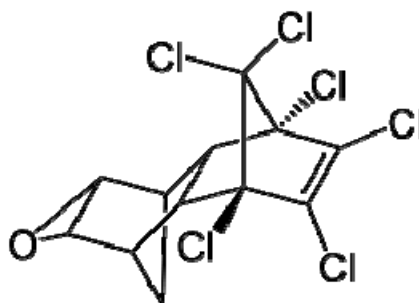


Figura II.7. Estructura química del dieldrin (fuente Wikimedia Commons)

### Isodrin

Este insecticida es un sólido blanco cristalino. No tiene mucha trascendencia puesto que no se ha utilizado mucho y además se transforma rápidamente a endrin (Nakatsugawa *et al.*, 1965).

### Endrin

El endrin (Figura II.8) es un polvo ligeramente tostado, de baja presión de vapor, metabolizable a aldehído y cetoaldrin por exposición a altas temperaturas y a la luz. Químicamente es muy similar al dieldrin, del cual es isómero y sólo se diferencia de éste por la disposición espacial de los dos anillos. Presenta tendencia a depositarse en sedimentos, aunque también se ha encontrado en suelos. Presenta una corta vida media en los tejidos de mamíferos (Brooks, 1974) y de aves (Heinz y Johnson, 1979). Junto con el telodrin, es uno de los organoclorados más tóxicos (Blus, 2003).

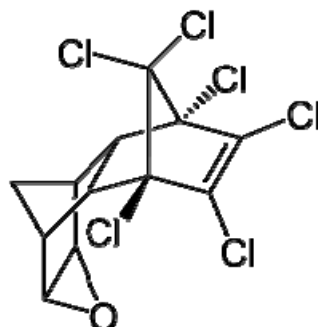


Figura II.8. Estructura química del endrin (fuente Wikimedia Commons)

En España y otros países su uso se limitó al cultivo de algodón, siendo muy eficaz sobre *Earias insulana*, plaga que afectó a este cultivo en el mediterráneo. Es igualmente eficaz contra roedores de los géneros *Pytimus* (topillo) y *Mus* (ratón) que afectan a cultivos de frutales (Barberá, 1989)

#### Heptacloro

El 1, 4, 5, 6, 7, 8, 8,-heptacloro-3a, 4, 7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano (Figura II.9) es un sólido blanco cristalino. Obtenido por aislamiento del clordano tecnológico, su toxicidad en mamíferos es de 4 a 5 veces superior que la del clordano. Es pobremente soluble en la mayoría de solventes orgánicos y el menos soluble en agua. Se une fácilmente a las partículas sólidas en suspensión y se evapora lentamente. Lo más común en los sistemas biológicos es que el heptacloro se convierta en epóxido, más tóxico que el compuesto original (Matsumura, 1985). Este epóxido, también formado por metabolismo del clordano, permanece en suelo y agua durante muchos años, biomagnificándose a través de la cadena trófica. El heptacloro se ha utilizado fundamentalmente contra termitas, hormigas y otros insectos del suelo. También se ha empleado en la lucha contra los insectos del algodón, los saltamontes y algunas plagas de cultivos, así como para combatir el paludismo.

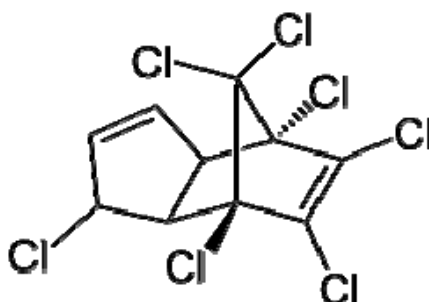


Figura II.9. Estructura química del heptacloro (fuente Wikimedia Commons)

### Clordano

El clordano (Figura II.10) fue el primero de los insecticidas ciclodiénicos usados en agricultura (Eisler, 1990a). Se trata de un insecticida de amplio espectro que se ha utilizado en diversos cultivos entre los que se incluyen vegetales, maíz, patatas, semillas oleaginosas, caña de azúcar, remolacha azucarera, frutas, algodón, yute y frutos secos (Smith, 1991). Físicamente es un líquido marrón, viscoso, insoluble en agua pero soluble en la mayoría de solventes orgánicos y aceites de petróleo. Se mantiene estable a menos que se exponga a altas temperaturas y luz potente (Dickshith, 1991). El clordano técnico contiene unos 45 compuestos, entre los que predominan cis-clordano (19%), trans-clordano (24%), isómeros de clordano (21.5%) y heptacloro (10%). Oxiclordano y heptacloro-epóxido son dos metabolitos del clordano con importancia desde el punto de vista toxicológico (Eisler, 1990a).

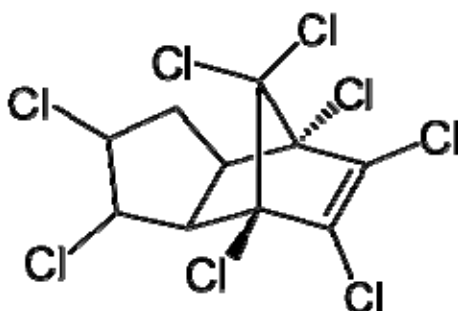


Figura II.10. Estructura química del clordano (fuente Wikimedia Commons)



### Endosulfán

El producto técnico consiste en una mezcla de 2 isómeros,  $\alpha$  y  $\beta$  en proporción 70:30. Es sólido, marrón cristalino, soluble en solventes orgánicos pero altamente insoluble en agua. Se trata de un compuesto menos persistente que el resto de organoclorados, con una vida media en agua que oscila entre los 3 y 7 días (Eichelberger y Lichtenberg, 1971), aunque puede persistir más tiempo si se une fuertemente a partículas sólidas. No parece acumularse en los animales de sangre caliente ya que se elimina rápidamente (Wiemeyer, 1996).

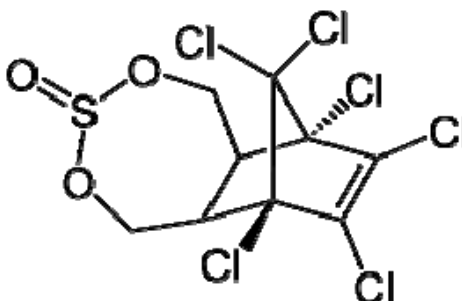


Figura II.11. Estructura química del endosulfán (fuente Wikimedia Commons)

Se trata de un plaguicida muy polivalente. En España ha sido aplicado en numerosos cultivos: cítricos, frutales, olivo, viñedo, avellano, maíz, patata, espárrago, alfalfa, algodón, sorgo, caña de azúcar, ornamentales (Barberá, 1989). También se empleaba en tratamientos de semillas. La prohibición de este insecticida ha sido reciente, ya que hasta diciembre de 2007 ha estado autorizado en España para el cultivo de avellanas, tomates y algodón (Decisión de la Comisión 2005/864/CE)

### **Hexaclorobenceno (HCB)**

El hexaclorobenceno (HCB) (Figura II.12) es un funguicida que se introdujo por primera vez en 1945 para el tratamiento de semillas de cebollas, sorgo y cultivos de cereales. A pesar de que su uso como funguicida en España está prohibido desde 1994 (Orden de 4 de febrero de 1994) y en los países firmantes del Convenio de Estocolmo (UNEP, 2001), actualmente este compuesto se considera ubicuo, ya que se encuentra presente en casi todos los compartimentos del medio ambiente (Barber *et*



al., 2005).

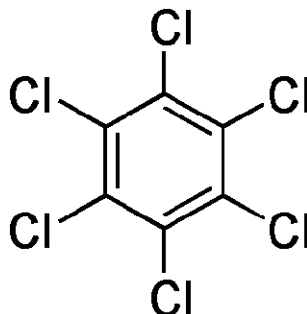


Figura II.12. Estructura química del HCB (fuente Wikimedia Commons)

Dado que puede producirse una importante liberación desde suelos o sedimentos donde se encuentra retenido, una parte importante del HCB detectado en la atmósfera se considera procedente de su uso histórico (Bailey, 2001). El resto de emisiones pueden deberse a un origen industrial (Arrebola *et al.*, 2009), a la aplicación de plaguicidas con trazas de HCB o a la liberación en vertederos de los productos que lo contengan. Otras fuentes importantes son los procesos de combustión, ya que casi todos producen trazas de HCB (Breivik *et al.*, 2004), y aquellos procesos químicos que utilicen cloro como intermediario ya que generan HCB como subproducto y/o impureza (Jacoff *et al.*, 1986).

### **Mirex**

Físicamente es un sólido blanco cristalino, insoluble en agua pero soluble en algunos solventes orgánicos como benceno y xileno. Se utilizó para sustituir al dieldrin y heptacloro en el control de hormigas (Baker, 1964) y también como retardante de llama (Eisler, 1990b). Se trata de uno de los organoclorados más estables y persistentes, siendo productos de su degradación el hexaclorobenceno y clordecona.



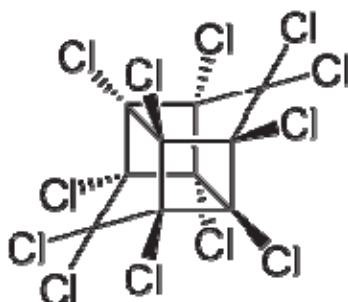


Figura II.13. Estructura química del mirex (fuente Wikimedia Commons)

### II.2.1.2. Bifenilos policlorados (PCBs)

La síntesis de los bifenilos policlorados se describió por primera vez en 1881 pero hasta 1929 no se empezaron a comercializar. Se han utilizado para multitud de aplicaciones, principalmente como fluidos dieléctricos en condensadores, transformadores y sistemas hidráulicos y de intercambio de calor, aunque también en la formulación de aceites lubricantes, pinturas, pesticidas, tintes, ceras o plásticos. Además, puesto que en el pasado las emisiones de PCBs se consideraban legales, aceptables e incluso libres de riesgo, éstos se liberaron al medio de forma intencionada, aplicándose directamente en carreteras con el fin de impedir la dispersión de polvo, o incluyéndose como aditivos en algunas formulaciones de insecticidas (Hoffman *et al.*, 2001). Las mezclas comerciales se identificaron con distintos nombres como Clophen, Kanechlor o Arochlor, siendo este último el más conocido. La numeración que acompañaba al nombre indicaba el porcentaje de contenido en cloro en peso. La mayor producción tuvo lugar a principios de los 70, siendo restringida o prohibida a partir de ese momento en varios países cuando se empezó a evidenciar que la exposición crónica podría entrañar riesgos para la salud humana y del medio ambiente (Rice *et al.*, 2003). En 1985 solamente España y Francia seguían produciendo PCBs (Holoubek, 2001). Actualmente la producción, uso, comercio y manejo de los PCBs están regulados bajo las directrices del Convenio de Estocolmo y, a pesar de que todos los residuos de PCBs deberán ser eliminados o descontaminados en España antes de 2011 (Resolución del 9 de Abril de 2001), existe una excepción que permite el uso de equipos que contienen PCBs, principalmente transformadores y condensadores eléctricos hasta 2025 (UNEP, 2005).



El nombre de estos contaminantes hace referencia a su estructura química que consiste en núcleo bifenilo formado por dos anillos de benceno unidos por un enlace simple C-C (Figura II.14). Se denominan policlorados porque un número variable de 1 a 10 átomos de cloro sustituyen el mismo número de átomos de carbono del bifenilo, dando lugar a 209 congéneres distintos, de los cuales únicamente entre 100 y 150 han sido utilizados y pueden encontrarse en el medio (Rice *et al.*, 2003). El número y posición de los átomos de cloro determina las características químicas y biológicas de cada isómero. Generalmente, a mayor número de átomos de cloro, mayor liposolubilidad y resistencia a la degradación. Esta degradación puede dar lugar a productos incluso más tóxicos que los compuestos originales con diferentes propiedades fisicoquímicas y distribución medioambiental (Hoffman *et al.*, 2001).

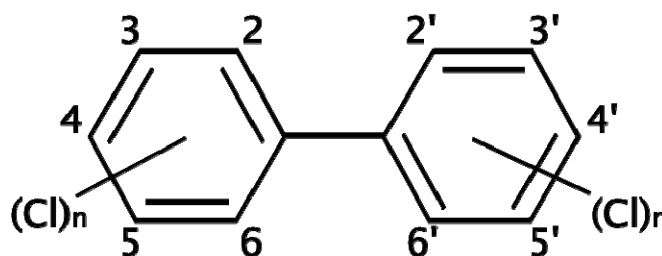


Figura II.14. Estructura química de los PCBs (fuente Wikimedia Commons)

Los PCBs se clasifican en dos grupos según su grado de eliminación. Los de eliminación rápida suelen mostrar baja persistencia y bioacumulación (Hansen *et al.*, 1983; Hansen, 1987; Norstrom, 1988; Guruge y Tanabe, 1997), parecen metabolizarse rápidamente y se eliminan principalmente como metabolitos (Bunyan y Page, 1978; Brunn, 1984). Los PCBs persistentes tienden a presentar tasas de eliminación mucho más lentas, se pueden eliminar como metabolitos o sin metabolizar y muestran elevados factores de bioacumulación en las poblaciones de aves silvestres. La eliminación no biliar en heces y la transferencia a huevos constituyen otras vías importantes de eliminación de PCBs sin metabolizar, aunque falta información para determinar su importancia (Drouillard, 2000).



### II.2.1.3. Retardantes de llama bromados

Los retardantes de llama son sustancias utilizadas en la fabricación de plásticos, textiles, circuitos electrónicos y otros materiales para evitar la ignición de materiales potencialmente combustibles. Dentro de este grupo se encuentran algunos compuestos orgánicos bromados, como son los éteres difenílicos polibromados (PBDEs), el hexabromociclododecano (HBCD), el tetrabromobisfenol A (TBBPA) y los bifenilos polibromados (PBBs). Los retardantes de llama reactivos, como el TBBPA, se unen covalentemente a los polímeros mientras que los aditivos, entre los que se encuentran los PBBs, los PBDEs y el HBCD, se mezclan con los polímeros sin llegar a unirse químicamente, por lo que pueden separarse o liberarse al medio ambiente desde la superficie del producto más fácilmente que los reactivos (Bergman, 1989). De esta manera el producto pierde la protección frente a las altas temperaturas y además la contaminación del medio por estos compuestos es mayor.

#### ***Éteres difenílicos polibromados (PBDEs)***

Los PBDEs constituyen un grupo importante de retardantes de llama. Desde la década de los 60 han sido añadidos a los termoplásticos utilizados en la fabricación de electrodomésticos, televisores, placas bases y revestimientos de ordenadores y materiales de construcción. Estos compuestos se encuentran también en espumas de poliuretano, tapicerías de mobiliario doméstico, interior de automóviles y otros medios de transporte, alfombras, cortinas y demás tejidos no destinados a ropa (WHO/ICPS, 1994). En Europa, el principal uso de PBDEs ha sido la fabricación de PVC (Rahman *et al.*, 2001).

A diferencia de los PCBs, cuya emisión al medio suele ocurrir en puntos concretos, como es el caso de las fugas accidentales de transformadores eléctricos, las mezclas de PBDEs se liberan continuamente durante la vida funcional de los productos que los contienen (Hooper y McDonald, 2000). Estos productos se suelen eliminar junto al resto de residuos domésticos en vertederos e incineradoras, constituyendo así una fuente importante de emisión continua de PBDEs al medio. Desde los vertederos, los PBDEs pueden liberarse y formar parte de los lixiviados mientras que durante la incineración darán lugar a dioxinas. Además, algunos PBDEs



pueden ser producidos en la naturaleza (Jansson *et al.*, 1987; Faulkner, 1998).

La estructura (Figura II.15) y propiedades de los PBDEs son similares a los PCBs y PBBs (bifenilos polibromados), existiendo también un total de 209 congéneres en función del número y posición de los átomos de bromo sustituidos en los anillos bifenilo (WHO/ICPS, 1994). Además los congéneres de PBDEs se enumeran de acuerdo a las mismas normas de la IUPAC que se utilizan para enumerar los PCBs, en función de la posición del átomo de bromo en los anillos.

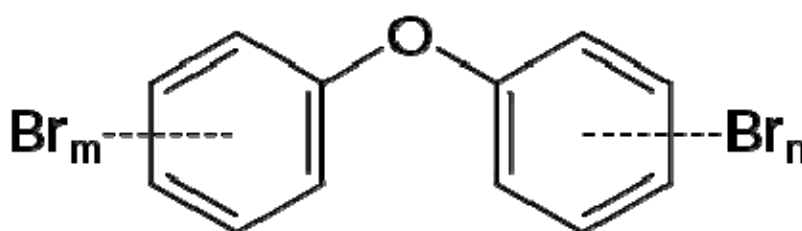


Figura II.15. Estructura química de los PBDEs (fuente Wikimedia Commons)

Los PBDEs comerciales son compuestos estables, cuyos puntos de ebullición oscilan entre 310 y 425°C. Son lipofílicos, especialmente los de mayor número de sustituciones de bromo. Existen tres mezclas comerciales principalmente: Penta (principalmente compuesta por BDE-47 y BDE-99, 38-49% respectivamente, además una menor proporción de de otros tri- a hepta-BDEs), octa (una mezcla de hexa- a deca-BDEs, dominada por los congéneres hepta- y octa-, cuya proporción exacta varía considerable entre los dos productos comercializados) y deca (92-97% de BDE 209-deca-, junto con nona- y octa-BDEs) (La Guardia *et al.*, 2006 )

Dado que el enlace C-Br es más débil que el C-Cl, los PBDEs son más fácilmente degradables en el medio ambiente que los PCBs (Hooper y McDonald, 2000). Esta degradación es cada vez más evidente, ya que, a pesar de que el altamente bromado DeBDE (BDE 209) es el compuesto más utilizado, la mayoría de PBDEs encontrados en el medio son de menor número de Br, los cuales son más bioacumulables y tóxicos que el propio BDE 209 (Söderström *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2004). De hecho, actualmente no se sabe cuál es la proporción de los congéneres tetra a hexa-BDEs que se encuentran en el ambiente como productos de degradación



de y cuál es la proporción que procede de las mezclas penta-BDE comerciales (Hooper y McDonald, 2000).

#### **II.2.1.4. Cinética de los compuestos organohalogenados**

##### **Absorción**

Aunque la absorción cutánea y respiratoria son importantes vías de entrada de los COPs en aves, la principal es la ingesta de alimento contaminado. Componentes de la dieta como la fibra o la grasa y la ingesta total de comida afectan a su absorción intestinal (Heath y Vandekar, 1964). Así por ejemplo, el DDT se absorbe hasta 10 veces más a nivel gastrointestinal si está disuelto en grasas animales o vegetales (Keller y Yeary, 1980; Palin *et al.*, 1982). En cualquier caso, la absorción intestinal de los lípidos en la mayoría de especies de aves parece ser eficiente, oscilando entre el 77 a más del 97% (Karasov, 1990), la cual es similar a la encontrada para PCBs (Drouillard, 2000). En el caso de otros compuestos organohalogenados, la absorción puede depender del compuesto implicado. Así por ejemplo, el DDT es difícilmente absorbido por vía cutánea, mientras que el dieldrin sí se absorbe de manera efectiva (Smith, 2004).

##### **Distribución**

La distribución en sangre hacia los distintos órganos tendrá lugar en función del grado de irrigación de los tejidos y de la relativa afinidad de los compuestos por los componentes de la sangre (Drouillard, 2000). Según estudios experimentales en aves, los COPs se distribuyen de forma relativamente rápida entre los compartimentos grasos del organismo, llegando a establecerse un equilibrio entre las fracciones lipídicas plasmáticas y las del tejido adiposo (Norstrom, 2002), el cual se alcanza en pocos días en aves de pequeño tamaño (Drouillard, 2000). Variaciones en la temperatura ambiental y el aumento de reservas corporales previo a la migración o a la reproducción provocan cambios en las reservas grasas en respuesta a las demandas de energía y por tanto, una alteración en el equilibrio de los contaminantes en el organismo, que pueden redistribuirse de nuevo en sangre. Este hecho es especialmente importante en las aves, puesto que sufren mayores fluctuaciones a lo largo del año en sus reservas grasas que otros vertebrados.



## **Acumulación**

Debido a sus propiedades físico-químicas, estas sustancias se eliminan con dificultad y tienden a acumularse en el organismo. De esta manera pueden provocar una acción tóxica indefinida y crónica en el individuo. Aunque el almacenaje de estos compuestos puede ser explicado parcialmente por sus características lipofílicas, existen otros factores a tener en cuenta como son la estructura química que presentan, la competencia con los lugares de unión en los tejidos y el ratio metabolismo/excreción (Bickel, 1984; Smith, 2004). Al parecer cada compuesto presenta una determinada afinidad hacia los distintos órganos, así aquellos compuestos menos apolares presentan mayor afinidad por tejidos con mayor proporción de fosfolípidos como es el caso del encéfalo (Kawai *et al.*, 1988). Por ejemplo el DDT y su metabolito DDE se acumulan en gran proporción en tejido adiposo, mientras que los isómeros de HCH son almacenados en distinto grado en función de su metabolismo. Entre los ciclodiénicos también existen diferencias, ya que el dieldrin es ávidamente almacenado mientras que el endrin lo hace en poca cantidad. Aunque la acumulación se produce principalmente en tejido adiposo, donde se suele acumular el 90 % de los PCBs del organismo en individuos sanos (Subramanian, 1986; Borlakoglu *et al.*, 1991), esta también tiene lugar y puede producir efectos tóxicos en hígado, encéfalo, riñón y glándulas adrenales (Smith, 2004).

## **Metabolismo**

Para favorecer su eliminación, el organismo intenta transformar estas sustancias en otras menos lipofílicas y más polares mediante reacciones de biotransformación. La principal vía es la hidroxilación mediante el sistema microsomal citocromo P-450, la cual puede ser inducida en aves y mamíferos por la mera presencia de varios de los COPs. La actividad de estas enzimas varía en función de muchos factores biológicos entre los que se encuentran la edad, el sexo, la especie, la dieta, estados de enfermedad o fatiga (Walker, 1980). Se considera que la capacidad de las aves para metabolizar PCBs es intermedia entre los mamíferos y los peces (Walker, 1990). Otros mecanismos implican la dehidrocloración, la conversión a epóxidos más estables, como la formación del dieldrin a partir del aldrin (Smith, 2004), la conjugación con glutatión o la formación de glucurónidos. La mayoría de estas



reacciones tiene lugar en el hígado, aunque en algunos organismos son también importantes las reacciones producidas en otros órganos como el pulmón, el intestino, la piel o los riñones (María-Mojica, 1998). Dado que las reacciones enzimáticas tienen especificidad estereoquímica, la presencia de los halógenos en los lugares de acción de la enzima impide su metabolismo (Norstrom, 2002). En general los grupos alquilo (excepto el metilo) se metabolizan más fácilmente que los anillos aromáticos en los animales terrestres endodermos. En los compuestos con múltiples anillos aromáticos, como los bifenilos y defeniléteres, el ataque a las posiciones meta/para se ve favorecido respecto al orto/meta (Boon *et al.*, 1992; Walker, 1992). Por tanto, la sustitución de un solo átomo halógeno en la posición para puede suponer un aumento en la resistencia al metabolismo de la molécula.

### **Eliminación**

Los compuestos padres se eliminan principalmente por la vía biliar y fecal, produciéndose en ocasiones su reabsorción en intestino y transporte a hígado y riñón, órganos donde tendrá lugar su biotransformación (Smith, 2004). Aquellos metabolitos que presenten alta polaridad, como es el caso de los conjugados glucurónicos, se eliminarán por orina. Otra ruta importante de eliminación de organoclorados es la leche, la cual está determinada por su alto contenido lipídico (3-5%) y la abundante irrigación sanguínea de la glándula mamaria (Jensen, 1983). En las aves (Bargar *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2008), peces (Svendsen *et al.*, 2007) y tortugas (Alava *et al.*, 2006) la transferencia de lípidos al huevo durante su formación supone una importante vía de eliminación de COPs del organismo de la hembra adulta. Como consecuencia el embrión en formación se verá expuesto a estos contaminantes de origen materno (Drouillard, 2000), alcanzando la máxima exposición en el momento de eclosionar o poco tiempo después, cuando los lípidos de la yema se hayan absorbido completamente (Drouillard *et al.*, 2003). Otras vías complementarias de eliminación de COPs son el pelo (Matthews *et al.*, 1976) y, en las aves, las plumas (Espín *et al.*, 2010) y las secreciones de la glándula uropígea (van den Brink *et al.*, 1998).



### **II.2.1.5. Factores que afectan a la toxicidad de los compuestos organohalogenados**

La presencia de estos compuestos y su toxicidad está determinada por diversos factores, tanto extrínsecos, como la alimentación o el clima, como propios del individuo como el sexo, la edad y el estado corporal, siendo al parecer éste último, junto con el tamaño del animal, los más importantes en relación con la susceptibilidad ante los plaguicidas (Dikshith, 1991).

#### **Sexo**

Según algunos estudios, el sexo determina en cierta medida la actividad de las enzimas microsomales del hígado. Conney y Bubns (1962) evidenciaron que esta actividad en los animales inmaduros era mayor en el macho que en la hembra. Sin embargo, muchos autores han encontrado mayores niveles de organoclorados en machos (Tanabe *et al.*, 1989; Donaldson *et al.*, 1999; Wienburg y Shore, 2004), lo cual podría explicarse por la transferencia de importantes concentraciones a los huevos (Bargar *et al.*, 2001).

#### **Edad**

En distintos estudios sobre rapaces se ha demostrado que las concentraciones de organoclorados aumentan con la edad del animal (Stendell *et al.* 1989; María-Mojica, 1996; Wienburg y Shore, 2004). Sin embargo se ha evidenciado que, en general, en el transcurso de un año las concentraciones de COPs llegan a alcanzar un equilibrio entre el organismo y el medio, en el que la absorción es equivalente a la eliminación (Drouillard, 2000). Este equilibrio suele alcanzarse, en las aves, con la madurez sexual (Elliott y Shutt, 1993; Bustnes *et al.*, 2003a), momento a partir del cual la acumulación de COPs se supone independiente de la edad del animal.

Las aves en estado embrionario son especialmente sensibles, ya que los productos del metabolismo de los compuestos organohalogenados no pueden ser excretados y permanecen en el torrente sanguíneo durante todo el proceso de incubación (Fry, 1995).





## **Alimentación**

Kunisue *et al.* (2002) observaron que los niveles de organoclorados más elevados se daban en aves piscívoras, seguidas de las insectívoras, omnívoras y herbívoras. Otros estudios demuestran que las especies que se alimentan de peces y aves son las más afectadas por los compuestos organoclorados y sufren declives poblacionales por detrimento de la reproducción a largo plazo o mortandades en intoxicaciones agudas (Prestt *et al.*, 1970; Newton y Bogan 1979; Henny y Elliott, 2007). Además, se ha demostrado que cuanto mayor es el porcentaje de aves en la dieta, mayores son los niveles de organoclorados en las rapaces, y que cambios en la dieta se traducen en variaciones en la carga de organoclorados en el organismo (van Drooge *et al.*, 2008).

Otros estudios demuestran que ciertos componentes de la dieta como los lípidos, las proteínas y las vitaminas influyen significativamente en la toxicidad de los plaguicidas (Boyd *et al.*, 1970; Boyd y Krijnen, 1970).

## **Especie**

Se ha demostrado en distintos estudios que aquellas especies con dietas más especializadas muestran menor actividad monooxigenasa necesaria para el metabolismo de xenobióticos lipofílicos (Walker *et al.*, 1987; Fossi *et al.*, 1995).

Por otro lado, distintos estudios laboratoriales demostraron que las aves de presa son menos sensibles a los PCBs que las Codornices (*Coturnix coturnix*), o las Gallinas (*Gallus gallus*) (Elliott *et al.*, 1990,1997), pero más sensibles que el Charrán común (*Sterna hirundo*) (Hoffman *et al.*, 1998).

## **Condición corporal**

El fenómeno de movilización de compuestos organoclorados a partir de los depósitos grasos corporales y su relación con las concentraciones tisulares ha sido objeto de numerosos estudios (Subramanian *et al.*, 1986; Lambeck *et al.*, 1991; Elliott *et al.*, 1996; Kenntner *et al.*, 2003; Wienburg y Shore, 2004). En gavilanes, cernícalos y garzas que murieron en Reino Unido en la década de los 90, las concentraciones de



PCBs en individuos con poca o ninguna reserva grasa corporal eran hasta 30 veces superiores que en los individuos no emaciados de la misma edad y sexo (Wienburg y Shore, 2004). De forma similar, las concentraciones totales de difenililifáticos son mayores en aves de muy pobre o moderada condición corporal. Esto se debe a que, durante situaciones catabólicas, las reservas grasas se movilizan y junto a ellas los contaminantes almacenados, los cuales se redistribuyen vía sanguínea hasta órganos de gran actividad metabólica como el hígado (Bogan y Newton, 1977; Elliott *et al.*, 1996).

### **Factores extrínsecos**

Las propiedades físico-químicas de la sustancia, su concentración en el producto, el modo de aplicación y la ruta de de exposición son algunos factores que también podrían influir en la toxicidad producida por los COPs. También condiciones ambientales de humedad y temperatura influyen en la absorción de estas sustancias (Dikshith, 1991). Estudios experimentales con animales demuestran que la hipotermia favorece la absorción del DDT (Frawley, 1958) y que los organoclorados persisten más tiempo en el medio ambiente cuando las temperaturas son más bajas (Ólafsdóttir *et al.*, 2005).

Se deben tener en cuenta, además, las interacciones producidas por el uso conjunto de diferentes compuestos, lo que da lugar en ocasiones a sinergismo (lindano y heptacloro) o antagonismo (OMS, 1992) en sus efectos.

Se ha observado que la baja disponibilidad de presas asociada a determinados niveles de organoclorados en rapaces puede causar disminución en la productividad (Gervais y Anthony, 2003)

#### **II.2.1.6. Efectos tóxicos de los compuestos organohalogenados sobre las aves**

Los primeros efectos tóxicos de los compuestos organoclorados sobre vertebrados superiores aparecieron pocos años después de empezar a usarlos como insecticidas. En un principio se evidenciaron efectos de toxicidad aguda, manifestada por mortandades de aves silvestres (Hotchkiss y Pough, 1946). En el caso de los PCBs, la detección de altos niveles en Gaviotas hiperbóreas (*Larus hyperboreus*) enfermas o



en estado agónico sugirió la posible participación de estos compuestos en la muerte de dichos animales (Gabrielsen *et al.*, 1995; Henriksen *et al.*, 2000). Hoy en día sabemos que exposiciones crónicas no letales a compuestos organoclorados son capaces de afectar la supervivencia y productividad de poblaciones silvestres (Sharma *et al.*, 1976).

Puesto que en la mayoría de estudios de campo los efectos que se han observado se refieren a mezclas de compuestos, a continuación estudiaremos los efectos en conjunto, sin hacer distinciones para compuestos concretos, teniendo en cuenta que fenómenos de sinergismo o antagonismo entre los propios contaminantes podrían alterar dichos efectos. Estas alteraciones a nivel de individuo se pueden traducir en declives poblacionales cuando afectan a un elevado porcentaje de la población. Dado que el estado de salud de una población puede ser evaluado mediante el estudio de la proporción de individuos que se encuentran en diferentes estados fisiopatológicos, parece apropiado que los estudios de biomonitorización se centren en los efectos de los contaminantes a nivel de individuo (Fox, 1993).

### **Alteraciones bioquímicas**

Muchos de los compuestos organohalogenados ejercen efectos tóxicos a nivel hepático y renal, lo cual se ve reflejado en las alteraciones de determinados parámetros bioquímicos sanguíneos. Así un aumento en los niveles de enzimas creatin-kinasa (CK), aspartato amino transferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH) se ha evidenciado en plasma de aves a las que se les administró organoclorados vía oral (Dieter, 1974,1975). En el mismo estudio se observó, además, una disminución significativa de la hemoglobina y valor hematocrito en las aves tratadas con Aroclor 1254 y un aumento del tamaño del hígado relacionado con la exposición a Aroclor 1254 o a DDE. En estudios de campo también se han observado alteraciones bioquímicas, encontrando que en gaviotas de los Grandes Lagos los niveles de bilirrubina, albúmina, proteínas totales y colesterol eran inferiores en el grupo de individuos con altas concentraciones de compuestos organohalogenados que en los menos contaminados (Fox *et al.*, 2007).

Ciertos compuestos organohalogenados, como algunos congéneres de PCBs o el HCB, presentan una estructura similar a la de 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina



(2,3,7,8-TCDD) por lo que se denominan compuestos “tipo dioxinas”. Es una estructura coplanar, con uno o ningún átomo de Cl en posición orto, o con 2 átomos de Cl adyacentes en posiciones meta y para. Esta estructura les permite unirse al receptor Ah del mismo modo que las policlorodibenzodioxinas (PCDD) y los policlorodibenzofuranos (PCDF) (Figura II.16), dando lugar a efectos tóxicos similares, entre los que se incluyen edema, pérdida de peso, alteraciones en hígado y timo, embriotoxicidad, teratogénesis e inmunotoxicidad (Tanabe, 1989). El receptor Ah es un factor de transcripción que interviene en la regulación de varios genes entre los que se incluyen los que codifican la síntesis de enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos, como el citocromo P-450 1A (CYP 1A 1) (Hahn, 1998). Las alteraciones en la homeostasis debidas a la inducción de la síntesis de proteínas parecen ser responsables de muchos de los efectos tóxicos observados tras la exposición a dioxinas y compuestos relacionados, aunque los mecanismos moleculares para la mayoría de estos efectos son desconocidos (Bosveld y van der Berg, 1994; Mandal, 2005). Algunos de estos efectos pueden deberse a la biotransformación de los contaminantes a metabolitos reactivos que pueden interaccionar con los constituyentes celulares de diversas formas, iniciándose así una serie de efectos tóxicos (Levy, 1987) entre los que se incluyen mutagénesis, carcinogénesis y neurotoxicidad. La inducción de CYP1A 1 no se puede considerar *per se* un efecto tóxico de la exposición a PCDD, PCDF y PCBs, pero se trata de una de las respuestas bioquímicas más sensibles de las mediadas por el receptor Ah (Bosveld y van der Berg, 1994). Por ello, la medición de la actividad de 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), una enzima está asociada a la actividad de CYP1A1 (Rutten *et al.*, 1987), se ha utilizado como biomarcador de la inducción del receptor Ah en animales, incluido las aves (Elliott *et al.*, 1996).

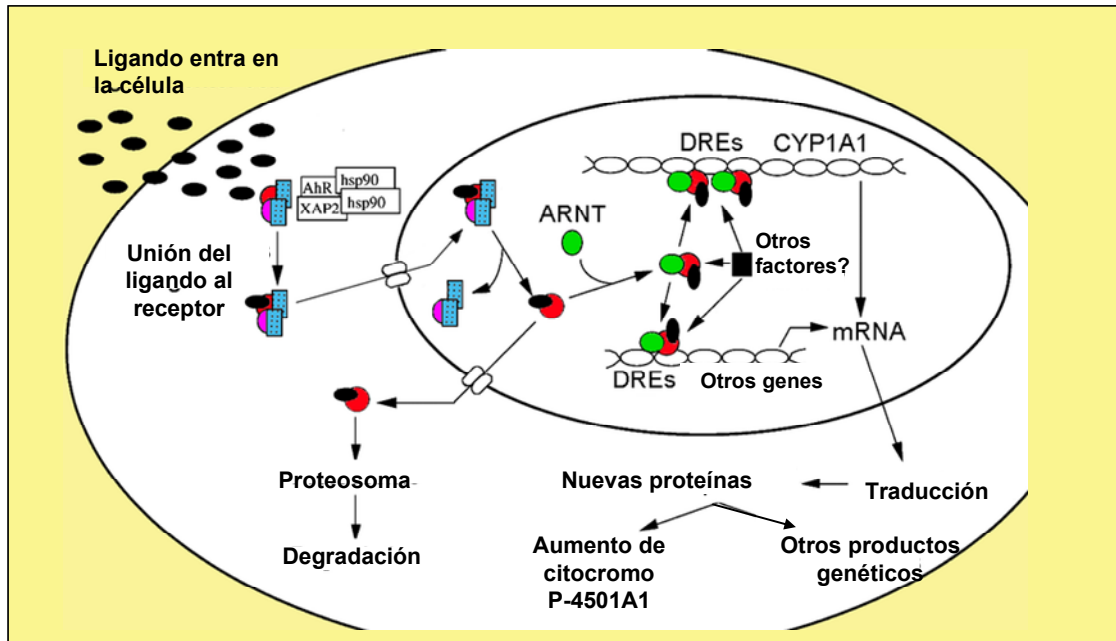


Fig II.16. Mecanismo de activación del receptor Ah (Denison y Nagy, 2003)

La exposición a determinados organohalogenados, entre los que se incluyen PCBs y dioxinas, puede provocar una alteración en la ruta de la síntesis del grupo hemo en las aves (Fox *et al.*, 1988; Kennedy *et al.*, 1998). Esta alteración dará lugar a una acumulación de porfirinas en hígado (Marks, 1985), cuya medición también se considera un buen biomarcador de exposición a estos compuestos (Fox, 1993)

La medición de niveles de vitamina A también se considera un biomarcador sensible de la exposición a compuestos organohalogenados (Peakall, 1992; Fox, 1993) entre los que se incluyen PCBs (Chen *et al.*, 1992; Palace *et al.*, 1997), PBBs (Chen *et al.*, 1992), PCDDs y PCDFs (Spear *et al.*, 1990), dieldrin (Zile, 1992) y PBDEs (Fernie *et al.*, 2005b). La inducción de la actividad de enzimas hepáticas específicas del catabolismo retinoide (Spear *et al.*, 1992; Zile, 1992; Henriksen *et al.*, 2000) puede producir un metabolismo acelerado de la vitamina y sus metabolitos y con ello un agotamiento de sus reservas en el organismo (Zile, 1992). Además, aquellos compuestos cuya estructura es similar a la tiroxina (T4) como son el DDT, algunos PCBs y PBDEs y metabolitos de ambos (Hooper y McDonald, 2000; McDonald, 2002) pueden favorecer la excreción del retinol por interferencia, en distinto grado, con la la transtiretina (TTR) (Brouwer y van den Berg, 1986), la proteína transportadora de T4 y



vitamina A (Goodman, 1980). Dado que la vitamina A es esencial para la diferenciación de las estructuras epiteliales y un correcto funcionamiento de la visión y de los sistemas inmune y reproductor, su carencia provocará alteraciones a estos niveles. Un déficit de esta vitamina se asocia también a mortalidad embrionaria, retraso en el crecimiento y deformidades óseas. Además, puesto que la vitamina A tiene función antioxidante en el organismo, la exposición a compuestos que inducen la actividad de enzimas oxidasas de función mixta, como es el CYP450 que generan radicales libres puede favorecer el agotamiento de sus reservas, produciéndose daños en las membranas lipídicas, proteínas celulares y ADN de las aves (Hoffman *et al.*, 1998; Hoffman y Heinz, 1998).

### **Disrupción endocrina**

Los contaminantes ambientales pueden alterar el sistema endocrino mediante distintos mecanismos. Pueden afectar directamente órganos implicados, alterar los niveles hormonales o bien actuar como disruptores endocrinos (ED). Un ED se define como una sustancia o mezcla de sustancias exógenas capaces de alterar la función o funciones del sistema endocrino causando efectos adversos sobre la salud de un organismo, su progenie o sus poblaciones. La disrupción endocrina puede producir interferencias en la síntesis, secreción, transporte, unión, actividad o eliminación de las hormonas naturales del organismo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (CSTEE, 1999).

Son muchos los compuestos organohalogenados considerados ED. En concreto clordecona, o,p'-DDT, metoxicloro, endosulfan y dicofol se consideran estrogénicos (Bulger *et al.*, 1978; Eroschenko y Palmiter, 1980; Fry *et al.*, 1981; Soto *et al.*, 1992), al igual que algunos metabolitos hidroxilados de PCBs (Korach *et al.*, 1988; Soontornchat *et al.*, 1994). Estos compuestos son especialmente importantes en el caso de aves en desarrollo, ya que la diferenciación de su sistema reproductor es estrógeno-dependiente (Fry, 1995). Esto puede explicar el hecho de que la inyección de o,p'-DDT en huevos fértiles de gaviotas provocara el desarrollo de tejido ovárico y oviductos en embriones machos (Fry y Toone, 1981; Fry *et al.*, 1987; Fry, 1995; Hoyer, 2001) y anormalidades, tanto en embriones machos como en hembras (Fry, 1995). También en condiciones de campo se ha encontrado una relación entre la



contaminación por DDT y feminización de gaviotas de California (Fry y Toone, 1981).

Probablemente, el primer ejemplo de disrupción endocrina en poblaciones silvestres es uno de los más serios y documentados efectos de los compuestos orgánicos persistentes en aves silvestres. Se trata del fracaso reproductivo debido a la disminución del grosor de cáscara del huevo inducido por p,p'-DDE (Ratcliffe, 1970; Peakall *et al.*, 1973; Lundholm, 1997) cuyo mecanismo de acción se descubrió casi 30 años más tarde (Vos *et al.*, 2000). El p,p'-DDE inhibe la síntesis de prostaglandina E2, lo cual se traduce en una disminución de la hormona a nivel de la glándula mucosa de la cáscara y como consecuencia un menor transporte de calcio al interior de la glándula (Lundholm, 1997).

Como ya se ha mencionado, algunos de los compuestos organohalogenados o sus metabolitos presentan una estructura similar a la T4 (Hooper y McDonald, 2000; McDonald, 2002), por lo que pueden actuar como competidores inhibidores de la unión de tiroxina a transtiretina, y alterar los niveles de hormona tiroidea transportada en sangre y líquido cefalorraquídeo (Letherland, 2000).

### **Alteraciones del sistema nervioso y del comportamiento**

La neurotoxicidad producida por los compuestos organoclorados causa efectos a nivel motor, sensorial, cognitivo o autónomo (Weiss y Laties, 1975; Geller *et al.*, 1979; Evangelista de Duffard y Duffard, 1996). Al parecer el mecanismo de acción consiste en cambios en la cinética del sodio y potasio en la membrana de células nerviosas, pudiendo estar implicado el transporte del calcio o la actividad de la enzima Calcio-ATPasa (Woolley *et al.*, 1985; Smith, 1991, 2004). En el caso de los insecticidas ciclodiénicos, su mecanismo consiste en una inhibición de los receptores GABA (Narahashi, 2001), los principales receptores inhibidores, lo que se traduce en numerosos efectos, incluidas las características convulsiones tónicas. Por ello las aves de presa que mueren intoxicadas por ciclodiénicos suelen presentar las garras cerradas (Walker, 2003). Cuando las dioxinas o compuestos "tipo dioxina" se expusieron *in ovo* en distintas especies de aves domésticas y silvestres se describió desmielinización (Henshel, 1998), mientras que la exposición a dieldrin, DDE o PCBs puede causar disminución en los niveles de dopamina, serotonina y norepinefrina en el encéfalo



(Sharma, 1973; Heinz *et al.*, 1980).

La disminución de las habilidades motoras y el retraso del desarrollo cognitivo por la exposición crónica a organoclorados (Blus, 2011) implica que las aves sean más susceptibles de ser morir al ser depredadas, colisionar contra coches, padecer enfermedades o inanición (Frank y Lutz, 1999).

Fenómenos de disrupción endocrina pueden causar alteraciones en el comportamiento ya que determinadas hormonas como los estrógenos (Adkins-Regan *et al.*, 1994) y las hormonas tiroideas intervienen en el desarrollo del sistema nervioso del embrión (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). De hecho, el desequilibrio tiroideo es un mecanismo reconocido de desarrollo neuronal deficiente (Morreale de Escobar *et al.*, 2000; Porterfield, 2000). Por ejemplo, en palomas tratadas con una mezcla de organoclorados compuesta por DDE, PCBs (Aroclor 1254), mirex y fotomirex se observó una alteración en los niveles hormonales (incluida la T4) y anomalías en el cortejo, construcción del nido, incubación y cuidado de los pollos, lo que condujo a un evidente fracaso reproductivo (McArthur *et al.*, 1983). Alteraciones similares se observaron en Cernícalos americanos (*Falco sparverius*) adultos expuestos durante cortos periodos de tiempo a DE-71, una de las mezclas comerciales de PBDEs (Ferne *et al.*, 2008). En estudios de campo también se ha relacionado la contaminación por compuestos organohalogenados con alteraciones en el comportamiento reproductor de los padres. En charranes que criaban en Green Bay en 1983 se observó abandono del nido por parte de los padres, desaparición de huevos y un aumento del periodo de incubación respecto a los del Lago Poyga, una zona menos contaminada (Kubiak *et al.*, 1989). En gaviotas del Ártico, los niveles de PCBs en sangre se relacionaron con un menor cuidado de los padres por disminución del tiempo en el nido (Bustnes *et al.*, 2001)

### **Alteraciones del sistema inmune**

La importancia de este apartado radica en que los organismos infectocontagiosos se consideran especialmente relevantes en la regulación de las poblaciones y la evolución de las especies silvestres (Grenfell y Dobson, 1995; Hamilton, 2001), siendo el sistema inmune del hospedador el responsable de la lucha contra éstos. Dado que una gran parte de las funciones del sistema inmune están





regulados por el sistema endocrino (Fairbrother *et al.*, 2004), los fenómenos de disrupción endocrina causados por los compuestos organohalogenados se pueden traducir en alteraciones a este nivel.

Al parecer la inmunotoxicidad puede ser una de las explicaciones para la menor probabilidad de supervivencia evidenciada en aves con altos niveles de organoclorados en su organismo (Bustnes *et al.*, 2003b). Se ha demostrado que algunos contaminantes ambientales pueden llegar a ser inmunotóxicos, provocando un aumento de la susceptibilidad al padecimiento de este tipo de enfermedades (Vos y Luster, 1989; Grasman *et al.*, 1996). En distintas especies de aves se han observado alteraciones de la respuesta inmune humoral y celular por la exposición a compuestos organohalogenados, concretamente PCBs, DDE y PBDEs, (Grasman *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1996; Fernie *et al.*, 2005a). Por otro lado, Sagerup *et al.* (2000), encuentran una relación positiva entre la presencia de nematodos y las concentraciones hepáticas de distintos organoclorados, sobre todo de congéneres de PCBs.

### ***Fracaso reproductivo***

Los efectos adversos sobre la reproducción de las aves se han observado desde finales de los años cuarenta debido al uso masivo de DDT en agricultura y silvicultura (Kenntner *et al.*, 2003).

Las alteraciones que pueden finalmente conducir a un fracaso en el éxito reproductivo se observan a distintos niveles. En las aves adultas consisten en mortalidad, aumento del estrés, disminución de la puesta y del grosor de la cáscara del huevo, reducción del tiempo de incubación y menor cuidado de los pollos (Fry, 1995). También se ha observado puestas más tardías y aumento de la depredación en el nido (Helberg *et al.*, 2005). A nivel embrionario las alteraciones consisten en mortalidad o fracaso en la eclosión, malnutrición de los pollos e incapacidad de desarrollarse, teratogénesis y alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso por disrupción endocrina (Fry, 1995). Un claro ejemplo de las alteraciones producidas por compuestos organoclorados durante el desarrollo embrionario es el síndrome conocido como GLEMEDS (Great Lakes embryo mortality, edema and deformity syndrome) que



provocó embriomortalidad, edema y malformación del pico y del esqueleto en embriones y pollos de Pigargo americano (*Haliaeetus albicilla*), cormoranes, gaviotas y charranes de la región de los Grandes Lagos, en Norteamérica. Este síndrome se ha correlacionado enormemente con las TEQs de compuestos “tipo dioxina” (Fry, 1995).

Como consecuencia del fracaso reproductivo causado por los compuestos organohalogenados, muchas especies de aves silvestres han sufrido importantes declives poblacionales (Mora *et al.*, 1993; Fry, 1995; Henny y Elliott, 2007).

#### **II.2.1.7. Interpretación de las concentraciones de compuestos organohalogenados en aves**

A continuación se describen concentraciones de los compuestos organohalogenados de interés en el presente trabajo, tanto en huevos como en sangre o plasma de rapaces, especialmente del grupo de las rapaces nocturnas. La interpretación de resultados para la evaluación del riesgo se centrará en los niveles asociados con el fracaso reproductivo.

##### ***Insecticidas organoclorados***

Según estudios de laboratorio, las rapaces nocturnas parecen ser igual de sensibles a los efectos de los insecticidas organoclorados que otras aves de presa (Blus, 1996). Sin embargo, al menos en E.E.U.U., las poblaciones silvestres de búhos han sufrido pocos problemas serios relacionados con la disminución del grosor de cáscara, productividad, mortalidad o declives poblacionales (Blus, 1996), ni siquiera durante el auge del uso de estos compuestos (Seidensticker y Reynolds, 1971; Henny, 1972; Klaas y Swineford, 1976; Klaas *et al.*, 1978; Lincer y Clark, 1978; Springer, 1980; Henny *et al.*, 1984; Noble y Elliott, 1990). Esto se ha atribuido al hecho de que las rapaces nocturnas se ven generalmente menos expuestas porque su dieta está basada en mamíferos e invertebrados que generalmente presentan niveles más bajos de contaminantes que las aves (Henny, 1972; Noble y Elliott, 1990).

Uno de los parámetros más estudiados y útiles en la interpretación de residuos de insecticidas organoclorados es la disminución del grosor de la cáscara de huevo (Martínez-López, 2005). A pesar de que otros contaminantes o determinados estados



fisiológicos pueden provocar esta alteración, se ha comprobado que la exposición a DDE es la principal causa (Blus, 2011). Se debe tener en cuenta que el grado de disminución del grosor de cáscara es mayor a concentraciones más bajas de DDE (Blus, 2011). Así, mientras que valores de 1 µg/g (peso húmedo) de DDE en huevos se relacionan con una pérdida entre 5 y 10% de grosor, valores de 59 µg/g están relacionados con disminución del 44% (Risebrough, 1972; Blus *et al.*, 1974, 1979). Además, el grado de disminución causado por una determinada concentración de DDE también varía entre las distintas especies de aves, e, incluso dentro del grupo de las rapaces, entre especies de la misma familia (Peakall, 1975). Este efecto puede ser crucial para las aves silvestres, ya que se estima que si la disminución del grosor de cáscara de  $\geq 18\%$  persiste durante varios años, se pueden producir declives poblacionales (Blus, 2011). Por otro lado, la dureza de la cáscara también se ve comprometida por la exposición a DDE, afectando ambos parámetros a la productividad y, por tanto, al éxito reproductivo (Blus, 1984; Henny y Bennett, 1990).

Aunque la exposición experimental a dieldrin en Lechuzas (*Tyto alba*) se ha correlacionado con una ligera disminución en el grosor de cáscara (Mendenhall *et al.*, 1983), se considera que los procesos reproductivos de las aves, al igual que de los mamíferos, no son sensibles a los efectos del dieldrin, incluso a concentraciones relativamente altas (Peakall, 1996; Elliott y Bishop, 2011). Por otro lado, se ha observado una correlación entre los niveles de dieldrin en plasma y un aumento de la mortalidad de los volantones de Búho americano (*Bubo virginianus*) (Frank y Lutz, 1999), un descenso en la productividad en Autillos yanquis (*Otus asio*) criados en cautividad por exposición a endrin (Fleming *et al.*, 1982) y un descenso en la productividad de Cernícalos americanos asociada a la exposición a heptacloro epóxido (Henny *et al.*, 1983). Sin embargo, en general los efectos adversos producidos por ciclodiénicos se han relacionado más frecuentemente con mortalidad directa.

También el HCB altera la supervivencia y eclosión en aves (Schwetz *et al.*, 1974; Reed *et al.*, 1977) y se ha asociado a problemas reproductivos en poblaciones silvestres (Gilbertson y Reynolds, 1972; Jarman *et al.*, 1996).

Tabla II.1. Concentraciones de insecticidas en sangre de distintas especies de aves ( $\mu\text{g/L}$ ). Datos expresados en medias y rangos.

Especie Año de muestreo	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	Lindano	$\delta$ -HCH	$\Sigma$ HCH	Endosulfan I	Endosulfan II	Endosulfan sulfato	$\Sigma$ Endosulfan	Referencia Localización
Buitre africano ( <i>Pseudogyps africanus</i> ) 1993-1995	7,70 2,98 3,81 3,72	34,32 5,04 36,66 39,98	5,32 2,10 23,5 14,75	NA	NA	3,38 3,05 4,61 1,67	5,09 ND 4,82 2,13	11,8 5,29 27,1 3,95	20,27 8,34 36,52 7,75	Van Wyk <i>et al.</i> , 2001* Dronfield (n=28) Sandveld (n=4) Moholoholo (n=6) De Wildt (n=22)
Águila real ( <i>Aquila chrysaetos</i> ) 2008	NA	0,13- 0,15	NA	NA	NC	NA	NA	NA	NA	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Finmark, Noruega (n=2)
Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> ) 2008	NA	0,12; 0,07- 0,14	NA	NA	NC	NA	NA	NA	NA	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=16)
Pigargo europeo ( <i>Haliaeetus albicilla</i> ) 2008	NA	0,12	NA	NA	NC	NA	NA	NA	153,2 (45,3-395)	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=5)



Gavilán besra ( <i>Accipiter virgatus</i> ) 2005-2007	NA	NA	NA	NA	166,6; 11,1- 541	NA	NA	NA	NA	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** India (n=4)
Milano negro ( <i>Milvus migrans govinda</i> ) 2005-2007	NA	NA	NA	NA	77,2; <1-619	NA	NA	NA	44,4 (<1-290)	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** India (n=51)
Lechuza ( <i>Tyto alba</i> ) 2005-2007	NA	NA	NA	NA	79,3	NA	NA	NA	58,3	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** India (n=1)
Águililla calzada ( <i>Hieraaetus pennatus</i> ) 1999-2003	1,67; ND-20	6,19; ND-75	10,10; ND-123	7,38; ND-50	NA	43; ND-239,03	16,3; ND-90	29,75; ND-216	NA	Martínez-López <i>et al.</i> , 2009* Región de Murcia (n=62)
Busardo ratonero ( <i>Buteo buteo</i> ) 2001	ND	4,05; 3,4-4,7	0,76; ND-1,4	11; 10-12	15,92; 13,63- 18,21	15; 15-15	6,15; 3,7-8,6	32,35; 8,7-56	NA	Martínez-López, 2005* Región de Murcia (n=2)
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> ) 2003	0,62; ND-4,02	3,5; ND- 10,31	0,66; ND-3,16	4,97; ND- 17,37	9,76; ND- 24,62	70,62; ND-145,05	25,92; 9,05-58,73	32,95; ND-248,4	NA	Martínez-López, 2005* Región de Murcia (n=11)



Azor ( <i>A. gentilis</i> ) 2002-2003	1,93; ND-10	2,49; ND- 6,69	0,56; ND-2,85	6,52; ND-14	11,5; ND- 19,64	46,1; ND-122	10,4; ND-49	18,16; ND-67	NA	Martinez-López, 2005* Región de Murcia (n=11)
Pigargo americano ( <i>Haliaeetus leucocephalus</i> ) 1990-1994	NA	NA	NA	NA	< LD	NA	NA	NA	NA	Donaldson <i>et al.</i> , 1999** Lago Erie (n=30) Lake Huron (n=1) Lago Nipigon (n=7) Lago Superior (n=11) Lago de los Bosques (n=2)

\*sangre de pollos

\*\*plasma de pollos

\*\*\*plasma de individuos de diferentes edades

ND= no detectado; NA= no analizado



Tabla II.1. Concentraciones de insecticidas en sangre de distintas especies de aves ( $\mu\text{g/L}$ ). Datos expresados en medias y rangos. (Continuación)

Especie Año de muestreo	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Heptacloro	Heptacloro epóxido	Referencia Localización
Buitre africano ( <i>P. africanus</i> ) 1993-1995	NA	9,07 4,75 9,20 3,75	4,51 12,16 3,14 2,79	NA	2,12 2,82 32,25 11,72	Van Wyk <i>et al.</i> , 2001* Dronfield (n=28) Sandveld (n=4) Moholoholo (n=6) De Wildt (n=22)
Águila real ( <i>A. chrysaetos</i> ) 2008	NA	NA	NA	NA	0,092-0,12	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Finnmark, Noruega (n=2)
Azor ( <i>A. gentilis</i> ) 2008	NA	NA	NA	NA	0,28; 0,1-0,82	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=16)
Pigargo europeo ( <i>H. albicilla</i> ) 2008	NA	NA	NA	NA	0,28; 0,19-0,85	Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=5)
Gavilán besra ( <i>Accipiter virgatus</i> ) 2005-2007	NA	4,7; <1-9	NA	NA	21,9; <1-45	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=4)
Milano negro ( <i>Milvus migrans govinda</i> ) 2005-2007	NA	9,1; <1-68,5	NA	NA	26,2; <1-156	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=51)



Lechuza ( <i>T. alba</i> ) 2005-2007	NA	6,3	NA	NA	28,1	Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=1)
Águililla calzada ( <i>H. pennatus</i> ) 1999-2003	3,67; ND-27	6,51; ND-81,15	10,45; (ND-117,97	NA	NA	Martinez-López, 2005* Región de Murcia (n=62)
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> ) 2001	ND	1,85; 1,3-2,4	1,89; ND-3,6	0,57; ND-1	2,2; 1,6-2,8	Martinez-López, 2005* Región de Murcia (n=2)
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> ) 2003	7,5; 0,1- 46,81	34,9; 11,61- 93,63	23,59;ND- 57,73	9,26; ND- 23,58	9,81; ND-25,76	Martinez-López, 2005* Región de Murcia (n=11)
Azor ( <i>A. gentilis</i> ) 2002-2003	4,06; ND-24	7,88; ND-18,17	10,49; ND-30	6,06; ND-25	4,39; ND-23	Martinez-López, 2005* Región de Murcia (n=11)
Pigargo americano ( <i>H. leucocephalus</i> ) 1990-1994	NA	3,0; 0,4-11,0 7,0 3,1; 1,6-5,5 5,1; 2,9-11,5 3,1; 2,6-3,7	NA	NA	NA	Donaldson <i>et al.</i> , 1999** Lago Erie (n=30) Lake Huron (n=1) Lago Nipigon (n=7) Lago Superior (n=11) Lago de los Bosques (n=2)

\*sangre de pollos; \*\*plasma de pollos; \*\*\*plasma de individuos de diferentes edades

ND= no detectado; NA= no analizado





Tabla II.1. Concentraciones de insecticidas en sangre de distintas especies de aves ( $\mu\text{g/L}$ ). Datos expresados en medias y rangos.  
(Continuación)

Especie; Año de muestreo	p,p'-DDT	p,p'-DDD	p,p'-DDE	$\Sigma$ DDT	Referencia; Localización
Buitre africano ( <i>P. africanus</i> ) 1993-1995	5,53 ND ND 14,02	ND ND ND 5,97	9,09 3,95 5,16 10,67		Van Wyk <i>et al.</i> , 2001* Dronfield (n=28) Sandveld (n=4) Moholoholo (n=6) De Wildt (n=22)
Alimoche ( <i>Neophron percnopterus</i> ) 1999-2001	19 1 0,95 1,2 0,22	0,17 0,16 0,15 0,17 ND	2,1 0,82 3,8 3,9 6,0		Gómara <i>et al.</i> , 2004**** Navarra (n=6) Segovia (n=3) Cádiz (n=3) Menorca (n=2) Fuerteventura (n=13)
Águila real ( <i>A. chrysaetos</i> ) 2008	NA	NA	0,6-4,88		Sonne <i>et al.</i> , 2010** Finnmark, Noruega (n=2)
Azor ( <i>A. gentilis</i> ) 2008	NA	NA	7,5; 1,77-24,7		Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=16)
Pigargo europeo ( <i>H. albicilla</i> ) 2008	NA	NA	5,2; 1,09-10,91		Sonne <i>et al.</i> , 2010** Troms, Noruega (n=5)



Gavilán besra ( <i>A. virgatus</i> ) 2005-2007	8,6; <1-23	1,1; <1-3,1	35,2; 7-115		Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=4)
Milano negro ( <i>M. migrans govinda</i> ) 2005-2007	19,2; <1-227	8,7; <1-57,4	15,3; <1-137		Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=51)
Lechuza ( <i>T. alba</i> ) 2005-2007	74	ND	5,3		Dhananjayan y Muralidharan, 2010*** Ahmedabad, India (n=1)
Águililla calzada ( <i>H. pennatus</i> ) 1999-2003	7,5; ND-63	7,89; ND-207,11	5,6; ND-25		Martínez-López <i>et al.</i> , 2009* Región de Murcia (n=62)
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> ) 2001	5,45; 3,7-7,2	1,74; ND-3,1	1,57; ND-3		Martínez-López, 2005* Región de Murcia (n=2)
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> ) 2003	11,31; ND-31,74	70,76; ND-202,15	5,53; ND-13,99		Martínez-López, 2005* Región de Murcia (n=11)
Pigargo americano ( <i>H. leucocephalus</i> ) 1990-1994	0,6; ND-2 4,6 2,4; 0,6-7,9 5,6; 1,6-17,1 0,1; ND-0,1	NA	22,4; 3,6-139,4 62,5 23,9; 12,6-85 28,0; 7,6-148,4 54,0; 40,1-72,6		Donaldson <i>et al.</i> , 1999** Lago Erie (n=30) Lake Huron (n=1) Lago Nipigon (n=7) Lago Superior (n=11) Lago de los Bosques (n=2)



Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> ) 2000-2005				4,7; 1,4-16,8 10,7; 6-16,9 9,4; 5,9-15,2	Strause <i>et al.</i> , 2007** Michigan, EEUU Zona de referencia (n=3) Alto Rio Kalamazoo (n=6) Bajo Rio Kalamazoo (n=2)
--	--	--	--	--	---

\* Sangre de pollos; \*\* Plasma de pollos; \*\*\* Plasma de individuos de diferentes edades; \*\*\*\* Suero de individuos de diferentes edades; ND= no detectado; NA= no analizado; MG= media geométrica

Tabla II.2. Niveles de organoclorados en huevos asociados a alteraciones reproductivas en rapaces ( $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo)

Especie	Compuesto	Concentración	Efecto	Referencia
Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> )	DDE	5	10% DGR***	Lincer y Clark, 1978
Lechuza ( <i>Tyto alba</i> )	DDE	12 41	20% DGR* 28% DGR*	Mendenhall <i>et al.</i> , 1983
Lechuza ( <i>T. alba</i> )	DDE	> 5,3	12-14% DGR***	Klaas <i>et al.</i> , 1978
Cárabo ( <i>Strix aluco</i> )	DDE	3	19% DGC**	Yoccoz <i>et al.</i> , 2009
Lechuza ( <i>T. alba</i> )	DDE	>12	75% DPR*	Mendenhall <i>et al.</i> , 1983
Lechuza ( <i>T. alba</i> )	DDE	3-5	NOEL DGC***	Klaas <i>et al.</i> , 1978
Búho americano ( <i>B. virginianus</i> )	$\Sigma$ DDTs	3,6 12	NOEL GC, DPR*** LOEL GC, DPR, V ***	Strause <i>et al.</i> , 2007



Lechuza ( <i>T. alba</i> )	Dieldrin	12 41	3% DGC* 5% DGC*	Mendenhall <i>et al.</i> , 1983
Halcón peregrino ( <i>Falco peregrinus</i> )	Dieldrin	0,7	DP ***	Newton, 1988
Autillo yanqui ( <i>Otus asio</i> )	Endrin	0,27	43% DPR*	Fleming <i>et al.</i> , 1982
Autillo californiano ( <i>O. kennicotti</i> )	Heptacloro epóxido	3,94	NOEL DP***	Henny <i>et al.</i> , 1984
Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	$\beta$ -HCH	5,5	NOEL DPR***	Henny <i>et al.</i> , 1983
Búho chico ( <i>Asio otus</i> )	HCB	1,49	NOEL DPR***	Henny <i>et al.</i> , 1984
Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	HCB	2,4	NOEL DPR***	Henny <i>et al.</i> , 1983

\*Dato obtenido por exposición experimental; \*\* Predicción calculada a partir de resultados de campo; \*\*\* Dato obtenido en estudios de campo; DGC=disminución del grosor de cáscara; DPR=disminución de la productividad; DP=declive poblacional; V=viabilidad embrionaria



Tabla II.3. Niveles de Insecticidas organoclorados en huevos de rapaces nocturnas (ng/g). Datos expresados en medias y rangos

Especie Año de muestreo	Dieldrin	Heptacloro epóxido	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCB	Mirex	Referencia Localización
Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> )* 1966-1967	160; 110-240	160; 90-240	NA	NA	NA	NA		Seidensticker y Reynolds, 1971 EEUU (n=3)
Autillo yanqui ( <i>Otus asio</i> ) * 1973	130; 100- 240 (n=8)	100-220 (n=2)	NA	NA	NA	110 (n=3)	120 (n=3)	Klaas y Swineford, 1976 Ohio, EEUU
Lechuza ( <i>Tyto alba</i> )* 1972-1973	370	ND-100	NA	NA	NA	NA	ND- 2200	Klaas <i>et al.</i> , 1978 Maryland, EEUU (n=41)
Búho americano ( <i>B. virginianus</i> )* 1974-1977	1700 (600-1500)	100 (ND-100)	NA	NA	NA	100 (ND-400)	NA	Springer, 1980 Ohio, EEUU (n=4)
Búho chico ( <i>Asio otus</i> )* 1993	ND	ND	ND	ND	ND	80	ND	Henny <i>et al.</i> , 1998 Región Sarotov, Rusia (n=1)
Búho chico ( <i>A. otus</i> )* 1995	ND	ND	NC; ND- 70	40 (ND-270)	NA	NC (ND-410)	NA	Henny <i>et al.</i> , 2003 Región Stavropol, Rusia (n=10)
Autillo europeo ( <i>Otus scops</i> )** 1995	ND	ND	ND	ND	NA	ND	NA	Henny <i>et al.</i> , 2003 R. Stavropol, Rusia (n=2)



Cárabo ( <i>Strix aluco</i> )**								Bustness <i>et al.</i> , 2007
1986-1989	NA	NA	39,1	36,4	16,4	290,9	NA	Noruega (n=12)
2001-2004			1,76	4	15,3	72		Noruega (n=42)
Autillo de madriguera ( <i>Athene cunicularia</i> )* 2002	3,37; 0,4- 19,4	Heptacloro 8,26;0,1-39,6	NA	NA	14,16 1-25,3	NA	NA	García-Hernández <i>et al.</i> , 2006 México (n=8)
Mochuelo ( <i>Athene noctua</i> )** 1998-2000	NA	NA	0,4	9,4	17	130	NA	Jaspers <i>et al.</i> , 2005 Bélgica (n= 39)

\* Concentraciones en peso húmedo; \*\* Concentraciones en peso de lípidos

Tabla II.4. Concentraciones de difenilifáticos en huevos de rapaces nocturnas (ng/g)

Especie					Referencia
Año de muestreo		DDE	DDD	DDT	Localización
Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> ) * 1966-1967	Media (rango)	700 (400-1100)	NA	NA	Seidensticker y Reynolds, 1971 Montana, EEUU (n=3)
Autillo yanqui ( <i>Otus asio</i> )* 1973	Media (rango)	1290 (330-2800) (n = 35)	120 (n=2)	190 (n=1)	Klaas y Swineford, 1976 Ohio, EEUU
Lechuza ( <i>Tyto alba</i> ) * 1972-1973		Media; mediana 3730; 2550*	Rango ND-1,1	Rango 0,19-0,65	Klaas <i>et al.</i> , 1978 Maryland, EEUU (n=41)
Búho americano ( <i>B. virginianus</i> )* 1974-1977	Media (rango)	3000 (ND-4300)	100 (ND-200)	NA	Springer, 1980 Ohio, EEUU (n=4)



Búho chico ( <i>Asio otus</i> )* 1993		70	ND	ND	Henny <i>et al.</i> , 1998 Rusia (n=1)
Búho chico ( <i>A. otus</i> )* 1995	Media; (rango)	410;( 60-4580)	ND	ND	Henny <i>et al.</i> , 2003; Rusia (n=10)
Autillo europeo ( <i>Otus scops</i> ) * 1995	Media; rango	110; (80-140)	ND	ND	Henny <i>et al.</i> , 2003 Rusia (n=2)
Mochuelo de madriguera ( <i>Athene cunicularia</i> ) * 1996	Media Geométrica (rango)	8830 (4160-32820)			Gervais and Anthony, 2003 California, EEUU (n=9)
Mochuelo de madriguera ( <i>A. cunicularia</i> )* 1998	Media Geométrica (rango)	2600 (900-10110)			Gervais and Anthony, 2003 California, EEUU (n=21)
Mochuelo de madriguera ( <i>A. cunicularia</i> ) * 1999	Media Geométrica (rango)	740 (60-3110)			Gervais and Anthony, 2003 California, EEUU (n=26)
Mochuelo de madriguera ( <i>A. cunicularia</i> ) * 2000	Media Geométrica (rango)	1000 (200-25560)			Gervais and Anthony, 2003 California, EEUU (n=20)
Mochuelo de madriguera ( <i>A. cunicularia</i> ) * 2001	Media Geométrica (rango)	1140 (610-3710)			Gervais and Anthony, 2003 California, EEUU (n=16)
Mochuelo europeo ( <i>Athene noctua</i> ) ** 1998-2000	Mediana	p,p'-DDE 830	ND	o,p'-DDT: ND p,p'-DDT: 1,7	Jaspers <i>et al.</i> , 2005 Bélgica (n= 39)
Mochuelo de madriguera ( <i>A. Cunicularia</i> ) * 2002	Media (rango)	22,33 (3,90-40,8)	9,25 (0,1-27)	16,51 (0,1-36,2)	García-Hernández <i>et al.</i> , 2006 México (n=8)
Cáرابو ( <i>Strix aluco</i> ) ** 1986-1989	Media	9064	NA	NA	Bustness <i>et al.</i> , 2007 Noruega (n=12)



Cárabo ( <i>S.aluco</i> ) ** 2001-2004	Media	1700	NA	NA	Bustness <i>et al.</i> , 2007 Noruega (n=42)
Búho americano ( <i>B. virginianus</i> )* 2000-2005	Media Geométrica (rango)	314; (246–417) 1269;( 306-4987) 1305; (618-2013)			Strause <i>et al.</i> , 2007; EEUU Zona de referencia (n=5) Alto Rio Kalamazoo (n=5) Bajo Rio Kalamazoo (n=7)

\* Concentraciones en peso húmedo; \*\* Concentraciones en peso de lípidos





### **Bifenilos policlorados**

La evaluación de los efectos tóxicos producidos por los PCBs es complicada debido a varios factores. Por un lado, la toxicidad depende del patrón concreto de congéneres acumulados en el individuo y los metabolitos que se forman, lo cual puede depender de la localización geográfica, ya que las mezclas comerciales de PCBs pueden ser distintas en cada país. Además, la contaminación de los productos comerciales de PCBs con PCDFs complica la situación, ya que estos compuestos son mucho más tóxicos. A esto hay que añadir que raramente existe una exposición a mezclas intactas de PCBs, por lo que los patrones de exposición serán diferentes dependiendo de los metabolitos que se formen en cada especie (Rice *et al.*, 2003)

En el caso de los congéneres “tipo dioxina”, debido al común mecanismo de acción con la TCDD y compuestos relacionados, consistente en la unión al receptor Ah, la estimación de la toxicidad de mezclas complejas que contengan este tipo de compuestos se puede realizar utilizando un factor de equivalencia tóxica (TEF). Este factor expresa la toxicidad relativa de determinados compuestos PCBs en relación a la 2,3,7,8-TCDD a la que se le asigna un TEF de 1. Puesto que se ha evidenciado que los efectos son aditivos, para estimar la toxicidad total de los compuestos “tipo dioxina” en una muestra, se utilizará la suma del producto de la concentración de cada congénere por su respectivo TEF, obteniendo la concentración equivalente tóxica (TEQ) (Safe, 1990; van den Berg *et al.*, 1998), valor que se utilizará para la estimación del riesgo.

Tabla II.5. Valores de TEF para aves (van der Berg *et al.*, 1998).

Congéneres	IUPAC Prefijos PCBs	TEF Aves
PCB 77	3,3',4,4'-Tetra	0,05
PCB 81	3,4,4',5-Tetra-	0,1
PCB 105	2,3,3',4,4'-Penta-	0,0001
PCB 114	2,3,4,4',5-Penta-	0,0001
PCB 118	2,3',4,4',5-Penta-	0,00001
PCB 123	2,3',4,4',5'-Penta-	0,00001



PCB 126	3,3',4,4',5-Penta-	0,1
PCB 156	2,3,3',4,4',5-Hexa-	0,0001
PCB 157	2,3,3',4,4',5'-Hexa-	0,0001
PCB 167	2,3',4,4',5,5'-Hexa-	0,00001
PCB 169	3,3',4,4',5,5'-Hexa-	0,001
PCB 189	2,3,3',4,4',5,5' -Hepta	0,00001

Aparte de la importante toxicidad de los congéneres “tipo dioxina”, se deben tener en cuenta los efectos que determinados metabolitos de PCBs pueden producir mediante mecanismos distintos a la unión al receptor Ah o por interacciones con algunos congéneres padres. Por tanto, al menos hasta que se desarrollen otros procedimientos similares a los usados en los compuestos “tipo dioxina”, es recomendable medir el total de congéneres de PCBs en las muestras (Rice *et al.*, 2003).

Se ha descrito fracaso reproductivo en aves de distintas especies expuestas experimentalmente a distintas mezclas de PCBs, manifestado por embriomortalidad, disminución en la tasa de eclosión o del grosor de cáscara (Hoffman *et al.*, 1996). Sin embargo, McLane y Hughes (1980) no encontraron efectos en el grosor de cáscara, número de huevos, tasa de eclosión o productividad tras la administración de Aroclor 1248, la mezcla comercial con mayor contenido en el congéner 77 (Anitescu *et al.*, 2000) a Autillos yanquis en la dieta. Las concentraciones de PCBs en huevos oscilaron de 4 a 18 ppm (peso húmedo). No se ha encontrado estudios de laboratorio con exposición a esta misma mezcla de PCBs en rapaces, pero la administración en gallinas provocó un descenso en la tasa de eclosión y una media de 23 ppm ph en huevos (Scott, 1977), ligeramente superior a la de los autillos.

Siguiendo el criterio establecido por Strause *et al.* (2007) para la evaluación del riesgo por exposición a PCBs en Búho americano, los niveles sin efecto observable (NOEL) y niveles más bajos con efecto observable (LOEL) para PCBs se resumen en la tabla II.6.



Tabla II.6. Valores tóxicos de referencia establecidos por Strause *et al.* (2007) para Búho americano en peso húmedo.

	Valor tóxico de referencia	Parámetro de respuesta	Referencia
Total PCBs (ng/g)			
NOEL	7000	DGC, TP, VE, EE	McLane y Huges, 1980
LOEL	21000	DGC, TP, VE, EE	
Total TEQs (pg/g, ph)			
NOEL	135	IE, VE	Elliott <i>et al.</i> , 1996; Elliott <i>et al.</i> , 2000; Woodford <i>et al.</i> , 1998  Elliott <i>et al.</i> , 1996
LOEL	400	IE	

DGC=Disminución del grosor de cáscara; TP=Tamaño de puesta; VE=Viabilidad embrionaria; EE=Éxito de eclosión; EE= Inducción enzimática

En la tabla II.7 se recopilan los niveles de PCBs encontrados en huevos de Strigiformes.



Tabla II.7. Niveles de PCBs en huevos de distintas especies de Strigiformes (ng/g)

Congénera	Cárabo ( <i>Strix aluco</i> )*a 1986-1989 (n=12) Media	Mochuelo ( <i>Athene noctua</i> )* b 1998-2000 (n=40) Mediana (rango)	Cárabo ( <i>S. aluco</i> )* a 2001-2004 (n=42) Media	Lechuza ( <i>Tyto alba</i> )* c 2001 (n=17) Media (rango)	Búho chico ( <i>Asio otus</i> )* c 2001 (n=6) Media (rango)	Cárabo ( <i>S. aluco</i> )* c 2001 (n=1)	Mochuelo de madriguera ( <i>A. cunicularia</i> )**d 2002 (n = 8) Media (rango)
PCB 8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 18	NA	1 (ND-11)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 28	NA	NA	NA	1,47 (ND-2,3)	2,03 (1,7-2,3)	2, 3	NA
PCB 31	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 31/28	NA	49 (5-550)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 37	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,5 (0,3-7,4)
PCB 44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 52	NA	4 (ND-68)	NA	NC (ND-1,3)	1,50 (1,2-19)	2	NA
PCB 70	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 74	NA	47(7-370)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 77	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4,6 (ND-18,5)
PCB 81	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,7 (ND-1,8)



PCB 87	NA	NA	NA	NA	NA	NA	651,1 (36,9-1716)
PCB 95	NA	5(1-24)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 99	310,9	100(21-500)	37	NA	NA	NA	NA
PCB 101	48,4	34 (6-190)	7,42	(ND-1,1)	1,05 (ND-1,3)	1,4	NA
PCB 105	NA	60 (12-210)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 110	NA	11(2-87)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 118	254,3	170 (36-480)	42	(ND-1,3)	0,88 (ND-1,1)	ND	NA
PCB 126	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3,3 (0,3-5)
PCB 128	NA	67 (13-370)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 132	NA	3(1-7)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 138	1616	NA	219,1	9,08 (5,3-13,6)	7,22 (4,8-9,5)	12,6	NA
PCB 138/163	NA	720(140-4400)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 149	NA	59 (10-340)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 151	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 153	3338	890 (190-6486)	431,3	12,9 (8,2-17,8)	16,27 (11,9-19,8)	18,4	NA
PCB 156	NA	58 (12-300)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 158	NA		NA	NA	NA	NA	19,5 (4,9-59,4)
PCB 167	NA	26(6-120)	NA	NA	NA	NA	
PCB 169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,26 (ND-1,1)



PCB 170	713,5	240 (41-2600)	69,2	NA	NA	NA	NA
PCB 177	NA	33(5-150)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 179	NA	NA	NA	NA	NA	NA	244,7 (ND-1642)
PCB 180	2498	590 (12-5200)	238,5	7,48 (2,9-10,7)	9,17 (7,3-10,1)	10,3	16,12 (0,7-65,1)
PCB 183	NA	70(12-410)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 187	695,8	440 (93-1800)	141,7	NA	NA	NA	NA
PCB 195	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 194	403,2	83 (19-570)	37,1	NA	NA	NA	NA
PCB 196	NA	64(14-240)	NA	NA	NA	NA	NA
PCB 199	NA	66(12-240)	NA	NA	NA	NA	NA
ΣPCBs	9878	3900 (790-23000)	1223	33,94 (20,6-44,4)	38,08 (32-41,9)	47,5	967,6 (125-2815)

a Bustnes *et al.*, 2007, Noruega Central; b Jaspers *et al.*, 2005, Bélgica; c Kubistova *et al.*, 2003, República Checa; d García-Hernández *et al.*, 2006, México; \* Peso de lípidos; \*\* Peso húmedo; \*\*\*Suma de congéneres 8, 28, 37, 44, 49, 52, 60, 66, 70, 74, 77, 81, 82, 87, 99, 101, 105, 114, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 158, 169, 170, 179, 180, 183, 187, 189; NA=no analizado; ND=no detectado; NC=no calculado



## **Polibromodifenil éteres**

Los estudios que evalúan la toxicidad por PBDEs en aves son escasos (Chen y Hale, 2009) aunque demuestran que la exposición a estos compuestos en individuos adultos pueden causar disminución de la fertilidad y del éxito reproductivo (Fernie *et al.*, 2009). Esto parece ser debido a alteraciones en el vínculo de la pareja y el comportamiento de cortejo en ambos sexos que conllevan un retraso en la puesta y disminución del tamaño del huevo y del grosor de cáscara (Fernie *et al.*, 2008). Según Henny *et al.* (2009), concentraciones de PBDEs próximas a 1 µg/g de peso húmedo en huevos de Águila pescadora (*Pandion haliaetus*) pueden reducir el éxito reproductivo en aves silvestres.

En el caso de la exposición a Penta-BDE (DE-71) *in ovo* (18,7 µg/g total PBDEs/huevo) y durante el desarrollo (15,6 ng/g peso corporal/día) en Cernícalos americanos se observaron alteraciones en tiroides, niveles de vitamina A, homeostasis del glutathion, en el sistema inmune y el desarrollo (Fernie *et al.* 2005a, b, 2006). En concreto el congénere BDE-100 se correlacionó positivamente con el tamaño, el aumento de peso y el consumo de alimento, por lo que se sugirió que es el que tiene mayor influencia sobre el crecimiento de los pollos. Se debe tener en cuenta que un mayor tamaño corporal puede ser perjudicial para los individuos por implicar un mayor coste energético (Fernie *et al.*, 2006). Sin embargo, según McKernan *et al.* (2009) la inyección de más de 1,8 µg/g (peso húmedo) ó 32 µg/g (peso lípidos) de DE-71 en la cámara aérea de huevos en incubación produce disminución de la eclosión y efectos subletales en pollos recién nacidos como es la inducción de EROD.

### **II.2.2. Metales pesados**

La mayoría de los metales forman parte de la composición de la corteza terrestre (Dalzeil, 1999) por lo que se encuentran de forma natural y ubicua en el medio ambiente. Aquellos que se hallan en niveles traza en la corteza, es decir a una concentración de 1000 ppm o inferior, son los principales causantes de problemas de toxicidad por metales. Esto es debido a que, aunque muchos de estos metales son esenciales para la vida a bajas concentraciones, la mayoría de los organismos no se adaptan a ellos cuando se exponen a altas concentraciones (Duffus, 1983). Dado que, a diferencia de los compuestos organohalogenados, los metales no son sintetizados ni degradados por el hombre, la exposición a niveles excesivos de estos metales traza



pueden producirse de modo natural como consecuencia de fenómenos geológicos normales. La meteorización de las rocas, la lixiviación de suelos o las erupciones volcánicas pueden lograr que estos metales queden disponibles en la biosfera. Sin embargo, las actividades humanas, especialmente tras la Revolución Industrial, han supuesto un aumento de la redistribución de los metales en los distintos compartimentos del medio (Fyfe, 1998), siendo el plomo y el zinc los metales de mayor emisión (Díaz Mayans *et al.*, 1993). Serán estos dos metales, junto con el cadmio y el cobre los elementos traza objeto de estudio del presente trabajo.

Desde el punto de vista toxicológico y de salud pública, el cadmio y el plomo junto con el mercurio son los metales más peligrosos (Scheuhammer, 1987c; García-Fernández y María-Mojica, 2000). Por el contrario las aves son en general resistentes a la intoxicación por zinc y cobre, aunque la exposición a altas concentraciones que excedan los mecanismos de regulación puede dar lugar a efectos adversos (Eisler 1993, 1998).

En la tabla II.8 se resumen las principales características físico-químicas de los cuatro metales.

Tabla II.8. Características físico-químicas del cadmio, plomo, zinc y cobre.

Símbolo	Cd	Pb	Zn	Cu
<b>Grupo sistema periódico</b>	IIb	IVa	IIb	Ib
<b>Nº atómico</b>	48	82	30	29
<b>Peso atómico</b>	112,4	207,5	65,38	63,55
<b>Punto de fusión</b>	320,9° C	327,5° C	420° C	1083° C
<b>P. de ebullición</b>	765° C	1740° C	907° C	2567° C
<b>Generalidades</b>	Maleable, dúctil	Gris azulado, maleable, dúctil	Cristalino, insoluble en agua, soluble en alcohol, ácidos y álcalis	Blando, dúctil, maleable
<b>Presentación</b>	Óxidos, sulfuros, cloruros, bromuros, sulfatos	Sulfuros, seleniuros, sulfosales, fosfatos, arseniatos, silicatos	Óxidos, carbonatos, silicatos, sulfuros	Sulfuros, carbonatos, óxidos, cloruros, silicatos, sulfoantimoniuro





### **II.2.2.1. Cadmio**

#### ***Características, usos y fuentes de exposición a cadmio***

El cadmio es un metal relativamente raro en la corteza terrestre, sin función fisiológica conocida. A pesar de que normalmente se encuentra a bajas concentraciones en suelo y agua, muchas plantas y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran en sus tejidos (Duffus, 1983).

Es un metal de tardío descubrimiento que no ha sido muy utilizado en industria hasta la década de los 90, momento en el que comenzó a emplearse en multitud de aplicaciones, principalmente en galvanizados, por sus propiedades anticorrosivas. También se ha utilizado como pigmento en pinturas y plásticos y como cátodo en baterías. Además es un subproducto de la obtención de zinc, plomo y cobre. Las erupciones volcánicas y los incendios forestales se consideran sus fuentes naturales de contaminación, mientras que el polvo y humo emitidos en fundiciones, los productos de incineración de materiales con cadmio y combustibles fósiles, la aplicación de fertilizantes y emisiones de lodos de depuradora y aguas residuales son las principales fuentes de contaminación antropogénica.

#### ***Cinética del cadmio***

La edad, el sexo, la forma química ingerida, los hábitos alimenticios, el estado nutricional, la época del año, la localización geográfica y la posición en la cadena trófica son factores que afectan la toxicocinética del cadmio (García-Fernández *et al.*, 1996; Burger *et al.*, 2003).

A pesar de que la absorción pulmonar de cadmio es más eficiente que la digestiva (Nordberg, 1974; Goyer, 1996), el alimento contaminado es la principal fuente de cadmio en las aves (Cain *et al.*, 1983; García-Fernández *et al.*, 1995). La baja absorción gástrica puede deberse a que, sobre todo a bajas concentraciones, la mayor parte del cadmio ingerido es retenido en las vellosidades intestinales, (Phillips, 1979). Conforme aumenta la exposición, el porcentaje de cadmio retenido disminuye (Scheuhammer, 1988), probablemente debido a los efectos tóxicos del metal sobre el epitelio intestinal (Richardson y Fox, 1975). De hecho, en aves silvestres se ha observado que daños en la mucosa intestinal pueden favorecer la absorción del cadmio, aunque dietas pobres en calcio, zinc o hierro pueden favorecer también la absorción de este metal (Scheuhammer, 1987c).



El transporte del cadmio en sangre se produce principalmente en el interior de linfocitos y eritrocitos (Szadkowski, 1972; Willden, 1973; Bernard y Lauwerys, 1984) y en menor grado unido a albúmina o metalotioneínas (Goyer, 1996).

El 90% del cadmio del organismo se almacena unido a metalotioneínas (Friberg *et al.*, 1974). La íntima unión del cadmio a la metalotioneína hace que el metal no sea difusible, lo cual impide el desarrollo de sus efectos tóxicos (Goyer, 1996; Scheuhammer, 1987c) pero también favorece la acumulación durante la vida del animal. Los principales órganos de acumulación son el riñón y el hígado, seguido de cerebro y hueso (García-Fernández *et al.*, 1996) aunque la distribución es dosis dependiente. Así por ejemplo, se ha observado que la exposición a dosis elevadas en poco tiempo en aves produce una acumulación mayor a nivel hepático que renal, mientras que si la exposición es continua a bajas dosis (<0.5 mg/Kg) la acumulación en riñón es 2-3 veces superior a la hepática (Scheuhammer, 1987c).

La principal vía de eliminación es la urinaria, aunque sólo una pequeña fracción del cadmio absorbido (0,01%) es eliminada por esta vía (Bernard y Lauwerys, 1984). El porcentaje de cadmio eliminado por esta vía puede aumentar en caso de daño renal por cadmio (Goyer *et al.*, 1984; Goyer, 1996). De forma complementaria, el cadmio también se elimina durante el crecimiento de la pluma, mediante la secreción de la glándula salina y en hembras, durante la formación del huevo (Burger, 1993; Burger y Gochfeld, 1985, 2000).

#### **II.2.2.2. Plomo**

##### ***Características, usos y fuentes de exposición a plomo***

El plomo es el metal tóxico más ampliamente distribuido en la naturaleza. Los procesos de obtención de plomo, la fabricación de insecticidas, pinturas, vidrios y baterías y el consumo de gasolina con plomo como aditivo antidetonante hasta el 1998 en España (Directiva 98/70/CE; RD 785/2001) han supuesto las principales fuentes antropogénicas de contaminación por plomo. La ingestión de perdigones de plomo ha sido descrita como la fuente de exposición más importante en aves, incluidas las rapaces, y muchos autores la han considerado como una de las causas que contribuyen al descenso de sus poblaciones en todo el mundo (Pattee y Hennes, 1983; Feierabend y Myers, 1984; Cade, 2007).



### **Cinética del plomo**

El plomo en aves, al igual que el cadmio, se comporta según un modelo tricompartmental similar al que sucede en hombre y otros mamíferos (García-Fernández, 1994).

La absorción vía digestiva en aves es muy rápida (Pain y Rattner, 1988), aunque no supera el 10% del total del plomo ingerido (Booth y MacDonald, 1988; Goyer, 1996), mientras que la totalidad del plomo depositado en pulmones es absorbido (Danielson, 1970). Ambas vías son las principales en vertebrados terrestres (Goyer, 1996).

Una vez absorbido, la mayor parte del plomo se distribuye por el torrente sanguíneo asociado a los eritrocitos, principalmente unido a la hemoglobina (Clemens *et al.*, 1975; Lumeij, 1985). En su distribución a hígado, riñón y otros tejidos blandos como el cerebro, el pulmón, el corazón y músculo, los niveles de plomo en sangre disminuyen progresivamente como consecuencia de su acumulación en tejido óseo, el cual se considera el tercer compartimento (Mautino, 1997) y tejido acumulador por excelencia (García-Fernández, 1994). De hecho es en hueso donde se hallan las concentraciones más elevadas en caso de exposiciones crónicas (Stendell, 1980), a diferencia de las exposiciones agudas en las que los niveles más altos se detectan en hígado y riñón (Longcore *et al.*, 1974; Pattee *et al.*, 1981; García-Fernández *et al.*, 1995). Sin embargo, el grado de acumulación de plomo en aves puede estar determinado por la edad, el sexo y los hábitos alimenticios (García -Fernández, 1994).

El plomo se elimina del organismo vía fecal principalmente (Tsuchiya, 1986), eliminándose a mayor velocidad el plomo presente en tejidos blandos que el acumulado en hueso (Franson y Pain, 2011). A pesar de que este metal puede transferirse a los huevos, varios autores han sugerido que lo hace en baja proporción (Furness, 1993). También durante el crecimiento de la pluma se produce transferencia de plomo circulante y hepático (Honda *et al.*, 1986). En aves rapaces, la formación de egagrópilas permite la eliminación de fragmentos de plomo ingeridos con la presa y constituye un mecanismo protector frente a la intoxicación por plomo (Redig y Arent, 2008).



### **II.2.2.3. Zinc**

#### ***Características, usos y fuentes de exposición a zinc***

El zinc es un metal poco abundante en la corteza terrestre que se utiliza en el galvanizado del hierro y varias aleaciones como el latón o el bronce. También se emplea en pilas, fusibles, funguicidas y materiales de construcción. En cosmética se utiliza como pigmento o aditivo antiséptico.

La contaminación por zinc es principalmente antropogénica (Díaz Mayans *et al.*, 1993), como consecuencia de las actividades de electrogalvanizado, procesos de fundición y refinería, drenajes de minería, aguas residuales domésticas o industriales, consumo de combustibles fósiles y residuos sólidos, aguas de escorrentías, corrosión de aleaciones de zinc y superficies galvanizadas.

#### ***Cinética del zinc***

La absorción del zinc procedente de la dieta oscila normalmente entre un 20-30% (Goyer, 1996). El aumento en la absorción se ha asociado a bajo peso corporal, déficit de zinc y presencia de determinadas prostaglandinas, mientras que una menor absorción está asociada a un exceso de calcio en la dieta o déficit de piridoxina o triptófano (Goyer, 1996). El zinc absorbido pasa rápidamente a plasma y se une a albúmina,  $\beta_2$ -macroglobulina y aminoácidos (Sternlieb, 1988) para ser transportado a hígado, páncreas, riñón, bazo y músculo donde rápidamente se induce la síntesis de metalotioneínas (Cao *et al.*, 2002) que secuestran el exceso de zinc, reduciendo así los efectos dañinos sobre el organismo. El zinc es un potente inductor de estas proteínas y la redistribución del zinc de las enzimas a las metalotioneínas constituyen un mecanismo protector que mantiene bajos niveles intracelulares de este metal. En exposiciones agudas, el hígado es el órgano que presenta mayores niveles de zinc, mientras que en exposiciones crónicas la mayor cantidad de zinc se encuentra en hueso.

En condiciones normales, los complejos de zinc que no pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal serán eliminados con las heces (NAS, 1979), siendo la excreción renal mínima (Casey y Hambidge, 1980).



#### **II.2.2.4. Cobre**

##### ***Características, usos y fuentes de exposición a cobre***

El cobre es uno de los metales traza más abundantes (Duffus, 1983). Es un micronutriente esencial para la mayoría de organismos y su carencia se caracteriza por anemia microcítica hipocrómica por alteración en la síntesis de hemoglobina.

La mayoría del cobre se utiliza en la fabricación de material eléctrico, tuberías y maquinaria. Las emisiones de cobre a la atmósfera proceden principalmente de actividades antropogénicas como la fundición, minería, industria del chapado, acererías y refinerías, eliminación de residuos domésticos y aplicación de fertilizantes, lodos de depuradoras, funguicidas y molusquicidas o por consumo de combustibles fósiles. En menor medida las emisiones de cobre son de origen natural, procedente de erupciones volcánicas, aerosoles marinos, polvo en dispersión o descomposición de vegetales.

##### ***Cinética del cobre***

La inhalación o la absorción cutánea son las vías más probables de incorporación de altos niveles de cobre en el organismo, ya que permiten el paso sin barreras al torrente sanguíneo (ATSDR, 1990), mientras que la absorción gastrointestinal está regulada normalmente por las reservas corporales (Sarkar *et al.*, 1983). El exceso de cobre absorbido se une a las metalotioneínas de las células mucosas del tracto gastrointestinal y se elimina cuando estas células mueren y se desprenden. Muchos factores intervienen en la absorción del cobre incluyendo la competición por lugares de unión con metales como el zinc, la quelación por fitatos y la interacción con la vitamina C (USEPA, 1980). El cobre absorbido se transporta en suero unido a albúminas y ceruloplasminas y se almacena principalmente en hígado y médula ósea, posiblemente unido a metalotioneínas, aunque no es tan buen inductor de estas proteínas como el cadmio o el zinc (Goyer, 1996). También se almacena en encéfalo, corazón, riñón y músculo. En aves la principal vía de eliminación es la biliar (Beck, 1961).

#### **II.2.2.5. Factores que afectan a la toxicidad de los metales en aves**

Diversos factores, tanto intrínsecos como externos, pueden determinar la toxicidad de los metales en las aves (Finley y Dieter, 1978; Custer *et al.*, 1984;



Hoffman *et al.*, 1985b; García-Fernández *et al.*, 1995; Burger, 2008). Estos factores a menudo interfieren en la capacidad de asimilación de los metales, disminuyendo su acumulación en el organismo.

### **Especie**

Según estudios, el plomo es mucho más tóxico en pollos de especies altriciales como el Cernícalo americano, que en los de especies precociales como las codornices, los Ánades reales (*Anas platyrhynchos*) o los Faisanes (*Phasianus colchicus*) (Hoffman *et al.* 1985a). También se ha observado que los Busardos colirrojos y distintas especies de buitres son capaces de sobrevivir a concentraciones de plomo más elevadas que otras aves rapaces (Redig *et al.*, 1991; Carpenter *et al.*, 2003; García-Fernández *et al.*, 2005a).

En estudios de exposición *in vitro* a cadmio y plomo en eritrocitos de distintas especies de aves, se ha observado que en el Búho real la acumulación de estos metales era mayor que en el Ánade real o el Busardo ratonero (*Buteo buteo*), presentando este último la menor acumulación de cadmio, mientras que sensibilidad a los efectos del cadmio fue mayor para esta misma especie (Hernández-García, 2010).

### **Edad y sexo**

Se ha observado en distintas especies de aves que los niveles de plomo en hembras son mayores que en machos. Esto es probablemente debido a que, durante la formación de la cáscara de huevo, el incremento en la demanda de calcio induce una mayor absorción intestinal de plomo asociada a la movilización del calcio óseo y de la existencia de una absorción común para ambos elementos (Finley y Dieter, 1978; Pattee, 1984). Por el contrario, también en distintas especies de aves, son los machos los que acumulan mayores niveles de cadmio, cobre y zinc (Gochfeld y Burger, 1987; Debacker *et al.*, 2001; Barjaktarovic *et al.*, 2002).

La edad puede ser un factor importante en los niveles de metales acumulados en el organismo. Así, en estudios en gaviotas se ha descrito que los niveles de cadmio, plomo y cromo aumentan con la edad, mientras que los de mercurio y selenio disminuyen (Gochfeld *et al.*, 1996). Además, al parecer los individuos jóvenes son, en general, más sensibles a los efectos del plomo y cadmio que los adultos de la misma especie (Hoffman *et al.*, 1985b; Scheuhammer, 1987c).



## **Alimentación**

Distintos autores coinciden en que las concentraciones de plomo y cadmio en aves están determinadas por los distintos hábitos alimenticios (Pain y Amiard-Triquet, 1993; García-Fernández *et al.*, 1995), los cuales a menudo determinan algunas de las diferencias encontradas entre especies.

El hecho de que muchos de los metales pesados presenten, al menos parcialmente, la valencia  $2^+$  y que cationes divalentes compitan en su absorción por el común mecanismo de transporte, puede ocasionar interacciones, tanto protectoras como potenciadoras, de los efectos tóxicos de estos metales (Gochfeld, 1997). Así por ejemplo, muchos de los efectos histopatológicos observados en aves intoxicadas por cadmio son muy similares a los causados por un déficit de hierro (anemia, hiperplasia de médula ósea, hipertrofia cardíaca) o de zinc (hipoplasia testicular) ya que la exposición crónica a cadmio en la dieta provoca alteraciones en el metabolismo del hierro, zinc y calcio (Freeland y Cousins, 1973; Scheuhammer, 1987c). Igualmente se ha observado que determinadas deficiencias nutricionales como dietas bajas en calcio, favorecen la absorción y acumulación de plomo y cadmio en aves (Scheuhammer, 1996). Autores como Longcore *et al.* (1974), Koranda *et al.* (1979) y Stendell *et al.* (1979) opinan que dietas ricas en calcio, fósforo y proteína alivian los efectos del plomo, mientras que la escasez de alimentos los exacerba.

Cuando el plomo es ingerido con el alimento, determinados grupos químicos se unen al plomo dando lugar a una forma insoluble en el intestino (Morton *et al.*, 1985). Por otro lado, se ha observado en ánades que la ingestión crónica de cadmio asociada a una alimentación restringida produce alteraciones del metabolismo energético, además de una mayor acumulación de zinc en riñones (Di Giulio y Scalón, 1985). Dietas complementadas con zinc, al igual que hierro, vitamina C, calcio o selenio alivian los efectos nocivos del cadmio, mientras que la adición de plomo o mercurio los exacerban (Hammons *et al.*, 1978).

La inyección de zinc en saco vitelino de pollos a los 7 días de incubación protege de las deformidades y mortalidad causada por el plomo (Anwer *et al.*, 1988). El zinc es además un antagonista del cobre que potencia los efectos de las carencias de este metal en ratas y pollos cuando el ratio zinc cobre es extremadamente alto mientras que la complementación con cobre en la dieta en cantidades fisiológicas contrarresta los efectos de intoxicación por zinc (Tom *et al.*, 1977).



## **Hábitat**

Las aves que habitan zonas de caza tienen mayor probabilidad de intoxicarse por la ingesta de perdigones. En el caso de las rapaces, estos perdigones o los fragmentos de bala de plomo pueden ser ingeridos junto con la presa si están incrustados en el músculo o hueso (García-Fernández *et al.*, 2005a).

La proximidad a fundiciones o refinerías, plantas de reciclaje de baterías, industrias, plantas incineradoras o zonas mineras aumenta también la susceptibilidad de intoxicación por metales pesados (Eisler, 1988; Blanco *et al.*, 2003). Además se ha observado que las concentraciones de cadmio son superiores en aves silvestres que frecuentan o habitan zonas urbanas o industrializadas (Hutton y Goodman, 1980; García-Fernández *et al.*, 1995).

El hecho de que el cadmio, junto al mercurio, sea uno de los principales contaminantes de ecosistemas acuáticos (Díaz Mayans *et al.*, 1993; García-Fernández, 1994), explica que este metal se acumule en peces e invertebrados acuáticos, por lo que las aves que dependen de estos ecosistemas se verán expuestas de forma crónica al cadmio el cual se acumulará en sus tejidos internos (Scheuhammer, 1987c).

## **Condiciones climáticas**

Aves expuestas a plomo a bajas temperaturas mostraron mayor sensibilidad y mortalidad que las expuestas en ambientes templados (Kendall y Scanlon, 1984; Buerger *et al.*, 1986). El mecanismo de esta interacción es desconocido pero se sugiere que puede ser un efecto combinado por la simultaneidad de los factores estresantes (Selye, 1973), el efecto tóxico directo del plomo sobre el metabolismo general que compromete la capacidad del ave para resistir al frío, o ambos (Kendall *et al.*, 1996).

## **Otros factores**

La condición corporal es un factor que se debe tener en cuenta ya que se ha observado que puede aumentar o contrarrestar la toxicidad de los metales no esenciales (Furness, 1996; Gochfeld, 1997), además de influir en sus niveles (Richards *et al.*, 1987)





La forma físico-química del cadmio determina su biodisponibilidad (Prokop *et al.*, 2003) y su toxicidad (Nordberg *et al.*, 1975; Cherian y Goyer, 1978). De hecho el cadmio ingerido como cadmio-tioneína ejerce un mayor efecto tóxico que la dosis equivalente de cadmio inorgánico. Este hecho adquiere mayor importancia en aves rapaces ya que que el cadmio que consumen se encuentra en su mayor parte en forma de cadmio-tioneína en el interior de las vísceras (sobre todo riñón e hígado) de sus presas; y, por tanto, biológicamente incorporado. En cambio Custer *et al.* (1984) opinan que los compuestos orgánicos de plomo, como el acetato, son más tóxicos que el plomo biológicamente incorporado; y éste más que el plomo presente en el polvo atmosférico. Estos autores consideran que, aunque el plomo biológicamente incorporado no es capaz de provocar cuadros de intoxicación, sí contribuye a la elevación de los niveles de plomo corporal.

El tiempo de exposición es especialmente importante en el caso del plomo, ya que aves expuestas a dosis relativamente bajas durante un tiempo prolongado pueden sufrir efectos tóxicos similares a los observados en aves que presentan intoxicación aguda (Franson y Pain, 2011).

#### **II.2.2.6. Efectos tóxicos de los metales en las aves**

##### ***Alteraciones bioquímicas***

Tanto el cadmio como el plomo interfieren en la actividad de varias enzimas, a menudo por competencia con otros elementos esenciales como el zinc o el calcio (Eisler, 1985; Godwin, 2001).

En concreto el plomo es un potente inhibidor de enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo del eritrocito ( $\delta$ -ALAD, ferroquelatasa, coproporfirinógeno oxidasa, hemo sintetasa). Entre todas ellas destaca la  $\delta$ -ALAD porque su inhibición por plomo es mayor que en el resto de enzimas y es, además, el primer cambio bioquímico cuantificable tras la exposición a plomo (Tola *et al.*, 1973). Una inhibición del 45-59% de la actividad de esta enzima es suficiente para provocar anemia en pollos de Cernícalos americanos expuestos a plomo (Hoffman *et al.* 1985b; Henny *et al.*, 1994).

Otras alteraciones de parámetros bioquímicos por exposición a plomo y cadmio son la disminución de la actividad fosfatasa alcalina (Rozman *et al.*, 1974; Kertész y Hlubik, 2002; Mateo *et al.*, 2003a) y el aumento de la actividad alanina aminotrasferasa



(Rozman *et al.*, 1974; Hoffman *et al.*, 1981; Cain *et al.*, 1983). Por otro lado la exposición a plomo se ha relacionado con un aumento de la glucosa, la creatinina, el colesterol y la creatin quinasa en suero (Hoffman *et al.*, 1981; Mateo *et al.*, 2003a).

Algunos metales como el cadmio, cobre, plomo y zinc son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) en aves mediante distintos mecanismos. Cuando la producción de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante del organismo, se produce estrés oxidativo que es la causa primaria de peroxidación lipídica (Stohs *et al.*, 2000), alteraciones de la fluidez de membrana (Bagchi *et al.*, 2000), daño en la cadena de ADN (Bagchi *et al.*, 1996), alteraciones en las enzimas antioxidantes (Mateo *et al.*, 2003b) y finalmente carcinogénesis (Bagchi *et al.*, 1996). Uno de estos mecanismos es el derivado de la inhibición de la actividad  $\delta$ -ALAD por parte del plomo, el cual provoca una acumulación del sustrato, el ácido aminolevulínico (ALA) y estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (Bechara, 1996) produciéndose peroxidación de las membranas de los eritrocitos con la consecuente hemólisis (Lawton y Donaldson, 1996). También la interacción del plomo con la hemoglobina es responsable de la formación de ROS (Ribarov y Bochev, 1982). En el caso del cadmio, la interacción con los sistemas antioxidantes, también observada en el plomo (Patrick, 2006), parece ser el mecanismo responsable de generar radicales libres (Bertin y Averbeck, 2006). En eritrocitos de Búho real y Busardo ratonero expuestos *in vitro* a cadmio y plomo, la actividad peroxidasa, glutathion transferasa (GST) y catalasa aumentaron como consecuencia del estrés oxidativo (Hernández-García, 2010).

### **Inducción de metalotioneínas**

Las metalotioneínas son unas proteínas ricas en cisteína (Cherian y Goyer, 1978) con un peso molecular de 10000-12000 Da en aves. La síntesis de esta proteína es inducida cuando los niveles de metales en el organismo alcanzan cierto nivel. Por eso se han propuesto como biomarcadores de exposición a metales, aunque estudios recientes indican que también son inducibles por elementos no tóxicos como los glucocorticoides (Gil y Pla, 2001). La función biológica de estas proteínas no está definida, pero al parecer participan en el normal almacenamiento de zinc y cobre y en la detoxificación y almacenamiento de de metales no esenciales como el cadmio o el mercurio (Scheuhammer, 1987c).



### **Alteraciones celulares y tisulares**

La exposición a cadmio puede inducir una nefropatía caracterizada por necrosis de los túbulos proximales, proteinuria, glucosuria, aumento de los niveles de cadmio en orina y disminución en riñones, con la presencia de metalotioneínas en plasma (Goyer *et al.*, 1984). Hay evidencias de que el mecanismo es similar en aves, aunque si la exposición se produce a bajas dosis, es improbable que estas lesiones tengan lugar en individuos de vida libre (Scheuhammer, 1987c). Parece ser que la disfunción renal asociada a una alteración del metabolismo de la vitamina D es la responsable de la osteomalacia, osteoporosis y fracturas espontáneas que se producen por altos niveles de cadmio (Bernard y Lauwerys, 1984).

También el plomo afecta al riñón, principalmente en forma de nefrosis y aparición de cuerpos de inclusión intranucleares en aves intoxicadas por plomo (Locke *et al.*, 1966; Pattee *et al.*, 1981; Beyer *et al.*, 1988). Este metal produce también necrosis miocárdica y necrosis fibrinoide arterial (Pattee *et al.*, 1981).

La intoxicación aguda por cobre en aves se manifiesta principalmente por la erosión de la molleja y el proventrículo (Henderson y Winterfield, 1975; Poupoulis y Jensen, 1976; Jensen y Maurice, 1978).

En el caso de la intoxicación por zinc, la pancreatitis es la lesión característica, siendo evidenciada tanto en aves silvestres como de cautividad (Droual *et al.*, 1991; Zdziarski *et al.*, 1994; Beyer *et al.*, 2004; Sileo *et al.*, 2004)

A nivel celular, en estudios experimentales que utilizaron eritrocitos de Ánade real se observó que tanto el plomo como el cadmio son capaces de inducir la muerte programada de este tipo de células (Romero *et al.*, 2009).

### **Alteraciones del desarrollo neurocomportamental y locomotor**

El sistema nervioso es uno de los principales sistemas afectados por el plomo (Redig y Arent, 2008). Esta afectación se caracteriza por debilidad muscular, parálisis del buche, esófago, proventrículo y molleja, letargia, parálisis de extremidades y cuello convulsiones y ceguera (Lumeij, 1985; Mateo *et al.*, 2003b). Se trata de síntomas relacionados con desmielinización de sistema nervioso central y periférico (Hunter y Haigh, 1978; Hunter y Wobeser, 1980; Platt *et al.*, 1999).



Las alteraciones del comportamiento observadas en gaviotas expuestas a bajas concentraciones de plomo se manifiestan por anomalías en la locomoción, equilibrio, termorregulación, aprendizaje y reconocimiento de individuos (Burger y Gochfeld, 1997, 2005). En el caso del cadmio, la exposición en patos de corta de edad es capaz de provocar anomalías en el comportamiento de huida (Heinz *et al.*, 1983).

Por otro lado, altas concentraciones de plomo y cadmio en la dieta provocaron pérdida de masa corporal y disminución del consumo de alimento (Di Giulio y Scanlon, 1984; Beyer *et al.*, 1988).

Estas alteraciones del comportamiento pueden conllevar una mayor probabilidad de depredación, muerte por inanición o el padecimiento de enfermedades infecciosas que favorezcan la muerte por otras causas (Heinz *et al.*, 1983; Scheuhammer y Norris, 1996; Burger y Gochfeld, 1997).

### ***Alteraciones reproductivas y del desarrollo***

La atrofia testicular en aves se ha observado por exposición a la misma concentración de cadmio que produce daño renal. Sin embargo, mientras que estas lesiones renales parecen tener poca influencia en la supervivencia del individuo, la alteración de la función testicular puede tener un drástico impacto por la reducción de la fertilidad (Furness, 1996).

También la exposición a plomo produce alteraciones testiculares. En tórtolas se ha observado degeneración testicular en adultos expuestos experimentalmente (Kendall y Scanlon, 1981; Veit *et al.*, 1982).

Los efectos de cadmio y plomo sobre el tamaño de puesta y grosor de cáscara son contradictorios. Mientras que algunos estudios experimentales describen disminución de la puesta y del grosor de cáscara en ánades, gallinas y codornices (White y Finley, 1978; Edens y Garlich, 1983), estos no se han observado en rapaces en cautividad (Pattee, 1984) ni en aves de vida libre (Scheuhammer, 1987c; Furness, 1996; Dauwe *et al.*, 2004)

Se ha demostrado que las sales de cadmio depositadas en el blastodermo de embriones de pollos causan alteraciones teratogénicas (Schowing, 1984). Sin embargo, dado que las aves no parecen transferir cadmio al huevo, o lo hacen en pequeñísimas concentraciones, esta observación no parece tener relevancia para los



estudios en aves silvestres (Furness, 1996). Aunque un exceso de zinc causa teratogénesis en embriones de ranas y peces, no existe evidencia definitiva de este efecto en vertebrados superiores. De hecho, en mamíferos un exceso de zinc puede llegar a proteger contra determinados teratógenos (Eisler, 1993).

Tanto el plomo como el cadmio parecen influir en el crecimiento de aves expuestas. En estudios experimentales se ha observado una alteración de la actividad de enzimas del metabolismo cerebral relacionada con un retraso en el crecimiento en los animales expuestos a plomo (Hoffman *et al.*, 1985b). En garzas expuestas a cadmio el crecimiento de huesos fue menor que en las no expuestas (Spahn y Sherry, 1999).

### **Alteraciones del sistema inmune**

Se ha observado que determinados metales, entre los que se incluyen plomo y cadmio, pueden causar efectos adversos sobre el sistema inmune de las aves a dosis en las que no se observan otros efectos tóxicos (Exon, 1984; Trust *et al.*, 1990; Rocke y Samuel, 1991; Fair y Myers, 2002) incluidas las rapaces (Redig *et al.*, 1991). Estas alteraciones afectan tanto a la inmunidad humoral como la celular (Koller, 1980; Rocke y Samuel, 1991; Snoeijs *et al.*, 2004).

En general, los metales pesados se consideran inmunosupresores, lo cual provoca un aumento de la susceptibilidad a agentes infecciosos. Aunque se sugiere que esta alteración puede estar relacionada con efectos citotóxicos directos sobre las células del sistema inmune, carcinogénesis, deficiencias nutricionales o respuesta al estrés, es necesario seguir investigando acerca de los mecanismos implicados (Exon, 1984; Grasman y Scanlon, 1995). Al parecer diversos factores como la ruta de exposición, dosis, duración de la exposición, edad y características genéticas son de vital importancia en la inmunomodulación causada por metales (Exon, 1984; Descotes, 1988).

### **Alteraciones carcinogénicas y mutagénicas**

Tanto el plomo como el cadmio han mostrado suficiente capacidad de inducir carcinogénesis en animales de laboratorio (Goyer, 1996). Aunque este hecho no está totalmente demostrado en aves, sí que se ha observado genotoxicidad en pollos de Milano negro (*Milvus migrans*) expuestos a bajos niveles de cadmio (hasta 18 µg/dL), si bien este efecto se vio potenciado en individuos de pobre condición corporal (Baos



et al., 2006). Estos mismos autores encontraron diferencias interespecíficas, siendo el Milano real (*Milvus milvus*) más sensible que la Cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*).

Se ha demostrado que la inoculación directa de zinc en testículos de aves y roedores induce la aparición de tumores testiculares (NAS, 1979; Goyer, 1996), aunque este metal no es carcinogénico por cualquier otra vía (Eisler, 1993).

#### **II.2.2.7. Interpretación de las concentraciones de metales en aves**

##### **Plomo**

Uno de los problemas para establecer niveles que diferencien intoxicaciones agudas, crónicas y subletales, a partir de las concentraciones presentes en sangre total y tejidos, es conocer las concentraciones de base consideradas como de “no exposición” (García-Fernández, 1994). Según Franson y Pain (2011), debido a la ubicuidad del plomo procedente de fuentes antropogénicas, los niveles considerados “naturales” no existen actualmente en el medio. Así, se han descrito como niveles de fondo aquellas concentraciones encontradas en zonas alejadas de fuentes de contaminación (Franson y Pain, 2011). En la tabla II.9 se recopilan algunos datos sobre niveles encontrados en distintos tejidos de aves en grupos control de estudios experimentales y niveles mínimos en estudios sobre animales de vida libre (modificado de García-Fernández, 1994).



Tabla II.9. Concentraciones sobre peso húmedo transformadas a partir de las concentraciones dadas por los autores sobre peso seco (la concentración sobre peso húmedo es aproximadamente 3-4 veces menor que sobre peso seco (Pain y Amiard-Triquet, 1993). Concentraciones en hueso sobre peso seco.

Tejido	Concentración	Especie	Referencia
<b>Hígado</b>	10 ppb	Cernícalo americano ( <i>Falco sparverius</i> )	Pattee, 1984*
	<300 ppb	Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	Franson <i>et al.</i> , 1983*
	70 ppb	Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	Stendell, 1980*
	<100 ppb	Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	Custer <i>et al.</i> , 1984*
	<300 ppb	Distintas especies de rapaces	Pain y Amiard-Triquet, 1993
<b>Riñón</b>	<350 ppm	Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	Custer <i>et al.</i> , 1984*
<b>Sangre</b>	33 µg/dL	Cernícalo americano ( <i>F. sparverius</i> )	Custer <i>et al.</i> , 1984*
	2-4 µg/dL	Aguila pescadora ( <i>Pandion haliaetus</i> )	Henny <i>et al.</i> , 1991
	<10 µg/dL	Diversas aves	Pattee y Hennes, 1983 Hoffman <i>et al.</i> , 1981
	7,6 µg/dL	Búho real ( <i>Bubo bubo</i> )	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
	10 µg/dL	Cernícalo común ( <i>F. tinnunculus</i> )	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
	10,8 µg/dL	Busardo ratonero ( <i>Buteo buteo</i> )	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
	9,4 µg/dL	Mochuelo común ( <i>Athene noctua</i> )	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
	4,8 µg/dL	Diversas aves	Scheuhammer, 1989
	3,21 µg/dL	Aguililla calzada ( <i>Hieraetus pennatus</i> )	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004
	2,64 µg/dL	Busardo ratonero ( <i>Buteo buteo</i> )	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004
	7,60 µg/dL	Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004

\* Estudios experimentales en los que usan grupos control.

El diagnóstico de la intoxicación por plomo se puede determinar mediante la identificación de las lesiones características asociadas a altos niveles, sin requerir el establecimiento de un umbral de toxicidad para cada especie (Franson y Pain, 2011). La dificultad aparece cuando se pretende conocer la repercusión de la exposición a concentraciones subletales, donde las lesiones o signos clínicos no son tan evidentes. Por ello, el estudio de los niveles de plomo en el mayor número de especies, en distintos estados fisiológicos, resulta fundamental. En base a estos estudios, en



función del grado de severidad, se puede clasificar la exposición en tres niveles (Franson y Pain, 2011):

- Intoxicación subclínica: Corresponde al rango de valores en los cuales se producen efectos fisiológicos que son insuficientes para alterar de forma severa las funciones biológicas normales ni causar signos externos de intoxicación. Ante estas concentraciones, si las aves dejan de estar expuestas a plomo, probablemente se recuperarán. Niveles de plomo inferiores a este rango se pueden considerar como niveles de fondo.
- Intoxicación clínica: Umbral aproximado en el que comienzan a aparecer signos clínicos como la anemia, lesiones tisulares, pérdida de peso, incoordinación muscular, diarrea verde y anorexia. Si la exposición a plomo persiste, se puede producir la muerte del animal.
- Intoxicación clínica grave: Umbral aproximado en el que los efectos asociados pueden estar amenazando directamente la vida de animales de vida libre y/o de experimentación.

Según Franson y Pain (2011), en base a los estudios encontrados, los niveles en Falconiformes correspondientes a cada nivel son los recogidos en la tabla II.10.

Tabla II.10. Interpretación de los residuos de plomo ( $\mu\text{g/dL}$  peso húmedo) en falconiformes (tomado de Franson y Pain, 2011).

	Sangre	Hígado	Riñón	Referencias
Subclínica	20, <50	200, <600	200, <400	Custer <i>et al.</i> , 1984; Henny <i>et al.</i> , 1991; Kramer y Redig, 1997
Clínica	50-100	600-1000	400-600	Lumeij <i>et al.</i> , 1985; Kramer y Redig, 1997
Clínica grave	>100	>1000	>600	Redig <i>et al.</i> , 1980; Hoffman <i>et al.</i> , 1981; Pattee <i>et al.</i> , 1981, 2006; Langelier <i>et al.</i> , 1991; Kramer y Redig, 1997

Mientras que los individuos que presentan concentraciones dentro del rango de exposición subclínica pueden recuperarse de las alteraciones en el caso de que la exposición a plomo no continúe, aquellos expuestos a mayores concentraciones pueden padecer efectos severos, con signos clínicos y posiblemente la muerte si la





exposición se prolonga. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los umbrales descritos son orientativos ya que diversos factores pueden interaccionar y causar variaciones en estos niveles (Franson y Pain, 2011).

Por otro lado, dada la capacidad de bioacumulación del plomo en el organismo, la exposición continuada a este metal puede suponer que individuos expuestos a concentraciones relativamente bajas durante un largo periodo de tiempo puedan sufrir efectos similares a aquellos expuestos a altos niveles de manera aguda, aún presentando bajas concentraciones de plomo en sus tejidos (Franson y Pain, 2011). Por tanto, el significado biológico de las concentraciones tisulares de plomo es más difícil de determinar si el historial de exposición del ave es desconocido; de ahí que se destaque la importancia de la monitorización, entendiéndose como el estudio continuado de la exposición en el tiempo (Martínez-López, 2005).

Si bien la medición directa de los niveles de plomo en sangre se considera un método apropiado para la evaluación del riesgo en fauna silvestre (García-Fernández, 1994), algunos autores opinan que la medición de ciertos parámetros sanguíneos como la actividad de la  $\delta$ -ALAD de eritrocitos o la protoporfirina en sangre son indicadores de efecto óptimos para evaluar la exposición reciente a plomo en aves (Pain y Rattner, 1988; Scheuhammer, 1989; Martínez-López *et al.*, 2004). En el caso de la  $\delta$ -ALAD, estudios recientes, incluido uno que forma parte de la presente memoria, han demostrado que se trata de un biomarcador útil de exposición y efecto a bajas concentraciones de plomo en sangre de pollos de rapaces (Martínez-López *et al.*, 2004; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011).

En la tabla II.11 se describen los niveles de plomo encontrados en sangre de rapaces nacidos en zonas contaminadas y no contaminadas, con los niveles de actividad  $\delta$ -ALAD asociada.

Tabla II.11. Niveles de plomo en sangre y actividad  $\delta$ -ALAD en sangre de rapaces de zonas contaminadas y no contaminadas

Especie		Niveles de plomo en sangre ( $\mu\text{g/dL}$ )		Actividad $\delta$ -ALAD		Referencia
		Área contaminada	Área no contaminada	Área contaminada	Área no contaminada	
Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> )	Media; rango	3,8; < 5 -14 (n=10)	-	219,7; 93-346* (n=10)	-	Henny <i>et al.</i> , 1994
Aguilucho pálido ( <i>Circus cyaneus</i> )	Media; rango	6,7; <3,8-67,5 (n=41)	4,2; <1,4-14,1 (n=8)	399; 174-600* (n=41)	612,6; 529-671* (n=8)	Henny <i>et al.</i> , 1994
Cernícalo americano ( <i>Falco sparverius</i> )	Media; rango	24; <5-227 (n=30)	8,7; <3,4-35 (n=22)	256,6; 51-393* (n=30)	566,1; 383-724* (n=22)	Henny <i>et al.</i> , 1994
Busardo colirrojo ( <i>Buteo jamaicensis</i> )	Media; rango	ND (n=2)	ND (n=2)	188,6; 165-313* (n=2)	323,5; 294-353* (n=2)	Henny <i>et al.</i> , 1994
Autillo californiano ( <i>Megascops kennicottii</i> )	Media; rango	10; <5-71 (n=3)	-	473,3; 469-478* (n=3)	-	Henny <i>et al.</i> , 1994
Búho real ( <i>B. bubo</i> )	Media $\pm$ DE; rango	-	7,6 $\pm$ 2; 6-20 (n=7)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
Cernícalo común ( <i>F. tinnunculus</i> )	Media $\pm$ DE rango	-	10 $\pm$ 1,3; 5-26 (n=12)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997



Aguililla calzada ( <i>Hieraaetus pennatus</i> )	Media; rango	-	18; 15-21 (n=2)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Águila perdicera ( <i>H. fasciatus</i> )	Media rango	-	8,75; 4-13,5 (n=2)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Busardo ratonero ( <i>Buteo buteo</i> )	Media±DE rango	-	10,8±1,5; 3-17 (n=5)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
Mochuelo común ( <i>Athene noctua</i> )	Media±DE rango	-	9,4±2; 6-15 (n=5)	-	NA	García-Fernández <i>et al.</i> , 1997
Milano negro ( <i>Milvus migrans</i> )	Media rango	5,4; ND-17,9 (n=25)	-	NA	-	Benito <i>et al.</i> , 1999
Milano negro ( <i>M. migrans</i> )	Media±DE; rango	8,41±5,245; 0,72-22,1 (n=69)	-	NA	-	Blanco <i>et al.</i> , 2003
Aguililla calzada ( <i>H. pennatus</i> )	Media±DE; rango	-	3,21±1,98; 1,10-10,57 (n=27)	-	679,1±67; 537,5-849,1** (n=18)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> )	Media±DE; rango	-	2,74±1,04; 1,34-3,54 (n=4)	-	744,2±87,9; 650-852** (n=4)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004
Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Media±DE; rango	-	7,60±3,64; 3,93-11,21 (n=3)	-	584±51,7; 539-640,5** (n=3)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2004



Gavilán de Cooper ( <i>Accipiter cooperii</i> )	Media±DE; rango	-	0,28±0,04; ND-0,71 (n=15)	-	74,9±2,2; 67,2-84,2 *** (n=9)	McBride <i>et al.</i> , 2004
Milano negro ( <i>M. migrans</i> )	Media±DE; rango	4,67±3,76; ND-26,52 (n=89)	-	NA	NA	Baos <i>et al.</i> , 2006
Águila pescadora ( <i>Pandion haliaetus</i> )	Media; rango	ND; ND-0,8 (n=10)	ND; ND-0,38 (n=12)	NA	NA	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2000
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media rango	1,16; ND-2,04 (n=14)	ND; ND-1,94 (n=12)	NA	NA	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2001
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	rango	ND-1,06 (n=9)	ND-1,06 (n=9)	NA	NA	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2002
Azor ( <i>A. gentilis</i> )	Media	-	ND (n=8)	-	NA	Stout <i>et al.</i> , 2010

\* Unidad de actividad definida como el incremento de 0,100 en la absorbancia a 555 nm con 1,0-cm luz/ml eritrocitos/h a 38°C; \*\*  $\mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ ; \*\*\*  $\text{nmol ALA/min/ml RBC}$ ; ND=No detectado; NA= No analizado



## **Cadmio**

Al igual que en el caso del plomo, el tipo habitual exposición a cadmio es la crónica a bajas dosis (García-Fernández, 1994) mientras que las intoxicaciones agudas ocurren en muy contadas ocasiones (Bernard y Lauwerys, 1984; Blood *et al.*, 1988).

El cadmio se acumula principalmente en riñón y la determinación de los niveles presentes en este órgano se considera el mejor indicador de exposiciones crónicas (Hutton y Goodman, 1980), mientras que la sangre se puede considerar un apropiado indicador de exposición reciente a este metal (García-Fernández *et al.*, 1997). Aunque se considera que concentraciones de cadmio en sangre inferiores a 0,5 µg/dL corresponden a valores de exposición de base en humanos, aún no se ha establecido un umbral de toxicidad para cadmio en sangre ni un rango de concentraciones correspondientes a contaminación de base en aves (Martínez-López *et al.*, 2005). Sin embargo en faisanes a partir de 1,7 µg/dL se observaron efectos adversos (Świergosz y Kowalska, 2000). En el caso de los riñones, se ha propuesto como umbral de toxicidad de cadmio 40 µg/g, aunque para algunas aves puede ser de tan sólo 10 µg/g (Eisler, 1985; Furness, 1996). Ante una exposición a bajas concentraciones de cadmio, los niveles de este metal en riñón son mayores que en hígado, siendo el ratio hígado: riñón menor que 1 (Scheuhammer, 1987c).

Otra forma de evaluar el riesgo por exposición a cadmio se basa en la capacidad de unión del cadmio al grupo tiol de las metalotioneínas (7 mol Cd/mol MT, Kito *et al.*, 1982). Cuando la ecuación “potencial tóxico-Cd=[Cd]tejido/([MT]tejido\*7)” es menor que 1, en teoría, todo el cadmio presente en el organismo puede ser retenido por estas proteínas (Hollis *et al.*, 2001; Knapen *et al.*, 2004). Según estudios experimentales en palomas, una dieta con más de 2 mg/kg de cadmio es capaz de aumentar la síntesis inducida de metalotioneínas, con una posible alteración del metabolismo del calcio, zinc y hierro en los animales afectados (Scheuhammer y Templenton, 1990).

Aunque los estudios basados en tejidos de necropsia nos pueden proporcionar información de utilidad, motivos éticos, legales y científicos indican la necesidad de buscar otro tipo de muestras no cruentas y más fáciles de obtener como es el caso de la sangre (Martínez-López *et al.*, 2005). La recopilación de datos obtenidos en estudios de campo es de gran utilidad para la interpretación de resultados. En la tabla II.12 se



recogen los valores de cadmio en sangre encontrados en distintas especies de aves habitantes de zonas contaminadas y no contaminadas.

Tabla II.12. Concentraciones de cadmio en sangre en aves rapaces de zonas contaminadas y no contaminadas.

Especie		Zona contaminada	Zona no contaminada	Referencia
Aguilucho pálido ( <i>Circus cyaneus</i> )	Rango	0,5-3,6 (n=16)	-	Henny <i>et al.</i> , 1994
Cernícalo americano ( <i>Falco sparverius</i> )	Rango	0,6-0,8 (n=11)	0,8-1,5 (n=6); 50%	Henny <i>et al.</i> , 1994
Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> )	Media Rango	0,35 <0,5-0,6 (n=8)	-	Henny <i>et al.</i> , 1994
Busardo colirrojo ( <i>Buteo jamaicensis</i> )	Media Rango	ND (n=2)	0,9 ND-2,6 (n=2)	Henny <i>et al.</i> , 1994
Autillo californiano ( <i>Megascops kennicottii</i> )	Media Rango	1,7 0,6-3,2 (n=3)	-	Henny <i>et al.</i> , 1994
Búho real ( <i>Bubo bubo</i> )	Media±DE Rango	-	0,1±0,001 0,04-0,28 (n=5)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Cernícalo común ( <i>F. tinnunculus</i> )	Media±DE Rango	-	0,14±0,06 0,07-0,25 (n=8)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Busardo ratonero ( <i>Buteo buteo</i> )	Media± DE Rango	-	0,09 0,06-0,12 (n=4)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Mochuelo común ( <i>Athene noctua</i> )	Media±DE Rango	-	0,08 ND-0,12 (n=3)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Aguililla calzada ( <i>Hieraaetus pennatus</i> )	Media± DE Rango	-	0,11 0,1-0,12 (n=2)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995
Águila perdicera ( <i>H. fasciatus</i> )	Media±DE Rango	-	0,09 0,01-0,17 (n=2)	García-Fernández <i>et al.</i> , 1995



Milano negro ( <i>Milvus migrans</i> )	Media Rango	0,68 0,1-1,4 (n=25)	-	Benito <i>et al.</i> , 1999 1998
Milano negro ( <i>M. migrans</i> )	Media±DE Rango	0,183±0,291 0-1,8 (n=69)	-	Blanco <i>et al.</i> , 2003 2001
Cigüeña blanca ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Media Rango	0,15 ND-0,9 (n=30)	-	Benito <i>et al.</i> , 1999
Aguililla calzada ( <i>H. pennatus</i> )	Media±DE Rango	-	0,3±0,3 ND-1,29 (n=27)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2005
Busardo ratonero ( <i>B. buteo</i> )	Media±DE Rango	-	0,16±0,07 ND-0,27 (n=4)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2005
Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Media±DE Rango	-	0,58±0,79 ND-1,5 (n=3)	Martínez-López <i>et al.</i> , 2005
Milano negro ( <i>M. migrans</i> )	Media±DE Rango	0,052±0,042 ND-0,19 (n=89)	-	Baos <i>et al.</i> , 2006
Águila pescadora ( <i>Pandion haliaetus</i> )	Media	ND (n=10) ND (n=7)	- ND (n=12)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2000
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media	ND (n=14)	ND (n=12)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2001
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media	ND (n=9) ND (n=9)	ND (n=9)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2002
Azor ( <i>A. gentilis</i> )	Media	-	ND (n=8)	Stout <i>et al.</i> , 2010

## Zinc

La mayoría de los animales pueden tolerar un exceso moderado de zinc en la dieta y regular los niveles en su organismo de forma efectiva (Ewan, 1978; Sileo *et al.*, 2004). Por este motivo, altas concentraciones de zinc no son alarmantes desde el punto de vista toxicológico (Goede, 1985), aunque los mecanismos de homeostasis pueden llegar a fracasar cuando las concentraciones de zinc son extremadamente



altas (Sileo *et al.*, 2004). En aves intoxicadas los niveles séricos de zinc pueden oscilar entre 640 y 3200  $\mu\text{g/dL}$  (Zdziarski *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 2004; Sileo *et al.*, 2004), mientras que una media de 271-313  $\mu\text{g/dL}$  corresponde a aves sanas (García-Fernández *et al.*, 2005). Esta media es similar a la encontrada en cotorras no expuestas a zinc 125-229  $\mu\text{g/dL}$  (Ososfki *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Blanco *et al.* (2003), los Milanos negros nacidos en zonas contaminadas por metales pesados presentaron niveles de zinc solo ligeramente superiores a estos valores (Tabla II.13)

Tabla II.13. Concentraciones de zinc en sangre en aves rapaces de zonas contaminadas y no contaminadas

Especie		Zona contaminada	Zona no contaminada	Referencia
Milano negro ( <i>Milvus migrans</i> )1998	Media	330	-	Benito <i>et al.</i> , 1999
	Rango	230-450 (n=25)		
Milano negro ( <i>M. migrans</i> ) 2001	Media $\pm$ DE	537 $\pm$ 99	-	Blanco <i>et al.</i> , 2003
	Rango	356-863 (n=69)		
Milano negro ( <i>M. migrans</i> ) 1999	Media $\pm$ DE	482 $\pm$ 94	-	Baos <i>et al.</i> , 2006
	Rango	334-958 (n=89)		
Águila pescadora ( <i>Pandion haliaetus</i> )	Media	498; 428-580 (n=10)	448; 348-554	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2000
	Rango	462; 310-538 (n=7)	(n=12)	
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media	494; 404-580	544; 480-610	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2001
	Rango	(n=14)	(n=12)	
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media	524;	610; 478-1080	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2002
	Rango	470-604 (n=9)	(n=9)	
Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Media $\pm$ DE	-	180 $\pm$ 41,7	Stout <i>et al.</i> , 2010
	Rango	-	129-230 (n=7)	

## Cobre

A pesar de ser un oligoelemento esencial, la intoxicación por cobre en aves no es inexistente y se caracteriza por la aparición de úlceras orales, anemia y necrosis de proventrículo y ventrículo (Henderson y Winterfield, 1975; Gilbert *et al.*, 1996).





De forma similar al zinc, la bibliografía relacionada con los niveles fisiológicos de cobre en aves es escasa. Los valores encontrados en aves sanas ingresadas en centros de recuperación oscilan entre 13 y 120  $\mu\text{g/dL}$  (García-Fernández *et al.*, 2005b), mientras que en cotorras el rango se encuentra entre 7 y 19  $\mu\text{g/dL}$  (Osofsky *et al.*, 2001). Sin embargo, en Milanos negros nacidos en zonas contaminadas por metales pesados, los niveles de cobre en sangre se encuentran dentro de esos rangos (Tabla II.14)

Tabla II.14. Concentraciones de cobre en sangre en aves rapaces de zonas contaminadas y no contaminadas

Especie		Zona contaminada	Zona no contaminada	Referencia
Milano negro ( <i>Milvus migrans</i> ) 1998	Media Rango	21,1 12-30,3 (n=25)	-	Benito <i>et al.</i> , 1999
Milano negro ( <i>M. migrans</i> ) 2001	Media $\pm$ DE Rango	32 $\pm$ 7 19-55 (n=69)	-	Blanco <i>et al.</i> , 2003
Águila pescadora ( <i>Pandion haliaetus</i> )	Media Rango	27,6; 23,4-40,4 (n=10) 21,4; 13,62-25,8 (n=7)	26; 22-33,4 (n=12)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2000
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media Rango	30; 25,4-40 (n=14)	31,8; 27,2-35,2 (n=12)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2001
Águila pescadora ( <i>P. haliaetus</i> )	Media Rango	37,4; 34-42,4 (n=9) 35; 21,8-41 (n=9)	38,6; 33,8-42,4 (n=9)	Rattner <i>et al.</i> , 2008 2002
Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> ) 2007	Media $\pm$ DE Rango	-	39,9 $\pm$ 7,3 29,4-48,8 (n=7)	Stout <i>et al.</i> , 2010

### II.2.3. Rodenticidas anticoagulantes

La lucha contra las plagas de roedores ha supuesto durante muchos siglos un gran problema para la humanidad, debido principalmente a los perjuicios económicos y sanitarios que estos animales pueden causar. Dadas las características fisiológicas y etológicas de los roedores, la actuación contra estas plagas ha resultado



especialmente difícil, siendo imprescindible en la mayoría de los casos la utilización de compuestos químicos específicos. Existen multitud de tipos de rodenticidas en cuanto a su modo de acción, si bien los más utilizados son los anticoagulantes (Moreno-Marí *et al.*, 2004). De hecho, desde la introducción de la warfarina en la década de los 50, estos compuestos han sido los más frecuentemente utilizados en la lucha contra los roedores (Lawley *et al.*, 2006), y su uso doméstico y profesional está extendido actualmente. El hecho de que las dosis utilizadas normalmente no sean perjudiciales para los humanos y otros animales y que su toxicidad aguda sea mucho menor que la crónica, resulta en una mayor eficiencia, incluso en áreas extensas. Sin embargo la aplicación de estos compuestos en zonas rurales supone un riesgo para otras especies no diana como pequeños mamíferos, aves granívoras e invertebrados que se intoxican por ingestión directa del cebo (intoxicación primaria) o aves rapaces o carroñeras que pueden intoxicarse por el consumo de animales que han ingerido el cebo (intoxicación secundaria).

Numerosos casos de intoxicación secundaria por rodenticidas anticoagulantes han sido documentados en distintas especies de rapaces (Newton *et al.*, 1990, 1994, 1997; Berny *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2010). La mayoría de estas intoxicaciones están asociadas a rodenticidas de segunda generación (SGARs) (Berny *et al.*, 1997), los cuales tienen efecto al cabo de varios días tras la ingestión, periodo en el que los roedores pueden seguir consumiendo el cebo si está disponible. El hecho de que estos compuestos puedan persistir en el organismo durante meses (Eason *et al.*, 1996), y que los individuos puedan desarrollar resistencias, favorecerá que las concentraciones acumuladas sean aún mayores (Pelz, 2007). Además, debido al efecto de los rodenticidas, estos roedores pasan más tiempo en áreas abiertas, se tambalean y permanecen inmóviles antes de morir, por lo que son más susceptibles de ser depredados (Cox y Smith, 1992).

En base a su composición química, los rodenticidas anticoagulantes se pueden clasificar en dos grupos: los derivados de la 4-hidroxicumarina y los derivados de la indandiona (Tabla II.15).



Tabla II.15. Clasificación de los rodenticidas anticoagulantes en base a su composición química

<b>Derivados de hidroxicumarina</b>	Primera generación	<i>Cumaclor</i> <i>Cumafuril</i> <i>Warfarina</i>
	Segunda generación	<i>Brodifacoum</i> <i>Bromadiolona</i> <i>Difenacoum</i> <i>Difetalona</i> <i>Flocumafen</i>
<b>Derivados de indandiona</b>	<i>Clorofacinona</i> <i>Pindona</i> <i>Valona</i>	

A continuación se comentarán algunos aspectos de los rodenticidas anticoagulantes estudiados en la presente memoria.

### II.2.3.1. Warfarina y derivados hidroxicumarínicos

La **warfarina** o (RS)-4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil) cumarina (Figura II.17) fue el primer rodenticida anticoagulante introducido en el mercado. Su descubrimiento fue fruto de la investigación de las intoxicaciones observadas en ganado durante la década de los 20 en Wisconsin. Estas intoxicaciones, caracterizadas por una alta mortalidad y sangrado, se relacionaron con el consumo de pasto en mal estado. Posteriormente se descubrió que se debía a la transformación de la cumarina, presente en el trébol de olor blanco (*Melilotus alba*) del pasto, en dicumarol por fermentación fúngica (Last, 2002). Gracias al descubrimiento de las propiedades anticoagulantes del dicumarol y su aplicación en la prevención de formación de trombos en humanos, se sintetizó la warfarina, una sustancia estable, incolora, inodora y básicamente insípida y con mayor actividad anticoagulante, cuyo nombre se debe a que fue patentada por la "Wisconsin Alumni Research Foundation".



Debido al uso repetido y extendido de la warfarina en la lucha contra los roedores muchas especies desarrollaron resistencia a su acción anticoagulante (Boyle, 1960), lo que condujo a la comercialización de nuevos compuestos para erradicar las plagas, aunque este anticoagulante se sigue utilizando en la profilaxis de la trombosis y la embolia.

Los nuevos compuestos, conocidos como rodenticidas anticoagulantes de segunda generación (SGARs), son los más comercializados actualmente. Desgraciadamente la mayor eficacia contra los roedores coincide con una mayor toxicidad y mayor vida media en el organismo (Eason *et al.*, 1996), características que favorecen la capacidad de estos compuestos de causar intoxicaciones secundarias en los depredadores (Shore *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2008).

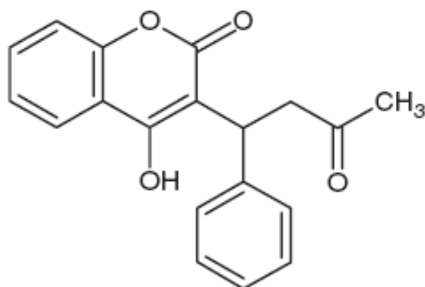


Figura II.17. Estructura química de la warfarina (fuente Wikimedia Commons)

**Brodifacoum** o 3-[3-(4'-bromodifenil-4-il)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil]-4-hidroxycumarina (Figura II.18) es uno de los más nuevos y potentes SGARs, efectivo por ingestión de una única baja dosis (Kaukinen, 1982). Es un polvo beige muy estable en el medio que resiste degradación por la luz hasta 30 días (Chalermchaikit *et al.*, 1993). Es además muy persistente en los tejidos de mamíferos y de aves (Eason *et al.*, 2002). En España están autorizados 10 preparados comerciales con 0,005% de brodifacoum (MARM, 2011).

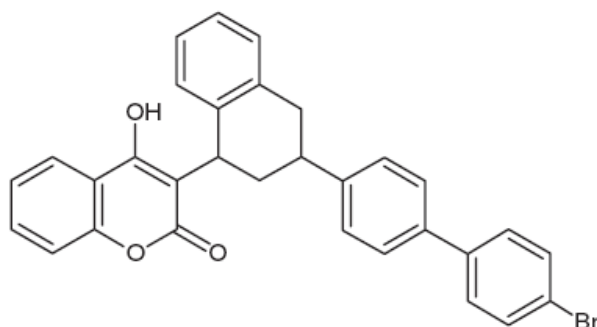


Figura II.18. Estructura química de brodifacoum (fuente Wikimedia Commons)

La **bromadiolona** o 3-[3-(4'-bromodifenil-4-il)-3-hidroxi-1-fenilpropil]-4-hidroxicumarina (Figura II.19) es un polvo amarillento, estable hasta los 2000°C (Chalermchaikit *et al.*, 1993). Se trata del compuesto más apetecible para los roedores aunque, a pesar de ser un SGAR, algunos roedores han desarrollado resistencias en Reino Unido y Dinamarca (Rowe *et al.*, 1981). En España hay registrados 11 productos comerciales con 0.005% de bromadiolona, 1 con 0,01% y 2 con 0,25% (MARM, 2011).

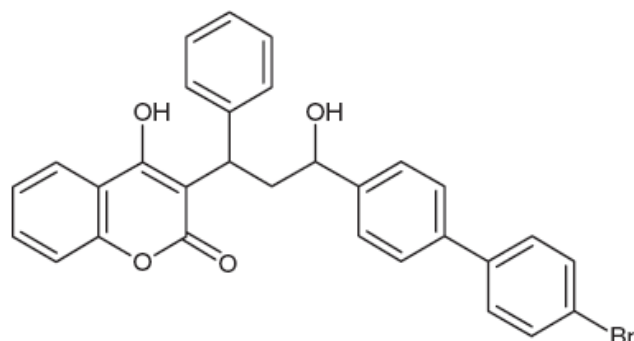


Figura II.19. Estructura química de bromadiolona (fuente Wikimedia Commons)

**Difenacoum** o 3-(3-difenil-4-il-1, 2 ,3 ,4-tetrahidro-1-naftil)-4-hidroxicumarina (Figura II.20) es un polvo de color blanco hueso, más tóxico que la warfarina pero menos apetecible. Ocho preparados comerciales con 0,005% de difenacoum están disponibles en España para la lucha contra los roedores (MARM, 2011).

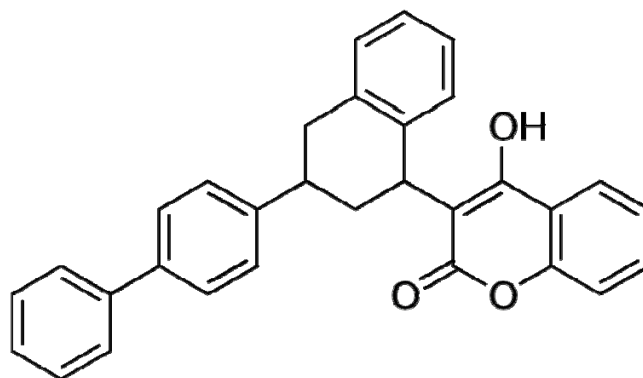


Figura II.20. Estructura química de difenacoum (fuente Wikimedia Commons)

### II.2.3.2. Derivados de la indandiona

La **clorofacinona** (2-( $\alpha$ -4-clorofenil-a-fenilacetil)-1,3-indandiona) (Figura II.21) no es efectiva contra las especies resistentes a la warfarina. Se trata de un compuesto muy soluble en solventes orgánicos pero moderadamente en agua (Murphy, 2007). En España existen tres productos registrados con 0,005% de clorofacinona y dos con 0,25% de (MARM, 2011).

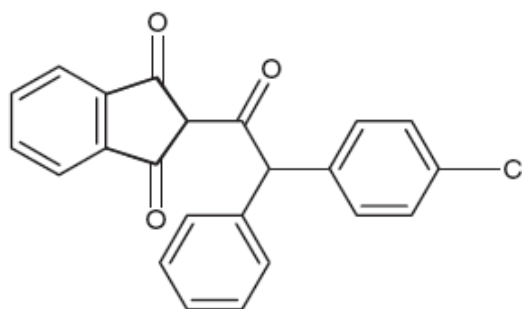


Figura II.21. Estructura química de clorofacinona (fuente Wikimedia Commons)

Fue precisamente la clorofacinona una de las sustancias empleada para el control de una plaga de Topillo campesino (*Microtus arvalis*) que tuvo lugar en Castilla-León entre 2006 y 2007 (Olea *et al.*, 2009). Debido a la presión ejercida por los agricultores, el gobierno regional decidió aplicar toneladas de cebos de este rodenticida en dos ocasiones consecutivas sin éxito de erradicación de la plaga, pero



causando la muerte por intoxicaciones secundarias a distintas especies de animales, incluidas aves rapaces (Olea *et al.*, 2009).

### II.2.3.3. Cinética de los rodenticidas anticoagulantes

La estructura química de los rodenticidas anticoagulantes determina su toxicocinética (Murphy, 2007). En general, la vida media de los rodenticidas de primera generación en el organismo es menor para que para los de segunda (Erickson y Urban, 2004).

Aunque la mayoría de las intoxicaciones por rodenticidas anticoagulantes tienen lugar tras la exposición oral (Murphy, 2007), estos compuestos se absorben también fácilmente a través de la piel y el sistema respiratorio (WHO, 1995).

Tras la absorción, los SGARs alcanzan rápidamente altas concentraciones en sangre, donde persisten pocos días para acumularse rápidamente en riñón, páncreas y sobre todo hígado, el principal órgano de acumulación. Desde el hígado, la eliminación de los residuos acumulados se produce de forma bifásica, con una primera fase rápida seguida de otra lenta, pudiendo alcanzar una vida media en hígado de hasta un año (Erickson y Urban, 2004). Por el contrario, la cinética de los rodenticidas anticoagulantes de primera generación es mucho más rápida, ya que la eliminación total del hígado puede producirse en tan solo cuatro días (Belville, 1981).

La mayoría de los rodenticidas anticoagulantes y, sobre todo los SGARs, se eliminan principalmente por heces sin metabolizar (Huckle *et al.*, 1989; Huckle y Warburton, 1989). Solamente la warfarina es metabolizada en gran proporción y se elimina principalmente por orina (Erickson y Urban, 2004).

La eliminación de los rodenticidas anticoagulantes mediante las egagrópilas constituye una vía complementaria de excreción en las especies que no son capaces de digerir huesos, plumas ni pelos. En Lechuzas se calcula que hasta un 25% del total ingerido se elimina por esta vía (Gray *et al.*, 1994; Newton *et al.*, 1994). Además, desde el punto de vista de biomonitorización, la recolección y análisis de egagrópilas de rapaces nocturnas se consideran buenos indicadores de la exposición a brodifacoum y otros rodenticidas anticoagulantes (Gray *et al.*, 1994; Eadsforth *et al.*, 1996).



#### II.2.3.4. Mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes

Todos los rodenticidas anticoagulantes, tanto los derivados hidroxycumarínicos como los de la indandiona, actúan mediante el mismo mecanismo de acción (Figura II.24). Este consiste en una coagulopatía debida a la inhibición de la enzima vitamina K<sub>1</sub> epóxido reductasa, con una depleción de la vitamina K<sub>1</sub> e interferencia en la activación de los factores de coagulación II, VII, IX y X (Craciun *et al.*, 1997, 1998). Cada uno de estos factores debe unirse al calcio para ser activo en la formación de un coágulo. Para poder unirse al calcio necesitan que la vitamina K<sub>1</sub> pueda oxidarse a vitamina K<sub>1</sub> epóxido. Esta oxidación está relacionada con la adición de grupos carboxilo a los precursores de factores de coagulación que no presentan suficientes ácidos dicarboxílicos para unirse al calcio y necesitan la vitamina K<sub>1</sub> hidroquinona como cofactor de la carboxilación. En un individuo normal, el epóxido de vitamina K<sub>1</sub> es capaz de regenerarse por reducción. El tiempo que transcurre desde la ingestión del rodenticida hasta que aparecen los signos clínicos se debe a la vida media de los factores de coagulación en plasma y al mecanismo de acción indirecto (Murphy y Talcott, 2001).

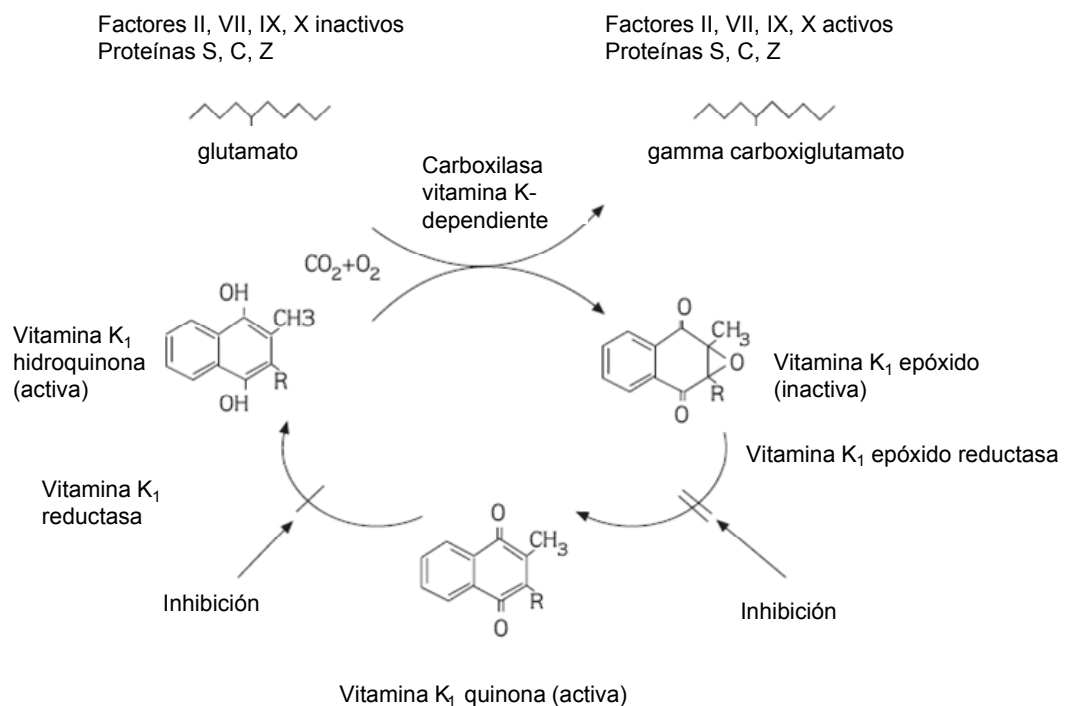


Figura II.24. Mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes (Buckle, 1994)





### II.2.3.5. Factores que afectan a la toxicidad de los rodenticidas anticoagulantes

#### **Especie**

Según estudios experimentales, las diferencias en la sensibilidad a los efectos de los rodenticidas puede deberse a la distinta capacidad para metabolizar estos compuestos. Se ha demostrado que las rapaces nocturnas tienen muy poca capacidad de metabolizar metabolitos de la warfarina adquiridos tras la ingesta de mamíferos contaminados. Watanabe *et al.* (2010) sugieren, por tanto, que este grupo de aves tiene poca capacidad de detoxificar rodenticidas anticoagulantes, lo que concuerda con la alta frecuencia de envenenamiento encontrada en estas especies.

En el caso de los SGARs, se han encontrado marcadas diferencias respecto a la sensibilidad entre las especies de mamíferos empleadas en laboratorio (WHO, 1995), mientras que la información respecto a las distintas especies de rapaces es escasa (Walker *et al.*, 2008). En el estudio realizado por Riedel y colaboradores (1991) se evidenció que los efectos sobre la coagulación de la sangre eran más marcados en cárabos que en Busardos ratoneros o cuervos.

#### **Alimentación**

Determinados hábitos alimenticios pueden favorecer la intoxicación por rodenticidas anticoagulantes independientemente de la resistencia que presente cada especie (Eason y Spurr, 1995), además de influenciar el tipo de intoxicación. Aunque se han observado incidentes de intoxicación secundaria en aves insectívoras (Godfrey, 1985), este tipo de intoxicación es más frecuente en especies depredadoras o necrófagas, especialmente aquellas que se alimentan de las especies de roedores a las que van destinados los cebos. Así, la aplicación del brodifacoum dentro o alrededor de edificios no afectó a las poblaciones de lechuzas que se alimentaban de roedores en zonas alejadas de los edificios (Hegdal y Blaskiewicz, 1984). Por el contrario, las aves granívoras presentan mayor riesgo de intoxicación primaria por la forma de presentación de los cebos (Eason y Spurr, 1995).

#### **Edad**

Durante la exposición experimental a clorofacinona en Cernícalos americanos se observó que los individuos juveniles eran más sensibles al presentar mayor



frecuencia de hemorragias y más temprana aparición de síntomas que los individuos adultos (Radvanyi *et al.*, 1988).

### ***Tipo de compuesto y modo de aplicación***

A diferencia de los mamíferos, en aves existen marcadas diferencias en los efectos en función del compuesto implicado (Joerman, 1998). En general, según los estudios de evaluación de riesgo realizados por la EPA en base a la información de estudios experimentales e incidentes de envenenamiento, los SGARs suponen mayor riesgo para la fauna silvestre, sobre todo las aves, que los anticoagulantes de primera generación (EPA, 2008). De hecho, los SGARs son aproximadamente 100-1000 veces más tóxicos que la warfarina y otros rodenticidas de primera generación (Newton *et al.*, 1999). Entre los SGARs, estudios de exposición en Lechuzas sugieren que el brodifacoum es más tóxico que bromadiolona (Mendenhall y Pank, 1980) y el difenacoum (Newton *et al.*, 1990), aunque Gray *et al.* (1994) indican que la toxicidad del difenacoum, el brodifacoum y el flocoumufen son similares en esta especie. En Ánade real y Codornices, distintos estudios de exposición en laboratorio demuestran que la toxicidad aguda del brodifacoum es mayor que la de la bromadiolona, la clorofacinona y la difacinona, aunque la exposición subaguda es similar (EPA, 1998).

El particular mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes permite que los roedores puedan volver a consumir el cebo en repetidas ocasiones, con la consecuente acumulación de mayores niveles de anticoagulantes en su organismo (Stone *et al.*, 2003)

Se ha observado que la aplicación ininterrumpida del brodifacoum causa mayor mortalidad y acumulación tisular en los roedores, al igual que mayor número de intoxicaciones secundarias en Busardos ratoneros, córvidos y cárabos que una aplicación intermitente del cebo (Eason y Spurr, 1995).

### ***Persistencia en el medio ambiente***

En general los rodenticidas son resistentes a la hidrólisis (excepto la difacinona que tiene una vida media de 44 días a pH 5), relativamente persistentes a la degradación aeróbica en suelo (vida media de 26 a 178 días) y pueden considerarse inmóviles en suelo, además de poco hidrosolubles.



En base a la información disponible, se supone que hay poca o ninguna contaminación de aguas superficiales ni profundas por brodifacoum, clorofacinona o difacinona (EPA, 1998).

### **Otros factores**

El estrés, cambios en la dieta o el aumento de la actividad pueden favorecer la aparición de los efectos de la intoxicación por rodenticidas anticoagulantes (Colvin y Wang, 1974, Laliberté *et al.*, 1976; Oliver y Wheeler, 1978). También la presencia de pequeñas heridas, incluso previamente a la exposición a rodenticidas, puede causar un aumento de la sensibilidad a estos compuestos (Savarie *et al.*, 1979; Mendenhall y Pank, 1980).

#### **II.2.3.6. Efectos tóxicos de los rodenticidas anticoagulantes en aves**

La interferencia en la activación de los factores de coagulación por parte de los rodenticidas anticoagulantes implica que, una vez agotadas las reservas de estos factores, los animales son susceptibles a padecer hemorragias letales provocadas por traumas leves, sobreesfuerzos y posiblemente otras causas (Stone *et al.*, 2003). Estas hemorragias pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, incluso en tejido subcutáneo y órganos internos. En rapaces nocturnas intoxicadas de forma secundaria se observaron hemorragias intracelómicas y miocárdicas con hemopericardio, en mesenterios intestinales y grasa perihepática (Stone *et al.*, 2003). Antes de morir, sobre todo en casos de hemorragias subletales, la sintomatología puede ser inespecífica, con debilidad, letargo, palidez de mucosas, disminución o ausencia de apetito, poliuria y polidipsia, taquicardia y polipnea con disnea, fatiga y percepción alterada (Valchev *et al.* 2008). Como consecuencia de estas alteraciones los animales pueden ser depredados con mayor facilidad, ser más susceptibles de sufrir accidentes traumáticos o padecer enfermedades infecciosas o parasitarias, hipotermia o intoxicación por contaminantes organoclorados almacenados en tejido adiposo (Stone *et al.*, 2003).

Se debe tener en cuenta que cabe la posibilidad de que el hígado, el principal órgano de acumulación de los rodenticidas anticoagulantes, pueda sufrir efectos adversos. Aunque se trata de un aspecto poco estudiado, Kumar y Saxena (1993) encontraron necrosis y vacualización de los hepatocitos con agrandamiento y deformación del núcleo en ratas tratadas con bromadiolona.



La vitamina K interviene en el metabolismo del hueso y es necesaria para la síntesis de  $\gamma$ -carboxiglutamato, un componente de proteínas óseas como la osteocalcina (Weber, 2001). Estudios realizados en la especie humana han demostrado que el tratamiento con warfarina y bajos niveles de vitamina K en la dieta están relacionados con una disminución de la densidad ósea, osteoporosis y mayor frecuencia de fracturas óseas (Barnes *et al.*, 2005). En cambio no se ha encontrado relación entre los niveles de SGARs, la densidad ósea y la resistencia a la fractura en Cernícalo común (*Falco tinnunculus*) y Lechuza común, probablemente debido a que los niveles o el tiempo de exposición a SGARs fueron insuficientes (Knopper *et al.*, 2007).

#### **II.2.3.7. Interpretación de las concentraciones de rodenticidas anticoagulantes**

La interpretación de niveles de rodenticidas anticoagulantes requiere a menudo la pericia del veterinario toxicólogo para poder relacionar la exposición a estos compuestos con la susceptibilidad a padecer la enfermedad, el trauma o la colisión que le produjo la muerte (EPA, 2008). Esta interpretación se ve dificultada por el hecho de que los niveles relacionados con la aparición de efectos adversos y muerte no se han establecido para la mayoría de especies de rapaces (Walker *et al.*, 2008). Concentraciones totales de rodenticidas superiores a 100-200 ng/g de peso húmedo en hígado se consideran potencialmente letales en Lechuzas (Newton *et al.*, 1998,1999). Sin embargo, Stone *et al.* (1999) encontraron niveles tan bajos como 10 ng/g de brodifacoum en un Búho americano con hemorragias subcutáneas y palidez de órganos.

En la tabla II.16 se recopilan los niveles de rodenticidas anticoagulantes encontrados en aves con síntomas de intoxicación.



Tabla II.16. Concentraciones de encontradas en hígado de aves con síntomas de intoxicación por rodenticidas anticoagulantes. Concentraciones en ng/g de peso húmedo. Datos expresados en medias y rangos

Compuesto	Especie	Concentración	Referencia
Brodifacoum	Autillo californiano ( <i>Megascops kennicottii</i> )	400-800 (n=5)	Hegdal y Colvin, 1988
	Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> )	10- 640 (n=12)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Autillo californiano ( <i>M.kennicottii</i> )	340-800 (n=2)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Águila real ( <i>Aquila chrysaetos</i> )	30 (n=1)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Busardo colirrojo ( <i>Buteo jamaicensis</i> )	230-1600 (n=7)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Lechuza ( <i>T.alba</i> )	585 (n=1)	Walker <i>et al.</i> , 2010c
Warfarina	Halcón peregrino ( <i>Falco peregrinus</i> )	1480 (n=1)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Pigargo americano ( <i>Haliaeetus leucocephalus</i> )	1400 (n=1)	Stone <i>et al.</i> , 1999
Total rodenticidas	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> )	670 (140 bromadiolona; 530 brodifacoum) (n=1)	Stone <i>et al.</i> , 1999
	Lechuza ( <i>T.alba</i> )	409 (396 bromadiolona; 13 brodifacoum) (n=1)	Walker <i>et al.</i> , 2010a
	Milano real ( <i>M.milvus</i> )	139 (55 bromadiolona; 84 difenacoum) (n=1)	Walker <i>et al.</i> , 2010a
	Lechuza ( <i>T.alba</i> )	727 (723 brodifacoum; 4 difenacoum)	Walker <i>et al.</i> , 2010b



	Lechuza ( <i>T.alba</i> )	694 (663 brodifacoum; 17 difenacoum; 14 floucumafen) (n=1)	Walker <i>et al.</i> , 2010b
	Milano real ( <i>M.milvus</i> )	112-171 (n=8)	Walker <i>et al.</i> , 2010b
	Lechuza ( <i>T.alba</i> )	518 (511 brodifacoum; 7 difenacoum)	Walker <i>et al.</i> , 2010c
	Milano real ( <i>M.milvus</i> )	270-355 (n=2)	Walker <i>et al.</i> , 2010c

En un principio los análisis de rodenticidas se limitaban casi exclusivamente a los casos en los que se sospechaba intoxicación por la presencia de hemorragias profusas no asociadas a trauma (Stone *et al.*, 2003) o al posible riesgo por la aplicación de cebos (Merson *et al.*, 1984; Hegdal y Colvin, 1988). Posteriormente, debido a la sospecha de que las alteraciones en la coagulación causadas por los rodenticidas podrían favorecer el desarrollo de otras patologías, y a la necesidad de conocer la frecuencia de exposición a estos compuestos en rapaces, los análisis abarcaron un gran número de individuos encontrados muertos o ingresados en centros de recuperación (Stone *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2008). La detección frecuente de rodenticidas en gran variedad de especies de fauna silvestre confirma el hecho de que la exposición ambiental a estos compuestos efectivamente existe (EPA, 2008).

En la tabla II.17 se recogen los niveles encontrados en estudios de biomonitorización de distintas especies de rapaces.



Tabla II.17. Concentraciones de rodenticidas anticoagulantes en hígado de aves en estudios de biomonitorización. Concentraciones en ng/g de peso húmedo. Datos expresados en medias y rangos

Compuesto	Especie	Concentración	Referencia
Warfarina	Búho americano ( <i>Bubo virginianus</i> ) (n=61)	11 8-12	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Cárabo norteamericano ( <i>Strix varia</i> ) (n=25)	2,6 2,5-5	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Lechuza ( <i>Tyto alba</i> ) (n=78)	2,5 2,5-8	Albert <i>et al.</i> , 2010
Difacinona	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=61)	11 8-12	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Cárabo norteamericano ( <i>S. varia</i> ) (n=25)	10 10-12	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Lechuza ( <i>T. alba</i> ) (n=78)	10 10-20	Albert <i>et al.</i> , 2010
Clorofacinona	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=61)	2,9 2,5-14	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Cárabo norteamericano ( <i>S. varia</i> ) (n=25)	4,3 2,5-15	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Lechuza ( <i>T. alba</i> ) (n=78)	NA	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Busardo colirrojo ( <i>B. jamaicensis</i> ) (n=1)	180	Stone <i>et al.</i> , 2003
Brodifacoum	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=61)	52 1-609	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=42)	210 7-970	Stone <i>et al.</i> , 2003



	Cárabo norteamericano ( <i>S. varia</i> ) (n=25)	74 1-927	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Lechuza ( <i>T. alba</i> ) (n=78)	27 10-470	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Autillo californiano ( <i>Megascops kennicottii</i> ) (n=8)	160 7-470	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Busardo colirrojo ( <i>B. jamaicensis</i> ) (n=42)	210 6-1280	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Gavilán de Cooper ( <i>Accipiter cooperii</i> ) (n=12)	100 8-220	Stone <i>et al.</i> , 2003
<b>Bromadiolona</b>	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=61)	42 5-571	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) (n=10)	230 50-1080	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Cárabo norteamericano ( <i>S. varia</i> ) (n=25)	84 2-1012	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Lechuza ( <i>T. alba</i> ) (n=78)	20 5-720	Albert <i>et al.</i> , 2010
	Autillo californiano ( <i>M. kennicottii</i> ) (n=3)	300 50-500	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Busardo colirrojo ( <i>B. jamaicensis</i> ) (n=6)	230 80-500	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Gavilán de Cooper ( <i>A. cooperii</i> ) (n=5)	350 40-600	Stone <i>et al.</i> , 2003
<b>Difacinona</b>	Busardo colirrojo ( <i>B. jamaicensis</i> ) (n=1)	340	Stone <i>et al.</i> , 2003
	Gavilán de Cooper ( <i>A. cooperii</i> ) (n=1)	100	Stone <i>et al.</i> , 2003
<b>Warfarina</b>	Gavilán de Cooper ( <i>A. cooperii</i> ) (n=1)	100	Stone <i>et al.</i> , 2003





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### III.1. ESPECIE DE ESTUDIO

#### **Descripción**

El Búho real (*Bubo bubo*) pertenece al Orden Strigiformes y la Familia Strigidae. Se trata de la rapaz nocturna más grande de España, donde su peso puede variar entre 1220 y 1770 g en machos y entre 1759 y 2390 g en hembras, con una envergadura de 131 a 168 cm y longitud total de 59 a 72 cm (Martínez *et al.*, 2002). Estas cifras suelen verse alteradas debido al sexo y la procedencia geográfica, aumentando en los países del Norte de Europa, donde el peso medio ronda los 3000 g (Mikkola, 1995).

Morfológicamente destaca su enorme cabeza de la que sobresalen unas distintivas “orejas” (Foto III.1). Su color leonado rojizo, moteado de pardo oscuro dorsalmente y rayado en el pecho, con grandes ojos de color naranja, es común en gran parte de Europa. Por el contrario en zonas más áridas de Eurasia y Oriente Medio su plumaje tiende a mimetizarse con el paisaje adoptando una coloración mucho más pálida, llegando incluso a tener los ojos amarillos (Mikkola, 1995). Su cola es corta y presenta franjas transversales oscuras similares a las de las alas.



Foto III.1. Ejemplar adulto de Búho real (J.F. Calvo)



## **Ecología**

Al igual que otras rapaces nocturnas, el Búho real es sedentario y fuertemente territorial durante todo el año, ocupando territorios cuyo tamaño medio y área de caza próxima al nido depende sobre todo de la disponibilidad de presas en la zona. Cuando el hábitat es favorable, las parejas pueden llegar a estar relativamente cercanas, llegando a encontrarse nidos a menos de 2 Km de distancia (Mikkola, 1995).

En el área mediterránea los roquedos elegidos por esta especie son de pequeñas dimensiones, en zonas de baja pendiente (Foto III.2), coincidentes con el hábitat idóneo para el Conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) (Blondel y Badan, 1976; Donázar *et al.*, 1989), pero poco accesibles a las personas. Esto último podría ser reflejo de la sensibilidad de la especie a la persecución directa, una de las causas más importantes de mortalidad no natural en nuestra zona de estudio y otras áreas del Paleártico (Hernández, 1989; Martínez *et al.*, 1992; Mikkola, 1995). Sin embargo son varios los autores que han señalado la preferencia del Búho real y el Águila-azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) por los roquedos de mayores dimensiones en zonas abruptas, especialmente en ambientes humanizados (Donázar, 1988; Ontiveros, 1999; Sánchez-Zapata, 1999). Por otro lado, la selección de pequeños cortados puede deberse a la necesidad de optimizar los costes energéticos durante la caza, puesto que el traslado de presas a nidos situados en cortados elevados puede resultar energéticamente limitante para esta especie, debido a su considerable carga alar (0,71 g/cm<sup>2</sup>; Mikkola, 1995) y a la ausencia de corrientes térmicas durante la noche (Donázar, 1988). También Donázar (1988), Beneyto y Borau (1996) y Penteriani *et al.* (2002) han encontrado preferencia por montañas de baja altitud en Europa.



Foto III.2. Nido de Búho real en la zona de estudio (M. León)

Sus hábitos no son estrictamente nocturnos ya que suele cazar al anochecer y al amanecer, cuando la luminosidad es tenue, y es visible también de día sobre todo en invierno y primavera. Aunque puede cazar en el bosque, tiene preferencia por espacios abiertos.

### **Alimentación**

Se trata de la rapaz europea más especializada en la captura de conejos (Delibes e Hiraldo, 1981; Martínez y Calvo, 2001; Martínez y Zuberogoitia, 2001). Cuando las poblaciones de estos lagomorfos se ven afectadas, más fragmentadas y con densidades menores, el Búho real puede verse obligado a capturar otras especies de menor valor nutricional como ratas o erizos (Donázar, 1987; Penteriani *et al.*, 2002), siendo capaz de comer desde coleópteros hasta crías de corzo (*Capreolus capreolus*), pasando por otras aves como patos, urogallos, búhos de menor tamaño; y lagartos, serpientes o ranas (Mikkola, 1995).

En nuestra zona de estudio también la disponibilidad de conejo determina la variedad de presas en la dieta. Así por ejemplo se ha observado que en las sierras del



sur de la Región de Murcia (Sierra Minera Cartagena-La Unión, La Muela-Cabo Tiñoso y Almenara), el Conejo europeosolamente comprende el 35% de la dieta de esta rapaz, consumiendo una proporción similar de Ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) (23% de la dieta), aparte de palomas (*Columba* spp.), Perdices (*Alectoris rufa*), Erizos (*Erinaceus europeus* y *Atelerix algirus*) y Gaviotas patiamarillas (*Larus michahellis*). Por el contrario, en los territorios localizados en las sierras del norte de la misma Región y sur de la provincia de Alicante (Escalona, Altaona, Monte el Valle y Columbares), el conejo es muy abundante y por tanto la principal presa (71% de la dieta) aunque su alimentación puede complementarse con palomas, perdices, cernícalos, liebres (*Lepus europaeus*) o ratas (León *et al.*, 2008).

### **Reproducción**

El Búho real alcanza su madurez sexual en su segundo o tercer año de calendario (Mikkola, 1995).

Los hábitos de nidificación de esta especie son fundamentalmente rupícolas. En el sureste español los taludes o roquedos de pequeño o medio tamaño rodeados de abundante cobertura boscosa suelen ser de elección, aunque el suelo y los árboles pueden ser también lugares apropiados para la puesta (Martínez *et al.*, 2003; Martínez y Calvo, 2006). Ésta tiene lugar entre enero y marzo en nuestras latitudes, con un tamaño variable de dos a cuatro huevos (Martínez y Calvo, 2006), en ocasiones hasta cinco (Pérez-García *et al.*, 2010) puestos a intervalos de 2 a 4 días, por lo que una puesta de 3 huevos tarda normalmente siete u ocho días en completarse (Mikkola, 1995). Al parecer, hembras más jóvenes tienen puestas más pequeñas y más tardías (Leibundgut, 1973). No se habían citado segundas puestas, pero sí de reemplazo en el caso de fracasos tempranos durante la incubación (Mikkola, 1995; Cramp y Simmons, 1985; Olsson, 1997). Sin embargo en nuestra zona de estudio se encontró excepcionalmente un nido de estas características en el año 2000, favorecido posiblemente por la gran abundancia de presas de la zona (Martínez *et al.*, 2003) aunque según Donazar (1990) la disponibilidad de alimento tiene mayor efecto sobre el número de parejas que intentará criar que sobre el tamaño de puesta.



La hembra comienza a incubar desde el momento en el que pone el segundo huevo y continúa durante 34-36 días. Pasado ese periodo los pollos empezarán a nacer, también a intervalos, y permanecerán en el nido hasta los 28-35 días de edad (Foto III.3) cuando, a pesar de ser incapaces de volar, comienzan a abandonar el nido. Los primeros intentos de vuelo ocurren cuando tienen unos 52 días, lográndolo a los 60 y obteniendo por primera vez su propio alimento a los 70 días. Según Morillo (1976), el grupo familiar permanece en el territorio de cría hasta octubre, cuando comienza la dispersión de los inmaduros. La productividad (número de pollos que llegan a volar en relación al número de parejas controladas) en nuestra zona de estudio se estima en 1,58, de 72 parejas controladas (Martínez y Calvo, 2006).



Foto III.3. Pollos de Búho real en nido (P. Gómez-Ramírez)

### ***Distribución***

La distribución de esta especie es transpaleártica, habitando diversidad de ambientes, tanto boreales como templados, mediterráneos, esteparios, desérticos o de clima tropical con inviernos secos (Voous, 1960).

La especie es inexistente en las Islas Canarias y Baleares. La población de la Península Ibérica disminuye en las zonas donde el paisaje adopta rasgos más





eurosiberianos y de menor relieve, con tendencia a desaparecer en la franja costera del Norte peninsular y Galicia (Figura III.1).

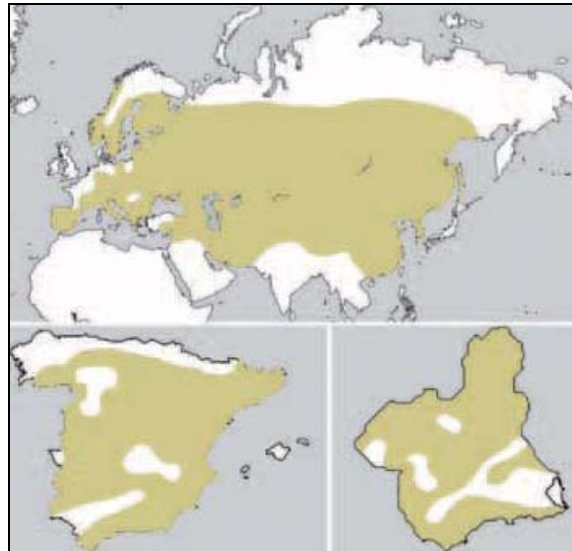


Figura III.1. Distribución mundial, española y murciana del Búho real. Según del Hoyo *et al.* (1999), de Juana y Varela (2000) y Martí y del Moral (2003), respectivamente (tomado de Martínez y Calvo, 2006)

La población de Búho real en nuestro área de estudio se ha estimado en 240-270 parejas aproximadamente, es decir, un 10-12% del total de la población de esta especie en España (Martínez y Zuberogoitia, 2003; Martínez y Calvo, 2006).

### **Amenazas y estado de conservación**

Tras bruscos declives en las poblaciones europeas durante la primera mitad del siglo veinte, principalmente debido a persecución directa, recientemente se ha registrado cierta recuperación gracias a la protección legal y proyectos de reintroducción a gran escala llevados a cabo en las décadas de los 70 y 80 (Donázar y Kalinainen, 1997). Esta tendencia ha continuado y se ha visto reflejada en las modificaciones de las medidas de protección para la especie en España y nuestra área de estudio. Así, mientras que en el “Libro Rojo de los Vertebrados de España” estaba catalogada como “Rara” (Blanco y González, 1992), en el 2004 no se incluyó en el “Libro Rojo de las Aves de España” debido a la mejora en sus poblaciones



(SEO/Birdlife 2008). Tampoco se ha incluido en “Catálogo Valenciano de Especies Amenazadas de Fauna” (Decreto 32/2004), donde anteriormente estaba catalogada como “Vulnerable” (Decreto 265/1994). Sin embargo otros catálogos vigentes desde 1990, como es el “Catálogo Nacional de Especies Amenazadas” (RD 439/1990) y la Ley 7/1995 de la Región de Murcia la consideran “Especie de Interés Especial”. A nivel mundial está catalogada en la categoría de “Preocupación Menor” (Birdlife International, 2009) y en Europa está protegida por el Convenio de Berna (Decisión 82/72/CEE), la Directiva 2009/147/EC y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES).

En España las poblaciones de Conejo europeo se vieron disminuidas a causa de la mixomatosis, la hemorragia vírica y una gestión cinegética inadecuada (Martínez y Zuberogoitia, 2001), hecho importante en su día puesto que la falta de presa podría considerarse la principal amenaza en el Búho real en el resto de la Península (Martínez y Zuberogoitia, 2001; Martínez y Calvo, 2001). Sin embargo son otros los factores que afectan a las poblaciones de nuestra área de estudio: disparos, expolios y electrocuciones son los principales desde hace varios años, aumentando cada vez más los casos de la última, posiblemente favorecido por la gran envergadura alar de la especie. La creencia por parte de los cazadores de que los depredadores naturales son responsables de la reducción del número de piezas de caza, ha dado lugar a una intensa persecución de estos animales en nuestro territorio. En Alicante, por ejemplo, más de 1000 aves de presa incluido búhos sufrieron disparos entre los años 1984 y 2000 (Martínez *et al.*, 1996, 2001), a pesar de ser especies legalmente protegidas.

### III.2. ÁREA DE ESTUDIO

Nuestro área de estudio abarca las sierras de Escalona, Altaona, Monte el Valle, Columbares, Sierra Minera Cartagena-La Unión, La Muela y Almenara (37°45'N, 0°57'W), al sur de la provincia de Alicante y Este de la Región de Murcia, en el sureste de España (Figura III.2). El clima es Mediterráneo meso-árido, con 275-400 mm de precipitaciones anuales y temperatura media máxima anual de 19°C.



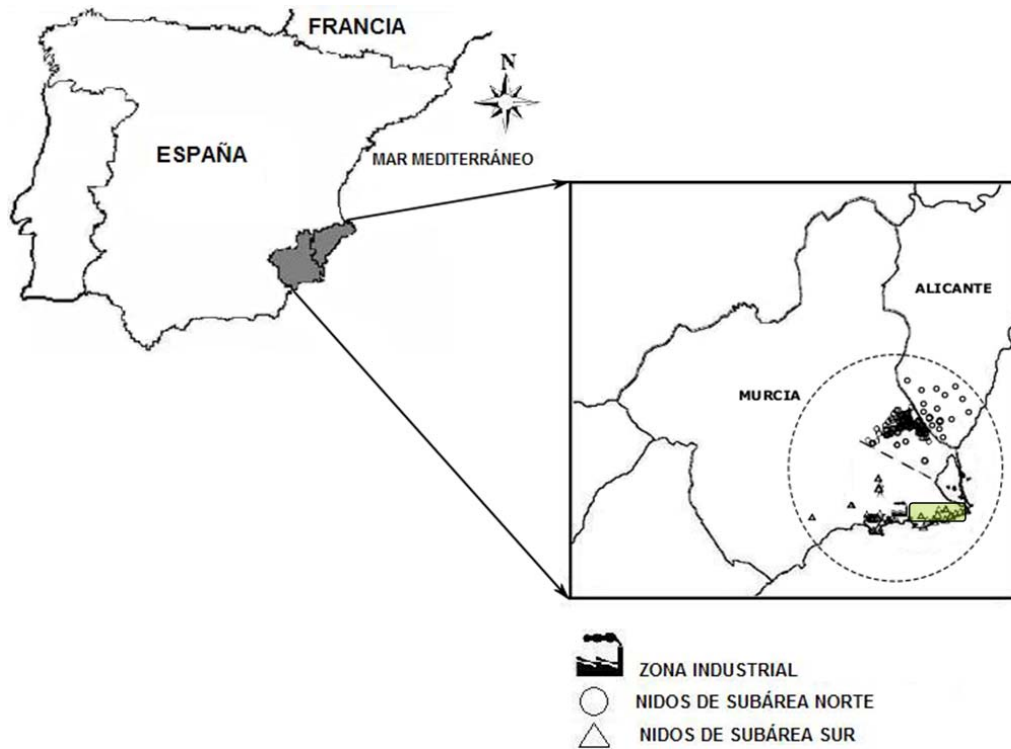


Figura III.2. Área de estudio. El círculo delimita el área de muestreo y la línea discontinua separa la subárea Norte de la subárea Sur. El segmento verde enmarca la zona correspondiente a la antigua explotación minera y su área de influencia.

Debido a que la zona de estudio es relativamente grande y existen diferencias en cuanto al uso del suelo, ésta se dividió en dos subáreas. La subárea Norte comprende las sierras de Escalona, Altaona, Monte el Valle y Columbares. En esta zona hay balsas de riego asociadas al cultivo de regadío, aunque predominan los cultivos leñosos, especialmente de cítricos (Foto III.4a). Por el contrario en la subárea Sur la agricultura predominante de regadío es destinada a herbáceos, normalmente asociada a un uso intenso de plaguicidas (Foto III.4b), si bien la superficie destinada a cultivos es menor que en la Norte (CREM, 2011). Además, en esta subárea algunos nidos se encuentran en una antigua zona minera, en la “Sierra Minera Cartagena-La Unión”, y otros se localizan en un radio de 16 km de distancia de Cartagena, una importante ciudad industrial.



Foto III.4a. Paisaje correspondiente a los alrededores de un nido de la subárea Norte (P.Gómez-Ramírez)



Foto III.4b. Paisaje correspondiente a los alrededores de un nido de la subárea Sur (P. Gómez-Ramírez)



### **III.3. METODOLOGÍA DE MUESTREO**

La toma de muestras fue realizada gracias a la colaboración de los grupos de investigación “Ecosistemas Mediterráneos” de la Universidad de Murcia y el “Área de Ecología” de la Universidad Miguel Hernández. En cada salida de campo participaron al menos un veterinario del grupo de investigación de “Toxicología y Veterinaria Forense” y un ecólogo de uno de los dos grupos mencionados, además de uno o dos escaladores expertos, imprescindibles para el acceso a determinados nidos localizados en zonas más abruptas.

La actividad reproductiva de los Búhos reales fue rigurosamente monitorizada por los ecólogos desde diciembre hasta el nacimiento de los pollos, con el fin de determinar la edad apropiada para la extracción de sangre (28-30 días de edad).

Previa evaluación clínica por el veterinario, y tomando las precauciones necesarias para evitar el estrés en los individuos, se procedió a la punción de la vena braquial con aguja 23 G y jeringuilla para obtener entre 3-5 ml de sangre (Foto III.5). Aproximadamente 1,5 ml de sangre se destinaron al análisis de metales pesados, insecticidas organoclorados, rodenticidas anticoagulantes y medición de actividad  $\delta$ -ALAD. El resto de la sangre se obtuvo sin heparina y se centrifugó en el laboratorio para obtener el suero necesario para el estudio de parámetros bioquímicos. Todas las muestras se transportaron en refrigeración en bolsas isotérmicas con hielo hasta el laboratorio, donde se almacenaron en congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los animales muestreados fueron pesados y medidos con el fin de determinar la edad aproximada, información utilizada para la interpretación de resultados.

Gracias al riguroso seguimiento de la reproducción de la especie durante el estudio, 58 huevos que no eclosionaron pudieron ser recogidos entre 2004 y 2009 para su análisis de contaminantes. Estos huevos se transportaron en condiciones de refrigeración en bolsas isotérmicas con hielo hasta el laboratorio, donde se almacenaron en congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.



Foto III.5. Toma de muestras (P. Gómez-Ramírez)

Con el fin de evaluar el grado de exposición a rodenticidas anticoagulantes en el Búho real, entre 2003 y 2010 se tomaron muestras de tejido hepático de búhos ingresados muertos o que murieron al cabo de pocos días en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (C.R.F.S.) “Santa Faz” de Alicante y del C.R.F.S. “El Valle” de Murcia mediante la realización de necropsia reglada (8 hembras- 4 de ellas juveniles- y 3 machos adultos). Estas muestras también fueron conservadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Entre 2007 y 2010 se capturaron 21 individuos adultos, a los que se les extrajo sangre siguiendo el mismo procedimiento que para los pollos. Dichas muestras fueron utilizadas para el estudio de parámetros bioquímicos y de los residuos de rodenticidas anticoagulantes.

En la tabla III.1 se recoge la totalidad de muestras analizadas en el presente trabajo, así como su año y subárea de muestreo.



Tabla III.1. Total de muestras de Búho real sometidas a análisis

Muestra	Subárea	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
<b>Sangre</b>	Norte	17	39	62	59	82	29	38	17	<b>343</b>
	Sur	-	11	9	17	24	18	12	8	<b>99</b>
<b>Suero</b>	Norte	11	25	63	56	69	93	96	-	<b>413</b>
	Sur	-	5	9	17	16	20	33	-	<b>100</b>
<b>Hígado</b>	Norte	1	7	2	-	4	2	1	-	<b>16</b>
	Sur	-	1	-	-	-	-	-	1	<b>2</b>
<b>Huevos</b>	Norte	-	2	7	2	15	7	9	-	<b>42</b>
	Sur	-	-	1	1	4	2	8	-	<b>16</b>

#### III.4. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN SANGRE

Los niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en sangre se determinaron en un total de 220 muestras obtenidas en pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007.

##### ***Técnica analítica y patrones utilizados***

Distintas técnicas analíticas pueden emplearse para la determinación de metales pesados. La espectrometría de absorción atómica de llama, electrotérmica, de absorción molecular, con cámara de grafito, la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) o la voltametría son algunas de ellas.

En el presente trabajo se ha utilizado la metodología descrita por García-Fernández *et al.* (1995) que emplea la voltametría de redisolución anódica de pulsos diferencial (DPASV).



### Soluciones patrón y concentraciones

A partir de un patrón madre de calidad y riqueza contrastadas de cada uno de los metales analizados se prepararon disoluciones de patrón más diluidas utilizando como disolvente agua Milli-Q:

Tabla III.2. Disoluciones patrón utilizadas en el análisis voltamétrico.

	Concentración madre (Sigma®)	Concentración 1/10	Concentración 1/100	Concentración 1/1000
<b>Cadmio</b>	1025 µg/ml	102,5 µg/ml	10,25 µg/ml	1,025 µg/ml
<b>Cobre</b>	1000 µg/ml	100,0 µg/ml	10,00 µg/ml	1,000 µg/ml
<b>Plomo</b>	1050 µg/ml	105,0 µg/ml	10,50 µg/ml	1,050 µg/ml
<b>Zinc</b>	1050 µg/ml	105,0 µg/ml	10,50 µg/ml	1,050 µg/ml

Para estabilizar las disoluciones y asegurar la suspensión del metal, evitando su precipitación, cada disolución fue acidificada con HCl 30% para cadmio, cobre y zinc, y con HNO<sub>3</sub> 65% para plomo.

### Equipo utilizado y condiciones de operación

Se utilizó un polarógrafo Metrohm® (Foto III.6) formado por un puesto de trabajo VA-757 y un ordenador con el software adecuado para procesar los datos. El puesto de trabajo consiste en una célula electrolítica, donde se deposita la muestra, y los siguientes electrodos:

- Electrodo de trabajo: electrodo de mercurio multimodo (MME)
- Electrodo de referencia Ag/AgCl, KCL 3 mol/l.
- Electrodo auxiliar de platino.



Antes de la realización del análisis cuantitativo se realiza un análisis cualitativo, llamado exploración o test, el cual permite tener una referencia de los niveles de metales presentes en la muestra. De esta forma se puede determinar tanto la concentración como el volumen de las disoluciones de patrón a utilizar para la determinación cuantitativa. La medida de intensidad de corriente del patrón añadido debe ser de 1,5 a 3 veces superior a la intensidad de corriente encontrada en la muestra para cada metal en el test. Las condiciones de trabajo se detallan en la siguiente tabla (Tabla III.3).

Tabla III.3. Condiciones de trabajo para el análisis de cadmio, plomo, cobre y zinc por voltametría de redisolución anódica.

Técnica	Gota pendiente de mercurio (HMDE)
Modo de medición	Diferencial de pulsos normal
Purga de N <sub>2</sub> inicial	5 minutos
Tiempo de electrolisis	120 s (Cd, Pb, Cu) 30 s Zn
Tiempo de reposo tras electrolisis	10 s
Potencial inicial de medición	-800 mV (Cd, Pb, Cu) -1200 mV Zn
Potencial final de medición	65 mV (Cd, Pb, Cu) -800 mV Zn
Tiempo de impulso	0,04 s
Amplitud de impulsos	50 mV
Velocidad de barrido	15 mV/s
Incremento de potencial	6 mV
Tiempo de repetición de impulsos	0,6 s





Foto III.6. Polarógrafo Metrohm® (P. Gómez-Ramírez)

Los límites de detección para el cadmio, plomo, cobre y zinc fueron de 0,012, 0,6, 0,27 y 0,636  $\mu\text{g/dL}$ , respectivamente.

### ***Preparación de muestras para el análisis***

Previamente al análisis, las muestras de sangre fueron tratadas para eliminar completamente la materia orgánica que pudiera interferir en los resultados (Oehme y Lund, 1979). El tratamiento de las muestras de sangre consistió en una digestión húmeda a altas temperaturas con una mezcla de ácidos nítrico, perclórico y sulfúrico (8:8:1), siguiendo el método descrito por García-Fernández *et al.* (1995).

### **Reactivos:**

El manejo de la muestra hasta llegar a una digestión completa supone un alto riesgo de contaminación que es preciso minimizar. Para ello se utilizaron reactivos de calidad idónea y material fungible sometido a un lavado que garantizase niveles mínimos de metales. Así, todos los reactivos utilizados en el proceso fueron de calidad Suprapur® (Merk, Darmstadt, Alemania) y utilizados en las disoluciones originarias de fabricación  $\text{HNO}_3$  65%,  $\text{HSO}_4$  96%,  $\text{HCl}$  30%,  $\text{HClO}_4$  70%. Para la dilución del extracto de digestión se utilizó agua destilada y purificada en un Milli-Q.





### Material:

Los tubos de cuarzo (10x100 mm) empleados en la digestión húmeda fueron lavados previamente con agua y jabón, sumergidos en una solución de ácido sulfúrico y aclarados con agua destilada para lavarlos con una solución de HNO<sub>3</sub> al 2% durante, al menos, 24 horas y luego aclarados dos veces con agua bidestilada y secarlos en estufa a 100°C.

### Procedimiento de digestión:

El proceso de digestión se llevó a cabo en el interior de una cabina extractora de humos Captair 5008 UN (Foto III.7) mediante un digestor Selecta® dotado de termostato para controlar temperaturas de 10 a 450°C y un bloque calefactor de aluminio con capacidad para 60 tubos de 10 mm de diámetro.

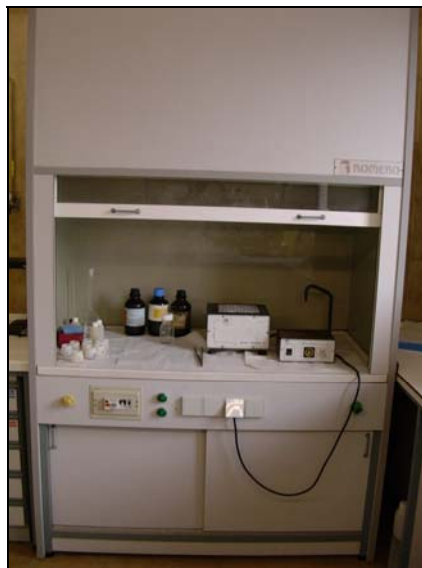


Foto III.7. Cabina extractora de humos (P. Gómez-Ramírez)

A 200 µl de sangre dispuesta en un tubo de cuarzo se añadieron 0,5 ml de la mezcla de ácidos (nitríco, perclórico y sulfúrico, 8:8:1). La mezcla se sometió a un aumento progresivo de temperaturas de 40 a 200°C a intervalos de 5°C/minuto, seguido de una digestión a 200°C durante 2 horas y un posterior aumento hasta 370°C a 20°C/5 minutos, manteniendo esta temperatura final hasta llegar a sequedad.



### **Análisis de metales pesados**

La muestra digerida se dejó enfriar y se añadieron 50  $\mu$ l de HCl como electrolito soporte, alcanzando un pH final entre 1 y 2, tal y como requiere la técnica analítica. A continuación la muestra se transfirió a la célula electrolítica mediante la adición de 10 ml de agua milli-Q al tubo de cuarzo. La concentración de metales en las muestras digeridas se calculó mediante dos adiciones de patrón (Sigma, St. Louis, MO) por análisis en un volumen constante. La repetibilidad y reproducibilidad se calcularon procesando 10 muestras idénticas de sangre liofilizada reconstituida (European Union Reference Standards) CRM195 y alcanzaron  $96,5 \pm 1,2\%$  y  $98,16 \pm 1,03\%$  respectivamente (García- Fernández *et al.*, 1995).

### **III.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA $\delta$ -ALAD EN SANGRE**

La actividad  $\delta$ -ALAD se determinó en 218 muestras obtenidas entre 2003 y 2007, empleando la técnica descrita por Scheuhammer (1987b) para aves. En primer lugar una alícuota de cada muestra de sangre entera se sometió a hemólisis con 4 volúmenes de Triton X-100. A continuación a 100  $\mu$ l del hemolisado se añadieron 100  $\mu$ l de ácido morfolinoetanosulfónico (MES) 0,5 M, 50 ml de agua y 50  $\mu$ l de solución de ácido aminolevulínico (ALA) 60 mM. Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra con el fin de utilizar una de ellas como blanco. A las muestras consideradas como blanco se les añadió 200 ml de una solución de TCA 0,4M/Hg<sup>2+</sup> 60 mM.

Todas las muestras se incubaron en baño térmico a 42°C. Al cabo de una hora la reacción se detuvo mediante la adición de 200  $\mu$ l de una solución de TCA/Hg<sup>2+</sup>. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos y 400  $\mu$ l del sobrenadante se mezclaron con 750  $\mu$ l de reactivo de Erlich's modificado (0,3 g de DMAB se disuelven en 9 ml de ácido acético glacial, 4,8 ml de ácido perclórico al 70% y se completa hasta 15 ml con ácido acético). La mezcla se dejaba incubar durante 10 minutos y se procedía a su lectura a 555 nm empleando un espectrofotómetro de luz ultravioleta Shimadzu 1603 (Foto III.8), comparándolo con su correspondiente blanco. De esta forma la cuantificación se basó en la medición colorimétrica del producto



(porfobilinógeno; PBG) que la enzima forma con el dimetilaminobenzaldehído. Para calcular la actividad enzimática se usó la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol PBG/h/L de glóbulos rojos (RBC)} = (\text{FD} \times (\text{PBG})^{-1} \times \text{M}) / \text{Hct} \times 100$$

donde,

FD (Factor de dilución)=71,875

$\text{PBG}^{-1} = (\text{Absorbancia PBG})^{-1} = 16,13$

M (Absorbancia de la muestra)=absorbancia medida a 555 nm

Hct=valor hematocrito

La actividad  $\delta$ -ALAD se expresa en  $\mu\text{mol PBG/h/L}$  de glóbulos rojos (RBC).



Foto III.8. Espectrofotómetro de luz ultravioleta (Shimadzu 1603) (P. Gómez-Ramírez)

### III.6. DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS EN SANGRE

En 316 muestras de sangre entera se analizaron hasta 14 insecticidas organoclorados ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\delta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH o lindano, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan I, endosulfan II, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, heptacloro y heptacloro epóxido) siguiendo el método descrito por Martínez-López *et al.* (2009).



### **Procedimiento analítico**

#### Material:

El embudo de placa porosa se limpió con una mezcla de ácido sulfúrico (98%) y agua oxigenada (30%), dejando filtrar por gravedad, para destruir cualquier resto de materia orgánica y de residuos de contaminantes. Después se lavó con agua y jabón, a continuación con agua destilada y, por último, con acetona. Finalmente se dejó secar en estufa a 80°C.

El resto del material se limpió de igual forma, exceptuando el paso del ácido sulfúrico/agua oxigenada.

#### Reactivos:

Los disolventes orgánicos utilizados (n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter dietílico) fueron de calidad residuos Pesticin (Lab-Scan<sup>®</sup>), al igual que el sulfato sódico anhidro granulado (Merck<sup>®</sup>).

#### Procedimiento de extracción y purificación:

La técnica utilizada consiste en una modificación del método descrito por María-Mojica *et al.* (2000), realizada por Martínez-López *et al.* (2009).

Las muestras de sangre fueron descongeladas y homogeneizadas por agitación. En un tubo tipo Falcon, un volumen de 200 µl de sangre fue homogeneizado con una mezcla de acetona: hexano en una proporción 1:3. Tras la rotura de las células mediante la aplicación de ultrasonidos (Labsonic<sup>®</sup>) durante 3-5 minutos, el homogeneizado se filtró al vacío a través de un embudo de placa porosa del nº 4, con 5 g de sulfato sódico anhidro para evitar que pasase la fase acuosa y permitir recoger tan sólo la fase extractante. A continuación, con otros 5 ml de hexano se recogieron los posibles restos de organoclorados que podrían haber quedado en las paredes del vaso del tubo y del embudo de placa porosa. Este extracto deshidratado se recogió en un matraz de 50 ml y se concentró al vacío en el rotavapor (Heidolph<sup>®</sup>) a una temperatura de 40-50°C a 60 rpm. El extracto seco se redisolvió en 5 ml de n-hexano y



se hizo pasar por gravedad a través de una microcolumna de Florisil® (SEP-PAK, Waters®), que debía ser activada previamente con 2 ml de n-hexano. Seguidamente se preparó una elución con la mezcla éter de petróleo-éter etílico (21:4), recogiendo todo el solvente en un matraz de 50 ml, que volvió a ser desecado a vacío en el rotavapor. Este último extracto se redisolvió en 5 ml de n-hexano, y se transfirió a un tubo de vidrio con tapón de corcho, que se conservó en refrigeración hasta su análisis.

#### Determinación cromatográfica:

Previamente al análisis de las muestras, los extractos se evaporaron a sequedad con nitrógeno y se resuspendieron en 1 ml de n-hexano, transfiriéndose a viales de los cuales se pinchó 1 µl en el cromatógrafo de gases (Shimadzu® GC 17A), con detector de captura de electrones (CG-EDC; Foto III.9). Se utilizó una columna tipo capilar SPB-608 (Supelco®) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de grosor, específicamente recomendada por la EPA para los 14 insecticidas organoclorados estudiados. Las condiciones cromatográficas se describen en la siguiente tabla (Tabla III.4).

Tabla III.4. Condiciones de trabajo para el análisis de insecticidas organoclorados.

Flujos:	a) Gas portador	He a 1 ml/min
	b) Make up	N <sub>2</sub>
Modo de inyección	Splitless	
Volumen de inyección autosampler	1 µl	
Temperatura de inyección	290 °C	
Temperatura del detector	330 °C	
Rango de temperaturas	2 min a 50°C	
	40 °C/min hasta 150 °C	
	8 °C/min hasta 290 °C	
	10 min a 290 °C	
	Enfriamiento a 50 °C	
Duración del cromatograma	35 min	



Foto III.9. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de captura de electrones (Shimadzu® GC 17A) (P. Gómez-Ramírez)

El tratamiento de los datos cromatográficos se realizó mediante el software Shimadzu Class-vp. Para identificar los compuestos organoclorados presentes en las muestras procesadas se compararon los tiempos de retención (tR) encontrados en las mismas con los de un patrón externo, ambos analizados en el CG-EDC con las mismas condiciones analíticas. Dicho patrón externo proviene de diluir a 1:25 un patrón calidad análisis cromatografico suministrado por Supelco®. El patrón original se comercializa en ampollas que contienen 16 compuestos organoclorados disueltos en 1 ml de metanol-diclorometano (98:2). La dilución se realiza con 24 ml de n-hexano calidad residuos en un frasco de 25 ml.

En todas las muestras, incluido el patrón externo, se añadió 10 µl de metoxicloro de concentración 1 mg/ml, como patrón interno. La sensibilidad obtenida con esta técnica y en las condiciones cromatográficas descritas es 0,06 ppb.

### **III.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS EN HUEVOS NO ECLOSIONADOS**

El análisis de insecticidas organoclorados ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH (lindano),  $\delta$ -HCH,  $\epsilon$ -HCH, heptacloro, heptacloro-epóxido, aldrin, isodrin, dieldrin, endrin, endosulfán, clordano cis y trans, *op'*-DDT, *op'*-DDD, *op'*-DDE y *pp'*-DDT, *pp'*-DDD, *pp'*-DDE;



hexaclorobenceno (HCB), metoxicloro y mirex), PCBs (metabolizables: 8, 31, 44, 52, 70, 101, 149, 151 y no-metabolizables PCBs: 28, 105, 153, 138, 180, 195, 194, 118, 170, 77, 128, 126, 156, 169) y PBDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154 y 183) se llevó a cabo en los laboratorios de Alterra, instituto de investigación de la Universidad de Wageningen (Países Bajos), bajo la supervisión del Dr. Nico van den Brink. En total se analizó el contenido de 58 huevos no eclosionados.

### **Preparación de muestras**

En primer lugar se midió la longitud (L) y la anchura (A) de cada huevo con un calibrador automático (Instrumentación Científica Técnica SL, Lardero, La Rioja, Spain) con un error de 0,01 mm (Foto III.10). Los huevos se abrieron, su contenido se pesó y guardó en congelación hasta el momento del análisis. Después de la descongelación, el contenido de los huevos se homogenizó y una pequeña parte fue usada para la determinación de organoclorados.

Después de la separación de las membranas internas, las cáscaras se dejaron secar hasta obtener un peso constante (más de un mes) y se pesaron (SP). El índice de cáscara se calculó como  $SP/LxA$  (Ratcliffe, 1970). El grosor de la cáscara se estimó como la media de cinco medidas tomadas en el ecuador del huevo con un calibrador automático con un error de 0,01mm.



Foto III.10. Obtención de parámetros biométricos de huevos no eclosionados (L.Ramón)

Algunos autores han sugerido que la putrefacción o el desarrollo embrionario pueden conllevar cambios en el contenido de lípidos del huevo y, por tanto, en las



concentraciones de contaminantes lipofílicos (Helander *et al.*, 1982). Por este motivo el contenido de los huevos fue examinado para determinar el grado de putrefacción y de desarrollo embrionario, así como de posibles deformidades. Los huevos sin embrión aparente se consideraron infértiles y el desarrollo embrionario se clasificó en cuatro estadios: 1=vasos sanguíneos; 2=mórula o blastocisto; 3=embrión en primeros estadios de desarrollo; 4=desarrollo embrionario muy avanzado (Foto III.11).



Foto III.11. Embrión en estadio 4 de desarrollo embrionario (P. Gómez-Ramírez)

### ***Procedimiento analítico***

#### Material utilizado

Previamente a su utilización, todo el material utilizado fue lavado en lavavajillas, secado y finalmente lavado con acetona y n-Hexano.

#### Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad análisis de residuos (ciclohexano MERK, 99% pureza; n-hexano Picograde LGC Promochem; decano Aldrich 99+%; acetato de etilo  $\geq 99,8$  % MERK; sulfato sódico, 99% anhidro extra puro Acros organics; lana de cuarzo Varian).

#### Procedimiento de extracción y purificación

Una alícuota de aproximadamente 1,5 g de contenido de huevo homogeneizado se mezcló con 24 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro utilizando un mortero (Foto III.12).





Esta mezcla se introdujo en su frasco de extracción correspondiente, cubierta por lana de cuarzo y se sometió a extracción con 100 ml de n-Hexano utilizando Soxtherm<sup>®</sup> (Foto III.12) (Gerhardt GmbH & Co. KG<sup>®</sup>), un proceso automatizado de extracción sólido-líquido basado en Soxhlet y Twisselmann, controlado por una unidad de control Multistat. Durante este proceso, en primer lugar la muestra se sumergió en solvente en ebullición para liberar el material extraíble. A continuación el solvente redujo su nivel por debajo del dedal de extracción y el exceso de solvente se acumuló en un tanque de recuperación localizado en la parte trasera del equipo. En el tercer paso, el material se extrajo mediante un reflujo del solvente y se acumuló en el frasco de extracción. Finalmente, la mayor parte del solvente se destiló hacia el tanque trasero para su posterior recuperación y los frascos de extracción fueron alzados automáticamente para separarlos de la parrilla de calentamiento. Cada 20 muestras se incluyó un blanco.

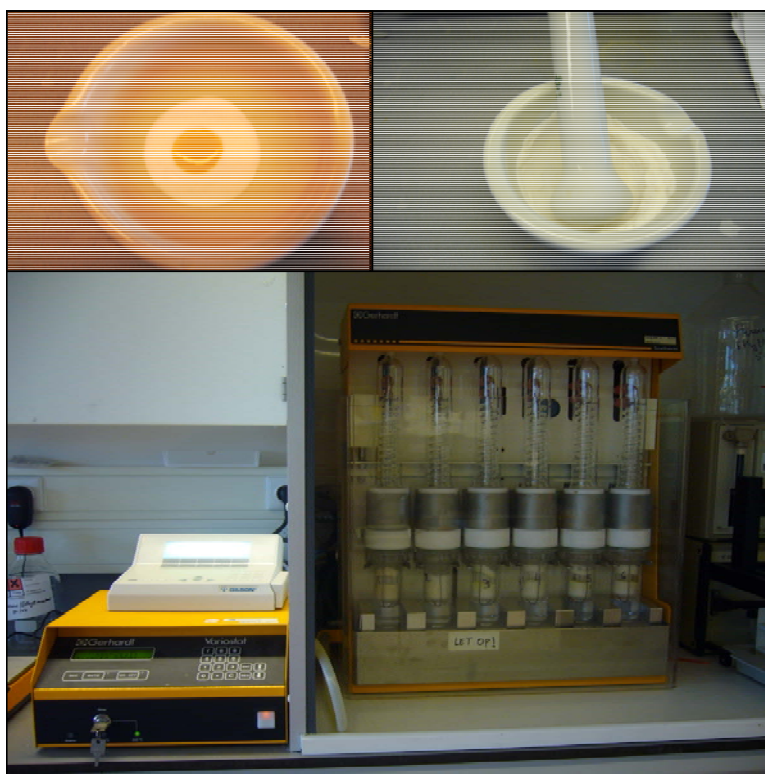


Foto III.12. Procesado de muestras para la extracción de compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados: homogeneizado de la muestra en mortero y extracción con Soxtherm<sup>®</sup> (P. Gómez-Ramírez)



Los extractos resultantes se evaporaron a 1 ml y se les añadió la misma proporción de ciclohexano (calidad análisis) para ser purificados mediante cromatografía de permeación por gel utilizando una columna Bio Beads SX3 (Bio Rad California, USA) (Foto III.13) y una mezcla de ciclohexano y acetato de etilo (1:1 v/v) como eluyente después de añadir PCB 18 y PCB 209 (Dr. Ehrenstorfer GmbH) como patrones internos. La recuperabilidad de la purificación fue del 80-90%. A partir de la purificación se obtuvieron dos extractos. En el primero se concentró la totalidad de lípidos de la muestra (fracción lipídica), por lo que se evaporó a sequedad para determinar por gravimetría el contenido lipídico de cada muestra. La segunda fracción se evaporó hasta casi sequedad, evitando la evaporación completa mediante la adición de 50  $\mu$ l de decano. Se redisolvió en 1 ml de n-hexano, se transfirió a un vial y se evaporó hasta 0,5 ml para su análisis.



Foto III.13. Columna de cromatografía de permeación por gel y autosampler (P. Gómez-Ramírez)

#### Determinación de compuestos organohalogenados

Para la detección y cuantificación de los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (Agilent 6890 Series GC System; 5973



Network Mass Selective Detector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Foto III.14), con una columna Varian cpsil5-C18 para PCB 100 m x 0,25 m,  $df = 0,1 \mu\text{m}$  para analizar 21 congéneres de PCBs (PCBs metabolizables: 8, 31, 44, 52, 70, 101, 149, 151 y no-metabolizables PCBs: 28, 105, 153, 138, 180, 195, 194, 118, 170, 77, 128, 126, 156, 169) y una columna DB5-MS 30 m x 0,32 mm,  $df = 0,25 \mu\text{m}$  para insecticidas organoclorados (Hexaclorociclohexanos:  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH (lindano),  $\delta$ -HCH,  $\epsilon$ -HCH; ciclodienos: heptacloro, heptacloro-epóxido, aldrin, isodrin, dieldrin, endrin, endosulfán, clordano cis y trans; difenilalifáticos:  $op'$ -DDT,  $op'$ -DDD,  $op'$ -DDE y  $pp'$ -DDT,  $pp'$ -DDD,  $pp'$ -DDE; hexaclorobenceno (HCB), metoxicloro y mirex) y PBDEs 28, 47, 99, 100, 153, 154 y 183.



Foto III.14. Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (P. Gómez-Ramírez)

Las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la siguiente tabla (Tabla III.5):



Tabla III.5. Condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos organohalogenados.

Flujos:	Gas portador: He a 1,4 ml/min
Modo de inyección	Splitless
Volumen de inyección autosampler	5 µl
Temperatura de inyección	250°C
Temperatura del detector	325° C
Rango de temperaturas	1 min a 90°C
	30°C/min hasta 225°C
	45°C/min hasta 300°C
	25°C/min hasta 325°C
Duración del cromatograma	48,17 min

Los resultados se procesaron con el Software Masshunter Workstation (Quantitative analysis for GC-MS, version B.04.00, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

El límite de detección para los PCBs fue de 0,33 ppb, mientras que para los insecticidas 0,05 ppb y para PBDEs 0,19 ppb.

### III.8. DETERMINACIÓN DE RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES

En 18 muestras de hígado y 50 de sangre (9 de adultos capturados entre 2008 y 2010 y 41 de pollos nacidos entre 2008 y 2010) de Búho real se evaluó la exposición a los cinco rodenticidas anticoagulantes más frecuentemente utilizados en la zona de estudio (warfarina, clorofacinona, bromadiolona, difenacoum y brodifacoum).



### **Procedimiento analítico**

#### Material:

Previamente a su utilización todo el material utilizado fue lavado con agua y jabón y aclarado, primero con agua destilada y seguidamente con acetona.

#### Reactivos:

En esta técnica el acetonitrilo (Lab-Scan<sup>®</sup>) de calidad análisis de residuos fue el único solvente utilizado. El ácido fórmico (Probus<sup>®</sup>) empleado para acidificar la muestra también cumplía los requisitos de calidad para análisis de residuos.

#### Procedimiento de extracción y purificación:

La extracción de rodenticidas anticoagulantes se realizó por extracción en fase sólida dispersiva mediante una modificación del método Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe), utilizando el kit proporcionado por la empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

Aproximadamente 2 g de sangre o hígado de Búho real fueron mezclados en un tubo con 2 ml de acetonitrilo por agitación, y homogeneizados utilizando un homogeneizador Heidolph DIAX 900 durante 3 minutos. A continuación, la mezcla se sometió a ultrasonidos (Labsonic<sup>®</sup>) durante 3-5 minutos y se añadió una combinación de 1,33 g de sulfato magnésico, 0,33 g cloruro sódico y 0,17 g citrato deshidratado. Esta mezcla de sales favorece la separación de la fase líquida y estabiliza los compuestos que se quieren analizar. La mezcla se agitó vigorosamente manualmente y, posteriormente, con el agitador de tubos. A continuación, el tubo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se mantuvo en congelación a -4°C durante, al menos, una hora. Transcurrido ese tiempo, con el fin de purificar el extracto, el sobrenadante del tubo se transfirió a otro de menor tamaño mezclándolo con 300 mg de sulfato magnésico, 50 mg de PSA y 50 mg de DSC-18 (Foto III.15). La mezcla se agitó de la misma forma que en el paso anterior y el tubo se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. Finalmente el sobrenadante se transfirió a un vial de cromatografía,



donde se evaporó a sequedad y se resuspendió en 1 ml de acetonitrilo acidificado con 10  $\mu$ l de ácido fórmico al 5% en acetonitrilo.



Foto III.15. Extractos purificados (P. Gómez-Ramírez)

Debido a la escasez de muestra de sangre de pollos, se realizó un homogeneizado de la obtenida de todos los hermanos del mismo nido, en la misma proporción, hasta conseguir 2 g de muestra.

#### Detección y cuantificación:

La detección y cuantificación de los cinco anticoagulantes más comúnmente utilizados en la zona se realizó por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas con trampa de iones (LC-MS/MS) (Agilent VL). La columna utilizada fue una Sunfire de Waters C8 de 150mm x 4,6 y 5 micras de tamaño de partícula y se mantuvo a 25° C. Para la fase móvil se prepararon (A) agua con acetato amónico 20 mM y (B) metanol con acetato amónico 20 mM. Se estableció un flujo de 0,8 ml/min y un gradiente en el que a t=0 min, la proporción de B era del 50% y a t=22 min la proporción de B era del 95%.

La ionización se realizó mediante electrospray en modo negativo, seleccionando los iones precursores y fragmentándolos en la trampa con flujo de Helio y en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).



El límite de detección para cada compuesto fue de 5 ppb, excepto para difenacoum (0,55 ppb).

### **Validación del método analítico**

Distintas técnicas han sido utilizadas para la determinación de las concentraciones de rodenticidas anticoagulantes en tejidos animales (Hunter, 1985; Jin *et al.*, 2007; Albert *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo método cuyas principales ventajas son el menor gasto de solventes y reactivos, además de la rapidez y sencillez del procesado de las muestras. Con el fin de validar dicho método, se llevaron a cabo las pertinentes pruebas de exactitud y precisión.

#### Exactitud del método:

Para comprobar la exactitud del método se realizó un estudio de recuperación de los rodenticidas en muestras iguales de sangre de perro enriquecida con una mezcla de los cinco rodenticidas anticoagulantes de interés (warfarina, clorofacinona, bromadiolona, difenacoum y brodifacoum). Para comprobar los residuos de estos compuestos en la sangre de perro se realizaron sus correspondientes ensayos control o blanco. Para obtener los porcentajes de recuperación, se prepararon 4 replicados de muestras fortificadas a 40 ppb antes de realizar la técnica. Una vez realizada la determinación analítica, los valores obtenidos fueron comparados con los de las disoluciones patrón utilizadas para la fortificación.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la fórmula:

$$\text{Recuperación (\%)} = (\text{Cm/Cp}) \times 100,$$

*donde*

Cm = la concentración de cada uno de los compuestos en la muestra

Cp = la concentración de cada compuesto en la disolución patrón.



La recuperación fue del 60% para la warfarina y difenacoum, 52% para clorofacinona, 63% para bromadiolona y 46% para brodifacoum.

#### Precisión del método:

La repetibilidad se estudia para comprobar que un método es capaz de dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio cuando se repite el proceso de extracción para un mismo tipo de muestra. Permite determinar la concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo unas mismas condiciones experimentales, y por un mismo operador. Se evalúa mediante la obtención del coeficiente de variación (CV). Para conocer el valor de este parámetro se calculó el CV de 4 replicados de muestras fortificadas a 40 ppb. El criterio de aceptación fue que el CV obtenido entre las repeticiones a cada nivel de fortificación fuese  $\leq 20\%$ . La fórmula utilizada para su cálculo es:

$$\text{C.V.(\%)} = (\text{DE}/\text{Xm}) \times 100$$

*donde*

DE = desviación estándar de la serie de mediciones, cuya media es  $X_m$ .

La reproducibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo las mismas condiciones experimentales pero a distinto tiempo o por distintos operadores, ya que puede suponerse que, a lo largo del tiempo, ha podido haber cambios en material o instrumentación que afectarán al resultado de los análisis. Para este cálculo, se analizaron en diferentes tiempos cuatro muestras iguales de sangre fortificada con la mezcla de rodenticidas a una concentración de 40 ppb. Se aceptó la reproducibilidad intra-laboratorio como válida cuando el CV fue  $\leq 20\%$ .

Los coeficientes de variación para ambos parámetros y cada rodenticida fueron del 7% para la warfarina y la bromadiolona, 8% para brodifacoum y del 14% para clorofacinona y difenacoum.





### III.9. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO SANGUÍNEO

El análisis de albúmina, calcio, fósforo, aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL), colesterol, triglicéridos (TGL), creatin quinasa (CK), Gamma-glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ -GT), glucosa, lactato deshidrogenasa (LDH), proteínas totales (PT) y ácido úrico fue realizado mediante un autoanalizador espectrofotométrico (A25 de Atom®, foto III.16) en 485 muestras de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2009 y 18 adultos (9 machos y 9 hembras) capturados entre 2007 y 2009. Los reactivos utilizados fueron de la marca Biosystem.



Foto III.16. Autoanalizador A25 de Atom®

El A25® es un analizador automático, fabricado por BioSystems (Barcelona, España), de acceso aleatorio y continuo, diseñado para realizar mediciones basadas en la espectrometría de absorción molecular. El control del equipo se realiza *on line* desde un ordenador externo y mediante un software específico diseñado en entorno Windows®. El analizador prepara las reacciones con la ayuda de un brazo manipulador cartesiano de tres ejes (X, Y, Z), que soporta y desplaza una punta dosificadora termostaticada para la dispensación de los reactivos y de las muestras. La dosificación se realiza mediante una bomba de pistón cerámico de bajo mantenimiento. Las



reacciones tienen lugar en un rotor termostatzado a 37°C en el que directamente se realizan las lecturas de absorbancia mediante un sistema óptico integrado.

### III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### ***Metales pesados en sangre e insecticidas organoclorados en sangre***

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows® (Ver 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

Según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, la distribución de las concentraciones de metales pesados y de los insecticidas organoclorados en sangre no es normal en nuestra población. Por tanto se utilizaron tests no paramétricos para la comparación de medias y el estudio de correlaciones entre parámetros (Kruskal-Wallis y Spearman, respectivamente). Con el fin de mejorar la significación estadística, los valores de plomo y la actividad  $\delta$ -ALAD en sangre se normalizaron mediante transformación logarítmica y posteriormente se correlacionaron aplicando el coeficiente de correlación de Pearson. El nivel de significación para todas las pruebas se estableció en  $\alpha=0,05$ .

La variabilidad espacio-temporal en las concentraciones de insecticidas en sangre de pollos se estudiaron mediante el programa estadístico R (Maindonald y Braun, 2002). Se siguió un enfoque de selección de modelos basado en criterios de la teoría de la información (Burnham y Anderson, 2002). Para ello se utilizaron modelos lineales y lineales mixtos considerando tres variables explicativas: Territorio, Año y Área (Tabla III.8). Las variable "Territorio" fue considerada efecto aleatorio, y las variables "Año" y "Subárea" efectos fijos. Las variables de respuesta correspondían a cada uno de los compuestos en las muestras de sangre.

Para cada una de las variables de respuesta, los modelos se compararon utilizando el criterio de información de Akaike, en su versión corregida:

$$AICc = -2(\ln \Lambda) + 2K + \frac{2K(K+1)}{n-K-1}$$



donde  $\Lambda$  es la función de verosimilitud,  $K$  es el número de parámetros del modelo, y  $n$  es el tamaño muestral. Los modelos se ordenaron en función de:

$$\Delta_i = \text{AICc}_i - \text{AICc}_{\min}$$

siendo  $\text{AICc}_i$  el valor de AICc del modelo  $i$ , y  $\text{AICc}_{\min}$  el mínimo valor de AICc de todos los modelos. Para evaluar la importancia relativa de un modelo se utilizaron los pesos de Akaike:

$$w_i = \frac{\exp\left[-\left(\frac{\Delta_i}{2}\right)\right]}{\sum \exp\left[-\left(\frac{\Delta_i}{2}\right)\right]}$$

Valores de  $w_i$  próximos a 1 evidencian que un determinado modelo representa, sin ambigüedad, el “mejor” modelo posible del conjunto de modelos seleccionados. La importancia relativa de las variables explicativas ( $w_+(j)$ ) se puede estimar como el sumatorio de los pesos de Akaike de aquellos modelos en los que aparece la variable

### **Compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados**

Los análisis descriptivos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows® (Ver 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

Las concentraciones de estos compuestos se calcularon en relación al contenido lipídico. Este tipo de referencia es bastante frecuente en el estudio de contaminantes lipofílicos, a diferencia de la basada en el peso húmedo o seco (van den Berg *et al.*, 1994). Sin embargo, para poder comparar con otros estudios, algunos datos se calcularon también en peso húmedo corregido para la pérdida de humedad siguiendo el método descrito por Hoyt (1979).

Puesto que las concentraciones de contaminantes no presentaron una distribución normal (teniendo en cuenta la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov) y algunos de los compuestos presentaron una elevada frecuencia de valores por debajo del límite de detección, a los que se asignó cero para el estudio estadístico,



los valores estadísticos resumidos se proporcionan como medianas. Las correspondientes medias, desviaciones estándar y rango se aportan con el fin de comparar con otros estudios.

Con el fin de evaluar las tendencias espacio-temporales de los compuestos organohalogenados, se calcularon las medias de concentraciones de cada puesta y se aplicaron modelos lineales generales (GLMs), aplicando una función de enlace logarítmica mediante el paquete estadístico GenStat<sup>®</sup>, versión 13.2 (VSN International, Hertfordshire, UK). La evaluación de las tendencias de los porcentajes de la fracción de PCBs metabolizables se analizaron usando modelos lineales logarítmicos.

El nivel de significación para todas las pruebas se estableció en  $\alpha=0,05$ .

### ***Rodenticidas anticoagulantes***

El análisis estadístico se realizó utilizando la versión 15.0 del paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., 1989-1999). Según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov la distribución de las concentraciones de rodenticidas no es normal, por lo que los tests de comparación de medias y las correlaciones entre parámetros fueron no paramétricos (Kruskal-Wallis y Spearman, respectivamente).

El nivel de significación para todas las pruebas se estableció en  $\alpha=0,05$ .

### ***Parámetros bioquímicos***

El análisis estadístico para el estudio de los parámetros bioquímicos medidos en suero se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS<sup>®</sup> para Windows<sup>®</sup> (Ver 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

Según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov estos parámetros siguieron una distribución no normal, a excepción de los triglicéridos, la enzima lactato deshidrogenasa y el ácido úrico. Por tanto, la comparación de medias entre grupos de edad y sexo se realizó mediante el test T de Student para estos tres parámetros mientras que para el resto se aplicó el test de Kruskal-Wallis. El nivel de significación para todas las pruebas se estableció en  $\alpha=0,05$ .



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### **IV.1. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A METALES (Cd, Pb, Cu y Zn) EN SANGRE DE POLLOS DE BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA**

Debido a la ubicuidad de los metales en todos los compartimentos del medio, la exposición a estos elementos puede producirse incluso en zonas consideradas no contaminadas. En esas zonas, los animales suelen verse expuestos a bajas concentraciones de forma continuada. Como consecuencia de la capacidad de bioacumulación de los metales, en algún momento de su vida, los individuos pueden llegar a presentar niveles capaces de producir efectos subletales. A diferencia de las intoxicaciones agudas por dosis elevadas, los efectos asociados a este tipo de exposición son menos conocidos (Martínez-López *et al.*, 2004).

La medición de metales en sangre ha sido utilizada con éxito para evaluar el grado de exposición reciente en aves (García-Fernández *et al.*, 1995, 1996, 1997; Martínez-López *et al.*, 2004, 2005). Por este motivo, y con el fin de estudiar los posibles riesgos asociados a la exposición a metales pesados, se analizaron los niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en sangre de pollos de Búho real nacidos en el Sureste de España entre 2003 y 2007, así como su relación con posibles fuentes de contaminación asociadas. Cabe mencionar que los niveles de cobre y zinc de un individuo fueron extremadamente altos en comparación con el resto de la población (2063,33 y 2689,26 µg/dL respectivamente), por lo que fueron excluidos de los análisis estadísticos.

##### **IV.1.1. Evaluación de las concentraciones de metales en sangre de pollos de Búho real**

De los cuatro metales estudiados, el cadmio fue el detectado con menor frecuencia (35%), con una media para el conjunto de la población de  $0,107 \pm 0,26$  µg/dL (Tabla IV.1). Aunque aún no se han establecido niveles de referencia para aves no expuestas a cadmio (Martínez-López *et al.*, 2005) estos resultados son similares, o incluso inferiores, a los encontrados en rapaces de zonas no contaminadas (Henny *et al.*, 1994; García-Fernández *et al.*, 1996; Martínez-López *et al.*, 2005; Tabla II.12) y se encuentran dentro del rango de los niveles considerados por García-Fernández *et al.* (1996) para aves expuestas a bajas concentraciones. Tampoco se ha establecido un umbral de toxicidad para cadmio en sangre en aves, pero si que se ha descrito la aparición de efectos adversos asociados a concentraciones tan bajas como 1,7 µg/dL de cadmio en sangre de faisanes (Świergosz y Kowalska, 2000). Sin embargo estos



niveles sólo fueron superados por un individuo de nuestro estudio y además, según Blanco *et al.* (2004) y Baos *et al.* (2006) los niveles que presentan los individuos de nuestra población no se han relacionado con alteraciones del sistema inmune.

En el mismo sentido, los niveles medios de plomo en sangre del conjunto de la población ( $3,73 \pm 4,2$   $\mu\text{g/dL}$ ; Tabla IV.1) pueden considerarse dentro del rango establecido para aves no expuestas (Scheuhammer, 1989; Henny *et al.*, 1991; García-Fernández *et al.*, 1997; Martínez-López *et al.*, 2004), y similar a los niveles encontrados en varias especies de rapaces que habitan zonas no contaminadas (Henny *et al.*, 1994; Martínez-López *et al.*, 2004; McBride *et al.*, 2004). Sin embargo, aproximadamente un 10% de las muestras presentaron niveles de plomo por encima de  $10$   $\mu\text{g/dL}$ , siendo en 8 individuos (3,6%) próximos o superiores a  $15$   $\mu\text{g/dL}$ . Siguiendo los criterios descritos por Scheuhammer (1989), estos 8 pollos podrían estar expuestos a niveles inusuales de plomo.

Los niveles medios de los dos metales esenciales para el conjunto de la población fueron  $33,70 \pm 84,04$   $\mu\text{g/dL}$  para el cobre y  $349,46 \pm 150,36$   $\mu\text{g/dL}$  para el zinc (Tabla IV.1). Estos niveles están dentro del rango encontrado en aves sanas (Osofsky *et al.*, 2001; García-Fernández *et al.*, 2005b). Sin embargo, aproximadamente el 50% de los individuos presentaron niveles de zinc en sangre superiores a ese rango ( $125$ - $313$   $\mu\text{g/dL}$ ), encontrándose en once individuos niveles dentro del rango correspondiente a aves intoxicadas ( $640$ - $3200$   $\mu\text{g/dL}$ ) (Zdziarski *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 2004; Sileo *et al.*, 2004). No obstante, solo tres individuos presentaban niveles de zinc en sangre superiores a los encontrados en otros pollos de rapaces de vida libre (Blanco *et al.*, 2003; Baos *et al.*, 2006; Rattner *et al.*, 2008). Por otro lado, la mayoría de las animales regulan los niveles de zinc en su organismo de forma efectiva y son capaces de tolerar un exceso de zinc en la dieta (Ewan, 1978; Sileo *et al.*, 2004), por lo que altas concentraciones de este metal no son alarmantes desde el punto de vista toxicológico (Goede, 1985). En relación al cobre, aproximadamente el 9% de los individuos de nuestro estudio presentaron niveles superiores a los máximos encontrados en otros pollos de rapaces (Benito *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003; Rattner *et al.*, 2008). No obstante, los niveles en sangre relacionados con la intoxicación por cobre son desconocidos y la bibliografía relacionada con los niveles de base es escasa. Por otro lado, a pesar de la capacidad de regulación y la necesidad del organismo para su normal funcionamiento, se debe tener en cuenta que niveles excesivos de estos elementos pueden representar un estrés añadido para



aquellos individuos que ya estén sometidos a condiciones estresantes (Pérez-López *et al.*, 2008), como es el caso de los animales en crecimiento.

Tabla IV.1. Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el conjunto de la población en el área contaminada y no contaminada. Datos expresados en Mediana; Media $\pm$ DE (Rango),  $\mu\text{g/dL}$  en peso húmedo

	Conjunto población (n=220)	Área contaminada (AM) (n=22)	Área no contaminada (n=198)
<b>Cadmio</b>	ND; 0,107 $\pm$ 0,26 (ND-2,34)	ND; 0,084 $\pm$ 0,15 (ND-0,56)	ND; 0,11 $\pm$ 0,27 (ND-2,34)
<b>Plomo</b>	2,35; 3,66 $\pm$ 4,18 (ND-25,61)	7,42; 8,61 $\pm$ 6,76 0,49-25,61	2,09; 3,11 $\pm$ 3,39 ND-18,37
<b>Cobre</b>	14,28; 33,70 $\pm$ 84,04 (1,58-749,69) (n=219)	13,04; 45,6 $\pm$ 137,94 (2,65-660,82)	14,38; 32,37 $\pm$ 76,15 (1,58-749,69) (n=197)
<b>Zinc</b>	328,86; 349,46 $\pm$ 150,36 (50,95-1035,32) (n=219)	308,31; 327,47 $\pm$ 158,71 (116,41-823)	333,46; 351,92 $\pm$ 149,63 (50,95-1035,32) (n=197)

#### IV.1.2. Evaluación de la exposición a metales en una zona contaminada por una antigua explotación minera

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el área de estudio se dividió en dos subáreas. Cuando se compararon los niveles medios de plomo en sangre de pollos entre estas dos subáreas (3,05 $\pm$ 3,4  $\mu\text{g/dL}$  en la Norte y 6,5 $\pm$ 5,9  $\mu\text{g/dL}$  en la Sur) se evidenciaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). En la subárea Sur el 10% de los nidos se encuentran en una antigua explotación minera y sus alrededores, en la





“Sierra Minera Cartagena-La Unión” (Figura IV.1). En estas minas las extracciones de metales como el plomo, zinc, cobre, hierro, estaño, manganeso y plata se han llevado a cabo durante más de 2500 años (Pavetti *et al.*, 2006), llegando a ser el principal suministro de plomo y zinc de España durante el siglo XIX (Estevan-Senís, 1967). Según Martínez-Sánchez y Pérez-Sirvent (2009), los niveles de metales pesados en los suelos de la zona, son muy elevados, pudiendo sobrepasar en algunos puntos los 1000 mg/kg de plomo en suelo, valores que superan los límites permitidos en varios países (Pavetti *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta además que en algunos puntos los suelos son ácidos, hecho que favorece una alta biodisponibilidad de estos metales, especialmente después de las lluvias, ya que la oxidación de la pirita transforma los sulfuros en sulfatos causando solubilización de los metales pesados y un aumento de la contaminación derivada de la lixiviación (Pavetti *et al.*, 2006).

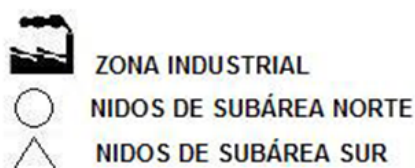


Figura IV.1. Área de muestreo para la evaluación de la exposición a metales pesados en pollos de Búho real. La línea de puntos delimita las subáreas Norte y Sur. El segmento verde enmarca la zona correspondiente a la antigua explotación minera y su área de influencia.

Las emisiones de metales pesados debidas a las actividades mineras para la obtención de metales y minerales suponen una importante fuente de contaminación



ambiental y numerosos estudios describen niveles de metales pesados más elevados en los animales que habitan zonas mineras que en los de zonas no contaminadas o de referencia (Beyer *et al.*, 1985, 2004; Eisler, 2000; Henny *et al.*, 1994, 2003; García-Fernández *et al.*, 2005c). De hecho, en nuestro estudio, cuando se excluyeron las muestras obtenidas en la antigua zona minera y su área de influencia (AM), la media del conjunto de la población resultó en  $3,11 \pm 3,39 \mu\text{g/dL}$  (Tabla IV.1), un valor significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que la media de la AM ( $8,61 \pm 6,76 \mu\text{g/dL}$ ) (Figura IV.2), y muy similar al encontrado en sangre de pollos de Aguililla calzada y Busardo ratonero nacidos en una zona no contaminada de la Región de Murcia (Martínez-López *et al.*, 2004; Tabla II.11). Además, los valores medios de plomo en sangre de los pollos nacidos en la AM (Tabla IV.1) fueron significativamente más elevados que los del resto de la subárea Sur ( $p = 0,013$ ). En comparación con otros estudios sobre metales pesados en pollos de rapaces de zonas contaminadas, los niveles en sangre de los pollos nacidos en la AM son superiores a los de pollos de Búho americano nacidos a lo largo del cauce de un río contaminado por una antigua zona minera (Henny *et al.*, 1994), pero casi idénticos a los encontrados en pollos de Milano negro nacidos cerca de una incineradora de residuos sólidos en Madrid (Blanco *et al.*, 2003).

Según Franson y Pain (2011), concentraciones de plomo inferiores a  $20 \mu\text{g/dL}$  son considerados como niveles de fondo en Falconiformes, mientras que concentraciones superiores a este límite pueden sugerir la exposición por la ingesta de presas contaminadas o de fragmentos de plomo incrustados en la carne o huesos de las presas capturadas por las aves rapaces (Mateo *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 2004; García-Fernández *et al.*, 2005a). En nuestro estudio, dos muestras superaron este límite, las cuales se obtuvieron de pollos nacidos en la AM. La ingestión de fragmentos de plomo es una fuente poco probable de contaminación en la población estudiada ya que la caza está prohibida durante la época de cría en la zona (Orden de 11 de junio de 2008). Sin embargo, es posible que las aves que se alimentan durante largos periodos de tiempo en zonas altamente contaminadas por plomo, como son las minas de metales, puedan sufrir exposiciones elevadas a este metal sin ingerir fragmentos de perdigones de plomo (Benson *et al.*, 1976). Teniendo en cuenta que el 22% de los pollos nacidos en la zona contaminada por las antiguas minas presentaron niveles de plomo por encima de los  $15 \mu\text{g/dL}$ , se puede sugerir que se debería hacer un mayor esfuerzo para monitorizar esta zona, con el fin de evaluar los riesgos asociados en los individuos que pueden estar expuestos durante toda su vida.

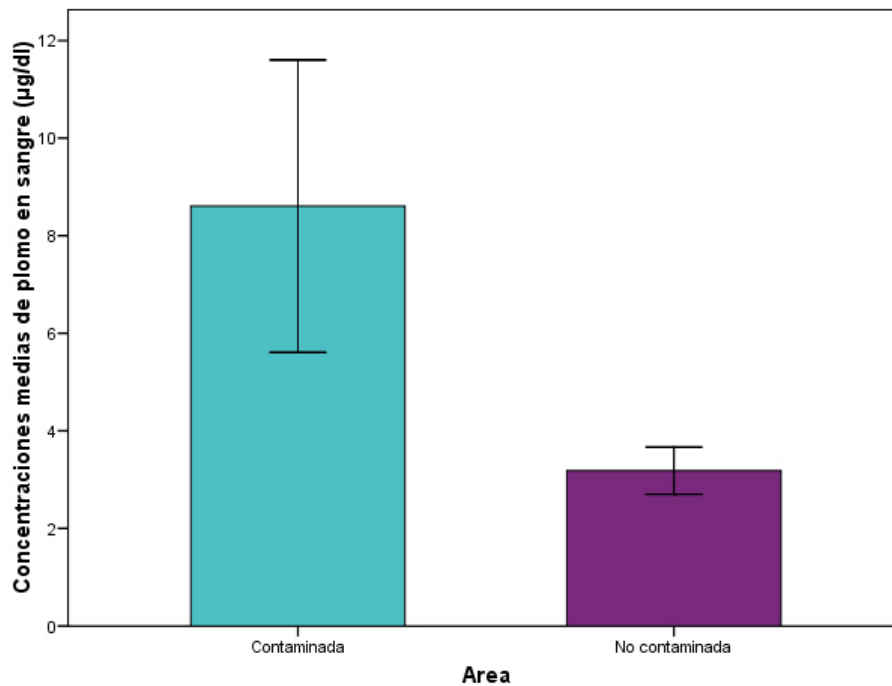


Figura IV.2. Concentraciones medias de plomo en sangre ( $\mu\text{g/dL}$ ) de la zona contaminada (Antigua Zona Minera y su área de influencia) y la zona no contaminada (IC: 95%) ( $p < 0,001$ )

En base a estos resultados podemos considerar que, para el caso concreto de los metales pesados, el área de estudio se puede dividir en dos áreas: la zona contaminada por metales pesados, correspondiente a la antigua zona minera y su área de influencia (AM) y la zona no contaminada que incluye el resto de la zona de estudio.

No obstante, al contrario que en el caso del plomo, la comparación de los niveles de cadmio, zinc y cobre en sangre de los pollos nacidos en la zona AM con los del resto de la población no ofreció diferencias significativas. Además la media de las concentraciones de cadmio fue más alta en la zona no contaminada que en la AM (Tabla IV.1). Estos resultados coinciden con los encontrados en otros estudios en rapaces de vida libre que habitan tanto zonas contaminadas como no contaminadas por metales (Benito *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003; Baos *et al.*, 2006; Rattner *et al.*, 2008; Stout *et al.*, 2010). Dado que los metales esenciales pueden ser regulados por el metabolismo, los incrementos en sus niveles no están directamente relacionados con



su biodisponibilidad, lo que dificulta la capacidad para detectar las variaciones en los niveles medioambientales (Walsh, 1990; Wenzel *et al.*, 1996).

Las actividades industriales pueden suponer otra importante fuente de contaminación por metales, que en nuestra zona de estudio deben ser consideradas por la proximidad de algunos nidos a Cartagena, una importante ciudad industrial, y Murcia, la capital de la Región de Murcia, donde la actividad industrial también tiene cierta importancia. Sin embargo, los niveles de metales en los individuos estudiados en el presente trabajo no parecen estar influidos por este tipo de contaminación, ya que no se han encontrado correlaciones significativas entre los niveles de metales y la distancia a ambas ciudades. La falta de correlación entre los niveles de cadmio, zinc y cobre en sangre y la proximidad a las posibles fuentes de contaminación se ha observado en estudios previos en pollos de Milano negro nacidos cerca de una incineradora (Blanco *et al.*, 2003) y en Carbonero común (*Parus major*) de los alrededores de una fundición (Vanparys *et al.*, 2008), aunque en ambos estudios el plomo sí que se relacionó con las respectivas fuentes de contaminación posibles.

#### IV.1.3. Correlaciones entre metales

Las correlaciones entre metales son a menudo debidas a la existencia de rutas metabólicas comunes en las que intervienen determinadas proteínas de unión como las metalotioneínas (Roesijadi, 1992; Wenzel *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2003). Sin embargo es escasa la bibliografía respecto a las posibles relaciones entre distintos metales en sangre de aves (Blanco *et al.*, 2003), aunque son más frecuentes los estudios que las realizan analizando órganos internos (Wenzel *et al.*, 1996; Debacker *et al.*, 2001; Ek *et al.*, 2004).

En nuestro estudio las correlaciones entre el cadmio y los metales esenciales fueron significativas y positivas (cadmio-cobre:  $Rho=0,16$ ,  $p=0,02$ ; cadmio-zinc:  $Rho=0,15$ ,  $p=0,03$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por Blanco *et al.* (2003) en pollos de Milano negro nacidos cerca de una incineradora. Según estos autores las correlaciones del cadmio con el zinc y cobre podrían sugerir que los dos metales esenciales están involucrados en los procesos de detoxificación del cadmio del organismo, los cuales estarían mediados por la inducción a metalotioneínas. También coincidiendo con Blanco *et al.* (2003), la correlación más fuerte en nuestro estudio fue la encontrada entre los dos metales esenciales ( $Rho=0,27$ ,  $p<0,001$ ), lo que sugiere la existencia de un patrón común regulador de metabolismo que puede



depender de factores fisiológicos, como la condición general del individuo (Debacker *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2003). La correlación significativa encontrada entre plomo y cobre ( $Rho=0,218$ ,  $p=0,001$ ) se atribuye al hecho de que el plomo puede inducir un aumento de proteínas de unión a otros metales esenciales como las protoporfirinas y metalotioneínas (Elliott *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1996).

Por otro lado, coincidiendo con estudios previos en sangre de pollos de Aguililla calzada (Martínez-López, 2005), se encontró una correlación significativa entre los niveles de cadmio y plomo en la sangre de los pollos de Búho real de nuestro estudio ( $Rho=0,145$ ,  $p=0,03$ ). Sin embargo, mientras que en dicho estudio cadmio y plomo se encontraron en una proporción 1:10, en las muestras de Búho real de la zona no contaminada la proporción fue 1:30. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la distinta capacidad de acumulación en el interior de los eritrocitos en las distintas especies de aves, descrita por Hernández-García (2010) en estudios de exposición a metales pesados *in vitro*.

#### **IV.1.4. Inhibición de la actividad $\delta$ -ALAD en pollos de Búho real nacidos en una antigua zona minera**

El plomo es un potente inhibidor de la actividad de varias enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo, entre las que se encuentran la  $\delta$ -ALAD, la ferroquelatasa, la coproporfirinógeno oxidasa (Warren *et al.*, 1998; Onalaja y Claudio, 2000) y la hemo sintetasa. El grupo hemo se incorpora a la hemoglobina y a citocromos mitocondriales formando parte del citocromo P-450 necesario en algunos procesos de detoxificación del hígado (Sassa *et al.*, 1975; Dieter y Finley, 1979). Dado que la inhibición de la actividad de la enzima  $\delta$ -ALAD es mayor que para el resto de enzimas y además es el primer cambio bioquímico cuantificable que se produce tras la absorción del plomo (Tola *et al.*, 1973), se considera un biomarcador sensible de exposición y efecto en aves (Dieter *et al.*, 1976; Scheuhammer 1987a, b). En función de las concentraciones de plomo presentes en el organismo esta inhibición puede persistir durante semanas o meses tras la exposición (Dieter y Finley, 1978; Pain, 1987)

Los efectos de la inhibición de la  $\delta$ -ALAD en aves pueden ser más severos que en mamíferos, ya que los glóbulos rojos nucleados de las aves son metabólicamente más activos y requieren la síntesis de las porfirinas, no sólo para la formación de la hemoglobina, sino también para las enzimas que contienen el grupo hemo (Brace y



Atland, 1956; Allen, 1971). Además, como consecuencia de la inhibición enzimática se produce una acumulación del sustrato de esta enzima, el ácido aminolevulínico (ALA), que causa un efecto neurológico al actuar como un receptor GABA agonista del sistema nervioso (Brennan y Cantril, 1979). Otro efecto de la acumulación del ALA es la estimulación de especies reactivas de oxígeno (Bechara, 1996) que producen peroxidación de las membranas de los eritrocitos y consecuentemente hemólisis (Lawton y Donaldson, 1991), contribuyendo así a la anemia causada por la inhibición de la  $\delta$ -ALAD.

En 218 muestras de sangre de pollos de Búho real de nuestra población los valores de actividad de esta enzima oscilaron entre 3,98 y 661,12  $\mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ , con una media de  $155,67 \pm 116,33 \mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ . Teniendo en cuenta las diferencias observadas en niveles de plomo sanguíneos entre la zona contaminada (AM) y no contaminada, cabría esperar también las diferencias encontradas respecto a los niveles de  $\delta$ -ALAD ( $65,17 \pm 50,19$  y  $165,83 \pm 117,31 \mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ , respectivamente), hecho observado en estudios similares (Henny *et al.*, 1994; McBride *et al.*, 2004).

Aunque se desconocen los valores de referencia de actividad  $\delta$ -ALAD en pollos de Búho real, la existencia de correlaciones negativas con los niveles de plomo en sangre puede ser suficiente para indicar la existencia de posibles efectos subletales. Este tipo de correlación se observó en nuestro estudio de forma significativa ( $P = -0,137$ ,  $p = 0,044$ ) (Figura IV.3), sobre todo cuando los niveles de plomo en sangre superaron los  $4 \mu\text{g/dL}$  ( $P = -0,341$ ,  $p = 0,006$ ).

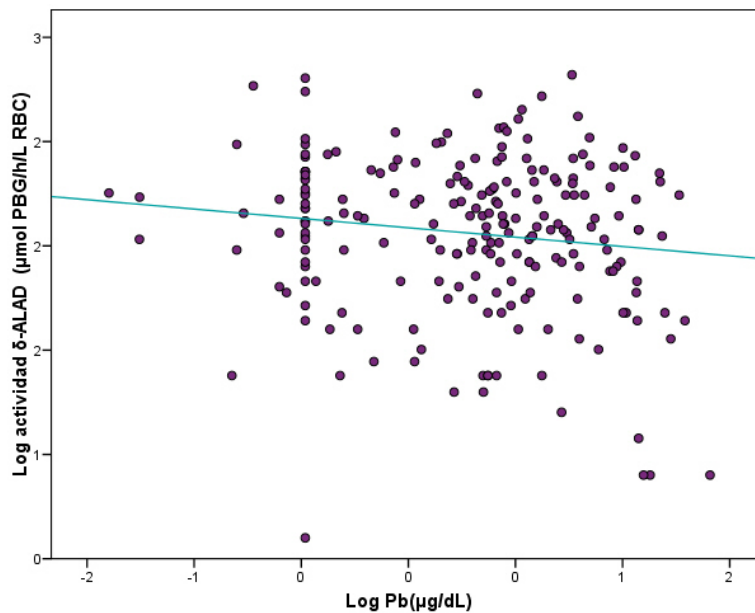


Figura IV.3. Relación entre niveles de plomo en sangre ( $\mu\text{g/dL}$ ) y actividad  $\delta$ -ALAD ( $\mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ ) en sangre de pollos de Búho real ( $P=-0,137$ ,  $p=0,044$ )

Esta correlación es indicativa de una inhibición enzimática, la cual llega a ser del 55% cuando las concentraciones de plomo en sangre exceden los  $15 \mu\text{g/dL}$ . Sin embargo, tal y como se muestra en la Figura IV.3, la inhibición de la enzima también se produce por exposición a inferiores niveles de plomo, incluso por debajo del límite establecido por Henny *et al.* (1994) para Cernícalos americanos y por Martínez-López *et al.* (2004) en Aguililla calzada, Busardo ratonero y Azor (*Accipiter gentilis*). Cabe destacar, además, que niveles de plomo en sangre superiores a  $10 \mu\text{g/dL}$  causaron un 31% de inhibición enzimática. Además, cuando se compararon las zonas de muestreo se observó que el grado de actividad enzimática era un 60% menor en la zona contaminada que en la zona no contaminada.

Dado que la inhibición enzimática causada por el plomo puede diferir entre especies, la edad e incluso el estado fisiológico, la patología asociada a dicha inhibición puede ser también diferente. En este sentido Beyer *et al.* (1988) encontraron diferente grado de inhibición de la  $\delta$ -ALAD por plomo en seis especies de aves diferentes. Por otro lado, Hoffman *et al.* (1985a) observaron que el plomo es considerablemente más tóxico en pollos de especies altriciales como el Cernícalo americano que en pollos de especies precociales como las codornices, los ánades o los faisanes. Así, mientras que las aves precociales necesitan una inhibición continuada del 80% o mayor de la  $\delta$ -ALAD en sangre para que disminuya la



hemoglobina tras la exposición a plomo (Hoffman *et al.*, 1981; Franson y Custer, 1982; Eastin *et al.*, 1983; Pain y Rattner, 1988), en pollos de Cernícalos americanos un 45-59% puede ser suficiente para producir anemia por una disminución importante de la hemoglobina y el valor hematocrito (Hoffman *et al.*, 1985b; Henny *et al.*, 1994). Estas diferencias interespecíficas en relación a la inhibición de la enzima  $\delta$ -ALAD y la anemia que produce (Franson *et al.*, 1983) se han encontrado incluso entre especies de aves rapaces. En base a todos estos estudios, es posible que algunos individuos de nuestra población puedan sufrir anemia por inhibición de  $\delta$ -ALAD por plomo.

## **IV.2. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS EN SANGRE DE POLLOS DE BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA**

En la especie humana, el estudio de la carga de organoclorados en sangre se ha revelado como un indicador válido de la carga total corporal (Radomski *et al.*, 1971) y de la carga en tejido graso (Stellman *et al.*, 1998; Botella *et al.*, 2004). Aunque la bibliografía relacionada en aves de vida libre es escasa (Martínez-López *et al.*, 2009), distintos autores han demostrado la utilidad de la sangre de rapaces en la biomonitorización de insecticidas organoclorados (Donaldson *et al.*, 1999; Martínez-López *et al.*, 2009). Además este tipo de muestras se ha sugerido como una herramienta útil para evaluar y monitorizar los resultados de la aplicación de medidas restrictivas (Martínez-López *et al.*, 2009).

### **IV.2.1. Niveles de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real**

En general, la frecuencia de detección de los insecticidas organoclorados analizados en 316 muestras de sangre de pollos nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España ha sido baja para el conjunto de la población (<20%), siendo el p,p'-DDE, el lindano y la suma de endosulfán I y II los compuestos más frecuentes (Tabla IV.2). No obstante, estas frecuencias son mayores en los primeros años de estudio, sobre todo para algunos insecticidas como el lindano (Tabla IV.2).





Tabla IV.2. Frecuencia de detección de los insecticidas organoclorados analizados en 316 muestras de sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España

	2003 (n=17)	2004 (n=50)	2005 (n=71)	2006 (n=76)	2007 (n=102)	Total población (n=316)
<b><math>\alpha</math>-HCH</b>	23%	42%	15%	1,6%	ND	11,7%
<b><math>\beta</math>-HCH</b>	5,9%	2%	ND	ND	ND	0,6%
<b>Lindano</b>	94%	48%	8,5%	2,6%	1%	15,8%
<b><math>\delta</math>-HCH</b>	ND	2%	1,4%	ND	ND	0,6%
<b><math>\Sigma</math>HCH</b>	94%	60%	18%	3,94%	1%	20,6%
<b>Aldrin</b>	1,26%	20%	ND	ND	1%	4,7%
<b>Dieldrin</b>	35%	18%	1,4%	10,5%	ND	7,6%
<b>Endrin</b>	17,6%	28%	ND	ND	1%	5,7%
<b>Heptacloro</b>	47%	18%	ND	4%	4%	7,6%
<b>Heptacloro epóxido</b>	71%	26%	ND	ND	ND	8%
<b><math>\Sigma</math> Endosulfán I y II</b>	80%	1,4%	1,4%	1,3%	ND	18,7%
<b><math>\Sigma</math>Ciclodiénicos</b>	99,68%	90%	2,8%	10,5%	5 %	24%
<b>p,p'-DDT</b>	11,7%	30%	1,4%	ND	ND	5,7%
<b>p,p'-DDD</b>	24%	18%	ND	ND	ND	4%
<b>p,p'-DDE</b>	64,7%	62%	8,45%	4%	ND	16%
<b><math>\Sigma</math>Difenilifáticos</b>	70%	70%	9,8%	4%	ND	18%
<b>Total insecticidas</b>	94%	96%	28%	12%	6%	31,3%

Dieldrin, la suma de endosulfán I y II, lindano y los difenilifáticos son los compuestos detectados en mayores concentraciones, sobre todo en los primeros años de estudio (Tablas IV.3, IV.4, IV.5 y IV.6).



Tabla IV.3. Concentraciones de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España (Mediana; media  $\pm$  DE, mínimo (Nº no detectados)-máximo en  $\mu\text{g/L}$  peso húmedo)

	2003 (n=17)	2004 (n=50)	2005 (n=71)	2006 (n=76)	2007 (n=102)	Total población (n=316)
$\Sigma$ HCH	1,82; 2,99 $\pm$ 3,45 ND(1)-10,91	0,80 4,46 $\pm$ 13,89 ND(18)-68,46	ND; 1,09 $\pm$ 3,85 ND(58)-22,55	ND; 0,32 $\pm$ 2,48 ND(73)-21,55	1,68 (1 detectado)	ND; 1,20 $\pm$ 6,16 ND(251)-68,46
$\Sigma$ Ciclodiénicos	19,20; 58,66 $\pm$ 100,05 ND(1)-418,08	6,88 19,84 $\pm$ 36,74 ND(5)-178,09	ND; 2,80 $\pm$ 16,55 ND(69)- 102,23	ND; 11,45 $\pm$ 41,72 ND(68)- 251,16	ND; 0,48 $\pm$ 2,65 ND(97)-20,59	ND; 9,83 $\pm$ 37,19 ND(240)-418,08
$\Sigma$ Difenilifáticos	0,80; 5,40 $\pm$ 12,03 ND(5)-37,27	0,92 2,68 $\pm$ 3,59 ND(15)-14,79	ND; 7,07 $\pm$ 25,18 ND(64)- 159,86	ND; 1,43 $\pm$ 8,21 ND(73)-58,88	ND	ND; 2,65 $\pm$ 13,18 ND(259)-159,86
<b>Total insecticidas</b>	23,28; 66,59 $\pm$ 104,2 ND(1)-421,15	12,46 26,98 $\pm$ 51,03 ND(2)-247,37	ND; 10,96 $\pm$ 29,43 ND(51)- 159,86	ND; 13,20 $\pm$ 49,45 ND(67)- 310,04	ND; 0,50 $\pm$ 2,65 ND(96)-0,59	ND; 13,45 $\pm$ 44,31 ND(217)-421,15

### Hexaclorociclohexanos

Coincidiendo con los resultados encontrados en sangre de pollos de Aguililla calzada del Sureste de España (Martínez-López *et al.*, 2009), el lindano se detectó con mayor frecuencia y en concentraciones más altas que el resto del grupo (Tabla IV.4). El lindano es el insecticida del grupo de HCHs de más reciente prohibición (Decisión 2000/801/EC), por lo que, a pesar de la menor persistencia que el resto de isómeros analizados, la detección de sus residuos en sangre de pollos de Búho real en mayores concentraciones no es sorprendente. Además, según el Reglamento (CE) 850/2004, el lindano ha podido ser utilizado en España hasta Noviembre de 2006 para el tratamiento correctivo profesional e industrial de árboles talados, madera y troncos o en aplicaciones industriales y domésticas en interiores; y hasta el 31 de Diciembre de 2007 como insecticida tópico veterinario y para la salud pública. Este tipo de



aplicaciones podrían ser la causa de la presencia de residuos de lindano en la sangre de los pollos estudiados.

Por el contrario los niveles de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  son muy inferiores a los detectados en sangre de buitres de África (van Wyk *et al.*, 2001) y de Azor y Busardo ratonero del Sureste de España (Martínez-López, 2005; Tabla II.1), donde el isómero  $\beta$  fue el más abundante. Nuestros resultados parecen estar en concordancia con el hecho de que el uso agrícola del HCH técnico fue prohibido en España en 1994 (Orden 4 de Febrero de 1994).

Tabla IV.4. Concentraciones de hexaclorociclohexanos en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España (Mediana; media  $\pm$  DE, mínimo (Nº no detectados)-máximo en  $\mu\text{g/L}$ , peso húmedo)

	2003 (n=17)	2004 (n=50)	2005 (n=71)	2006 (n=76)	2007 (n=102)	Total población (n=316)
<b><math>\alpha</math>-HCH</b>	ND; 0,96 $\pm$ 2,31 ND(13)-8,46	ND; 0,33 $\pm$ 0,55 ND(29)-2,68	ND; 0,52 $\pm$ 1,92 ND(60)-14,71	21,55 (1 detectado)	ND	ND; 0,29 $\pm$ 1,63 ND(279)-21,55
<b><math>\beta</math>-HCH</b>	ND; 0,05 $\pm$ 0,22 ND(16)-0,91	ND; 0,02 $\pm$ 0,11 ND(49)-0,81	ND	ND	ND	ND; 0,01 $\pm$ 0,07 ND(314)-0,91
<b>Lindano</b>	1,14; 1,98 $\pm$ 2,18 ND(1)-8,32	ND; 4,07 $\pm$ 13,83 ND(25)-8,46	ND; 0,27 $\pm$ 1,18 ND(65)-7,84	ND; 0,04 $\pm$ 0,29 ND(74)-2,50	1,68 (1 detectado)	ND; 0,83 $\pm$ 5,70 ND(266)-68,46
<b><math>\delta</math>-HCH</b>	ND	ND; 0,04 $\pm$ 0,29 ND(49)-2,02)	21,68 (1 detectado)	ND	ND	ND; 0,08 $\pm$ 1,22 ND(314)-21,68
<b><math>\Sigma</math>HCH</b>	1,82; 2,99 $\pm$ 3,45 ND(1)-10,91)	0,80 4,46 $\pm$ 13,89 ND(18)-68,46	ND; 1,09 $\pm$ 3,85 ND(58)-22,55	ND; 0,32 $\pm$ 2,48 ND(73)-21,55	1,68 (1 detectado)	ND; 1,20 $\pm$ 6,16 ND(251)-68,46



## Ciclodiénicos

El endosulfán es uno de los insecticidas de más reciente prohibición en España (Decisión 2005/864/EC), por lo que, a pesar de su baja persistencia en el organismo de los animales de sangre caliente (Wiemeyer, 1996), su detección era de esperar en nuestro estudio. De forma parecida al lindano, los niveles de endosulfán I y II en los pollos de Búho real nacidos en 2003 y 2004 (Tabla IV.5) son similares a los de pollos de Aguililla calzada nacidos entre 2001 y 2003 en la Región de Murcia (Martínez-López *et al.*, 2009; Tabla II.1).

En relación al dieldrin, se trata del segundo insecticida detectado en mayores concentraciones en el conjunto de la población estudiada (Tabla IV.5). Además, a pesar de que, al igual que la mayoría de los insecticidas organoclorados, el uso agrícola de dieldrin está prohibido desde 1994 en España (Orden 4 de Febrero de 1994), las concentraciones en algunas muestras son similares a las encontradas en la sangre de pollos de rapaces estudiados por Martínez-López (2005) (Rango=ND-93,63 µg/L; Tabla II.1), e incluso a las de adultos de Pigargo americano capturados en 1977 en EEUU (Rango=ND-80 µg/L; Henny *et al.*, 1981).

Tabla IV.5. Concentraciones de ciclodiénicos en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España (Mediana; media ± DE, mínimo (Nº no detectados)-máximo en µg/L peso húmedo)

	2003 (n=17)	2004 (n=50)	2005 (n=71)	2006 (n=76)	2007 (n=102)	Total población (n=316)
<b>Aldrin</b>	ND; 1,47±2,88 ND(13)-8,20	ND; 0,15±0,38 ND(40)- 2,22	ND	ND	5,56*	ND; 0,12±0,80 ND(301)-8,20
<b>Dieldrin</b>	ND; 0,96±1,66 ND(11)-5,25	ND; 2,88±10,66 ND(41)- 57,2	102,23*	ND; 10,97±39,96 ND(68)-46,50	ND	ND; 3,47±21,20 ND(292)-246,50
<b>Endrin</b>	ND; 1,44±3,86	ND; 0,39±0,74	ND	ND	3,08*	ND; 0,15±0,99



	ND(14)-12,03	ND(36)-2,9				ND(298)-12,03
<b>Heptacloro</b>	ND; 0,65±0,77 N(9)-2,23	ND; 0,82±2,80 ND(41)- 15,79	ND	ND; 0,37±2,04 ND(73)-14,85	ND; 0,39±2,37 ND(98)-7,5	ND; 0,38±2,03 ND(292)-17,51
<b>Heptacloro epóxido</b>	0,78; 2,14±2,95 ND(5)-8,79	ND; 0,25±0,75 ND(37)- 4,64	ND	ND	ND	ND; 0,16±0,87 ND(291)-8,79
<b>Endosulfán I</b>	8,63; 45,68±99,05 ND(1)-418,08	ND; 12,13±26,7 ND(26)- 118,75	96,34*	7,72*	ND	ND; 4,71±27,44 ND(274)-418,08
<b>Endosulfán II</b>	3,13; 5,86±8,14 ND(3)-31,51	1,07 1,94±3,06 ND(22)- 18,81	ND	ND	ND	ND;0,62±2,62 ND(274)-31,51
<b>∑ Endosulfán I y II</b>	16,41; 51,54±98,67 ND(2)-418,08	4,92 14,07±26,4 ND(10)- 118,75	96,34*	7,72*	ND	ND; 5,33±27,91 ND(257)-418,08
<b>∑Ciclodiénicos</b>	19,20; 58,66±100,05 ND(1)-418,08	6,88 19,84±36,7 ND(5)- 178,09	ND; 2,80±16, 55 ND(69)- 102,23	ND; 11,45±41,72 ND(68)- 251,16	ND; 0,48±2,65 ND(97)- 20,6	ND; 9,83±37,19 ND(240)-418,08

\* 1 detectado

### **Difenilalifáticos**

Al igual que en los huevos no eclosionados analizados en el presente estudio, el p,p'-DDE fue el difenilalifático más frecuente y abundante en las muestras de sangre. Este perfil coincide con el de distintas especies de aves carroñeras, tanto de África (van Wyk *et al.*, 2001) como de España (Gómara *et al.*, 2004). Por el contrario, en sangre de pollos de Azor, Busardo ratonero y Aguililla calzada nacidos entre 1999 y



2003 en el Sureste de España (Martínez-López, 2005; Martínez-López *et al.*, 2009; Tabla II.1), el p,p'-DDT y el p,p'-DDD se detectaron, a menudo, en mayores concentraciones. Sin embargo nuestros niveles de p,p'-DDE están dentro del mismo rango que los individuos de las tres especies mencionadas nacidos en el Sureste de España. Se trata de concentraciones muy inferiores a la media de 25,84 mg/kg de p,p'-DDE citada por Donaldson *et al.* (1999) en plasma de pollos de Pigargo americano de los Grandes Lagos y que no se asocian a problemas reproductivos.

Tabla IV.6. Concentraciones de difenilalifáticos en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España (Mediana; media  $\pm$  DE, mínimo (Nº no detectados)-máximo en  $\mu\text{g/L}$ , peso húmedo)

	2003 (n=17)	2004 (n=50)	2005 (n=71)	2006 (n=76)	2007 (n=102)	Total población (n=316)
<b>pp'-DDT</b>	ND; 1,24 $\pm$ 3,52 ND(15)-11,16	ND; 0,78 $\pm$ 1,59 ND(35)- 7,20	93,54 (1 detectado)	ND	ND	ND; 0,49 $\pm$ 5,36 ND(298)-93,54
<b>p,p'-DDD</b>	ND; 0,79 $\pm$ 2,25 ND(13)-9,14	ND; 0,46 $\pm$ 1,15 ND(41)- 5,15	ND	ND	ND	ND; 0,12 $\pm$ 0,72 ND(303)-9,14
<b>p,p'-DDE</b>	0,71; 3,36 $\pm$ 7,36 ND(6)-27,27	0,65 1,44 $\pm$ 2,08 ND(19)- 8,83	ND; 5,76 $\pm$ 22,93 ND(65)- 159,86	ND; 1,43 $\pm$ 8,21 ND(73)- 58,88	ND	ND; 2,05 $\pm$ 11,88 ND(265)-159,86
<b><math>\Sigma</math>Difenilalifáticos</b>	0,80; 5,40 $\pm$ 12,03 ND(5)-37,27	0,92 2,68 $\pm$ 3,59 ND(15)- 14,79	ND; 7,07 $\pm$ 25,18 ND(64)- 159,86	ND; 1,43 $\pm$ 8,21 ND(73)- 58,88	ND	ND; 2,65 $\pm$ 13,18 ND(259)-159,86



#### IV.2.2. Evolución espacio-temporal de los residuos de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real

En base al método de selección de modelos basada en la teoría de la selección descrita por Burnham y Anderson (2001), como resultado de la aplicación de los modelos lineales y lineales mixtos para cada una de las variables de respuesta (los 14 insecticidas organoclorados y la suma por grupos de compuestos), la variable explicativa “Año” sola o en combinación con otras aparecía en el mejor modelo (Tabla IV.7), excepto para el  $\delta$ -HCH. Por tanto se puede considerar que es la variable que más influye en los niveles de insecticidas en sangre de los pollos de Búho real estudiados. Esta variable explicativa fue también la mejor en el estudio realizado por Martínez-López (2005) en la Región de Murcia, en el que se analizaron los niveles de los mismos insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Busardo ratonero, Aguililla calzada y Azor.

Tabla IV.7. Importancia relativa de los factores (territorio, año y área) en los niveles de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real

Compuesto	Mejor modelo	wi	Importancia relativa (w+)		
			Territorio	Año	Subárea
$\alpha$ -HCH	Territorio + Año	0,549	0,800	1,000	0,254
$\beta$ -HCH	Año	0,405	0,236	0,696	0,261
Lindano	Territorio + Año	0,381	0,681	1,000	0,448
$\delta$ -HCH	Nulo	0,487	0,251	0,049	0,313
$\Sigma$ HCH	Territorio + Año	0,676	0,959	1,000	0,296
Aldrin	Año	0,448	0,405	1,000	0,243
Dieldrin	Territorio + Año	0,755	1,000	0,983	0,232
Endrin	Año	0,551	0,230	1,000	0,282
Heptacloro	Año	0,525	0,268	1,000	0,281
Heptacloro epóxido	Territorio + Año	0,632	0,869	1,000	0,274
EndosulfánI	Año	0,567	0,229	1,000	0,263
EndosulfánII	Año	0,589	0,230	1,000	0,235
$\Sigma$ Endosulfán	Año	0,587	0,230	1,000	0,237
$\Sigma$ Ciclodiénicos	Territorio + Año	0,750	1,000	1,000	0,250
p,p'-DDT	Territorio + Año	0,596	0,860	1,000	0,306
p,p'-DDD	Año	0,426	0,445	1,000	0,229
p,p'-DDE	Año	0,586	0,230	1,000	0,238
$\Sigma$ Difenilifáticos	Año	0,508	0,330	1,000	0,242
Total insecticidas	Territorio + Año	0,722	0,998	1,000	0,277



Para la comparación de medias de las concentraciones normalizadas se aplicaron modelos lineales mixtos, en los que la variable "Territorio" se consideró como factor aleatorio. Según estos modelos, los niveles de todos los insecticidas estudiados, excepto  $\delta$ -HCH, mostraron diferencias significativas entre años. Por el contrario, a diferencia de los niveles de organohalogenados en huevos, no se encontraron diferencias significativas entre subáreas.

Teniendo en cuenta las frecuencias de detección y eliminando los valores extremos encontrados en algunos compuestos, se observa que en general las concentraciones de insecticidas muestran una tendencia decreciente (Figuras IV.4, IV.5, IV.6, IV.7, IV.8 y IV.9). Este hecho parece lógico debido a que, tal y como se ha mencionado, la mayoría de estos insecticidas fueron prohibidos para uso agrícola en 1994 en España (Orden de 4 de Febrero de 1994). No obstante esta tendencia no se ha observado para el heptacloro, cuyas concentraciones se mantienen estables (Figura IV.5).

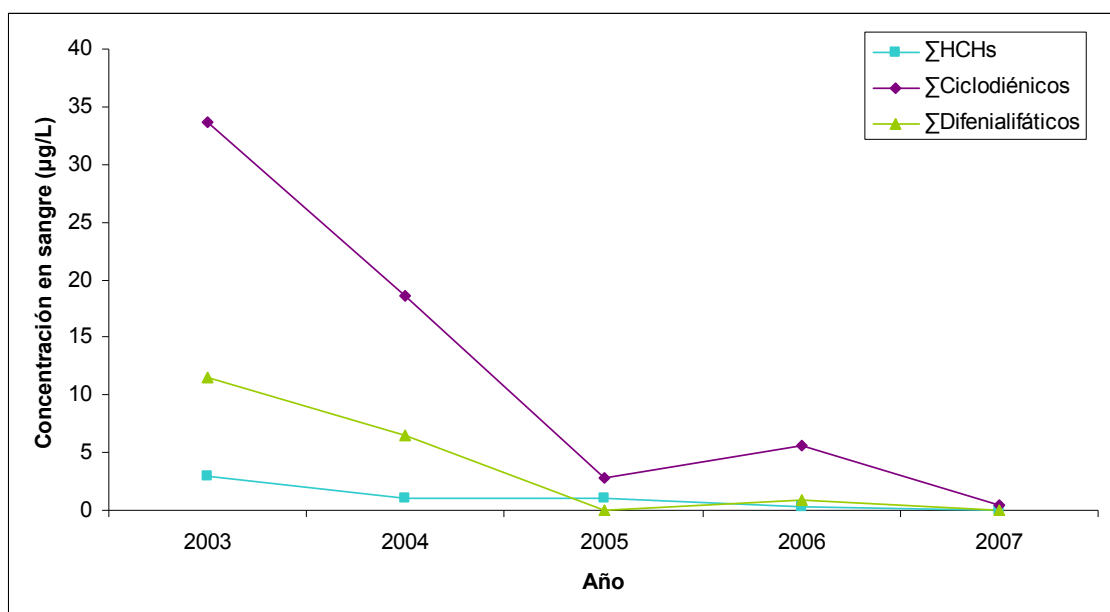


Figura IV.4. Evolución de concentraciones de insecticidas en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España por grupos de compuestos



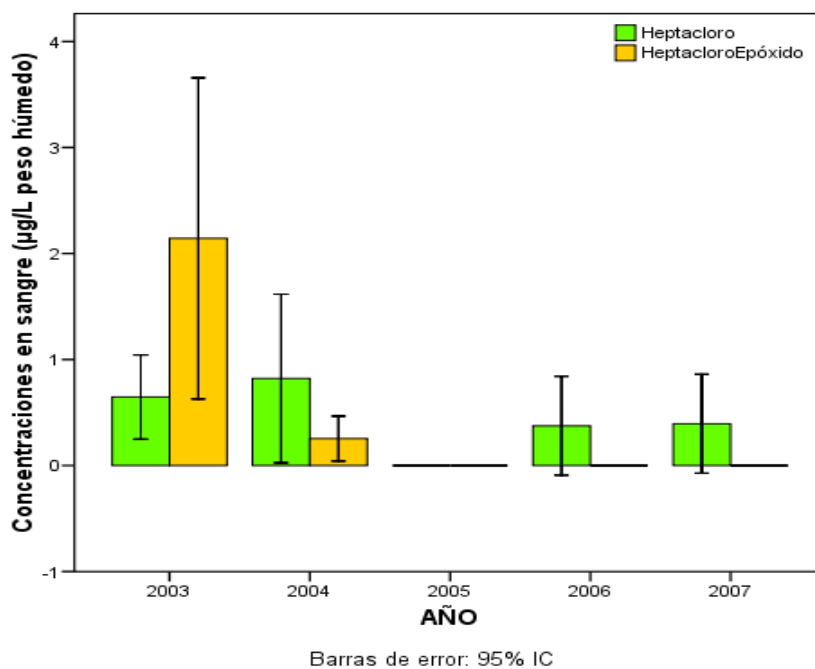


Figura IV.5. Concentraciones de heptacloro y su epóxido en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España (IC: 95%)

Mientras que todos los isómeros de HCHs tendieron a disminuir a lo largo del periodo de estudio, esta disminución fue más evidente para lindano, el insecticida del grupo de HCHs de más reciente prohibición (Figura IV.6). En los estudios realizados por Martínez-López *et al.* (2009), también se observó una disminución en los niveles de lindano en sangre de pollos de Aguililla Calzada, siendo más marcada en el 2000, año en el que se prohibió este insecticida en la zona de estudio. Por otro lado cabe mencionar que los niveles encontrados en 2003 en dicho estudio son muy similares a la media en sangre de los pollos de nuestra población nacidos el mismo año (1,89 vs 1,98  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente).

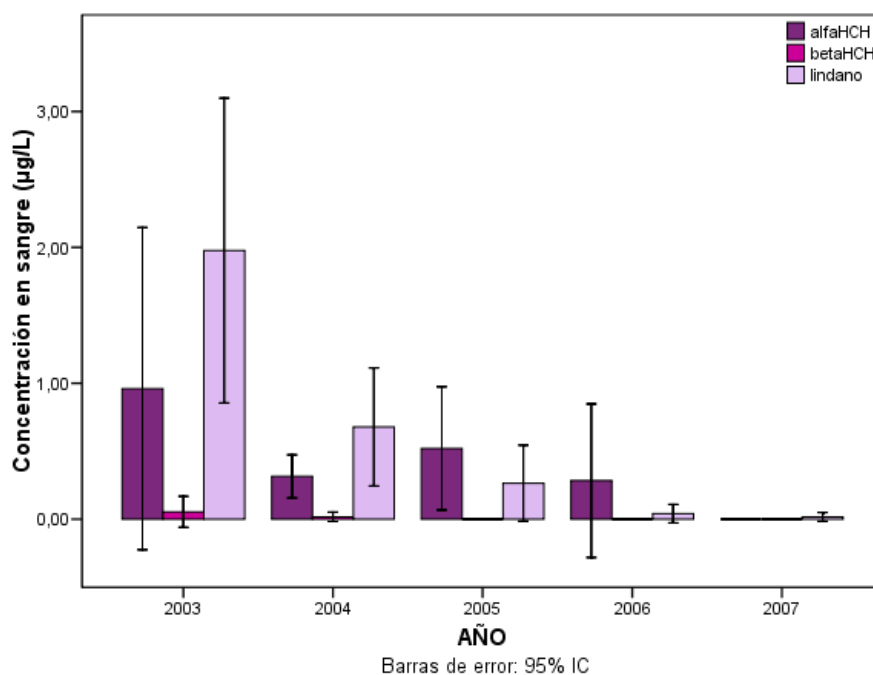


Figura IV.6. Concentraciones de  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH y lindano en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España (IC: 95%)

Al igual que la mayoría de compuestos, tanto aldrin como endrin tienden a disminuir. Sin embargo en el caso del dieldrin, no se ha podido determinar una tendencia para el periodo estudiado ya que las desviaciones estándar son muy altas (Figura IV.7).

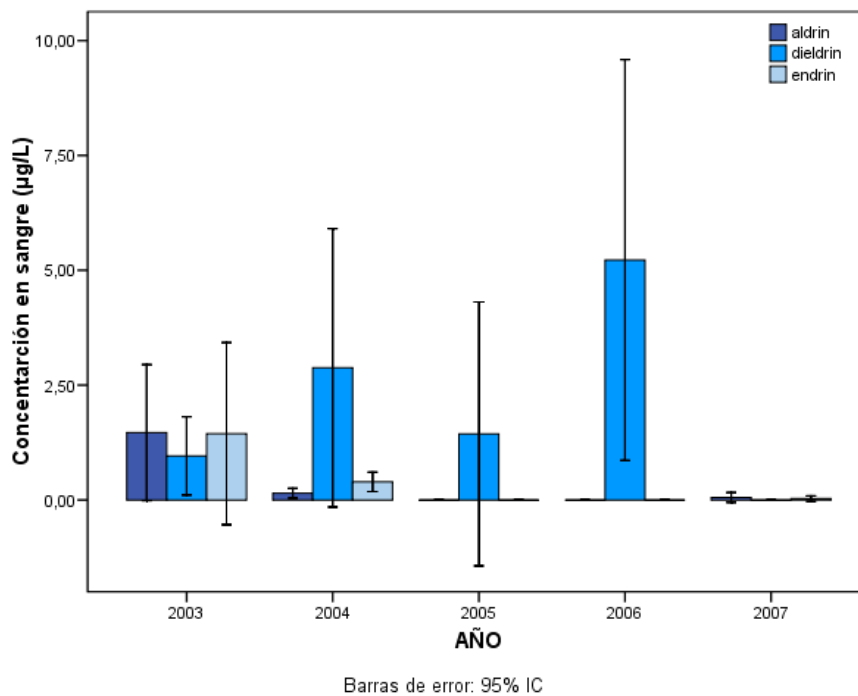


Figura IV.7. Concentraciones medias de aldrin, endrin y dieldrin en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España (IC: 95%)

El endosulfán es un plaguicida que se ha utilizado en España para una amplia variedad de cultivos de alimentos, incluidos los cítricos, frutas y vegetales (Barberá, 1989) hasta su prohibición en 2005 (Decisión 2005/864/EC). Aunque se permitió la autorización excepcional hasta 2007 para determinados cultivos en algunos países de la Unión Europea, en el caso de España esta autorización se limitó al cultivo del algodón, tomates y avellanas. El cultivo de este último fruto es inexistente en la zona de estudio. En cambio, la comparación de la evolución de la superficie destinada a cultivo de algodón (Centro Regional de Estadística de Murcia, 2011) respecto a las concentraciones de endosulfán en sangre de los pollos de Búho real nacidos en la misma zona, mostró una disminución casi paralela (Figura IV.8). Puesto que la disminución observada en nuestro estudio se produjo previamente a la prohibición, el descenso en los niveles de endosulfán en sangre podría relacionarse con una menor aplicación por una disminución de la superficie destinada a este tipo de cultivos. Por el contrario, aunque el tomate también es un producto abundante en la zona, su cultivo se ha mantenido en el tiempo de forma estable, por lo que no parece haber influido en el descenso del uso del insecticida y ni en la presencia de residuos en las muestras de búhos. En este sentido nosotros podríamos concluir que, al igual que se ha observado en Aguilillas calzadas (Martínez-López *et al.*, 2009), el uso de sangre de pollos de



Búho real podría ser considerada una buena unidad para monitorizar el uso de productos fitosanitarios.

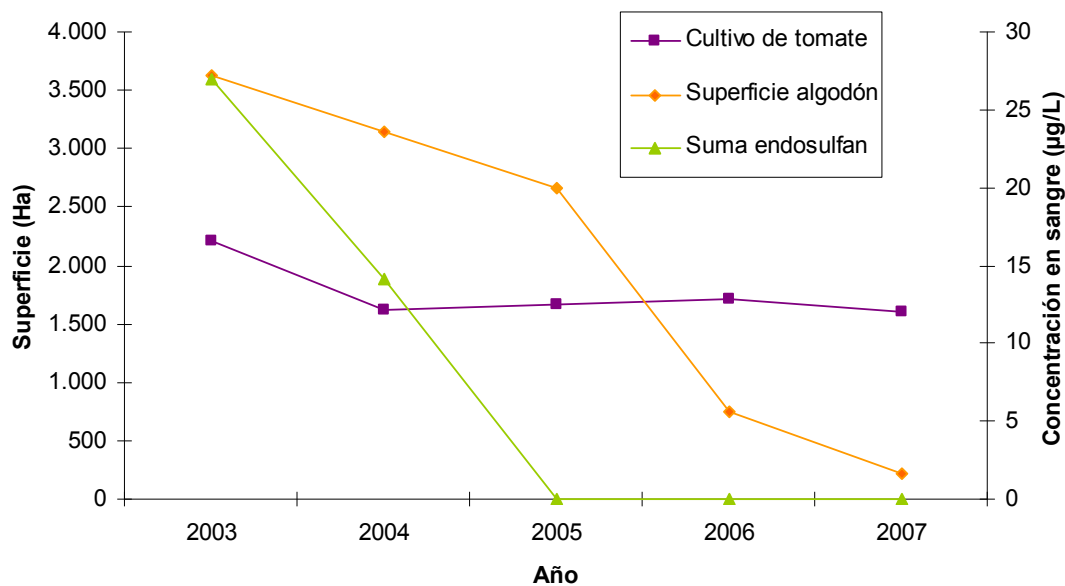


Figura IV.8. Evolución de las concentraciones de  $\Sigma$ Endosulfán I y II en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España y su relación con la superficie de terreno destinado a cultivo de algodón y tomate en el área de estudio.

Tal y como se observa en las Figuras IV.4 y IV.9, los niveles de  $\Sigma$ Difenalifáticos en sangre de la población estudiada tienden a disminuir durante el periodo de estudio.

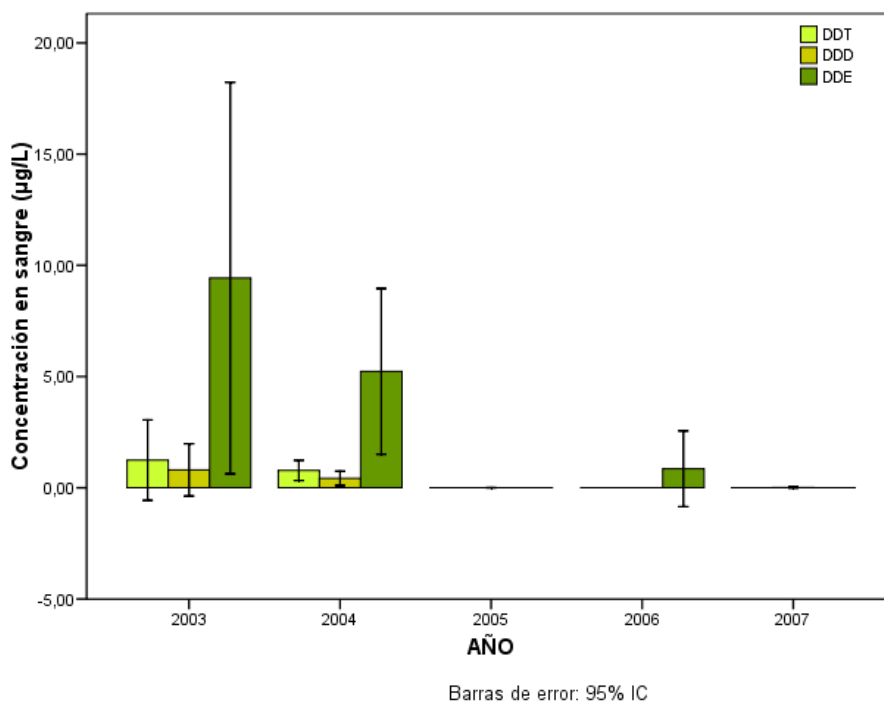


Figura IV.9. Concentraciones medias de p,p'-DDT, p,p'-DDD y p,p'-DDE en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España

Los residuos de DDT y compuestos relacionados (DDT-r) presentes actualmente en el medio están supuestamente asociados al uso del dicofol (Martínez-López *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008) ya que el DDT es un intermediario en la síntesis del dicofol, y pequeñas fracciones de DDT-r podían estar presentes en los productos comerciales de este insecticida (Directiva del Consejo 90/533/EEC), y por tanto en el medio. En nuestra zona de estudio el dicofol ha sido recomendado para combatir plagas de arañas que afectan a cítricos (Orden de 1 de Febrero de 2006; Resolución de 28 de Marzo de 2007), y en menor medida a melones y sandías (Orden de 26 de Noviembre de 2007) hasta 2009 (Decisión 2008/764/EC). Sin embargo, de forma similar al endosulfán, la comparación de los niveles de p,p'-DDT en sangre de pollos de Búho real con la superficie de terreno de la zona de estudio destinada a al cultivo de cítricos, melones y sandías, muestra una tendencia a la disminución para ambos parámetros (Figura IV.11). Por tanto, la disminución observada en los niveles de difenilifáticos, y en concreto de p,p'-DDT, podría estar más relacionada con la disminución de la superficie destinada a estos cultivos que con la prohibición. Esta disminución es más marcada en 2005, año en el que el Servicio de Sanidad y Protección Vegetal de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia envió un aviso alertando de la reclasificación a mayor grado de toxicidad (de "Tóxicas" a "Muy



Tóxicas”) del dicofol y endosulfán, entre otras (CARM, 2005). Por tanto la disminución observada en ambos compuestos podría estar también relacionada con este hecho.

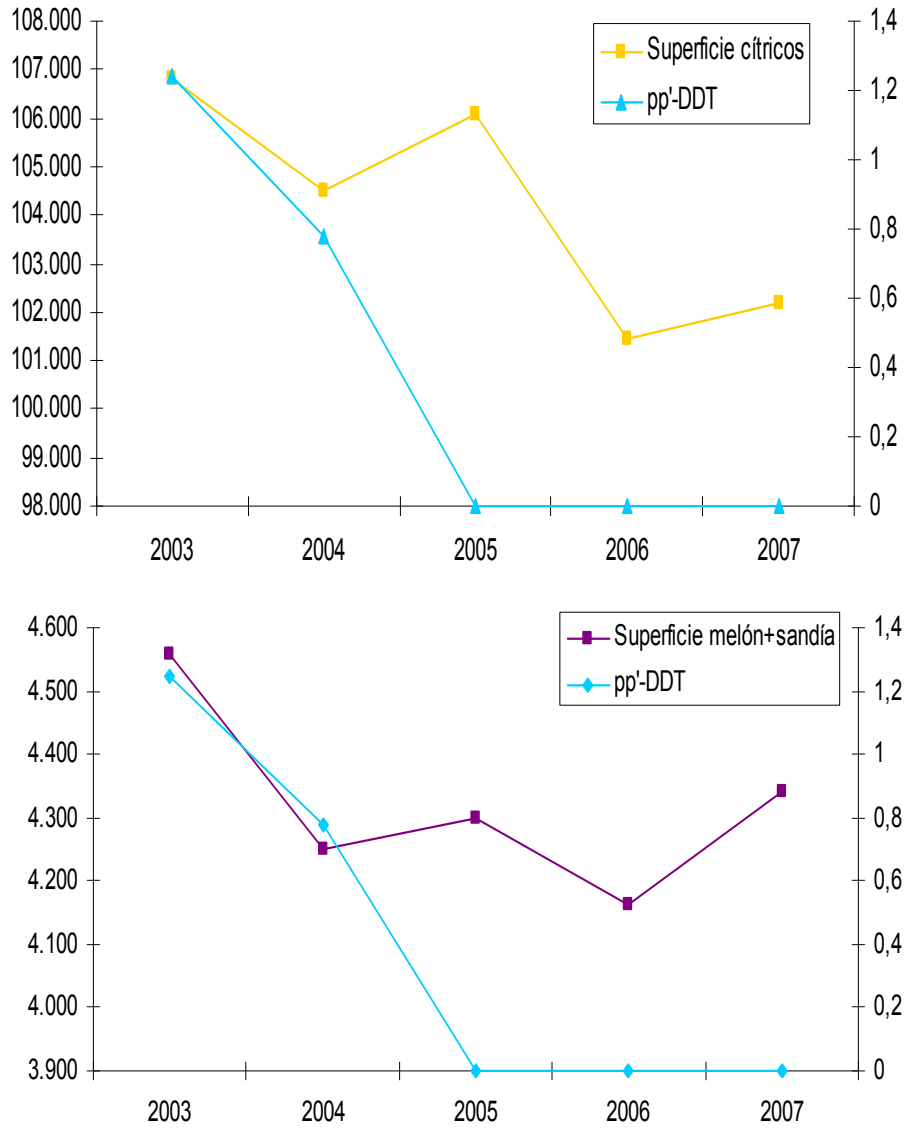


Figura IV.10. Evolución de las concentraciones de p,p'-DDT en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 ( $\mu\text{g/L}$ ) en el Sureste de España y su relación con la superficie de terreno destinado a cultivo de algodón y tomate en el área de estudio.



### IV.3. RESIDUOS DE COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS EN HUEVOS NO ECLOSIONADOS DE BÚHO REAL: TENDENCIAS ESPACIO-TEMPORALES Y EVALUACIÓN DEL RIESGO

La exposición a contaminantes ambientales se ha relacionado con frecuencia a determinados mecanismos tóxicos como la embriotoxicidad, la disminución del grosor de cáscara o alteraciones del comportamiento que han alterado el éxito reproductivo de distintas especies de aves (Gilbertson *et al.*, 1991; Elliott y Martin, 1994; McCarty y Secord, 1999; Fernie *et al.*, 2008). Como consecuencia de ello, numerosas poblaciones de aves han sufrido regresiones (Mora *et al.*, 1993; Fry, 1995; Henny y Elliott, 2007). Esta evidencia indujo la adopción de medidas legislativas que restringieran o prohibieran el uso agrícola de la mayoría de estos compuestos; lo cual se ha traducido en una disminución progresiva de las concentraciones en el medio y en los tejidos de aves (Bustnes *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a la alta persistencia y capacidad de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena trófica, los niveles de estos compuestos en el medio pueden ser todavía importantes y suponer riesgos potenciales para los seres vivos (van den Steen *et al.*, 2009).

En estudios previos sobre contaminantes organohalogenados en huevos de rapaces de la Región de Murcia se ha descrito un descenso en los niveles de insecticidas organoclorados y PCBs entre 1998 y 2004 (Martínez-López *et al.*, 2007). El objetivo del presente estudio era evaluar si esta tendencia existe en la zona de reproducción del Búho real del Sureste de España, donde la agricultura con aplicación de insecticidas ha sido intensa desde hace años y la actividad industrial es también elevada en algunas zonas.

Puesto que es un hecho demostrado que los animales centinelas pueden ser útiles para cuantificar la biodisponibilidad de los contaminantes en otras especies expuestas a las mismas fuentes de contaminación (Beeby, 2001), la información obtenida en el presente estudio también podría ser útil para evaluar los posibles riesgos para otras especies más sensibles, incluido el ser humano (National Research Council 1991; García-Fernández y María-Mojica 2000).

En la tabla IV.8 se proporciona la información relativa a los parámetros biométricos de los huevos analizados así como el contenido lipídico y el peso del contenido.



Tabla IV.8. Parámetros biométricos y características de huevos no eclosionados de Búho real del Sureste de España obtenidos entre 2004 y 2009

	Media	DE	Mínimo	Máximo
Índice de cáscara (mg/mm <sup>2</sup> ) (n = 57)	2,21	0,24	1,73	28,3
Grosor de cáscara (mm) (n = 58)	0,29	0,03	0,22	0,37
Peso de cáscara (g) (n = 57)	6,13	0,59	4,95	7,2
Longitud (mm) (n = 55)	57,98	2	53,4	62,6
Diámetro (mm) (n = 55)	48,1	1,55	40,2	50,9
% Lípidos (n = 58)	11,6	5,9	4,64	34,56
Peso contenido (g) (n = 58)	57,35	5,16	41,49	67,66

A pesar de que distintos autores han descrito un aumento en las concentraciones de compuestos lipofílicos como consecuencia de la disminución del contenido lipídico en el huevo durante el desarrollo embrionario (Newton y Bogan, 1978; Peakall y Gilman, 1979; Helander *et al.*, 2002), en nuestras muestras no se han observado alteraciones en el contenido lipídico debido a esta causa. Tampoco la putrefacción alteró el contenido lipídico en los huevos analizados. Además, ninguno de los compuestos estudiados se correlacionó con la cantidad de lípidos presente en los huevos analizados.

Por otro lado durante el desarrollo embrionario se puede producir una disminución del grosor de la cáscara en algunas especies (Kreitzer, 1972; Booth y Rahn, 1990), lo cual es previsible ya que el calcio es necesario para la formación del tejido óseo del embrión (Helander *et al.*, 2002). Sin embargo en nuestras muestras, coincidiendo con los estudios de Pigargo europeo (*Haliaeetus albicilla*) de Suecia (Helander *et al.*, 2002), el grosor de cáscara no fue diferente entre huevos embrionados y no embrionados.





### IV.3.1. Niveles de insecticidas organoclorados en huevos no eclosionados de Búho real

Las concentraciones de insecticidas organoclorados se proporcionan en la tabla IV.9.

Tabla IV.9. Concentraciones de insecticidas organoclorados en huevos no eclosionados de Búho real (ng/g, peso lípidos).

Compuesto	% detección	Población total Mediana; Media±DE (rango) (n=58)	Subárea Norte Mediana; Media±DE (rango) (n=42)	Subárea Sur Mediana; Media±DE (rango) (n=16)
$\alpha$ -HCH	6,9	ND; 2,17±8,23 (ND-39,14)	ND; 0,6±3,92 (ND-25,38)	ND; 6,29±13,80 (ND-39,14)
$\beta$ -HCH	25,9	ND; 56,30±156,42 (ND-751,96)	ND; 66,63±181,31 (ND-751,96)	ND; 29,20±45,18 (ND-127,37)
Lindano	3,4	ND; 2,21±12,51 (ND-86,09)	ND; 1,01±6,53 (ND-42,29)	ND; 5,38±21,52 (ND-86,09)
$\delta$ -HCH	3,4	ND; 0,95±5,23 (ND-34,19)	ND; 0,81±5,28 (ND-34,19)	ND; 1,31±5,25 (ND-21)
$\epsilon$ -HCH	19	ND; 4,60±10,48 (ND - 42,54)	ND; 5,94±11,79 (ND-42,54)	ND; 1,09±4,36 (ND-17,44)
$\Sigma$ HCH		ND; 66,24±158,34 (ND-751,96)	ND; 74,99±183,25 (ND-751,96)	26,49; 43,27±51,96 (ND-158,21)
Aldrin	3,4	ND; 0,80±4,51 (ND - 31,21)	ND; 1,10±5,29 (ND-31,21)	ND
Dieldrin	34,5	ND; 447,67±1776,02 (ND-9463,71)	ND; 591,47±2074,19 (ND-9463,71)	ND; 70,21±129,72 (ND-502,64)
Isodrin			ND	ND
Endrin			ND	ND
Heptacloro	13,8	ND; 0,67±2,05 (ND-11,83)	ND; 0,43±1,33 (ND-6,61)	ND; 1,32±3,25 (ND-11,83)



<b>Heptacloro epóxido</b>	10,3	ND; 352,17±1180,20 (ND-6447,43)	ND; 254,95±1110,06 (ND-6447,43)	ND; 607,36±1352,35 (ND-4319,34)
<b>Clordano-trans</b>	48,3	ND; 3,34±6,71 (ND-34,71)	ND; 3,90±7,71 (ND-34,71)	1,11; 1,84±2,29 (ND-7,12)
<b>Clordano-cis</b>			ND	ND
<b>Endosulfán</b>	17,2	ND; 165,79±646,18 (ND-4629,18)	ND; 67,90±189,08 (ND-847,5)	ND; 422,75±1179,70 (ND-4629,18)
<b>∑Ciclodiénicos</b>		15,55; 970,43±2116,50 (ND-9491,44)	13,765; 919,75±2276,69 (ND-9491,44)	116,11; 1103,48±1681,83 (ND-4745,4)
<b>p,p'-DDE (n=56)</b>	100	6248,19; 16290,13±27792,01 (565,60-129633,67)	4501,54; 15366,97±31699,89 (565,6-129633,67) (n=41)	16621,79; 18813,43±12409,73 (4875,8-47151,93) (n=15)
<b>op'-DDE</b>	3,4	ND; 0,19±1,33 (ND-10,04)	ND; 0,03±0,19 (ND-1,22)	ND; 0,63±2,51 (ND-10,04)
<b>op'-DDD</b>		ND	ND	ND
<b>p,p'-DDD</b>	24,1	ND; 30,54 ± 73,04 (ND-359,66)	ND; 28,09±68,28 (ND-359,66)	ND; 36,96±86,41 (ND-267,67)
<b>op'-DDT</b>	22,4	ND; 20,97±53,30 (ND-284,77)	ND; 18,29±44,37; (ND-172,85)	ND; 28,02±73,09 (ND-284,77)
<b>p,p'-DDT</b>	10,3	ND; 20,47±72,38 (ND-352,41)	ND; 14,10±56,64; (ND-341,2)	ND; 37,18±103,56 (ND-352,41)
<b>∑Difenilalifáticos</b>		6248,19; 16354,07±27843,08 (584,01-129935,33)	4462,95; 15061,61±31455,98 (53,27-129935,33)	15015,28; 17740,38±12868,31 (552,44-47394,44)
<b>Metoxicloro</b>	20,7	ND; 5,34±11,68 (ND-40,54)	ND; 5,63±11,50 (ND-40,54)	ND; 4,58±12,50 (ND-36,96)
<b>Mirex</b>	24,1	ND; 1,63±6,39 (ND-46,3)	ND; 0,65±2,17 (ND-11,79)	ND; 4,23±11,49 (ND-46,3)



<b>HCB</b>	100	ND; 29,34±37,17 (1,71-239,38)	16,34; 27,42±38,57 (1,71-239,38)	18,11; 34,39±33,85 (8,25-114,4)
<b>∑Insecticidas organoclorados (n=56)</b>		6833,4; 17307,03±27996,20 (606,97-131582,61)	5108,03; 16090,04±31471,17 (606,97-131582,61)	15705,19; 18930,33±13531,48 (591,51-47598,16)

Los compuestos más frecuentemente detectados fueron hexaclorobenceno (HCB), p,p'-DDE, clordano-trans y dieldrin; mientras que las mayores concentraciones se dieron en dieldrin y p,p'-DDE, seguidos de heptacloro epóxido y endosulfán. Por el contrario clordano-cis, op'-DDD, isodrin y su epóxido el endrin no se detectaron en ninguna muestra.

De forma similar que en huevos de rapaces nocturnas y diurnas recogidos durante la misma década en España y otros países europeos (Henny *et al.*, 2003; Mañosa *et al.*, 2003; Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2007), p,p'-DDE, el ubicuo metabolito del DDT, fue el compuesto mayoritario en todas las muestras. No obstante, la media de p,p'-DDE de nuestras muestras (16,3 µg/g peso de lípidos) fue mayor que la citada en dichos estudios. Esto puede ser debido a la mayor actividad agrícola de nuestra zona de estudio, donde la aplicación del DDT fue frecuente en el pasado (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008a). Así mismo, en estudios realizados con muestras de humanos de la Región de Murcia, se evidenció la influencia de las prácticas agrícolas sobre los niveles de insecticidas en el organismo (Molina *et al.*, 2005; Jakszyn *et al.*, 2009). Soportando esta misma idea, los niveles más altos de p,p'-DDE (media de la puesta=109,27 µg/g peso de lípidos) se dieron en los huevos recogidos de un nido rodeado de una extensa área de cultivo de regadío en la subárea Norte.

Tal y como se ha mencionado, los actuales residuos de DDT y compuestos relacionados (DDT-r) presentes en el medio están supuestamente asociados al uso del dicofol (Martínez-López *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008), un insecticida recomendado para el cultivo de cítricos en nuestra zona de estudio durante el periodo estudiado (Orden de 1 de Febrero de 2006; Resolución de 28 de Marzo de 2007) y permitido hasta 2009 (Decisión 2008/764/EC). Debido a que el ratio DDT/DDE en nuestras muestras fue bajo (0-0,09), se podría decir que la fuente de DDTs es relativamente antigua en nuestra área. Sin embargo, basándose en los análisis de



dicofol comercial y muestras de aire de China, Qiu *et al.*, (2005) sugirieron que este ratio no es válido en zonas donde la contaminación por dicofol es posible. Por eso sugirieron el uso del ratio  $o,p'$ -DDT/ $p,p'$ -DDT como indicador de "contaminación por DDT tipo dicofol". Así, en las regiones con este tipo de contaminación, este ratio sería mayor que en las zonas donde se ha usado el DDT técnico (1,3-9,3 frente  $<0,1$ ) (de la Cal *et al.*, 2008). En nuestro estudio, solamente en un nido, localizado en la subárea Norte, se obtuvo un ratio de 4,6, siendo en el resto de muestras  $<0,1$ , o no calculable. No obstante, es posible que este ratio se vea alterado en animales debido al metabolismo del  $p,p'$ -DDT a  $p,p'$ -DDE en el hígado (Gold y Brunk, 1982). Se debe tener en cuenta, además, que el  $o,p'$ -DDT se degrada más rápidamente que el  $p,p'$ -DDT en el medio (Martijn *et al.*, 1993) por lo que ratios bajos no son siempre indicativos de uso de DDT técnico (de la Cal *et al.*, 2008). Por tanto, la utilización de este ratio en aves requiere mayor investigación. Sin embargo, debido a que estudios recientes en pollos de rapaces diurnas de la Región de Murcia correlacionaron los niveles de  $p,p'$ -DDT en sangre con el uso agrícola del dicofol (Martínez-López, 2005) y, teniendo en cuenta que tanto en los huevos como en las muestras de sangre de nuestro estudio se han encontrado  $o,p'$ -DDT y  $p,p'$ -DDT, podemos sugerir la existencia de una fuente reciente de DDTs en la zona de estudio, probablemente debido a la aplicación del dicofol.

A pesar de que el HCB se detectó en todas las muestras, los niveles encontrados fueron mucho más bajos que los de los huevos de otras rapaces nocturnas de Europa (Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007). Aunque el HCB se encuentra de manera ubicua en casi todos los compartimentos del medio (Barber *et al.*, 2005) y no existe ninguna fuente dominante de emisión (Bailey, 2001), en poblaciones humanas de España los niveles más elevados se relacionaron con fuentes de contaminación de origen industrial (Arrebola *et al.*, 2009; Jakszyn *et al.*, 2009). De hecho, los niveles de HCB en los huevos de nuestro estudio fueron más altos que los encontrados en huevos de rapaces que nidifican en zonas alejadas de influencias urbanas o industriales (Martínez-López *et al.*, 2007).

El segundo grupo de insecticidas más importante en nuestro estudio fue el de los ciclodiénicos, principalmente debido a las altas concentraciones de dieldrin, heptacloro epóxido y endosulfán (media=448, 352, 166 ng/g de peso de lípidos, respectivamente) (Tabla IV.3). Aunque se ha demostrado que el dieldrin puede persistir muchos años después de su prohibición (Martijn *et al.*, 1993), en nuestro estudio no era esperable obtener concentraciones tan altas como las encontradas en



huevos de rapaces nocturnas de EEUU hace más de 25 años (Henny *et al.*, 1984). El endosulfán se detectó, incluso en niveles de ppm (Tabla IV.9), probablemente debido a su aún reciente prohibición, por lo que ha sido usado legalmente hasta Junio de 2007 (Decisión de la Comisión 2005/864/EC). Por el contrario, de forma parecida a otros estudios en rapaces diurnas y nocturnas (Henny *et al.*, 1984), el heptacloroepóxido se detectó con mayor frecuencia y a concentraciones mayores que las descritas en la sangre de pollos y huevos de rapaces diurnas de España (Mañosa *et al.*, 2003; Martínez-López *et al.*, 2009), siendo incluso mayores que las concentraciones en sangre de los pollos del presente estudio. Respecto al trans-clordano, aunque se detectó en casi la mitad de las muestras, los niveles fueron muy bajos (media=3,34 ng/g peso de lípidos). Puesto que el uso agrícola de este insecticida se prohibió en España en 1994, su presencia es indicativa de la elevada persistencia en el medio (Dearth y Hites, 1991).

Entre los hexaclorociclohexanos (HCHs),  $\beta$ -HCH, es considerado el isómero más persistente (Li *et al.*, 1998), lo que explica que fuera el más frecuente y abundante de nuestro estudio (Tabla IV.9), al igual que en otros estudios de huevos de rapaces (Henny *et al.*, 2003; Mañosa *et al.* 2003). Por otro lado, nuestros niveles fueron más elevados que los citados para huevos de rapaces nocturnas de otros países europeos (Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007). Particularmente elevados fueron los de los huevos recogidos en un nido rodeado de un cultivo intensivo en el subárea Norte, llegando a una concentración media de la puesta de 607 ng/g peso de lípidos. Al igual que el p,p'-DDE, los residuos de  $\beta$ -HCH se han asociado a áreas con intenso o moderado uso de insecticidas (Molina *et al.* 2005; Jakszyn *et al.* 2009). La restricción de uso de HCH tuvo lugar en España en 1994, momento a partir del cual solo se podía usar lindano en agricultura con más del 99% de isómero  $\gamma$  (Orden 4 de Febrero de 1994). Por tanto, la presencia de trazas de  $\beta$ -HCH es indicativa de la alta persistencia en el medio. Sin embargo, la baja frecuencia (3,4 %) y niveles de  $\gamma$ -HCH (media=2,21 ng/g peso de lípidos) en nuestras muestras puede tener su explicación en la prohibición total del lindano para uso agrícola en el año 2000 (Decisión 2000/801/EC), a lo que hay que unir su rápido metabolismo y eliminación en aves.

#### **IV.3.2. Niveles de PCBs en huevos no eclosionados de Búho real**

En nuestro estudio se encontraron niveles de PCBs mayores que los descritos en huevos de tres especies de rapaces nocturnas de la República Checa recogidos en 2001 (Kubistova *et al.*, 2003), de Lechuza (*Tyto alba*) de distintas áreas de



Branderburgo (Alemania) puestos en 1995 y 1996 (Wiesmüller *et al.*, 1999) y de Cárabo (*Strix aluco*) de Noruega central puestos entre 2001 y 2004 (Bustnes *et al.*, 2007). Por el contrario, nuestros niveles fueron mucho más bajos que los de huevos de Mochuelos (*Athene noctua*) recogidos entre 1998 y 2000 en Bélgica (Jaspers *et al.*, 2005). Con estos datos podríamos pensar que la exposición a PCBs de nuestra población se sitúa en niveles intermedios en un contexto europeo.

Tal y como se muestra en la Tabla IV.10, los congéneres más frecuentemente detectados fueron el 52, 138, 153, 170 y 180 y, al igual que en huevos de otras rapaces nocturnas y diurnas (Disser *et al.*, 1992; Wiesmüller *et al.*, 1999; Kubistova *et al.*, 2003; Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007). De ellos, los congéneres 138, 153 y 180 fueron los más abundantes.

Tabla IV.10. Concentraciones de bifenilos policlorados en huevos no eclosionados de Búho real (ng/g peso lípidos).

Compuesto	% detección	Población total	Subárea Norte	Subárea Sur
		Mediana; Media±DE (rango) (n=58)	Mediana; Media±DE (rango) (n=42)	Mediana; Media±DE (rango) (n=16)
PCB 8	84,48	11,27; 10,54±10,02 (ND-65,20)	9,22;10,53±10,78 (ND-65,20)	12,36;13,22±7,63 (3,07-31,86)
PCB 28	60,34	7,00; 13,06±26,89 (ND-120,31)	5,69;15,26±31,23 (ND-120,31)	7,14;7,26±5,74 (ND-19,37)
PCB 31	63,79	3,60; 3,93±3,90 (ND-5,36)	3,77;3,82±3,85 (ND-14,08)	3,37;4,20±4,13 (ND-15,36)
PCB 44	84,48	9,83; 9,00±5,42 (ND-21,33)	10,03;8,99±5,46 (ND-21,33)	9,24;9,05±5,51 (ND-17,87)
PCB 52	98,28	1,75; 2,33±2,09 (ND-10,81)	1,73;2,30±2,11 (ND-10,81)	1,80;2,40±2,10 (0,67-7,83)
PCB 70	94,83	7,21; 15,61±21,18 (ND-83,07)	5,93; 13,86±21,09 (ND-82,88)	11,74; 20,19±21,41 (2,43-83,07)
PCB 77	22,4	ND; 0,86±2,97 (ND-21,52)	ND;0,99±3,43 (ND-21,52)	ND;0,53±1,07 (ND-3,66)



<b>PCB 101</b>	32,76	ND; 6,84±35,46 (ND-269,52)	ND;2,03±3,81 (ND-15,45)	ND;19,45±67,11 (ND-269,52)
<b>PCB 105</b>	50	0,61; 11,71±23,66 (ND-144,25)	ND;7,61±15,70 (ND-60,70)	10,88;22,46±35,82 (ND-144,25)
<b>PCB 118</b>	89,7	29,80; 73,49 ± 104,99 (ND - 438,50)	20,35; 48,82±80,85 (ND-316,44)	89,00; 138,26±133,56 (13,33-438,50)
<b>PCB 126</b>	53,4	4,42; 40,05±109,45 (ND-608,24)	ND; 10,30±17,85 (ND-73,88)	37,67; 118,16±188,84 (ND-608,24)
<b>PCB 128</b>	82,8	7,94; 32,52±84,41 (ND-449,63)	4,20;11,79±20,27 (ND-88,84)	25,89;86,95±146,93 (0,69-449,63)
<b>PCB 138</b>	98,3	79,20; 460,78±1329,90 (ND-7421,41)	56,86; 128,39±183,10 (ND-703,82)	312,54; 1333,30±2346,87 (74,56-7421,41)
<b>PCB 149</b>	37,9	ND; 9,34±39,05 (ND-242,01)	ND;1,60±3,32 (ND-12,77)	3,73;29,63±71,82 (ND-242,01)
<b>PCB 151</b>	18,97	ND; 6,41±31,64 (ND-183,16)	ND;0,35±1,05 (ND-4,45)	ND;22,31±58,56 (ND-183,16)
<b>PCB 153</b>	100	155,82; 838,05±2296,37 (35,63-12137,21)	121,07; 243,65±326,75 (35,63-1290,37)	532,33; 2398,34±4020,03 (162,88-12137,21)
<b>PCB 156</b>	62,1	18,68; 55,79±92,77 (ND-567,74)	17,88;40,44±56,50 (ND-185,82)	53,34;96,06±146,92 (ND-567,74)
<b>PCB 169</b>	55,2	1,19; 31,30±79,64 (ND- 32,39)	ND;25,29±79,96 (ND-332,39)	16,67;47,05±79,12 (ND-299,84)
<b>PCB 170</b>	93,1	35,95; 219,52±605,38 (ND-3358,77)	28,14; 61,01±88,14 (ND-332,50)	176,42; 635,61±1056,60 (ND-3358,77)
<b>PCB 180</b>	100	111,08; 622,38±1683,62 (23,69-8242,80)	85,09; 170,25±221,08 (23,69-849,06)	441,51; 1809,21±2926,26 (113,82-8242,80)



<b>PCB 195</b>	17,2	ND; 15,76±50,82 (ND-257,48)	ND;2,33±14,86 (ND-96,35)	5,93;51,02±85,90 (ND-257,48)
<b>PCB 194</b>	53,4	7,76; 92,31±223,80 (ND-1154,02)	ND;34,38±70,28 (ND-347,82)	94,17;244,39±377,85 (ND-1154,02)
<b>∑PCBs</b>	100	544,67; 2569,96±658134 (84,85-34753,94)	411,21; 841,69±1046,44 (84,85-3731,62)	1943,85; 7106,67±11457,88 (472,25-34753,94)

### IV.3.3. Niveles de PBDEs en huevos no eclosionados de Búho real

A diferencia de lo observado en organoclorados, los compuestos bromados se detectaron con baja frecuencia y ninguno de los compuestos llegó a ser detectado en todas las muestras (Tabla IV.11).

Tabla IV.11. Concentraciones de PBDEs en huevos no eclosionados de Búho real (ng/g peso lípidos).

<b>Compuesto</b>	<b>% detección</b>	<b>Población total Mediana; Media±DE (rango) (n=58)</b>	<b>Subárea Norte Mediana; Media±DE (rango) (n=42)</b>	<b>Subárea Sur Mediana; Media±DE (rango) (n=16)</b>
<b>BDE 28</b>	36,20	ND; 0,167±0,27 (ND-1,26)	ND;0,18±0,29 (ND-1,26)	ND;0,13±0,24 (ND-0,72)
<b>BDE 47</b>	75,86	5,25; 15,83±24,84 (ND-99,02)	4,93;12,50±19,47 (ND-75,18)	9,87;23,88±33,96 (ND-99,02)
<b>BDE 100</b>	81,03	2,14; 9,14±16,68 (ND-76,56)	3,06;8,49±14,97 (ND-76,56)	1,88;10,72±20,67 (ND-67,31)
<b>BDE 99</b>	75,86	5,49; 24,31±47,19 (ND -252,62)	4,62;15,88±23,18 (ND-81,34)	12,23;44,63±77,27 (ND-252,62)
<b>BDE 154</b>	60,34	0,65; 3,14±7,18 (ND-47,31)	0,50;3,24±8,19 (ND-47,31)	1,14;2,89±3,98 (ND-11,86)
<b>BDE 153</b>	46,55	ND; 4,40±7,78 (ND-32,73)	ND;4,16±8,03 (ND-32,73)	1,89;4,99±7,31 (ND-26,77)





<b>BDE 183</b>	29,31	ND; 2,50±4,98 (ND-21,07)	ND;2,28± 4,63 (ND-21,079)	ND;3,04±5,86 (ND-19,31)
<b>∑ BDEs</b>	91,38	19,58; 50,49±93,79 (ND-457,19)	14,41; 46,73±65,21 (ND-239,58)	31,97;90,27±138,86 (ND-457,19)

En comparación con la mayoría de estudios de aves terrestres de otros países europeos, incluyendo rapaces nocturnas (Jaspers *et al.*, 2005; Chen y Hale 2010), los niveles de PBDEs en los huevos de Búho real fueron muy bajos (mediana  $\sum$ PBDEs=19,58 ng/g peso lípidos). Sin embargo, nuestros resultados son en general parecidos a los de huevos de Cárabo de Noruega central recogidos entre 2001 y 2004 (Bustnes *et al.*, 2007). Estos autores sugirieron que la disminución en los residuos de PBDEs en relación al periodo de estudio anterior (entre 1986-1989) fue debida a la restricción voluntaria del uso de compuestos de bajo grado de bromación. En nuestra zona este tipo de retardantes de llama no ha sido utilizado en los procesos industriales (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008c; MARM 2010), por lo que serían los productos que contienen PBDEs la posible fuente de contaminación.

En relación al perfil de frecuencia de detección de congéneres de PBDEs, esta es característica de aves terrestres (Chen y Hale, 2010), e incluso coincide con el encontrado en huevos de mochuelos de Bélgica (Jaspers *et al.*, 2005), en los que BDE 99, 47 y 100 también fueron predominantes.

Según nos consta, aunque los niveles de PBDEs en aves de España han sido estudiados previamente (Guerra *et al.*, 2010; Muñoz-Arnanz *et al.*, 2010), este es el primer estudio sobre estos compuestos en rapaces nocturnas de nuestro país.

#### **IV.3.4. Tendencias temporales y espaciales de los compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados de Búho real**

Cuando los modelos lineales generales se aplicaron utilizando las concentraciones medias de la puesta, se encontraron interacciones significativas entre el espacio (subárea Norte y Sur) y el tiempo para el p,p'-DDE ( $F_{\text{prob conjunto analisis}}=0,027$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}}=0,025$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,014$ ,  $t_{\text{prob subárea}}=0,025$ ),  $\beta$ -HCH ( $F_{\text{prob conjunto analisis}}=0,045$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}}=0,072$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,011$ ,  $t_{\text{prob subárea}}=0,072$ ), HCB ( $F_{\text{prob conjunto analisis}}=0,002$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}}=0,027$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,46$ ,  $t_{\text{prob subárea}}=0,027$ ), total PCBs ( $F_{\text{prob conjunto analisis}}<0,001$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}}=0,05$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,81$ ,  $t_{\text{prob subárea}}=0,05$ )



y total PBDEs ( $F_{\text{prob conjunto análisis}} < 0,001$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}} = 0,007$ ,  $t_{\text{prob año}} = 0,198$ ,  $t_{\text{prob subárea}} = 0,007$ ).

Las tendencias de espacio y tiempo encontradas fueron similares para la mayoría de estos compuestos. Mientras que las concentraciones en la subárea Sur tienden a aumentar a lo largo del periodo de estudio, en la subárea Norte tienden a disminuir, excepto para el caso de los PCBs y el HCB que se mantienen estables (Figuras IV.11 y IV.12).

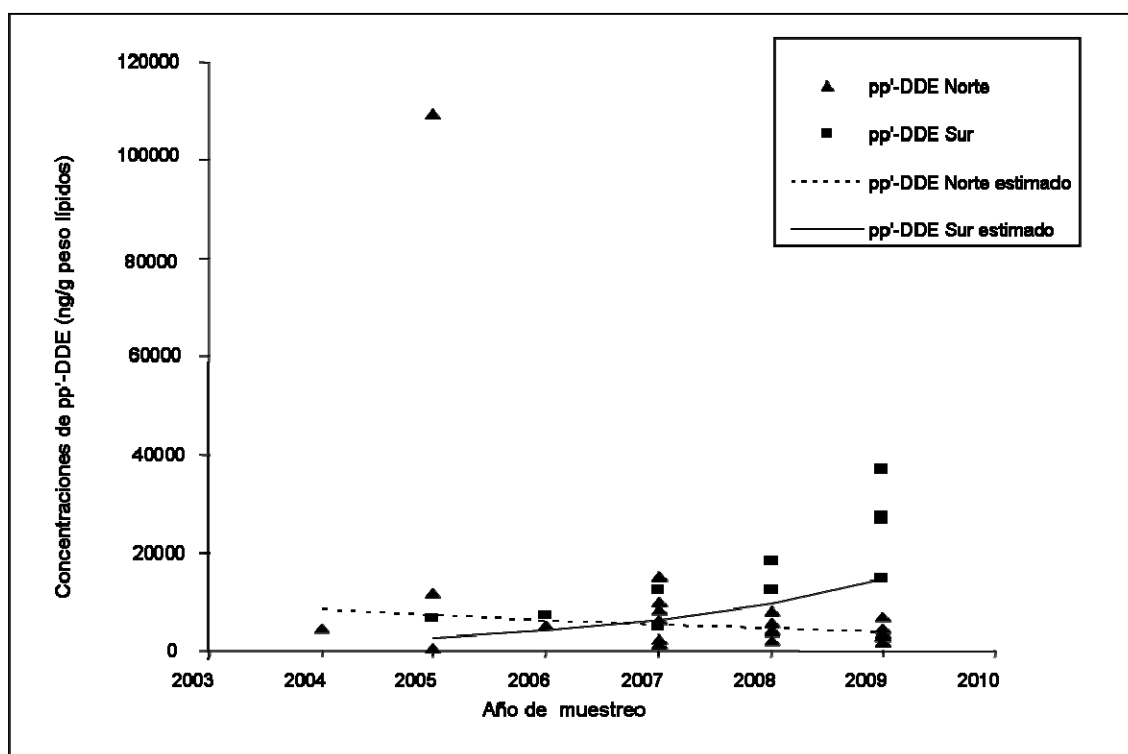


Figura IV.11. Interacción entre año y subárea de estudio para p,p'-DDE ( $F_{\text{prob conjunto}} = 0,027$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}} = 0,025$ ,  $t_{\text{prob año}} = 0,014$ ,  $t_{\text{prob subárea}} = 0,025$ ). p,p'-DDE Norte (triángulo ▲) y p,p'-DDE Sur (círculo ●) corresponden a concentraciones medias de la puesta para p,p'-DDE para cada subárea. El gráfico representa las tendencias estimadas para p,p'-DDE,  $\beta$ -HCH y total PBDEs.

Teniendo en cuenta lo observado en otros estudios de huevos de rapaces de Europa (Helander *et al.*, 2002; Bustnes *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2007), cabría esperar una disminución temporal de las concentraciones de contaminantes organohalogenados. El DDE podría ser, sin embargo, una excepción, ya que otros estudios han encontrado una estabilización e incluso aumento de los niveles en muestras de rapaces (Bustnes *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). Tal y como



ya se ha mencionado, la presencia de DDE y otros compuestos relacionados podría deberse al uso del dicofol (Martínez-López *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008), un insecticida recomendado para el cultivo de cítricos en la zona. Este tipo de cultivo ha sido especialmente importante en la subárea Norte, pero motivos económicos en los últimos años podrían haber propiciado el abandono de las tareas agrícolas, sobre todo en limoneros (CARM, 2010; Gomez-Ramírez, *Observ. Pers.*), lo que ha podido ocasionar una disminución de la aplicación de insecticidas. Por tanto, la disminución de los niveles de p,p'-DDE en las muestras de la subárea Norte puede ser un reflejo del cambio en las prácticas agrícolas. No obstante, si se excluye un valor extremo del año 2005, el descenso es menos evidente y se observa una tendencia a la estabilidad, similar a la observada en huevos de Cárabo de Noruega central por Bustnes *et al.* (2007). Según estos autores, la estabilización de los niveles a lo largo del periodo estudiado puede deberse a un equivalente aporte y eliminación de compuestos difenilalifáticos en el medio. Por tanto, el uso del dicofol para cultivos distintos a los limoneros podría ser la fuente de DDT-r en nuestra zona. Otra posible explicación sería un cambio en la dieta, tal y como otros autores han descrito como causante de las variaciones en la carga de organoclorados en rapaces (Gervais y Anthony, 2003; Mañosa *et al.*, 2003; van Drooge *et al.*, 2008). Puesto que el metabolismo de los compuestos organohalogenados es menor en aves que en mamíferos (Walker, 1983), cuanto mayor sea el porcentaje de aves en la dieta, mayores serán los niveles de estos compuestos en las aves rapaces (van Drooge *et al.*, 2008). Por tanto una disminución en la disponibilidad del Conejo europeo en la zona podría causar un incremento en la proporción de aves ingeridas por las hembras, contrarrestando así la disminución en el uso de dicofol en la subárea Norte. Sin embargo, no se ha descrito ningún descenso en las poblaciones de Conejo europeo en la zona durante el periodo de estudio.

En la subárea Sur, los niveles de pp'-DDE tienden a aumentar (Figura IV.4). En esta zona el Conejo europeo es menos abundante, lo que implica el consumo de aproximadamente el doble de aves por parte de los búhos que anidan en estos territorios (León *et al.*, 2008). Tal y como se ha sugerido en la subárea Norte, un aumento del número de aves en la dieta podría explicar el aumento de las concentraciones de organoclorados en la subárea Sur. Sin embargo, puesto que los niveles de op'-DDT y pp'-DDT también tienden a aumentar en la subárea Sur, podemos sugerir que el uso del dicofol en esta subárea pudo aumentar en esta zona. Por el contrario, estos dos compuestos tienden a disminuir en la subárea Norte. No



obstante, las tendencias de los compuestos padre no son significativas y es necesario profundizar en la investigación con el fin de confirmar la causa.

La supuesta variación en el tipo de presas de la subárea Sur podría explicar también el aumento de los niveles de PCBs, HCB y PBDEs (Figuras IV.4 y 5), si bien algunas posibles fuentes de contaminación deberían tenerse en cuenta. Cabe mencionar que algunas de las concentraciones más altas se han encontrado en nidos localizados en un radio de 16 km de distancia de Cartagena, una importante ciudad industrial de la Región de Murcia, en la subárea Sur. Además, en el año 2008 se autorizó una planta de tratamiento de PCBs en esta ciudad (CARM, 2008), convirtiéndose en una de las tres plantas de tratamiento existentes en España. A pesar de cumplir las medidas de seguridad obligatorias, el transporte y almacenamiento de grandes cantidades de PCBs puede suponer una fuente potencial de contaminación en la zona. Se debe añadir que en esta zona se encuentra un alto número de “antiguos transformadores” (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008b). Este tipo de transformadores se fabricaron antes de 1986 y tienen, por tanto, una mayor probabilidad de contener PCBs (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008), por lo que suponen un riesgo de contaminación por estos compuestos en caso de fugas. Respecto a los PBDEs, mientras que las concentraciones en Europa tienden a disminuir, probablemente debido a la reducción del uso y emisiones de compuestos menos bromados (Bustnes *et al.*, 2007; Chen y Hale, 2010) la proximidad a Cartagena y la liberación de productos que contienen PBDEs en esa ciudad podrían explicar el aumento de estos compuestos en la población del Sur.

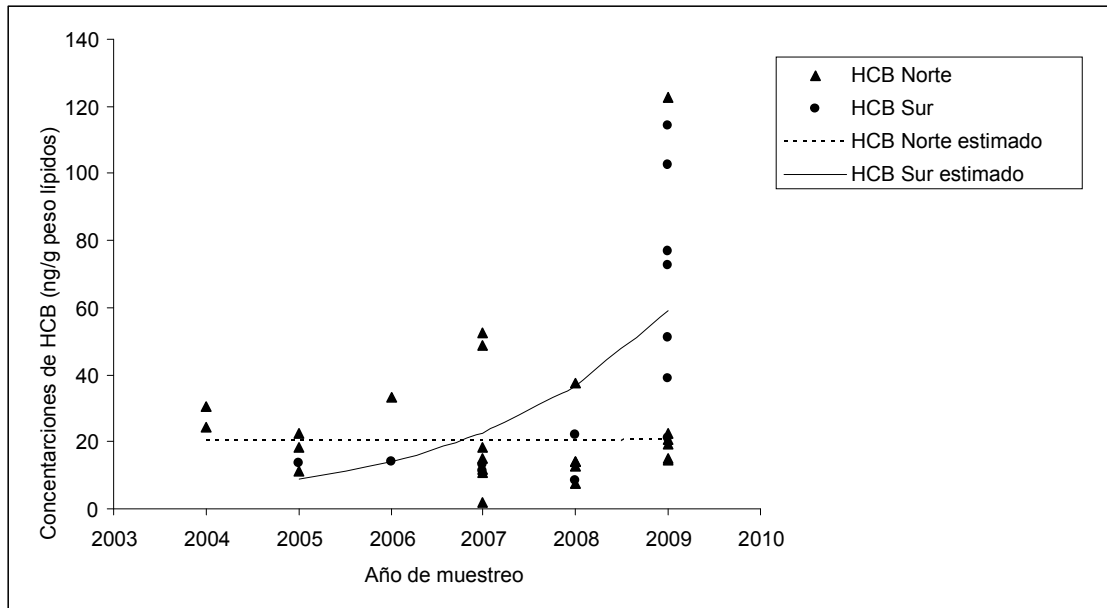


Figura IV.13. Interacción entre año y subárea de estudio para HCB ( $F_{\text{prob conjunto}}=0,002$ ,  $t_{\text{prob interacción año*subárea}}=0,027$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,46$ ,  $t_{\text{prob subárea}}=0,027$ ). HCB Norte (triángulo ▲) y HCB Sur (círculo ●) corresponden a concentraciones medias de la puesta para HCB en cada subárea. HCB Norte estimado y HCB Sur estimado son las tendencias predecibles calculadas mediante Modelos Lineales Generales. La tendencia estimada es similar para el total de PCBs.

En contraposición, el conjunto de los ciclodiénicos mostró un significativo descenso a lo largo del periodo en las dos subáreas ( $F_{\text{prob año}}=0,009$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,009$ ) (Figura IV.13), probablemente debido a la disminución de los niveles de clordano-trans ( $F_{\text{prob año}}=0,018$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,016$ ) pero principalmente del dieldrin ( $F_{\text{prob año}}<0,001$ ,  $t_{\text{prob año}}<0,001$ ), el compuesto más abundante del grupo. Dado que la mayoría de estos insecticidas no se ha utilizado desde 1994 en España, el descenso observado era previsible. En función de la concentración presente en el suelo, la vida media del dieldrin en suelos se ha estimado entre 2 y 15 años, (Beyer y Gish 1980), la cual es similar a la calculada para el DDT (Keller, 1970). La tendencia observada es indicativa de la degradación de este insecticida sin fuentes recientes de contaminación, al contrario que en el caso de los difenilalifáticos.

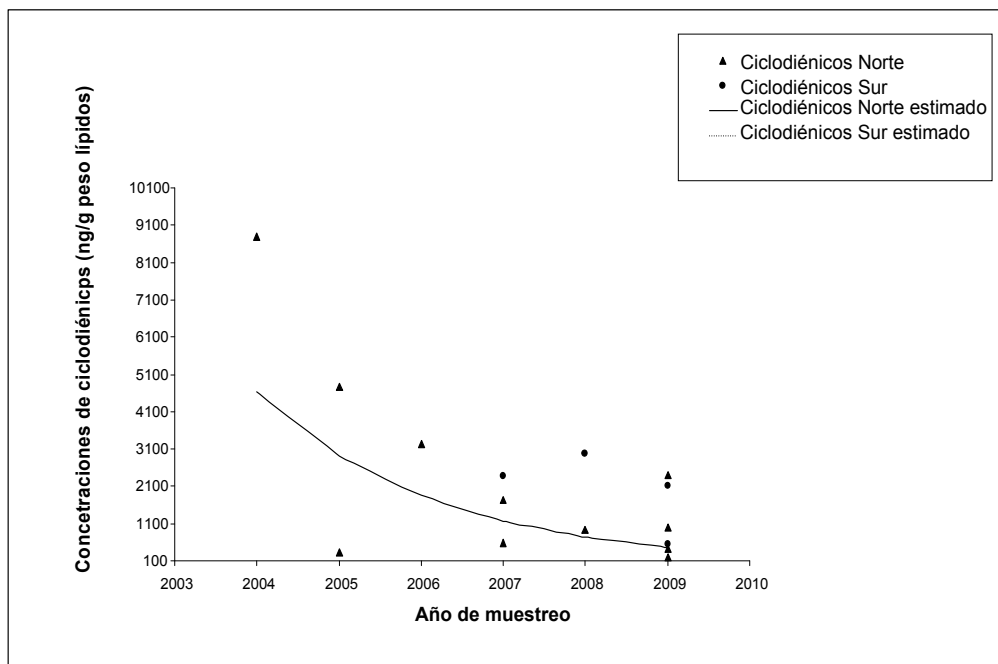


Figura IV.13. Tendencia temporal para los insecticidas ciclodiénicos. Ciclodiénicos Norte (triángulo ▲) y Ciclodiénicos Sur (círculo ●) corresponden a concentraciones medias de la puesta para los Ciclodiénicos en cada subárea. Los modelos mostraron la una tendencia significativa decreciente en ambas subáreas ( $F_{\text{prob año}}=0,009$ ,  $t_{\text{prob año}}=0,009$ ).

#### I.V.3.5. Interpretación de las concentraciones y evaluación del riesgo

Según el criterio utilizado para evaluar el grado de desarrollo embrionario, el 50% de los huevos se consideraron fértiles, pero los embriones murieron en diferentes estadios de desarrollo. Las medias de los niveles de organohalogenados no fueron significativamente diferentes entre los huevos fértiles y los infértiles, excepto para el clordano-trans. Sin embargo, las concentraciones de este compuesto fueron demasiado bajas (máximo=3,85 ng/g peso húmedo) como para alterar la función reproductora (NOAEL=200 ng/g peso húmedo) (Eisler *et al.*, 1990a). En relación al desarrollo embrionario, solo las concentraciones de Aldrin fueron significativamente más altas en embriones en sus primeros estadios de desarrollo (estadio 3), pero este compuesto sólo se detectó en un 3% de las muestras y las concentraciones fueron siempre bajas (máximo=4,7 ng/g peso húmedo).

A pesar de que los niveles de dieldrin en nuestras muestras pueden considerarse bajos y no parecen afectar la fertilidad, dos de los huevos contenían



niveles próximos al umbral de 700 ng/g de peso húmedo establecido por Newton (1988) como causante de declives poblacionales en Halcón peregrino (*Falco peregrinus*).

Según el criterio utilizado por Strause *et al.* (2007) para evaluar el riesgo por organohalogenados en Búho americano, aproximadamente el 8% de nuestras muestras superó el valor umbral de NOAEC para  $\Sigma$ DDTs (3600 ng/g peso húmedo) y solamente un huevo presentó concentraciones del total de PCBs por encima del NOAEC de 7000 ng/g peso húmedo. Por el contrario, aproximadamente el 36% de los huevos superaron el NOAEC del Total de TEQs (135 pg/g peso húmedo) (Strause *et al.*, 2007) y el 17% de las muestras superaron el LOAEC para el total de TEQs de 400 pg/g peso húmedo. Estas muestras también presentaron una fracción de PCBs metabolizables muy baja, lo que es indicativo de inducción de actividad enzimática, normalmente reconocido como una señal temprana de aviso de los efectos tóxicos causados por la activación del receptor Ah por parte de los PCBs y otros compuestos relacionados (van den Brink *et al.*, 2000). Además se encontró una correlación significativa entre los valores de TEQs y las concentraciones de PCBs metabolizables ( $F_{\text{prob}}=0,004$ ) (Figura IV.14). Por otro lado a bajas concentraciones de TEQs, la fracción metabolizable fue muy variable, lo cual puede ser debido a diferentes fuentes de contaminación, relaciones de la cadena trófica o posiblemente la presencia de otros contaminantes.

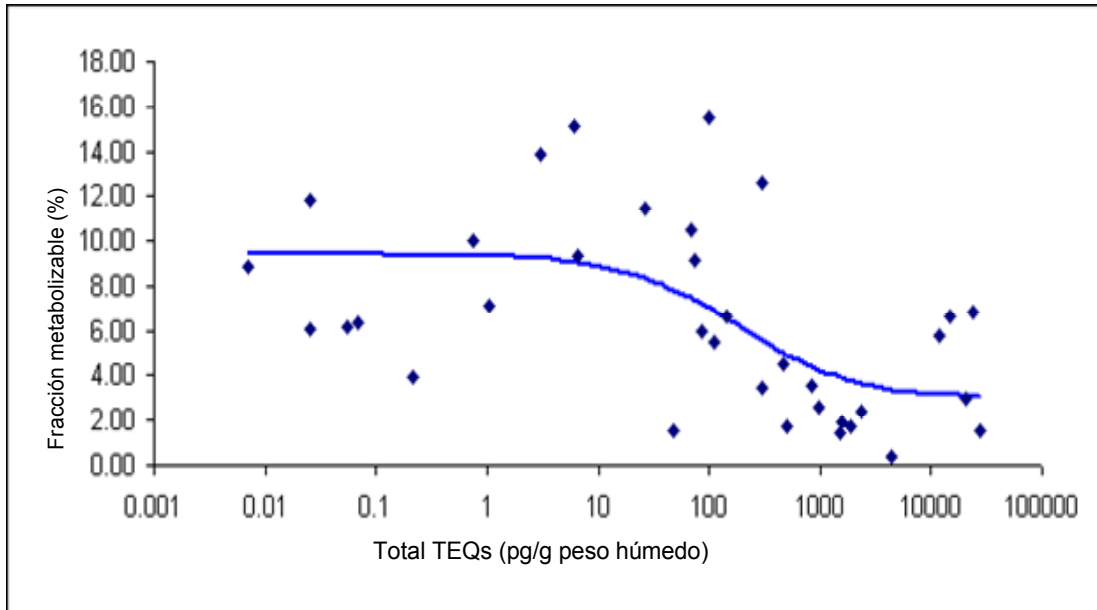


Figura IV.14. Relación entre el total de TEQs (pg/g peso húmedo) y la fracción de PCBs metabolizables. Según los Modelos Lineales Generales, ambos factores están correlacionados significativamente ( $F_{\text{prob}}=0,004$ )

La media de las concentraciones de PCBs y TEQ no fue diferente en función del éxito reproductivo ni la fertilidad, pero en comparación con la subárea Norte, valores significativamente más altos de  $\Sigma\text{TEQ}$  ( $\chi^2=15,88$ ,  $p=0,00$ ),  $\Sigma\text{DDTs}$  ( $\chi^2=8,89$ ,  $p=0,003$ ) y PCBs ( $\chi^2=18,02$ ,  $p=0,00$ ) correspondieron a los huevos recogidos en la subárea Sur. En esta subárea la densidad de población del Búho real es menor y se han encontrado menos nidos, hechos atribuidos a la menor disponibilidad de conejo en esta zona (León *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayor capacidad de producir efectos tóxicos de los compuestos tipo dioxina encontrados en los huevos de esta subárea podrían actuar sinérgicamente en detrimento de la población.

En general las concentraciones de pp'-DDE están por debajo del NOAEC de 12  $\mu\text{g/g}$  peso húmedo (Mendenhall *et al.*, 1983). No obstante los valores normalizados por transformación logarítmica de este metabolito se han correlacionado de forma significativa con una disminución del grosor de cáscara ( $P=-0,469$ ,  $p<0,001$ ) (Figura IV.15), alcanzando una disminución del 17% cuando las concentraciones de pp'-DDE eran mayores 100  $\mu\text{g/g}$  peso de lípidos (8  $\mu\text{g/g}$  peso húmedo). Esto ocurrió en cuatro huevos de la misma puesta de un nido rodeado de campos de cultivo intensivo de regadío de la subárea Norte. Estos resultados son muy similares a los encontrados en estudios experimentales donde se alimentaron lechuzas con dietas enriquecidas con





2,83  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo de DDE que presentaron una disminución del grosor de cáscara del 20% (Mendenhall *et al.*, 1983). En otros estudios de laboratorio realizados con Autillos californianos (*Megascops asio*), 2,8  $\mu\text{g/g}$  peso húmedo de DDE en la dieta provocaron una media del 13% de disminución del grosor de cáscara (McLane y Hall, 1972). También Newton y Bogan (1974) encontraron una disminución similar basándose en el índice de Rattcliffe cuando las concentraciones de DDE en huevos de Cernícalo americano fueron de 7  $\mu\text{g/g}$  peso húmedo.

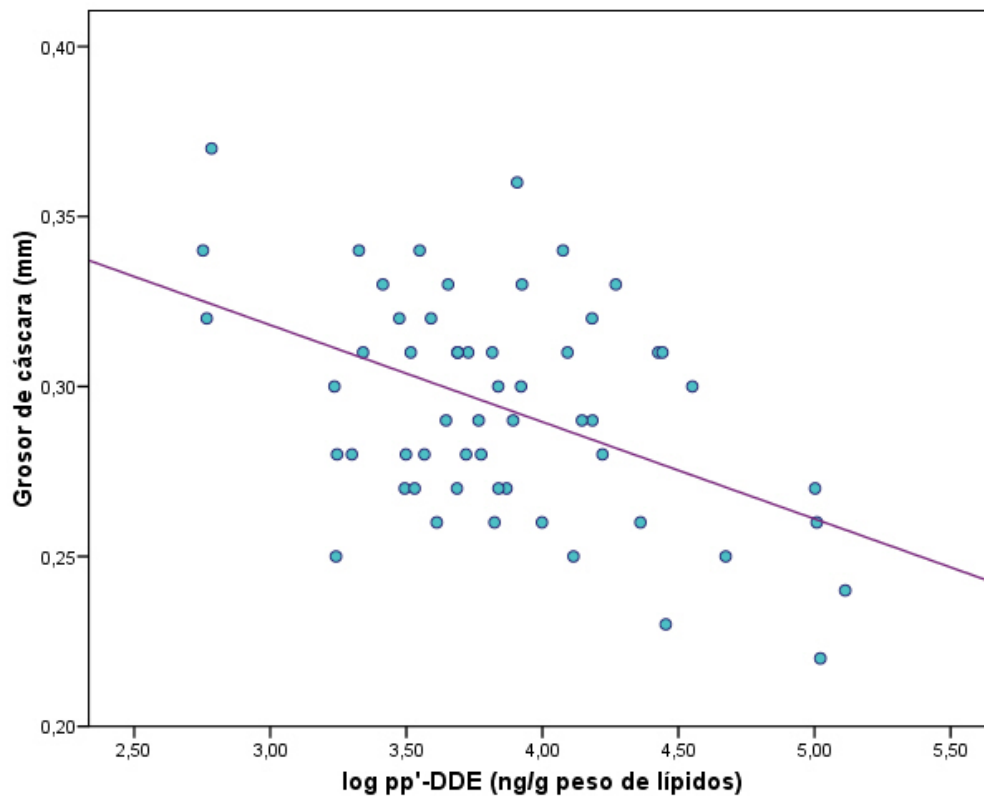


Figura IV.15. Correlación entre las concentraciones de pp'-DDE (ng/g peso de lípidos) y el grosor de cáscara (mm) ( $P=-0,469$ ,  $p<0,001$ ).

El Búho real se considera una especie abundante en nuestra zona de estudio (Martínez y Calvo, 2006), pero las tendencias poblacionales están todavía bajo estudio debido a una carencia de información sobre la especie en la zona en años anteriores (León *et al.*, 2008). Por este motivo, la influencia de la disminución del grosor de cáscara debe tenerse en cuenta y considerar que, si una disminución del 18% persiste durante un periodo de años, puede estar asociada a declives poblacionales (Blus, 2011). No obstante, declives poblacionales en otras rapaces nocturnas ya han sido descritas anteriormente en ausencia de disminución del grosor de cáscara. Por



ejemplo, según Gervais y Anthony (2003) la población del Autillo de madriguera (*Athene cunicularia*) disminuyó cuando concentraciones de pp'-DDE mayores de 4 µg/g se asociaron a una menor biomasa de roedores en la dieta.

*A priori* no se esperan efectos adversos debidos a los PBDEs en la población estudiada, ya que media del total de estos compuestos de los huevos analizados es muy similar a la encontrada en huevos de Cernícalos americanos utilizados como control en estudios de laboratorio (Ferne *et al.*, 2008). Nuestra media es además aproximadamente 1000 veces menor que el LOEL para PBDEs encontrado en huevos de Cernícalos americanos (LOEL=32 µg/g peso lípidos) (McKernan *et al.*, 2009). No se debe descartar, sin embargo, que se produzcan interacciones con otros contaminantes ambientales y estas sean responsables de efectos adversos sobre la salud. Así por ejemplo, se ha observado que estos contaminantes pueden interactuar con los PCBs causando efectos neurotóxicos en ratones expuestos durante un periodo crítico del desarrollo del cerebro (Eriksson *et al.*, 2006).

#### **IV.4. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES EN BÚHO REAL DEL SURESTE DE ESPAÑA**

La aplicación en zonas rurales de rodenticidas anticoagulantes para el control de plagas de roedores puede suponer un riesgo para los animales que los depredan, sobre todo las rapaces nocturnas (Stone *et al.*, 1999, 2003)

En un principio los análisis de residuos de rodenticidas anticoagulantes en animales silvestres solían limitarse a casos de hemorragias severas en ausencia de trauma, pero la sospecha de que una coagulopatía asociada a los rodenticidas podría ser un factor asociado a casos más complejos junto con la elevada frecuencia de detección de estos compuestos en determinadas especies condujo a su inclusión en los programas de biomonitorización (Stone *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2010b). Sin embargo, por lo que sabemos, en España no se ha realizado ningún estudio de este tipo, y los niveles de rodenticidas encontrados en aves silvestres se refieren a casos de intoxicación aguda por sospecha de envenenamiento (María-Mojica *et al.*, 1998) o tras la aplicación masiva intencionada para la erradicación de plagas (Olea *et al.*, 2009).



En el Sureste de España, el Búho real es una especie relativamente abundante que en ocasiones habita ambientes humanizados asociados a zonas de cultivo donde este tipo de biocidas pueden aplicarse.

Mientras que en las muestras de sangre no se detectó ningún rodenticida anticoagulante, el 83% de las muestras de hígado presentaron residuos de estos compuestos, siendo el difenacoum y el brodifacoum, seguidos de la bromadiolona los más frecuentemente detectados (82%, 64% y 17%, respectivamente). Las diferencias encontradas en relación al tipo de muestras puede ser debido a que estos compuestos alcanzan rápidamente altas concentraciones en sangre, donde persisten pocos días para acumularse en riñón, páncreas y sobre todo hígado. Desde el hígado, la eliminación de los residuos acumulados se produce de forma bifásica, con una primera fase rápida seguida de otra lenta, pudiendo alcanzar una vida media en hígado de hasta un año (Erickson y Urban, 2004).

La información relacionada con el uso de rodenticidas anticoagulantes en la zona de estudio es escasa. Sin embargo, precisamente los compuestos más frecuentes en nuestro estudio, difenacoum, brodifacoum y bromadiolona constan en el “Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino de España” (MARM, 2011), y además son los que presentan mayor número de productos comercializados en nuestro país (8, 10 y 13 preparados comerciales ,respectivamente), hecho que sugiere una mayor frecuencia de uso.

Los niveles de los cinco rodenticidas anticoagulantes encontrados en cada individuo se muestran en la Tabla IV.12.

Tabla IV.12. Residuos de rodenticidas anticoagulantes (ng/g, peso húmedo) en hígado de 18 Búhos reales del Sureste de España. ND=no detectado; NC= no calculado

Individuo	Causa de entrada	Warfarina	Clorofacinona	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Total
1	Desconocida	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
2	Desconocida	ND	ND	ND	1,62	169,64	<b>171,26</b>
3	Colisión	ND	ND	ND	6,18	207,22	<b>213,4</b>
4	Electrocución	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
5	Electrocución	ND	ND	9,82	0,55	12,03	<b>22,4</b>
6	Electrocución	ND	ND	86,65	4,03	4,46	<b>95,14</b>



7	Electrocución	10,29	ND	ND	41,53	ND	<b>51,82</b>
8	Electrocución	ND	ND	46,8	79,53	62,45	<b>188,78</b>
9	Electrocución	ND	ND	ND	4,82	68,1	<b>72,92</b>
10	Electrocución	ND	ND	ND	62,01	15,14	<b>77,15</b>
11	Electrocución	ND	ND	ND	1,94	ND	<b>1,94</b>
12	Traumatismo	ND	ND	ND	8,87	ND	<b>8,87</b>
13	Enganchado en valla metálica	ND	ND	ND	ND	21,22	<b>21,22</b>
14	Traumatismo	ND	18,92	ND	10,8	ND	<b>29,72</b>
15	Electrocución	ND	ND	ND	17,99	33,3	<b>51,29</b>
16	Electrocución	ND	ND	ND	0,99	12,11	<b>13,1</b>
17	Disparo	ND	ND	ND	9,31	323,47	<b>332,78</b>
18	Electrocución	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>Mediana</b>		ND	ND	ND	4,43	12,07	<b>40,51</b>
<b>Media</b>		NC	NC	7,96	13,90	51,62	<b>75,10</b>
<b>DE</b>		NC	NC	22,56	23,15	90,43	<b>93,13</b>
<b>Mínimo</b>		ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>Máximo</b>		10,29	18,92	86,65	79,53	323,47	<b>332,78</b>
<b>% Detección</b>		5,5	5,5	16,7	77,8	61	<b>83,3</b>

Se considera que los niveles de rodenticidas anticoagulantes asociados a efectos tóxicos en rapaces nocturnas oscilan entre 100 y 200 ng/g (Newton *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1999), si bien concentraciones tan bajas como 10 ng/g de brodifacoum se han asociado a hemorragias subcutáneas en Búhos americanos (Stone *et al.*, 1999). Más recientemente, Thomas *et al.* (en prensa) han estimado la probabilidad de efectos tóxicos asociados a distintas concentraciones de rodenticidas anticoagulantes en hígado de varias especies de rapaces. Según estos autores, 20 ng/g de rodenticidas anticoagulantes en hígado se puede relacionar con un 5% de probabilidad de causar efectos tóxicos en Búho americano, mientras que 70 ng/g se relacionaría con un 20% de probabilidades.

Durante la realización de las necropsias, solo en un individuo se observaron síntomas que pudieran tener relación directa con la exposición a estos compuestos, concretamente hemorragias en sacos aéreos y un hematoma en una extremidad



inferior. Aunque dicho individuo fue el que presentó los niveles de rodenticidas más altos (total=332,78 ng/g), dichas lesiones son probablemente debidas al impacto de perdigones, ya que un disparo que no le provocó la muerte inmediata fue su causa de entrada en el Centro de Recuperación. Sin embargo las concentraciones de rodenticidas superaron los 100 ng/g en otros dos individuos sin lesiones asociadas a rodenticidas, cuya causa de ingreso en el Centro de Recuperación fue la electrocución y traumatismos con lesiones irrecuperables.

Cabe recordar que el impacto de los rodenticidas anticoagulantes no se limita a los casos de muerte por hemorragias agudas, sino que, a menudo, la muerte es el resultado de una cadena de eventos asociados o la conjunción de varios factores (Stone *et al.*, 2003). Las hemorragias subletales dan lugar a una sintomatología inespecífica como debilidad, letargo, palidez de mucosas, disminución o ausencia de apetito, poliuria y polidipsia, taquicardia y polipnea con disnea, fatiga y percepción alterada (Valchev *et al.*, 2008). Como consecuencia de estas alteraciones los animales pueden ser depredados con mayor facilidad, ser más susceptibles de sufrir accidentes traumáticos o padecer enfermedades infecciosas o parasitarias, hipotermia o intoxicación por contaminantes organoclorados almacenados en tejido adiposo (Stone *et al.*, 2003). Las dos principales causas de ingreso de los búhos estudiados en el presente trabajo son la electrocución y los traumatismos. Dado que el 72% de los individuos estudiados presentaron niveles de brodifacoum superiores a los 10 ng/g asociado a hemorragias subcutáneas (Stone *et al.*, 2003), se podría sugerir que estos compuestos pudieron tener cierto papel en el desencadenamiento de la muerte de los individuos estudiados.

No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la edad, sexo, año ni procedencia de los búhos, ni correlaciones entre los compuestos, aunque un mayor número de muestras sería necesario para establecer tendencias.

#### **IV.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS Y SU RELACIÓN CON LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES PERSISTENTES**

El estudio de los parámetros bioquímicos es un método indirecto de evaluar el estado de salud general de los individuos que puede resultar una herramienta útil como indicador fisiológico en los programas de conservación de fauna silvestre (de Court *et al.*, 1995, van Wyk *et al.*, 1998). Una adecuada interpretación de resultados requiere disponer de los valores de referencia para cada especie, y de forma ideal,



para cada estadio vital, ya que ambos factores contribuyen en gran medida en la variabilidad de estos parámetros (Stout *et al.*, 2010), teniendo en cuenta además que la edad, el sexo, los ritmos circadianos y la lipemia postprandial pueden afectar y alterar diferentes componentes bioquímicos (van Wyk *et al.*, 1998; Joseph, 1999). Aunque en los últimos años existe un interés creciente por conocer los valores normales y el rango de variación de estos parámetros en las aves silvestres (Villegas *et al.*, 2002), este tipo de información es escasa para la mayoría de los parámetros y, en ocasiones, los resultados no pueden ser comparables porque las técnicas utilizadas por distintos autores son diferentes (Martínez-López *et al.*, 2004; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). Además, la mayoría de trabajos se centran en el estudio de estos parámetros en animales en cautividad y los trabajos sobre los niveles en aves silvestres que se encuentran en su hábitat natural y, en especial, sobre rapaces siguen siendo anecdóticos (van Wyk *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002). En este sentido, hemos encontrados algunos datos esporádicos en la bibliografía que hacen referencia a parámetros bioquímicos sanguíneos en algunas especies de rapaces de vida libre tales como el Buitre africano (*Gyps africanus*) (Van Wyk *et al.*, 1998), el Pigargo americano (Bowerman *et al.*, 2000), el Buitre negro (*Aegypius monachus*) (Villegas *et al.*, 2002), el Aguililla calzada (Casado *et al.*, 2002), el Azor (Sonne *et al.*, 2010; Stout *et al.*, 2010), el Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) (Hernández y Margalida, 2010), el Pigargo europeo y el Águila real (*Aquila chrysaetos*) (Sonne *et al.*, 2010).

Se debe tener en cuenta que algunos parámetros bioquímicos pueden actuar como indicadores secundarios del estrés ocasionado por la presencia de contaminantes ambientales persistentes, ya que sus niveles se ven alterados por la presencia de éstos (Bowerman *et al.*, 2000). Sin embargo, es escasa la bibliografía que relaciona las concentraciones de componentes bioquímicos sanguíneos en rapaces con una exposición conocida a contaminantes ambientales persistentes, como plomo, cadmio o plaguicidas organoclorados, por lo que la interpretación de los resultados se ve aún más dificultada.

Solo se han encontrado dos estudios sobre parámetros bioquímicos en nuestra especie de estudio, por lo que para la interpretación de nuestros resultados se han tenido en cuenta los realizados en otras especies de rapaces. En la Tabla IV.13 se recogen los valores de los parámetros bioquímicos estudiados en el presente trabajo en quince especies de rapaces, tanto mantenidas en cautividad como de vida libre.



Tabla IV.13. Parámetros bioquímicos en distintas especies de rapaces. Adaptado de Saimour, 2011.

	Búho real ( <i>Bubo bubo</i> ) d; n=20 Rango	Búho real ( <i>B. bubo</i> ) b n=36 Media±DE	Búho americano ( <i>B. virginianus</i> ) a; n=10 Media	Cárabo ( <i>Strix aluco</i> ) h Mediana; media (Rango) n=7	Pigargo europeo ( <i>Haliaeetus albicilla</i> ) g; n=5 Mediana (Rango)	Águila real ( <i>Aquila chrysaetos</i> ) c, g; n=7, 2 Rango	Pigargo americano ( <i>H. leucocephalus</i> ) a, c; n=8 Rango	Águila rapaz ( <i>Aquila rapax</i> ) d n=13 Rango
Albúmina (g/L)	18,7-22,4	1,19±0,03	12,7	19,3; 19,8 (15,3-26,9)	12,7 (11-14,4)	-, 13,9-14,5	10,9	25,3-28,4
FAL (U/L)	-	-	31	420; 629 (184-1459) n=8	1247 (974-1632)	15-36 1331-1595	23-30	17,1-69,7
AST (U/L)	-	382,20±26,7	287	279; 281 (214-368) n=8	-	-, 95-210	153-370	124-226
Calcio (mg/dL)	8,64-10,44	9,25±0,18	10,2	10,48; 10,6 (9,2-12,32) n=6	9,8 (9,04-10,48)	7,4-9,52 9,32-9,88	8,2-10,6	8,84-10,64
Colesterol mg/dL	150,93-274,77	180,80±5,5	-	-	236,46 (232,59-355,27)	100,23-190,02, 162,84-185,76	150,16-242,26	305,73-414,09
CK (U/L)	-	-	977	13; 86 (2-344) n=8	-	-	383	-



γ-GT (U/L)	-	-	-	25; 31 (4-77) n=8	4,82 (2-8)	-, 4-5	-	1,0-2,7
Glucosa (mg/dL)	243-390,6	403,80±8,80	355,68	360; 361,8 (338,4-392,4) n=6	284,4 (279-372,6)	249,84-407,7 304,2- 325,8	284,76-399,6	183,6-261
LDH (U/L)	-	-	-	-	-	320- 690	250-580	211-369
Fósforo (mg/dL)	-	6,18±0,35	4,34	6,44; 7,25 (3,5-12,7) n=8	6,19 (4,8-7,56)	1,9-3,6 6,35-6,72	3,03	-
Proteínas totales (g/L)	30,1-34,5	-	43,3	34,8; 38,6 (33,4-54) n=8	27,6 (23,3-29,4)	25-39 29,8-32,8	30-41	29-41,4
TGL (mg/dL)	-	337,50±105,1	-	-	-	-	212,4-183,2	-
Ácido úrico (mg/dL)	-	12±2,2	13,69	7,68; 7,68 (4,74-10,62)n=4	10,26 (3,48-20,16)	4,4-11,99 6,17-16,25	5,5-14,79	-

a Altman *et al.*, 1997. Rango de valores; b García-Rodríguez *et al.*, 1987. Media±desviación estándar; c Ivins *et al.*, 1986. Rango de valores; d Jennings, 1996. Rango de valores; e Kollias y McLeish 1978. Rango de valores; f Samour y D'Aloia, 1996. Rango de valores; g Sonne *et al.*, 2010. Muestras obtenidas de pollos. Mediana (rango); h Spagnolo *et al.*, 2008





Tabla IV.13. Parámetros bioquímicos en distintas especies de rapaces. Adaptado de Saimour, 2011 (continuación).

	Halcón Borní ( <i>Falco biarmicus</i> ) d; n=26 Rango	Halcón gerifalte ( <i>Falco rusticolus</i> ) a; n=12 Media	Halcón peregrino ( <i>Falco peregrinus</i> ) a, d; n=55, 14 Rango	Halcón sacre ( <i>Falco cherrug</i> ) b, f; n=38 Rango	Esmerejón ( <i>Falco columbarius</i> ) d; n=39 Rango	Busardo colirrojo ( <i>Buteo jamaicensis</i> ) a,c,e; n=10 Rango	Halcón de Harris ( <i>Parabuteo unicinctus</i> ) c, d; n=17 Rango	Azor ( <i>Accipiter gentilis</i> ) d, g n=24; 16 Rango, Mediana (rango)
Albúmina (g/L)	9,6-16	7,3	8,3-12,5	9-12,3	8,6-16,1	-	21-29,4	18,0-29,2; 13 (11,7-14)
FAL (U/L)	180-510	257	97-350	285-450	54-310	45-90	20-96	15,6-87,5; 1381 (740-1451)
AST (U/L)	30-118	97	50-105	45-95	50-125	113-180	160-348	176-409; -
Calcio (mg/dL)	8,28-9,8	9,6	8,4-10,24	8,6-10,44	8-9,8	8,4-10	8,4-10,64	8,6-10,76; media= 8
Colesterol (mg/dL)	116,1-340,56	-	150,93-406,35	174,15-332,82	116,1-301,86	100,23-150,16	255,42-506,97	154,8-445,05; -
CK (U/L)	350-650	402	357-850	355-651	521-807	1124	224-650	218-775; 154,8 (121,91-223,69)
γ-GT (U/L)	-	-	0-7	0,8-5,9	-	-	2,0-6,9	3,0-7,6; 5 (2-8)
Glucosa (mg/dL)	198-270	319,5	198-288	216-252	162-216	311,76-411,66	219,6- 282,6	207-286; 2,306



								(257,4-313,2)
LDH (U/L)	434-897	-	625-1210	551-765	320-630	470-775	160-563	120-906; -
Fósforo (mg/dL)	-	3,57	3,35	-	-	1,8 - 4,1	3,0 - 4,4	-; 6,19 (5,48-6,84)
Proteínas totales (g/L)	33-42	28,9	25-40	27-36	27,5-39	33-45	31-45,7	26,3-42; 0, 27(25,5-31,2)
Triglicéridos (mg/dL)	-	-	-	69,92-110,63	-	-	-	-
Ácido úrico (mg/dL)	0,005-0,012	0,014	0,005-0,011	0,005- 0,013	0,003-0,013	7,49-17,78	0,009- 0,013	0,008-0,014; 12,01 (6,17-13,57)

a Altman *et al.*, 1997. Rango de valores; b García-Rodríguez *et al.*, 1987. Media±desviación estándar; c Ivins *et al.*, 1986. Rango de valores; d Jennings, 1996. Rango de valores; e Kollias y McLeish 1978. Rango de valores; f Samour y D'Aloia, 1996. Rango de valores; g Sonne *et al.*, 2010. Muestras obtenidas de pollos. Mediana (rango); h Spagnolo *et al.*, 2008



Los resultados de los parámetros bioquímicos estudiados en el presente trabajo se muestran en la Tabla IV.14. Las muestras que presentaban signos de hemólisis fueron descartadas del análisis estadístico para evitar interferencias en algunos parámetros que pueden verse alterados por este efecto como son la LDH, la ALT, la AST, el calcio, la albúmina o la CK.

Tabla IV.14. Mediana; media $\pm$ DE (mínimo-máximo) de los parámetros bioquímicos estudiados en pollos y adultos de Búho real nacidos en el Sureste de España

	Pollos 2003-2009	Adultos 2007-2009
Albúmina (g/L)	16,53; 15,99 $\pm$ 3,15 (1,50-21,94) (n=346)	17,43; 16,05 $\pm$ 3,87 (6,31-20,44) (n=12)
FAL (U/L)	510,13; 525,81 $\pm$ 174,44 (9,81-1162,51) (n=338)	19,62; 46,19 $\pm$ 87,51 (14,72-323,74) (n=12)
AST (U/L)	169,68; 184,28 $\pm$ 77,68 (4,71-471,35) (n=367)	189,72; 198,46 $\pm$ 93,22 (28,28-362,94) (n=12)
Calcio (mg/dL)	10,27; 10,15 $\pm$ 3,32 (0,38-44,40) (n=362)	9,61; 10,09 $\pm$ 1,80 (7,11-13,70) (n=12)
Colesterol mg/dL	205,41; 254,29 $\pm$ 302,09 (7,38-2815) (n=364)	184,50; 186,14 $\pm$ 30,85 (136,53-233,70) (n=12)
CK (U/L)	280,02; 884,00 $\pm$ 1031,37 (2,00-3478,28) (n=301)	1440,12; 1363,11 $\pm$ 663,21 (322,03-2302,19) (n=6)
$\gamma$ -GT (U/L)	3,73; 10,82 $\pm$ 39,01 (0,11-451,87) (n=290)	1,50; 15,52 $\pm$ 43,60 (0,44-139,54) (n=10)
Glucosa (mg/dL)	438,13; 428,13 $\pm$ 73,22 (4,96-552,14) (n=347)	395,21; 393,29 $\pm$ 81,79 (252,37-497,05) (n=12)
LDH (U/L)	811,48; 825,26 $\pm$ 342,24 (5,39-1967,87) (n=321)	801,43; 936,04 $\pm$ 409,11 (562,10-1726,53) (n=8)
Fósforo (mg/dL)	7,13; 25,68 $\pm$ 109,12 (0,54-918,00) (n=366)	2,37; 2,91 $\pm$ 1,99 (1,29-8,61) (n=12)



Proteínas totales (g/L)	31,25; 29,76±8,8,2 (1,01-41,33) (n=368)	35,28; 32,59±10,59 (4,03-43,35) (n=12)
TGL (mg/dL)	117,09; 119,61±49,61 (2,31-285,09) (n=359)	90,36; 89,20±25,96 (42,00-133,64) (n=12)
Ácido úrico (mg/dL)	11,90; 12,10±4,81 (0,04-30,31) (n=357)	6,67; 7,66±3,23 (3,59-13,06) (n=12)
Urea (mg/dL)	15,45; 16,00±6,92 (6,24-32,00) (n=21)	
Creatinina (mg/dL)	0,60; 1,65±2,84 (0,10-9,71) (n=12)	
ALT (U/L)	51,50; 68,71±55,33 (2,25-158,00) (n=6)	

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la edad es un factor que puede afectar a los niveles de determinados parámetros bioquímicos (Stout *et al.*, 2010). Así los niveles de FAL son más elevados en individuos en crecimiento ya que es una enzima sintetizada por los osteoblastos. De hecho, si se comparan los datos encontrados en bibliografía, los niveles de FAL son de 10 a 100 veces superiores en individuos jóvenes que en adultos (Jennings, 1996; Sonne *et al.*, 2010). También en individuos jóvenes el fósforo y el potasio se ven aumentados debido a la hormona del crecimiento y la movilización para el desarrollo del hueso y el músculo (Clubb *et al.*, 1991a, b, c), mientras que la mayor síntesis de proteínas en esta fase vital produce un aumento de los niveles de ácido úrico (Hochleithner, 1994). En el caso de la glucosa, los niveles en juveniles pueden ser más elevados que en adultos (Hochleithner, 1989).

En nuestro estudio la mayoría de los parámetros presentaron niveles más altos en los pollos que en los adultos, aunque solo de forma significativa para la FAL ( $p<0,001$ ), el fósforo sérico ( $p<0,001$ ), los triglicéridos ( $p=0,002$ ) y el ácido úrico ( $p=0,001$ ). Por el contrario, en los adultos los niveles de  $\gamma$ -GT fueron significativamente superiores ( $p=0,009$ ).

Por otro lado, ninguno de los parámetros bioquímicos estudiados mostró diferencias significativas debidas al sexo en los individuos adultos ni en los pollos.



#### IV.5.1. Estudio de las correlaciones entre parámetros bioquímicos sanguíneos y los niveles de metales pesados en sangre de pollos de Búho real

La alteración de los parámetros bioquímicos tras la exposición a metales puede ser debida a la interferencia con la actividad de diferentes enzimas (Godwin, 2001) o al daño que producen en los distintos tejidos (Pattee *et al.*, 1981), si bien este último caso suele ocurrir a concentraciones más elevadas.

En el presente trabajo algunos de los parámetros bioquímicos estudiados se correlacionaron de forma significativa con los niveles de metales pesados en sangre. En concreto los niveles de ácido úrico aumentaron con los de cadmio en sangre ( $Rho=0,173$ ,  $p=0,017$ ). Aunque un incremento en los niveles de ácido úrico en aves por encima de 20 mg/dL puede ser indicativo de daño renal (Campbell, 1987) y el 13% de las muestras analizadas superan este valor, la correlación encontrada es débil y además el umbral de toxicidad para el cadmio en sangre de aves aún no se ha establecido (Martínez-López *et al.*, 2005).

El hecho de que dietas bajas en calcio favorezcan la absorción y acumulación de cadmio en aves (Scheuhammer, 1996) puede ser una explicación para la existencia de una correlación negativa entre los niveles de ambos elementos en las muestras de sangre analizadas ( $Rho=-0,21$ ,  $p<0,01$ ). Sin embargo, los niveles de calcio en suero de nuestras muestras (media=9,24 mg/dL) están dentro del rango encontrado en Búhos reales mantenidos en cautividad (García-Rodríguez *et al.*, 1987; Jennings, 1996) y de otras rapaces, tanto adultas como pollos (Tabla IV.13; Kollias y McLeish, 1978; Ivins *et al.*, 1986; Samour y D'Aloia, 1996; Altman *et al.*, 1997; Sonne *et al.*, 2010), por lo que esta correlación parece tener poca trascendencia clínica ante las concentraciones de cadmio encontradas.

La exposición a plomo puede producir alteraciones en los niveles séricos de distintos parámetros como la FAL, LDH, glucosa, triglicéridos, CK, albúmina, proteínas totales, colesterol, fósforo y creatinina (Hoffman *et al.*, 1981; Mateo *et al.*, 2003a). Algunos de estos efectos coinciden con los observados en nuestro estudio a concentraciones de plomo en sangre muy inferiores a las correspondientes a dichos estudios (Plomo-albúmina:  $Rho=0,2$ ,  $p=0,02$  y Plomo-glucosa sérica:  $Rho=0,19$ ,  $p=0,02$ ). Así por ejemplo, las concentraciones de plomo en sangre de Ánades estudiados por Mateo *et al.* (2003a), que causaron alteraciones de FAL, triglicéridos y colesterol, oscilaron entre valores 100 y 1000 veces mayores que los encontradas en



nuestro estudio; mientras que concentraciones de plomo en sangre entre 80 y 540  $\mu\text{g/dL}$  causaron incrementos significativos de la actividad ALT y de los niveles de albúmina y glucosa séricos en Pigargos americanos (Hoffman *et al.*, 1981).

#### **IV.5.2. Estudio de las correlaciones entre parámetros bioquímicos sanguíneos y los niveles de insecticidas organoclorados en sangre de pollos de Búho real**

Las alteraciones que algunos compuestos organohalogenados pueden producir sobre determinados órganos puede verse reflejada en una alteración de los parámetros bioquímicos sanguíneos, tal y como se ha demostrado en estudios experimentales, tanto en mamíferos como en aves (Dieter, 1974; Kutlu *et al.*, 2007; Sonne *et al.*, 2008 a,b). En el caso de las enzimas específicas de órganos, la inhibición o estimulación pueden ser características de la exposición una determinada clase de contaminantes, por lo que su estudio podría llegar a ser suficiente para conocer el tipo de contaminación al que los animales se han visto expuestos (Dieter, 1974). Sin embargo en condiciones de campo los animales se ven expuestos a diversos compuestos, cuyos efectos pueden verse inhibidos o potenciados entre sí, por lo que este tipo de determinaciones no siempre puede considerarse de forma aislada, pero sí como complemento de los análisis químicos de contaminantes, sobre todo en sangre de animales vivos (Dieter, 1975).

En general, los parámetros bioquímicos de las aves son difíciles de interpretar y la bibliografía que los relaciona con los niveles de compuestos organohalogenados en sangre es escasa (Dieter 1974, 1975; Dieter y Wiemeyer, 1978; Sonne *et al.*, 2010), por lo que algunos autores aplican algunos de los resultados encontrados en mamíferos.

Entre los parámetros que pueden verse alterados por una exposición a compuestos organohalogenados en aves se encuentran el aumento de la actividad de las enzimas CK, AST, ALT y LDH (Dieter, 1974, 1975; Dieter y Wiemeyer, 1978), así como una disminución de los niveles de ácido úrico, triglicéridos, albúmina, proteínas totales, fósforo y calcio (Fox *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, las correlaciones entre los niveles de insecticidas organoclorados y parámetros bioquímicos en sangre fueron, en general, débiles y negativas (Tabla IV.15). Fue el caso de la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual disminuyó significativamente conforme aumentaron las concentraciones totales de



insecticidas organoclorados estudiados (Tabla IV.15). Si bien las causas son desconocidas, este tipo de correlación coincide con la encontrada en tres especies de rapaces estudiadas por Sonne *et al.* (2010). No obstante, de forma similar a los efectos observados por Dieter (1974, 1975), Dieter y Wiemeyer (1977) y Sonne *et al.*, (2010) en sus estudios sobre aves, la actividad de algunas enzimas se vio aumentada por exposición determinados insecticidas organoclorados (Tabla IV.15, Lindano-AST:  $Rho=0,156$ ,  $p=0,03$ ; heptacloro epóxido-AST:  $Rho=0,185$ ,  $p=0,01$  y  $\Sigma$ HCHs-ALT:  $Rho=0,751$ ,  $p=0,012$ ). Tanto la AST como la ALT son enzimas intracelulares cuyos niveles séricos suelen ser bajos, pero que ante daño tisular serio, concretamente del hígado pueden aumentar (Hochleithner, 1994). Entre las alteraciones relacionadas con la exposición a compuestos organohalogenados se encuentran las que se producen a nivel metabólico o endocrino, así como los procesos regenerativos del hígado (Ettinger y Feldman, 1995; Thrall *et al.*, 2006).

A diferencia del estudio realizado por Sonne *et al.* (2010), los niveles de proteínas totales se correlacionaron negativamente y de forma significativa con  $\Sigma$ total de insecticidas organoclorados (Tabla IV.15). Sin embargo, Fox *et al.* (2007) sí que encontraron menores niveles de proteínas séricas en las gaviotas de la zona contaminada que en las que habitaban la zona no contaminada; resultados que coinciden con el estudio de Greichus *et al.* (1975) en el que se administraron PCBs y mezclas de DDT, DDD y DDE a pelícanos. La medición de los niveles de proteínas totales se utiliza como indicador del estado general de salud del individuo. Aunque la interpretación de este parámetro, al igual que el resto, debe realizarse teniendo en cuenta la edad y el estado fisiológico de los individuos, la hipoproteïnemia puede reflejar una disminución en la síntesis de proteínas debido a hepatopatías crónicas, malabsorción por problemas intestinales crónicos, proteinuria por alteraciones renales, hemorragias o malnutrición. Sin embargo, el estado general de salud de los individuos muestreados era bueno, por lo que podemos sugerir que los insecticidas organoclorados presentes en los individuos estudiados han podido alterar los niveles de proteínas séricas.

Los efectos de los compuestos organohalogenados sobre los niveles de glucosa y triglicéridos se han descrito en distintos estudios, pero las correlaciones encontradas son a menudo opuestas (Gorski y Rozman, 1987; Elliott *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2007; Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2010; Sonne *et al.*, 2010). En nuestro estudio ambos parámetros disminuyeron significativamente conforme aumentaron los



niveles de  $\Sigma$ HCHs ( $\Sigma$ HCHs-TGL:  $Rho=-0,203$ ,  $p=0,007$ ;  $\Sigma$ HCH-glucosa:  $Rho=-0,189$ ,  $p=0,012$ ).

Los niveles de  $\gamma$ -GT suelen utilizarse como marcador de daño hepático aunque su utilidad en aves es controvertida (Hochleitner, 1994). Sin embargo, y debido a que esta enzima interviene en el metabolismo de los conjugados de GSH para detoxificar xenobióticos a ácido mercaptúrico, los niveles de  $\gamma$ -GT aumentarían con la exposición a contaminantes (Lee y Jacobs, 2009). Esta correlación positiva se ha encontrado en humanos expuestos a bajas concentraciones de organoclorados (Lee y Jacobs, 2006). En nuestro estudio, las correlaciones encontradas son contradictorias (los niveles de la enzima aumentaron con las concentraciones de endosulfán pero disminuyeron con pp'-DDE), probablemente debido a que las concentraciones de insecticidas presentes en la sangre de nuestros individuos fueron demasiado bajas como para provocar alteraciones a estos niveles.

En base a estos resultados podemos sugerir que existen indicios de que los residuos de determinados insecticidas y metales puedan estar afectando negativamente la salud de algunos de los individuos estudiados. A pesar de que es necesario profundizar en este estudio, ya que las concentraciones encontradas pueden ser demasiado bajas o el tiempo de exposición demasiado breve como para alterar determinados parámetros. Sin embargo, podemos sugerir que el estudio de los parámetros bioquímicos, especialmente de FAL, TGL, AST,  $\gamma$ -GT y proteínas totales podrían ser de utilidad para estudiar la evaluación del riesgo asociado a la exposición a compuestos organoclorados en sangre de aves, mientras que el estudio de los niveles de ácido úrico y calcio podrían servir para evaluar la exposición a cadmio; y la albúmina y la glucosa se relacionaría con los niveles de plomo en sangre de aves.





Tabla IV.15. Correlaciones entre concentraciones de insecticidas organoclorados y parámetros bioquímicos en sangre de pollos de Búho real nacidos entre 2003 y 2007 en el Sureste de España. \* < 0,05; \*\*<0,01

	FAL (U/L)	AST (U/L)	Calcio (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	γ-GT (U/L)	Glucosa (mg/dL)	PT (g/L)	TGL (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	ALT (U/L)
<b>α-HCH</b>	-0,202**					-0,188*	-0,236**	-0,20**			
<b>Lindano</b>	-0,302**	0,156*					-0,407**	-0,149*			
<b>ΣHCH</b>	-0,290**					-0,189*	-0,407**	-0,203**			0,751*
<b>Aldrin</b>	-0,206**						-0,224**				
<b>Dieldrin</b>	-0,163*			-0,176*			-0,250**				
<b>Endrin</b>	-0,157*						-0,256**				
<b>Heptacloro</b>	-0,163*						-0,27**				
<b>Heptacloroepóxido</b>	-0,32**	0,185**	0,161*				-0,346**				
<b>Σ Endosulfán</b>	-0,291**				0,182*		-0,495**			-0,624*	
<b>Σ Ciclodiénicos</b>	-0,214**				0,215**		-0,483**				
<b>DDT</b>	-0,18*						-0,237**		0,53*		
<b>DDD</b>							-0,149*				
<b>DDE</b>	-0,176*				-0,16*		-0,277**				
<b>Σ Difenilifáticos</b>	-0,162*				-0,167*		-0,294**				
<b>Total insecticidas</b>	-0,170*					-0,228**	-0,369**				



## **V. CONCLUSIONS**



### **V.1. Assessment of heavy metal exposure (Cd, Pb, Cu y Zn) in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain**

**First:** The Eagle owl population from South-eastern Spain is exposed to low levels of cadmium and lead and presents zinc and copper levels that fall in the range considered as physiological.

**Second:** The significant correlations between cadmium, zinc and copper could suggest that the essential metals are involved in mechanisms of cadmium detoxification in the organism.

**Third:** The significant differences between blood lead levels in the Eagle owl chicks from the abandoned mining area and the rest of the study area suggest that the blood from Eagle owl chicks could be a useful tool for biomonitoring environmental contamination by this metal.

**Fourth:** The negative correlation between lead levels and  $\delta$ -ALAD activity in blood of Eagle owl chicks suggests that the activity of this enzyme could be used as a sensitive biomarker for lead exposure and effect in this species, even when blood lead levels are below the limit described by other authors as the lowest for  $\delta$ -ALAD activity inhibition by lead.

### **V.2. Assessment of organochlorine insecticides in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain**

**First:** Levels of organochlorine insecticides in blood of Eagle owl chicks are low and tend to decrease over time in the study area, with lindane, endosulfan, p,p'-DDE and dieldrin being the most frequent and abundant compounds. Among the organochlorine insecticides studied, lindane and endosulfan are the most recently banned in the study area and p,p'-DDE and dieldrin the most persistent compounds in the environment. This fact corroborates that the use of raptor chick blood can be considered as a non-destructive sampling unit for monitoring this type of contaminants.

**Second:** Endosulfan and p,p'-DDT levels in blood of Eagle owl chicks decreased according to the land surfaces dedicated to crops where dicofol and endosulfan were



recommended. This suggests that the blood of chicks from this species can be considered as an excellent sampling unit to monitor the use of insecticides.

### **V.3. Study of levels of organohalogen compounds in Eurasian Eagle owl unhatched eggs: Temporal-spatial trends and risk assessment**

**First:** PCBs and p,p'-DDE were the most frequent and abundant organohalogen compounds in unhatched Eagle owl eggs from South-eastern Spain.

**Second:** Temporal-spatial trends were significantly different between subareas for some compounds. While concentrations of HCB, p,p'-DDE,  $\beta$ -HCH, PCBs and PBDEs tended to decrease through the study period in the Northern subarea, levels of these compounds tended to increase in the Southern area. An increase in environmental contamination as well as a dietary shift with a greater amount of birds in the diet could be the causes for the increasing temporal trend of organohalogen levels in the Southern subarea.

**Third:** Although mean organohalogen levels in unhatched eggs fell below the toxic threshold levels for raptors, these levels were exceeded in some samples. Moreover, the negative correlation between TEQs and metabolisable PCBs could be indicative of hepatic enzyme induction. This induction is generally regarded as early warning signals for the Ah-receptor-related toxic effects of PCBs and related compounds. In addition, the eggshell thickness decreased with increasing p,p'-DDE levels, reaching 17% eggshell thinning (a degree of thinning related to population declines in birds) when levels of this metabolite exceeded 100 ng/g lipid weight.

**Fourth:** Despite the fact that the Eagle owl is considered an abundant species in the study area, population trends are currently being studied. Hence, continuing sampling and analyses of unhatched eggs are needed to validate the trends in organohalogen levels and evaluate the risks that an increase in concentrations could pose for the species.



#### **4. Assessment of exposure to anticoagulant rodenticides in Eurasian Eagle owls from Southeastern Spain**

**First:** The development of a new, fast, easy and low cost technique has permitted the detection of residues of five anticoagulant rodenticides (warfarin, difenacoum, brodifacoum, bromadiolone and chlorofacinone) in 83% of the liver samples of adult eagle owls that arrived dead or died at the Wildlife Rehabilitation Centre “Santa Faz” (Alicante).

**Second:** Difenacoum, brodifacoum and bromadiolone were the rodenticides most frequently detected in livers of adult Eagle owls. They are also the compounds most frequently marketed for agricultural use in Spain. Therefore, we assume that Eagle owls are able to reflect the frequency of use of these compounds in rural areas.

**Third:** Although it was not possible to relate the presence of anticoagulant rodenticides in the liver of Eagle owls with the direct causes of death, it is possible that they could be contributing to the death of the individuals studied.

#### **V.5. Study of serum biochemical parameters and the relation with levels of environmental pollutants in blood from Eagle owls**

**First:** The availability of a great number of serum samples has provided new information regarding biochemical parameters in both adults and chicks of free-living Eagle owls. For example, alkaline phosphatase, inorganic phosphate, triglycerides and uric acid were significantly higher in chicks than in adults.

**Second:** Despite organochlorine insecticide and metal concentrations being, in general, low in blood of Eagle owl chicks, we can suggest that levels of some biochemical parameters, especially alkaline phosphatase, triglycerides, AST,  $\gamma$ -GT and total proteins may be useful to evaluate risks associated to organochlorine insecticide exposure. On the other hand, uric acid and calcium could be used to evaluate risks associated to cadmium exposure and albumin and glucose to lead.



## **VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- ADKINS-REGAN E, MANSUKHANI V, SEIWERT C, THOMPSON R. 1994. Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *J Neurobiol* 25:865-877
- ALAVA J.J., KELLER J.M., KUCKLICK J.R., WYNEKEN J., CROWDER L., SCOTT G.I. 2006. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *Sci Total Environ* 367:170-181
- ALBERT C.A., WILSON L.K., MINEAU P., TRUDEAU S., ELLIOTT J.E. 2010. Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988-2003. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:451-459
- ALLEN R.L. 1971. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. Academic, New York, pp 873-881
- ALTMAN R.B., CLUBB S.L., DORRESTEIN G.M., QUESENBERRY K. 1997. Appendix I. En: Altman R.B., Clubb S.L., Dorrestein G.M., Quesenberry K. (Eds). *Avian medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia
- ANITESCU G., TAVLARIDES L.L. 2000. Oxidation of Aroclor 1248 in supercritical water: A global kinetic study. *Ind Eng Chem Res* 39:583-591
- ANWER J., ALI S., MEHROTA N.K. 1988. Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. *Drug Chem Toxicol* 11:85-95
- ARNOLD D.L., BRYCE F., KARPINSKI K., MES J., FERNIE S., TRYPHONAS H., TRUELOVE J., MCGUIRE P.F., BURNS D., TANNER J.R., STAPLEY R., ZAWIDZKA Z.Z., BASFORD D. 1993. Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female Rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part1B. Prebreeding phase: clinical and analytical laboratory findings. *Food Chem Toxicol* 11:811-824
- ARREBOLA J.P., FERNANDEZ M.F., PORTA M., ROSELL J., MARTÍNEZ DE LA OSSA R., OLEA N., MARTIN-OLMEDO P. 2010. Multivariate models to predict human adipose tissue PCB concentrations in Southern Spain. *Environ Int* 36:705-713



- ARREBOLA J.P., MARTIN-OLMEDO P., FERNANDEZ M.F., SÁNCHEZ-CANTALEJO E., JIMENEZ-RIOS J.A., TORNE P., PORTA M., OLEA N. 2009. Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: A multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ Int* 35:27-32
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological profile for copper. U.S. Public Health Service, Atlanta, Georgia, TP-90-08
- BAGCHI D., BAGCHI M., HASSOUN E.A., STOHS S.J. 1996. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague–Dawley rats. *Biol Trace Elem Res* 52:143-154
- BAGCHI D., JOSHI S.S., BAGCHI M., BALMOORI J., BENNER E.J., KUSZYNSKI C.A., STOHS S.J. 2000. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Biochem Mol Toxicol* 14:33-41
- BAILEY R.E. 2001. Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere* 43:167-182
- BAKER M.F. 1964. Studies on possible effects of mirex bait on the bobwhite quail and other birds. *Proc Annu Conf SE Assoc Fish and Game Comm* 18:1
- BANN J.M., DECINO T.J., EARLE N.W., SUN Y.-P. 1956. The fate of aldrin and dieldrin in the animal body. *J Agric Food Chem* 4:937-941
- BAOS R., JOVANI R., FORERO M.G., TELLA J.L., GÓMEZ G., JIMÉNEZ B., GONZÁLEZ M.J., HIRALDO F. 2006. Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and as concentrations in blood of nestling White storks (*Ciconia ciconia*) and Black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Toxicol Chem.* 25:1153-1159
- BARBER J.L., SWEETMAN A.J., VAN WIJK D., JONES K.C. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci Total Environ* 349:1-44





- BARBERÁ C. 1989. Pesticidas agrícolas. Ediciones Omega. Barcelona, España
- BARGAR T.A., SCOTT G.I., COBB G.P. 2001. Maternal transfer of contaminants: case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white Leghorn chickens (*Gallus domesticus*). *Environ Toxicol Chem* 20:61-67
- BARJAKTAROVIC L., ELLIOTT J.E., SCHEUHAMMER A.M. 2002. Metal and metallothionein concentrations in Scoter (*Melanitta spp.*) from the Pacific Northwest of Canada, 1989-1994. *Arch Environ Contam Toxicol* 43:486-491
- BARNES C., NEWALL F., IGNJATOVIC V., WONG P., CAMERON F., JONES G., MONAGLE P. 2005. Reduced bone density in children on longterm warfarin. *Pediatr Res* 57:578-581
- BECHARA E.J. 1996. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 29:841-851
- BECK A.B. 1961. Observations on the copper metabolism of the domestic fowl and duck. *Aust J Agric Res* 12:743-753
- BECKER P.H. 2003. Biomonitoring with birds. En: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (Eds). *Bioindicators and biomonitors: principles, concepts, and applications*. Elsevier, Oxford, pp 677-736
- BEEBY A. 2001. What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 112:285-298
- BELLEVILLE M.J. 1981. Absorption, distribution, metabolism and excretion studies in the rat using <sup>14</sup>C-labeled chlorophacinone. Unpubl. report submitted to EPA by Lipha Chemicals, Inc., New York. 14 pp
- BENEYTO A., BORAU J.A. 1996. El Búho real (*Bubo bubo*) en Cataluña (NE de España). En: Muntaner J., Mayol J. (Eds). *Biología y Conservación de las Rapaces Mediterráneas*, 1994:477-483. Madrid, SEOBirdlife.



- BENITO V., DEVESA V., MUÑOZ O., SUÑER M.A., MONTORO R., BAOS R., HIRALDO F., FERRER M., FERNÁNDEZ M., GONZÁLEZ M.J. 1999. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci Total Environ* 242:309-323
- BENSON W.W., BROCK D.W., GABICA J., LOOMIS M. 1976. Swan mortality due to certain heavy metals in the Mission Lake Area, Idaho. *Bull Environ Contam Toxicol* 15:171-174
- BERGMAN A. 1989. Brominated fire-retardants in a global environmental perspective. En: *Proceedings Workshop on Aromatic Fire-retardants*, Skokloster, Sweden, pp 13-23
- BERNARD A., LAUWERYS R. 1984. Cadmium in human population. *Cell Mol Life Sci* 40:143-152
- BERNY P.J., BURONFOSSE T., BURONFOSSE F., LAMARQUE F., LORGUE G. 1997. Field evidence of secondary poisoning of Foxes (*Vulpes vulpes*) and Buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 35:1817-1829
- BERTIN G., AVERBECK D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88:1549-1559
- BEYER W.N. 1996. Foreword. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. Lewis, Boca Raton, Florida
- BEYER W.N., DALGARN J., DUDDING S., FRENCH J.B., MATEO R., MIESNER J., SILEO L., SPANN J. 2004. Zinc and lead poisoning in wild birds in the tri-state mining district (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Arch Environ Contam Toxicol* 48:108-117
- BEYER W.N., GISH C.D. 1980. Persistence in earthworms and potential hazards to birds of soil applied DDT, dieldrin and heptachlor. *J Appl Ecol* 17:295-307
- BEYER W.N., PATTEE O.H., SILEO L., HOFFMAN D.J., MULHEM B.M. 1985. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ Pollut* 38A:63-86



- BEYER W.N., SPANN J.W., SILEO L., FRANSON J.C. 1988. Lead poisoning in six captive avian species. *Arch Environ Contam Toxicol* 17:121-130
- BIBBY C.J., NATTRASS M. 1986. Breeding status of the Merlin in Britain. *Br Birds* 79:170-185
- BICKEL M.N. 1984. The role of adipose tissue in the distribution and storage of drugs. *Prog Drug Res* 28:273-303
- BIRDLIFE INTERNATIONAL 2009. *Bubo bubo*. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- BLANCO G., FRÍAS O., JIMÉNEZ B., GÓMEZ G. 2003. Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in Black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ Toxicol Chem* 22:2711-2718
- BLANCO G., JIMÉNEZ B., FRÍAS O., MILLAN J., DÁVILA J.A. 2004. Contamination with nonessential metals from a solid-waste incinerator correlates with nutritional and immunological stress in prefledgling Black kites (*Milvus migrans*). *Environ Res* 94:94-101
- BLANCO J.C., GONZÁLEZ J.L. 1992. Libro Rojo de los Vertebrados de España. ICONA, Madrid
- BLÁZQUEZ E., AGUIRRE J. I., MARTÍNEZ-HARO M., MATEO R., JIMÉNEZ B. 2006. The use of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain). *Organohalogen Compounds* 68:2081-2085
- BLONDEL J., BADAN O. 1976. La biologie du Hibou Grand Duc en Provence. *Nos Oiseaux* 33:189-219
- BLOOD D.C., HENDERSON J.A., RADOSTITS O.M. 1988. Medicina Veterinaria. Interamericana-méxico
- BLUS L.J. 1984. DDE in birds' eggs: comparison of two methods for estimating critical levels. *Wilson Bull* 96:268-276



- BLUS L.J. 1996. Effects of pesticides on owls in North America. *J Raptor Res* 30:198-206
- BLUS L.J. 2003. Organochlorine pesticides. En: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns JJr (Eds). *Handbook of ecotoxicology 2<sup>nd</sup> edition*, CRC Press, Boca Raton, Florida pp 313-339
- BLUS L.J. 2011. DDT, DDD and DDE in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (Eds). *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp 425-444
- BLUS L.J., BELISLE A.A., PROUTY R.M. 1974. Relations of the Brown pelican to certain environmental pollutants. *Pestic Monit J* 7:181-194
- BLUS L.J., LAMONT T.G., NEELY JR. B.S. 1979. Effects of organochlorine residues on eggshell thickness, reproduction, and population status of Brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) in South Carolina and Florida, 1969-76. *Pestic Monit J* 11:40-53
- BOGAN J.A., NEWTON I. 1977. Redistribution of DDE in Sparrowhawks during starvation. *Bull Environ Contam Toxicol* 18:317-321
- BOLLEN W.B., ROBERTS J.E., MORRISON H.E. 1958. Soil properties and factors influencing aldrin-dieldrin recovery and transformation. *J Econ Entomol* 51:214-219
- BOON J.P., VAN ARNHEM E., JANSEN S., KANNAN N., PETRICK G., SCHULZ D.E., DUINKER J.C., REIJNDERS P.J.H., GOKSØYR A. 1992. The toxicokinetics of PCBs in marine mammals with special reference to possible interactions of individual congeners with the cytochrome P450- dependent monooxygenase system- An overview. En: Walker C.H., Livingstone D.R., Lipnick R.L. (Eds). *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*, Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, pp 119-159
- BOOTH D.T., RAHN H. 1990. Factors modifying rate of water loss from birds' eggs during incubation. *Physiol Zool* 63:697-709
- BOOTH N.H., MACDONALD L.E. 1988. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 6<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press-Ames



- BORLAKOGLU J.T., WILKINS J.P.G., DILS R.R. 1991. Distribution and elimination *in vivo* of polychlorinated biphenyl (PCB) isomers and congeners in the pigeon *Xenobiotica* 21:433-445
- BOSVELD A.T.C., VAN DER BERG M.V. 1994. Biomarkers and bioassays as alternative screening methods for the presence and effects of PCDD, PCDF and PCB. *Fresen J Anal Chem* 348:106-110
- BOTELLA B., CRESPO J., RIVAS A., CERRILLO I., OLEA-SERRANO M.F., OLEA N. 2004. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res* 96:34-40
- BOWERMAN W.W., STICKLE J.E., SIKARSKIE J.G., GIESY J.P. 2000. Hematology and serum chemistries of nestling Bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in the lower peninsula of MI, USA. *Chemosphere* 41:1575–1579
- BOYD E.M., DU BOIS Y., KRIJNEN C.J. 1970. Endosulfan toxicity and dietary protein. *Arch Environ Health* 21:15-22
- BOYD E.M., KRIJNEN C.J. 1970. Toxicity of dicophane (DDT) in relation to dietary protein intake. *Ind Med Surg* 39:229-240
- BOYLE C.M. 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* 188:517-525
- BRACE K., ALTLAND P.D. 1956. Life span of the duck and chicken erythrocyte as determined with C<sup>14</sup>. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:615-617
- BRAUNE B.M., GASKIN D.E. 1987. Mercury levels in Bonaparte's gulls (*Larus philadelphia*) during autumn moult in the Quoddy region, New Brunswick, Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* 16:539-549
- BREIVIK K., ALCOCK R., LI Y.F., BAILEY R.E., FIEDLER H., PACYNA J.M. 2004. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ Pollut* 128:3-16



- BRENNAN M.J., CANTRILL R.C. 1979. Delta-aminolaevulinic acid is a potent agonist for GABA autorreceptors. *Nature* 280:514-515
- BROOKS G.T. 1974. Chlorinated insecticides. Vol 1. CRC Press, Cleveland, pp 87-98
- BROUWER A., VAN DEN BERG K.J. 1986. Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to trans-thyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex, carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 85:301-312
- BRUNN H. 1984. Elimination and distribution of 2,2',4,5'-tetrachlorobiphenyl in laying hens. *Food Chem Toxicol* 22:689-691
- BUCKLE A.P. 1994. Rodent control methods in rodent pests and their control. Wallingford, Oxon, Commonwealth Agriculture Bureau (CAB) International
- BUERGER T.T., MIRARCHI R.E., LISANO M.E. 1986. Effects of lead shot ingestion on captive Mourning dove survivability and reproduction. *J Wildl Manag* 50:1-8
- BULGER W.H., MUCCITELLI R.M., KUPFER D. 1978. Studies on the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochem Pharmacol* 27:2417-2423
- BUNYAN P.J., PAGE J.M.J. 1978. Polychlorinated biphenyls. The effect of structure on the induction of quail hepatic microsomal enzymes. *Toxic Appl Pharmacol* 43:507-518
- BURGER J. 1993. Heavy metals in avian eggshells: another excretion method. *J Toxicol Environ Health* 41:207-220
- BURGER J. 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci Total Environ* 389:37-45
- BURGER J., DIAZ-BARRIGA F., MARAFANTA E., POUNDS J., ROBSON M. 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:20-31



- BURGER J., GOCHFELD M. 1985. Comparison of nine heavy metals in salt gland and liver of Greater scaup (*Aythya marila*), Black duck (*Anas rubripes*) and Mallard (*A. platyrhynchos*). *Comp Biochem Physiol* 81:287-292
- BURGER J., GOCHFELD M. 1995. Biomonitoring of heavy metals in the Pacific Basin using avian feathers. *Environ Toxicol Chem* 14:1233-1239
- BURGER J., GOCHFELD M. 1996. Lead and behavioral development: parental compensation for behaviorally impaired chicks. *Pharm Biochem Behav* 55:339-349
- BURGER J., GOCHFELD M. 1997. Age differences in metals in the blood of Herring (*Larus argentatus*) and Franklin's (*Larus pitixcan*) gulls. *Arch Environ Contam Toxicol* 33:436-440
- BURGER J., GOCHFELD M. 2000. Metals in Albatross feathers from Midway Atoll: influence of species, age, and nest location. *Environ Res* 82:207-221
- BURGER J., GOCHFELD M. 2005. Effects of lead on learning in Herring gulls: an avian wildlife model for neurobehavioral deficits. *Neurotoxicology* 26:615-624
- BURNHAM K.P., ANDERSON D.R. 2002. Model selection and multimodel inference. Practical information-theoretic approach. 2nd edition. Springer. New York
- BUSTNES J.O., BAKKEN V., ERIKSTAD K.E., MEHLUM F., SKAARE J.U. 2001. Patterns of incubation and nest-site attentiveness in relation to organochlorine (PCB) contamination in Glaucous gulls. *J Appl Ecol* 38:791-801
- BUSTNES J.O., BAKKEN V., SKAARE J.U., ERIKSTAD K.E. 2003a. Age and accumulation of persistent organochlorines: a study of Arctic-breeding Glaucous gulls (*Larus hyperboreus*). *Environ Toxicol Chem* 22: 2173-2179
- BUSTNES J.O., ERIKSTAD K.E., SKAARE U., BAKKEN V., MEHLUM F. 2003b. Ecological effects of organochlorine pollutants in the Arctic: A study of the Glaucous gull. *Ecol Appl* 13:504-515



- BUSTNES J.O., YOCCOZ N.G., BANGJORD G., POLDER A., SKAARE J.U. 2007. Temporal trends (1986-2004) of organochlorines and brominated flame retardants in Tawny owl eggs from Northern Europe. *Environ Sci Technol* 41:8491-8497
- CADE T.J. 2007. Exposure of California Condors to lead from spent ammunition. *J Wildl Manag* 71:2125-2133
- CAIN B.W., SILEO L., FRANSON J.C, MOORE J. 1983. Effects of dietary cadmium on Mallard ducklings. *Environ Res* 32:286-297
- CAMPBELL T. 1987. Avian Chemistries. *AAV Today* 1:121-122
- CAO J., HENRY P.R., DAVIS S.R., COUSINS R.J., MILES R.D., LITTELL R.C., AMMERMAN C.B. 2002. Relative bioability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Anim Feed Sci Technol* 101:161-170
- CARM (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). 2005. Servicio de Protección y Sanidad Vegetal. Utilización de productos fitosanitarios muy tóxicos
- CARM (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). 2008. Resolución de la Dirección de General de Calidad Ambiental, por la que se otorga a la empresa BEFESA GESTIÓN DE PCB, S.A. autorización ambiental integrada para la planta de descontaminación y desmantelamiento de transformadores y condensadores con PCBs en el término municipal de Cartagena (Murcia).
- CARM (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia). 2010. Estadística Agraria Regional, Serie histórica producciones de cultivos leñosos. [http://www.carm.es/newweb2/servlet/integra.servlets.ControlPublico?IDCONTENIDO=1392&IDTIPO=100&RASTRO=c212\\$m1174](http://www.carm.es/newweb2/servlet/integra.servlets.ControlPublico?IDCONTENIDO=1392&IDTIPO=100&RASTRO=c212$m1174).
- CARNAGHAN R.B.A., BLAXLAND J.D. 1957. The toxic effect of certain seed-dressings on wild and game birds. *Vet Rec* 69:324-325
- CARPENTER J.W., ANDREWS G.A., BEYER W.N. 2004. Zinc toxicosis in a Free-flying trumpeter swan (*Cygnus buccinator*). *J Wildl Dis* 40:769-774





- CARPENTER J.W., PATTEE O.H., FRITTS S.H., RATTNER B.A., WIEMEYER S.N., ROYLE J.A., SMITH M.R. 2003. Experimental lead poisoning in Turkey vultures (*Cathartes aura*). *J Wildl Dis* 39:96-104
- CASADO E., BALBOTIN J., FERRER M. 2002. Plasma chemistry in Booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) during breeding season. *Comp Biochem Physiol* 131A:233-241
- CASEY C.E., HAMBIDGE K.M. 1980. Epidemiological aspects of human zinc deficiency. En: Nriagu J.O. (Ed). *Zinc in the environment. Part II: health effects*. John Wiley, New York, pp 1-27
- CHALERMCHAIKIT T., FELICE L.J., MURPHY M.J. 1993. Simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in blood serum and liver. *J Anal Toxicol* 17:56-61
- CHAPMAN P.M., DEXTER R.N., GOLDSTEIN L. 1987. Development of monitoring programmes to assess the longterm health of aquatic ecosystems. A model from Purget Sound, USA. *Mar Pollut Bull* 18:521-527
- CHEN D., HALE R.C. 2010. A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds. *Environ Int* 36:800-811
- CHEN L.C., BERBERIAN I., KOCH B., MERCIER M., AZAIS-BRAESCO V., GLAUERT H.P., CHOW C.K., ROBERTSON L.W. 1992. Polychlorinated and polybrominated biphenyl congeners and retinoid levels in rat tissues: Structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 114:47-55
- CHERIAN M.G., GOYER R.A. 1978. Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity of metals. A mini review. *Life Sci* 23:1-10
- CHU I., VILLENEUVE D.C., YAGMINAS A., LECAVALIER P., POON R., FEELEY M., KENNEDY S.W., SEEGAL R.F., HAKANSSON H., AHLBORG U.G., VALLI V.E. 1994. Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. 1. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Fund Appl Toxicol* 22:457-468
- CLEMENS E.T., KROOK L., ARONSON A.L., STEVENS C.E. 1975. Pathogenesis of lead shot poisoning in the Mallard ducks. *Cornell Vet* 65:248-285



- CLUBB S., SCHUBOT R., JOYNER K. 1991a. Hematological and serum biochemistry reference intervals in juvenile Cockatoos. *J Avian Med Surg* 5:5-16
- CLUBB S., SCHUBOT R., JOYNER K. 1991b. Hematological and serum biochemistry reference intervals in juvenile Eclectus parrots (*Eclectus roratus*). *J Avian Med Surg* 4:218-225
- CLUBB S., SCHUBOT R., JOYNER K. 1991c. Hematological and serum biochemistry reference intervals in juvenile Macaws. *J Avian Med Surg* 5:154-162
- COHEN A.J., SMITH J.N. 1961. Fate of aldrin and dieldrin in locusts. *Nature* (Lond.) 189:600-601
- COLVIN H.W., WANG W.L. 1974. Toxic effects of warfarin in rats fed different diets. *Toxicol Appl Pharmacol* 28:337-348
- CONNAY A.H., BUBNS J.J. 1962. Factors influencing drug metabolism. En: Silvio G., Parkhurst A.S. *Advances in Pharmacology*. Academic Press. Volume 1, pp 31-58
- CONVENCIÓN SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES. 2010. Apéndices I, II y III en vigor a partir del 23 de junio de 2010 <http://www.cites.es/es-ES/elconveniocites/Documents/AppendicesCITESenvigordesde23062010.pdf>
- CONVENIO DE ESTOCOLMO. 2011. <http://chm.pops.int/Countries/National%20Implementation/tabid/253/language/es-CO/Default.aspx>
- COPELAND M.F., CHADWICK R.W. 1979. Bioisomerization of lindane in rats. *J Environ Pathol Toxicol* 2:737-749
- COX P., SMITH R.H. 1992. Rodenticide ecotoxicology: pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. En: Borrecco J.E., Marsh R.E. (Eds). *Proceedings of the 15th vertebrate pest conference*. University of California, Davis, California, USA, pp 165-170



- CRACIUN A.M., GROENEN-VAN DOOREN M.M., THIJSSSEN H.H., VERMEER C. 1998. Induction of prothrombin synthesis by K-vitamins compared in vitamin K-deficient and in brodifacoum-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1380:75-81
- CRACIUN A.M., GROENEN-VAN DOOREN M.M., VERMEER C. 1997. Nutritional vitamin K-intake and urinary gamma-carboxyglutamate excretion in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1334:44-50
- CRAMP S., SIMMONS K. 1985. The birds of the Western Palearctic. Vol.II. Oxford University Press, Oxford
- CREM (Centro Regional de Estadística de Murcia). 2011. Evolución de la superficie por cultivos y municipios. Agraria [http://www.carm.es/econet/sicrem/PU590/sec15\\_c6.html](http://www.carm.es/econet/sicrem/PU590/sec15_c6.html)
- CSTEE.19999. Report of the working group on endocrine disrupters of the European Union Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) of DG Consumer Policy and Consumer Health Protection
- CUSTER T.W, CUSTER C.M. 1995. Transfer and accumulation of organochlorines from Black-crowned night-heron eggs to chicks. *Environ Toxicol Chem* 14:533-536
- CUSTER T.W., FRANSON J.C., PATTEE O.H. 1984. Tissue lead distribution and hematological effects in American kestrels (*Falco sparverius* L.) fed biologically incorporated lead. *J Wildl Dis* 20:39-43
- DALZEIL I.W.D. 1999. Vestiges of a beginning and the prospect of an end. En: Craig G.Y., Hull J.H. (Eds). *James Hutton: Present and Future*. Geological Society Spec. Pub., London, UK, pp 119-155
- DANIELSON L. 1970. Gasoline containing lead. Swedish Natural Science Research Council. Ecological Research Committee Bull nr 6
- DAUWE T., JANSSENS E., KEMPENAERS B., EENS M. 2004. The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs *Environ Pollut* 129:125-129



- DE JUANA E., VARELA J.M. 2000. Guía de las aves de España. Península, Baleares y Canarias. Lynx Edicions, Barcelona
- DE LA CAL A., ELJARRAT E., RALDÚA D., DURÁN C., BARCELÓ D. 2008. Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain). *Chemosphere* 70:1182-1189
- DE LE COURT C., AGUILERA E., RECIO F. 1995. Plasma chemistry values of free-living White spoonbills (*Platalea leucorodia*). *Comp Biochem Physiol* 112A:137-141
- DEARTH M.A., HITES R.A. 1991. Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 25:245-254
- DEBACKER V., SCHIETTECATTE L.S., JAUNIAUX T., BOUQUEGNEAU J.M. 2001. Influence of age, sex and body condition on zinc, copper, cadmium and metallothioneins in Common guillemots (*Uria aalge*) stranded at the Belgian coast. *Mar Environ Res* 2:427-444
- DECISIÓN 2000/801/EC: Decisión de la Comisión, de 20 de diciembre de 2000, relativa a la no inclusión del lindano 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 activa. Diario Oficial 324, pp 42-43
- DECISIÓN 2005/864/EC: Decisión de la Comisión, de 2 de diciembre de 2005, relativa a la no inclusión del endosulfán 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 activa. Diario Oficial 317, pp 25-28
- DECISIÓN 2008/764/EC: Decisión de la Comisión de 30 de septiembre de 2008, relativa a la no inclusión del dicofol 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 262, pp 40-41



- DECISIÓN 82/72/CEE: Decisión del Consejo, de 3 de diciembre de 1981, referente a la celebración del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa (Convenio de Berna)
- DECRETO 265/1994, de 20 de diciembre, del Gobierno Valenciano, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies Amenazadas de Fauna y se establecen categorías y normas de protección de la fauna. (DOGV nº 2431, de 19.01.95)
- DECRETO 32/2004, de 27 de febrero, del Consell de la Generalitat, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Fauna Amenazadas, y se establecen categorías y normas para su protección. (DOGV número 4705 de fecha 04.03.2004)
- DEL HOYO J., ELLIOTT A., SARGATAL J. 1999. Handbook of the birds of the world. Vol. 5. Common Barn-Owls to Hummingbirds. Lynx Edicions, Barcelona
- DELIBES M., HIRALDO F. 1981. The rabbit as prey in the Iberian Mediterranean ecosystem. En: Myers K., Maclannes C.D. (Eds). *Proceedings of the World Lagomorph Conference*, University of Guelph, Ontario pp 614-622
- DENISON M.S., NAGY S.R. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309-334
- DESCOTES J. 1988. Immunotoxicity of Chemicals. En: *Immunotoxicology of drugs and chemicals*, Elsevier, Amsterdam, New York, pp 297-441
- DHANANJAYAN V., MURALIDHARAN S. 2010. Levels of organochlorine pesticide residues in blood plasma of various species of birds from India. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:129-136
- DI GIULIO R.T., SCALON P.F. 1985. Effects of cadmium ingestion and food restriction on energy metabolism and tissue metal (cadmium) in larvae of the prawn *Palaemon serratus*. *Mar Biol* 86:139-143
- DI GIULIO R.T., SCANLON P.F. 1984. Sublethal effects of cadmium ingestion on Mallard ducks. *Arch Environ Contam Toxicol* 13:765-771



- DI MUCCIO A., CAMONI I., CINTI P., PONTECORVO D. 1988. Survey of DDT-like compounds in dicofol formulations. *Ecotoxicol Environ Saf* 16:129-132
- DÍAZ MAYANS J., TORREBLANCA A., DEL RAMO J. 1993. Presencia de metales en el medio acuático. En: Mas A., Azcue J.M. (Eds). *Metales en Sistemas Biológicos*. Ed. Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona, pp 187-206
- DIETER M.P. 1974. Plasma enzyme activities in Coturnix quail fed graded doses of DDE, polychlorinated phenyl, malathion and mercuric chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 27:86-98
- DIETER M.P. 1975. Further studies of the use of enzyme profiles to monitor residue accumulation in wildlife: plasma enzymes in Starlings fed graded concentrations of morsodren, DDE, Aroclor 1254, and malathion. *Arch Environ Contam Toxicol* 3:142-150
- DIETER M.P., FINLEY M.T. 1978. Erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in Mallard ducks: duration of inhibition after lead shot dosage. *J Wildl Manag* 42:621-625
- DIETER M.P., FINLEY M.T. 1979. Delta-aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity in blood, brain and liver of lead-dosed ducks. *Environ Res* 19:127-135
- DIETER M.P., PERRY M.C., MULHERN B.M. 1976. Lead and PCBs in Canvasback ducks: relationship between enzyme levels and residues in blood. *Arch Environ Contam Toxicol* 5:1-13
- DIETER M.P., WIEMEYER, S.N. 1978. Six different plasma enzymes in Bald eagles (*Haliaeetus leucocephalis*) and their usefulness in pathological diagnosis. *Comp Biochem Physiol* 61C:153-155
- DIKSHITH T.S.S. 1991. Pesticides. En: Dikshith, T.S.S. (Ed). *Toxicology of pesticides in animals*. CRC Press, Inc. Florida, pp 3-11
- DIRECTIVA 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 relativa a la conservación de las aves silvestres



- 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
- DIRECTIVA 90/533/CEE del Consejo, de 15 de octubre de 1990, por la que se modifica el anexo de la Directiva 79/117/CEE relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas
- DIRECTIVA 98/70/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 1998 relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y por la que se modifica la Directiva 93/12/CEE del Consejo
- DISSER J., BRUNN H., NAGEL A., PRINZINGER R. 1992. Studies on the contamination of bird eggs with chlorinated hydrocarbons with special reference to PCBs. *Okolog Vogel* 14:173-209
- DONALDSON G.M., SHUTT J.L., HUNTER P. 1999. Organochlorine contamination in Bald eagle eggs and nestling from the Canadian Great Lakes. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:110-114
- DONÁZAR J.A. 1987. Geographic variations in the diet of the Eagle owls in western Mediterranean Europe. En: Nero R.W., Clark R.J., Knapton R.J., Hamre R.H. (Eds). *Biology and conservation of northern forest owls*. USDA Forest Service, Colorado, pp 220-224
- DONÁZAR J.A. 1988. Selección del hábitat de nidificación por el Búho real (*Bubo bubo*) en Navarra. *Ardeola* 35:233-245
- DONÁZAR J.A. 1990. Geographic variation in clutch and brood size of the Eagle owl (*Bubo bubo*) in the Western Palearctic. *Journal für Ornithologie* 131:439-443
- DONAZAR J.A., CEBALLOS O., FERNANDEZ C. 1989. Factors influencing the distribution and abundance of seven cliff-nesting raptors: a multivariate study. En: Meyburg B.U., Chancellor R. (Eds). *Raptors in the Modern World*, WWGBP. Berlín, London and Paris, pp 545-552



- DONÁZAR J.A., KALINAINEN P. 1997. Eagle owl *Bubo bubo*. En: Hagemeyer W.J.M., Blair M.J. (Eds). *The EBCC Atlas of European Breeding Birds, their distribution and abundance*. T. & A.D. Poyser, London pp 402-403
- DROUAL R., METREYER C.U., GALEY F.D. 1991. Zinc toxicosis due to ingestion of a penny in a Gray-headed chachalaca *Ortalis cinereiceps*. *Avian Dis* 35:1007-1011
- DROUILLARD K.G. 2000. Modelling the toxicokinetics and biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) in birds. Ph.D. thesis, Watershed Ecosystems Program, Trent, Ont., Canada
- DROUILLARD K.G., NORSTROM R.J., FOX G.A., GILMAN A., PEAKALL D. 2003. Development and validation of a Herring gull embryo toxicokinetic model for PCBs. *Ecotoxicology* 12:55-68
- DUFFUS J.H. 1983. Toxicología ambiental. Ediciones Omega, Barcelona
- DUKE G. 2008. The EU environmental policy context for monitoring for and with raptors in Europe. *Ambio* 37:397-400
- EADSFORTH C.V., GRAY A., HARRISON E.G. 1996. Monitoring the exposure of Barn owls to second-generation rodenticides in Southern Eire. *Pestic Sci* 47:225-233
- EASON C.T., MURPHY E.C., WRIGHT G.R.G., SPURR E.B. 2002. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology* 11:35-48
- EASON C.T., SPURR E.B. 1995. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *N Zeal J Zool* 22:371-379
- EASON C.T., WRIGHT G.R., BATCHELER D. 1996. Anticoagulant effects and the persistence of brodifacoum in Possums (*Trichosurus vulpecula*). *N Zeal J Agric Res* 39:397-400
- EASTIN W.C. JR, HOFFMAN D.J., O'LEARY C.T. 1983. Lead accumulation and depression of δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in young birds fed automotive waste oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:31-35





- EDENS F.W. GARLICH J.D. 1983. Lead-induced egg production decrease in leghorn and Japanese quail hens. *Poultry Sci* 62:1757-1763
- EICHELBERGER J.W., LICHTENBERG J.J. 1971. Persistence of pesticides in river water. *Environ Sci Technol* 5:541-544
- EISLER R. 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv., Biological Report 85 (1.2). Washington, US
- EISLER R. 1988. Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl Serv., Biological Report 85:1-94. Washington, US
- EISLER R. 1990a. Chlordane hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv., Biol. Rep 85 (1.21). Washington, US
- EISLER R. 1990b. Mirex hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl Serv Biol Rep 85 (1.1). Washington, US
- EISLER R. 1993. Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl Serv. Biol. Rep. 10. Washington, US
- EISLER R. 1998. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report No. 33). U.S. Department of the Interior and U.S. Geological Survey.
- EISLER R. 2000. Handbook of chemical risk assessment: vol 1, metals. Lewis, Boca Raton
- EK K.H., MORRISON G.M., LINDBERG P., RAUCH S. 2004. Comparative tissue distribution of metals in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Arch Environ Contam Toxicol* 47:259-269
- ELLIOTT J.E., BISHOP C.A. 2011. Cyclodiene and other organochlorine pesticides in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (Eds). *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp 447-475



- ELLIOTT J.E., KENNEDY S.W., LORENZEN A. 1997. Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls to Japanese quail (*Coturnix c. japoniica*) and American kestrels (*Falco sparverius*). *J Toxicol Environ Health* 51:57-75
- ELLIOTT J.E., KENNEDY S.W., PEAKALL D.B., WON H. 1990. Polychlorinated biphenyl (PCB) effects on hepatic mixed function oxidases and porphyria in birds. I. Japanese Quail. *Comp Biochem Physiol* 96C:205-210
- ELLIOTT J.E., MARTIN P.A. 1994. Chlorinated hydrocarbons and shell thinning in eggs of (*Accipiter*) hawks in Ontario, 1986-1989. *Environ Pollut* 86:189-200
- ELLIOTT J.E., SCHEUHAMMER A.M., LEIGHTON F.A., PEARCE P.A. 1992. Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:63-73
- 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., WILSON L.J., LANGELIER K.W., NORSTROM R.J. 1996. Bald Eagle mortality and chlorinated hydrocarbon contaminants in livers from British Columbia, Canada, 1989-1994. *Environ Pollut* 94:9-18
- ELLIOTT J.E., WILSON L.K., HENNY C.J., TRUDEAU S., LEIGHTON F.A., KENNEDY S.W., CHENG K.M. 2000. Biological effects of chlorinated hydrocarbons in Osprey chicks. *Environ Toxicol Chem* 20:866-879
- ELLIOTT S.J., EYLES J., DELUCA P. 2001. Mapping health in the Great Lakes areas of concern: A user-friendly tool for policy and decision makers. *Environ Health Perspect* 109:817-826
- EPA. 1998. Rodenticide Cluster: Reregistration Eligibility Decision (RED)
- EPA. 2004. Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach
- EPA. 2008. Risk mitigation decision for ten rodenticides



- ERICKSON W., URBAN D. 2004. Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- ERIKSSON P., FISCHER C., FREDRIKSSON A. 2006. Polybrominated diphenyl ethers, a group of brominated flame retardants, can interact with polychlorinated biphenyls in enhancing developmental neurobehavioral defects. *Toxicol Sci* 94:302-309
- EROSCHENKO V.P., PALMITER R.D. 1980. Estrogenicity of kepone in birds and mammals. En: McLachlan J.A. (Ed). *Estrogens in the environment*. Elsevier, New York, pp 305-325
- ESPÍN S., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARÍA-MOJICA P., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2010. Desarrollo de un método analítico para la extracción de plaguicidas organoclorados en plumas. *Anales de Veterinaria* 26:77-90
- ESTEVAN-SENÍIS M.T. 1967. Explotación minera de la Sierra de Cartagena (1840–1919). *Saitabi* 17:211-234
- ETTINGER S.J., FELDMAN E.C. 1995. Textbook of Veterinary Internal Medicine. W.B. Saunders, Philadelphia, USA
- EVANGELISTA DE DUFFARD A.M., DUFFARD R. 1996. Behavioral toxicology, risk assessment, and chlorinated hydrocarbons. *Environ Health Perspect* 104:353-360
- EWAN R.C. 1978. Toxicology and adverse effects of mineral imbalance with emphasis on selenium and other minerals. En: Oehme F. W. (Ed). *Toxicity of heavy metals in the environment*, Part 1. M. Dekker, New York, pp 445-489
- EXON J.H. 1984. Immunotoxicity of selected environmental chemicals, pesticides and heavy metals. *Prog Clin Biol Res* 161: 355-368
- FAIR J.M., MYERS O.B. 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* 11:199-208



- FAIRBROTHER A., SMITS J., GRASMAN K.A. 2004. Avian immunotoxicology. *J Toxicol Environ Health* 7B:105-137
- FAULKNER D.J. 1998. Naturally occurring brominated compounds. En: *Proceedings Workshop on Brominated flame retardants*, Skoklester, Sweden, 1998.
- FEIERABEND J.S., MYERS O. 1984. A national summary of lead poisoning in Bald eagles and waterfowl. National Wildlife Federation, Washington, DC 1-36
- FERNIE K.J., MAYNE G., SHUTT J.L., PEKARIK C., GRASMAN K.A., LETCHER R.J., DROUILLARD K. 2005a. Evidence of immunomodulation in nestling American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to environmentally relevant PBDEs. *Environ Pollut* 138:485-493
- FERNIE K.J., SHUTT J.L., LETCHER R.J., RITCHIE I.J., BIRD D.M. 2009. Environmentally relevant concentrations of DE-71 and HBCD alter eggshell thickness and reproductive success of American kestrels. *Environ Sci Technol* 43:2124-2130
- FERNIE K.J., SHUTT J.L., LETCHER R.J., RITCHIE J.I., SULLIVAN K., BIRD D.M. 2008. Changes in reproductive courtship behaviors of adult American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to environmentally relevant levels of the polybrominated diphenyl ether mixture, DE-71. *Toxicol Sci* 102:171-178
- FERNIE K.J., SHUTT J.L., MAYNE G., HOFFMAN D., LETCHER R.J., DROUILLARD K.G., RITCHIE I.J. 2005b. Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (*Falco sparverius*). *Toxicol Sci* 88:375-383
- FERNIE K.J., SHUTT J.L., RITCHIE I.J., LETCHER R.J., DROUILLARD K., BIRD D.M. 2006. Changes in the growth, but not the survival, of American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to environmentally relevant polybrominated biphenyl ethers. *J Toxicol Environ Health* 69A:1541-1554
- FINLEY M.T., DIETER M.P. 1978. Influence of laying on lead accumulation in bone of mallard ducks. *J Toxicol Environ Health* 1:929-937



- FLEMING W.J., MCLANE M.A.R., CROMARTIE E. 1982. Endrin decreases Screech Owl productivity. *J Wildl Manag* 46:62-468
- FORBES V.E., FORBES T.L. 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, London
- 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. 1993. What have biomarkers told us about the effects of contaminants on the health of fish-eating birds in the Great Lakes? The theory and a literature review. *J Great Lakes Res* 19:722-736
- FOX G.A., JEFFREY D.A., WILLIAMS K.S., KENNEDY S.W., GRASMAN K.A. 2007. Health of Herring gulls (*Larus argentatus*) in relation to breeding location in the Early 1990s. I. Biochemical measures. *J Toxicol Environ Health* 70A:1443-1470
- FOX G.A., KENNEDY S.W., NORSTROM R.J., WIGFIELD D.C. 1988. Porphyria in Herring gulls: a biochemical response to chemical contamination of Great Lake food chains. *Environ Toxicol Chem* 7:831-839
- FRANK R., LUTZ R.S. 1999. Productivity and survival of Great horned owls exposed to dieldrin. *Condor* 101:331-339
- FRANSON J.C., CUSTER T.W. 1982. Toxicity of dietary lead in young cockerels. *Vet Hum Toxicol* 24:421-423
- FRANSON J.C., PAIN D.J. 2011. Lead in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (Eds). *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp 563-593
- FRANSON J.C., SILEO L., PATTEE O.H., MOORE J.F. 1983. Effects of chronic dietary lead in American kestrels (*Falco sparverius*). *J Wildl Manag* 53:792-802



- FRAWLEY J.P., COOK J.W., BLAKE J.R., FITZHUGH O.G. 1958. Insecticide stability effect of light on chemical and biological properties of parathion. *J Agric Food Chem* 6:28-36
- FREELAND J.H., COUSINS R.J. 1973. Effect of dietary cadmium on anaemia, iron absorption, and cadmium binding protein in the chick. *Nutr Rep Int* 8:337-447
- FRIBERG L., PISCATOR M., NORDBERG G.F., KJLLESTROEN T. 1974. Cadmium in the environment 2<sup>nd</sup> ed, CRC Press Inc, Cleveland, Ohio, USA
- FRY D.M. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* 103:165-171
- FRY D.M., TOONE C.K. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213:922-924
- FRY D.M., TOONE C.K., SPEICH S.M., PEARD R.J. 1987. Sex ratio skew and breeding patterns of gull demographic and toxicological considerations. *Stud Avian Biol* 10:26-43
- FURNESS R.W. 1993 Birds as monitors of pollutants. En: Furness R.W., Greenwood J.J.D. (Eds). *Birds as monitors of environmental change*. Chapman and Hall, London, pp 86-143
- FURNESS R.W. 1996. Cadmium in birds. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). *Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 389-404
- FURNESS R.W., GREENWOOD J.J.D. 1993. Birds as monitors of environmental change. Chapman and Hall, London
- FYFE W.S. 1998. Towards 2050: the past is not the key to the future-challenges for the science of geochemistry. *Environ Geol* 33:92-95
- GABRIELSEN G.W., SKAARE J.U., POLDER A., BAKKEN V. 1995. Chlorinated hydrocarbons in Glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) in the southern part of Svalbard. *Sci Total Environ* 160-161:337-346



- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 1994. Impregnación por plomo y cadmio en aves silvestres de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., CALVO J.F., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARÍA-MOJICA P., MARTÍNEZ J.E. 2008. Raptor ecotoxicology in Spain: A review on persistent environmental contaminants. *Ambio* 37:432-439
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., MARÍA-MOJICA P. 2000. Contaminantes ambientales y su repercusión sobre la fauna silvestre. En: Fernandez, F., Pablos, M.V., Tarazona, J.V. (Eds). *Globalización Medioambiental. Perspectivas Agrosanitarias y Urbanas*. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, pp 215-227
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., ROMERO D., MARIA-MOJICA P., GODINO A., JIMÉNEZ P. 2005a. High levels of blood lead in griffon vultures (*Gyps fulvus*) from Cazorla natural park (southern Spain). *Environ Toxicol* 20:459-463
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., MOTAS-GUZMÁN M., NAVAS I., MARÍA-MÓJICA P., LUNA A., SÁNCHEZ-GARCÍA J.A. 1997. Environmental exposure and distribution of lead in four species of raptors in Southeastern Spain. *Arch Environ Contam Toxicol* 33:76-82
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., NAVAS I., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARÍA-MOJICA P., ROMERO D., GODINO A., JIMÉNEZ P., GERIQUE C. 2005b. Niveles de zinc y cobre en aves silvestres procedentes de centros de recuperación ¿sirven para monitorizar contaminación ambiental? *Rev Toxicol* 22:115
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., ROMERO D., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., NAVAS I., PULIDO M., MARIA-MOJICA P. 2005c. Environmental lead exposure in the European kestrel (*Falco tinnunculus*) from Southeastern Spain: the influence of leaded gasoline regulations. *Bull Environ Contam Toxicol* 74:314-319
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., SÁNCHEZ-GARCÍA J.A., GÓMEZ-ZAPATA M., LUNA A. 1996. Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:252-258



- GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J., SÁNCHEZ-GARCÍA J.A., JIMÉNEZ-MONTALBÁN P., LUNA A. 1995. Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain. *Environ Toxicol Chem* 14:2049-2058
- GARCÍA-HERNÁNDEZ J., SAPOZHNIKOVA Y. V., SCHLENK D., MASON A.Z., HINOJOSA-HUERTA O., RIVERA-DÍAZ J.J., RAMOS-DELGADO N.A., SÁNCHEZ-BON G. 2006. Concentration of contaminants in breeding bird eggs from the Colorado River Delta, Mexico. *Environ Toxicol Chem* 25:1640-1647
- GARCÍA-RODRÍGUEZ T., FERRER M., RECIO F., CASTROVIEJO J. 1987. Circadian rhythms of determined blood chemistry values in Buzzards and Eagle owls. *Comp Biochem Physiol* 88A:663-669
- GARDNER D.R., BAYLEY J.R. 1975. Methoxychlor: its effects on environmental quality. NRCC No. 14102. National Research Council of Canada, Ottawa
- GELLER I., STEBBINS W.C., WAYNER M.J. 1979. Test methods for definition of effects of toxic substances on behaviour and neuromotor function. Workshop sponsored by US Environmental Protection Agency, San Antonio. Publ 560/11-79-010. Washington, USA
- GERVAIS J.A., ANTHONY R.G. 2003. Chronic organochlorine contaminants, environmental variability and the demographics of a Burrowing owl population. *Ecol Appl* 13:1250-1262
- GIL F., PLA A. 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J Appl Toxicol* 21:245-255
- GILBERT R.W., SANDER J.E., BROWN T.P. 1996. Copper sulfate toxicosis in commercial laying hens. *Avian Dis* 40:236-239
- 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
- GIPS T. 1987. Breaking the pesticide habit: Alternatives to twelve hazardous pesticides. International Alliance for Sustainable Agriculture, Minneapolis, Minn, USA





- GOCHFELD M. 1997. Factors influencing susceptibility to metals. *Environ Health Perspect* 105:817-822
- GOCHFELD M., BELANT J., SHUKLA T., BENSON T., BURGER J. 1996. Heavy metals in laughing gulls: gender, age and tissue differences. *Environ Toxicol Chem* 15:2275-2283
- GOCHFELD M., BURGER J. 1987. Heavy metal concentrations in the liver of three duck species: influence of species and sex. *Environ Pollut* 45:1-15
- GODFREY M.E.R. 1985. Non-target and secondary poisoning hazards of "second generation" anticoagulants. *Acta Zoolog Fennica* 173:209-212
- GODWIN H.A. 2001. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol* 5:223-227
- GOEDE A.A. 1985. Mercury, selenium, arsenic and zinc in waders from the Dutch Wadden Sea. *Environ Pollut Ecol Biol* 37A:287-309.
- Gold B., Brunk G. 1982. Metabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)- ethane and 1,1-dichloro-2,2,-bis (p-chlorophenyl) ethane in the mouse. *Chem Biol Interact* 41:27-339
- GÓMARA B., RAMOS L., GANGOSO L. DONÁZAR J.A. GONZÁLEZ M.J. 2004. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in serum samples of Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) from Spain. *Chemosphere* 55:577-583
- GÓMEZ-RAMÍREZ P., E. MARTÍNEZ-LÓPEZ MARÍA-MOJICA P., LEÓN-ORTEGA M., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2011. Blood lead levels and  $\delta$ -ALAD inhibition in nestlings of Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) to assess lead exposure associated to an abandoned mining area. *Ecotoxicology* 20:131-138
- GOODMAN D.S. 1980. Plasma retinol-binding protein in lipoprotein structure. *Ann New York Acad Sci* 348:378-390
- GORSKI J.R., ROZMAN K. 1987. Dose-response and time course of hypothyroxinemia and hypoinsulinemia and characterization of insulin hypersensitivity in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rats. *Toxicology* 44:297-307



- GOYER R.A. 1996. Toxic effects of metals. En: Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J. (Eds). *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 5<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill pp 691-736
- GOYER R.A., CHERIAN M.G., DELAQUERRIERE-RICHARDSON L. 1984. Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induced nephropathy in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 5:89-100
- GRASMAN K.A., FOX G.A., SCANLON P.F., LUDWIG J.P. 1996. Organochlorine-associated immunosuppression in pre fledging Caspian terns and Herring gulls from the Great Lakes: An ecoepidemiological study. *Environ Health Perspect* 104:829-841
- GRASMAN K.A., SCANLON P.F. 1995. Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in Japanese quail. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:161-167
- GRASMAN K.A., SCANLON P.F., FOX G.A. 2000. Geographic variation in haematological variables in adult and pre fledling Herring gulls (*Larus argentatus*) and possible associations with organochlorine exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 38:244-253
- GRAY A., EADSFORTH C. V., DUTTON A.J., VAUGHAN J.A. 1994. The toxicity of three second-generation rodenticides to Barn owls. *Pestic Sci* 42:179-184
- GREICHUS Y., CALL D., AMMANN B., GREICHUS A., SHAVE H. 1975. Physiological effects of polychlorinated biphenyls or a combination of DDT, DDD, and DDE in Penned white pelicans. *Arch Environ Contam Toxicol* 3:330-343
- GRENFELL B.T., DOBSON A.T. 1995. Ecology of infectious diseases in natural populations. Cambridge University Press, Cambridge, England
- GUERRA P., PACEPAVICIUS G., JIMÉNEZ B., MUÑOZ-ARNANZ J., BLÁZQUEZ E., FERNIE K., CHAMPOUX L., MARVIN C., MACINNIS G., ELJARRAT E., BARCELÓ D., ALAEE M. 2010. Emerging halogenated flame retardants in Peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain. Proceedings of the 30th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs) - Dioxin 2010



- GURUGE K.S., TANABE S. 1997. Congener specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls in common cormorants, *Phalacrocorax carbo* from Lake Biwa, Japan. *Environ Pollut* 96:425-433
- HAHN M. E. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comp Biochem Physiol* 121:23-53
- HAMILTON W.D. 2001. Narrow roads of gene land. Vol II. Evolution of sex. Oxford University Press, Oxford, England
- HAMMONS A.S., HUFF J.E., BRAUNSTEIN H.M., DRURY J.S., SHRINER C.R., LEWIS E.B., WHITFIELD B.L., TOWILL L.E. 1978. Reviews of the environmental effects of pollutants: IV cadmium. U.S. Environ. Protection Agency Rep. 600/1-78-026
- HANSEN L.G. 1987. Food chain modification of the composition and toxicity of polychlorinated biphenyl residues. En: Hodgson H. (Ed). *Reviews in Environmental Toxicology*. Vol 3. Elsevier, New York, NY, USA, pp 149-212
- HANSEN L.G., TUINSTRA L.G.M.T., KAN C.A., STRIK J.J.T.W.A., KOEMAN J.H. 1983. Accumulation of chlorobiphenyls in chicken fat and swine after feeding Aroclor 1254 directly or swine fed Aroclor 1254. *J Agric Food Chem* 31:254-260
- HAYES W.J.JR. 1991. Introduction. En: *Handbook of pesticide Toxicology*, Vol 1. Hayes W.J.Jr, Laws E.R.Jr (Eds). Academic Press, San Diego
- HEATH D.F., VANDERKAR M. 1964. Toxicity and metabolism of dieldrin in rats. *Br J Ind Med* 21:269-279
- HEGDAL P.L. COLVIN B.A. 1988. Potential hazard to Eastern screech-owls and other raptors of brodifacoum bait used for vole control in orchards. *Environ Toxicol Chem* 7:245-260
- HEGDAL P.L., BLASKIEWICZ R.W. 1984. Evaluation of the potential hazard to Barn owls of Talon (brodifacoum bait) used to control rats and house mice. *Environ Toxicol Chem* 3:167-179



- HEINZ G.H., HASELTINE S.D., SILEO L. 1983. Altered avoidance behavior of young Black ducks fed cadmium. *Environ Toxicol Chem* 2:419-421
- HEINZ G.H., HILL E.F., CONTRERA J.F. 1980. Dopamine and norepinephrine depletion in Ring doves fed DDE, dieldrin and Aroclor 1254. *Toxicol Appl Pharmacol* 53:75-82
- HEINZ G.H., JOHNSON R.W. 1982. Diagnostic brain residues of dieldrin: some new insights. En: Lamb D.W., Kenaga E.E. (Eds). *Avian and mammalian wildlife toxicology: second conference*. ASTM STP 757. American Society for Testing and Materials, Philadelphia
- HELANDER B., OLSSON A., BIGNERT A., ASPLUND L., LITZÉN K. 2002. The Role of DDE, PCB, coplanar PCB and eggshell parameters for reproduction in the White-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Sweden. *Ambio* 31:386-403
- HELANDER B., OLSSON M., REUTERGÅRDH, L. 1982. Residue Levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationships to breeding success in White-tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Holarctic Ecol* 5:349-366
- HELBERG M., BUSTNES J.O., ERIKSTAD K.E., KRISTIANSEN K.O., SKAARE J.U. 2005. Relationships between reproductive performance and organochlorine contaminants in great Black-backed gulls (*Larus marinus*). *Environ Pollut* 134: 475-483
- HENDERSON B.M., WINTERFIELD R.W. 1975. Acute copper toxicosis in the Canada goose. *Avian Dis* 19:385-387
- HENNY C.J. 1972. An analysis of the population dynamics of selected avian species with special reference to changes during the modern pesticide era. *Wildlife Res. Rept.* 1, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Washington, DC U.S.A
- HENNY C.J., BENNETT J.K. 1990. Comparison of breaking strength and shell thickness as evaluators of white-faced ibis eggshell quality. *Environ Toxicol Chem* 9:797-805
- HENNY C.J., BLUS L.J., HOFFMAN D.J., GROVE R.A. 1994. Lead in hawks, falcons and owls downstream from a mining site on the Coeur d'Alene River, Idaho. *Environ Monit Assess* 29:267-288



- HENNY C.J., BLUS L.J., HOFFMAN D.J., GROVE R.A., HATFIELD J.S. 1991. Lead accumulation and osprey production near a mining site on the Coeur d'Alene River, Idaho. *Arch Environ Contam Toxicol* 21:415-424
- HENNY C.J., BLUS L.J., KAISER T.E. 1984. Heptachlor seed treatment contaminates hawks, owls and eagles of Columbia Basin, Oregon. *Raptor Res* 18:41-48
- HENNY C.J., BLUS L.J., STAFFORD C.J. 1983. Effects of heptachlor on American kestrels in the Columbian Basin, Oregon. *J Wildl Manag* 47:1080-1087
- HENNY C.J., ELLIOTT J.E. 2007. Toxicology. En: Bird D.M., Bildstein K.L. (Eds). *Raptor research and management techniques*. Hancock House Publishers Ltd., Surrey, British Columbia, Canada and Hancock House Publishers, Blaine, Washington, USA, pp 329-350
- HENNY C.J., GALUSHIN V.M., DUDIN P., KHRUSTOV A.V., MISCHENKO A.L., MOSEIKIN V.N., SARYCHEV V., TURCHIN V. 1998. Organochlorine pesticides, PCBs, and mercury in hawk, falcon, eagle and owl eggs from the Lipetsk, Voronezh, Novgorod and Saratov Regions, Russia, 1992-1993. *J Raptor Res* 32:143-150
- HENNY C.J., GALUSHIN V.M., KHOKHLOV A.N., MALOVICHKO L.V., ILJUKH M.P. 2003. Organochlorine pesticides in eggs of birds of prey from the Stavropol Region, Russia. *Bull Environ Contam Toxicol* 71:163-169
- HENNY C.J., GRIFFIN C.R., STAHLLECKER D.W., HARMATA A.R., CROMARTIE E. 1981. Low DDT residues in plasma of Bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) wintering in Colorado and Missouri. *Can Field Nat* 95:249-252
- HENNY C.J., KAISER J.L., GROVE R.A., JOHNSON B.L., LETCHER R.J. 2009. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in eggs may reduce reproductive success of ospreys in Oregon and Washington, USA. *Ecotoxicology* 18:802-813
- HENRIKSEN E.O., GRABRIELSEN G.W., TRUDEAU S., WOLKERS J., SAGERUP K., SKAARE J.U. 2000. Organochlorines and possible biochemical effects in Glaucous gulls



(*Larus hyperboreus*) from Bjørnøya, the Barents Sea. *Arch Environ Contam Toxicol* 38:234-243

HENSHEL D.S. 1998. Developmental neurotoxic effects of dioxin and dioxin-like compounds on domestic and wild avian species. *Environ Toxicol Chem* 17:88-98

HERNÁNDEZ M. 1989. Mortalidad del Búho real en España. *Quercus* 40:24-25

HERNÁNDEZ M., MARGALIDA A. 2010. Hematology and blood chemistry reference values and age-related changes in wild Bearded vultures (*Gypaetus barbatus*). *J Wildl Dis* 46:390-400

HERNÁNDEZ-GARCÍA A. 2010. Evaluación *in vitro* de los efectos producidos por el plomo, el cadmio y su mezcla binaria en eritrocitos de tres especies de aves silvestres. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia

HERRERA A., ARIÑO A., CONCHELLO M.P., LAZARO R., BAYARRI S., PEREZ-ARQUILLUE C., GARRIDO M.D., JODRAL M., POZO R. 1996. Estimates of mean daily intakes of persistent organochlorine pesticides from Spanish fatty foodstuffs. *Bull Environ Contam Toxicol* 56:173-177

HOCHLEITHNER M. 1989. Blutchemische untersuchungen beim adulten und juvenilen Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) [Blood chemistry in adult and juvenile budgerigars]. *Inaug Diss Wien*

HOCHLEITHNER M. 1994. Biochemistries. En: Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (Eds). *Avian medicine: Principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth, Florida, pp 223-245

HOFFMAN D.J., FRANSON J.C., PATTEE O.H., BUNCK C.M., ANDERSON A. 1985a. Survival, growth and accumulation of ingested lead in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Arch Environ Contam Toxicol* 14:89-94

HOFFMAN D.J., FRANSON J.C., PATTEE O.H., BUNCK C.M., MURRAY H.C. 1985b. Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Comp Biochem Physiol* 80C:431-439



- HOFFMAN D.J., HEINZ G.H. 1998. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in Mallard ducks. *Environ Toxicol Chem* 17:161-166
- HOFFMAN D.J., MELANCON M.J., KLEIN P.N., EISSEMANN J.D., SPANN J.W. 1998. Comparative developmental toxicity of planar polychlorinated biphenyls congeners in chickens, American kestrels and Common terns. *Environ Toxicol Chem* 17:747-757
- HOFFMAN D.J., OHLENDORF H.M., MARN C.M., PENDLETON G.W. 1998. Association of mercury and selenium with altered glutathione metabolism and oxidative stress in Diving ducks from the San Francisco Bay region, USA. *Environ Toxicol Chem* 17:167-172
- HOFFMAN D.J., PATTEE O.H., WIEMEYER S.N., MULHERN B. 1981. Effects of lead shot ingestion on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity, haemoglobin concentration and serum chemistry in Bald eagles. *J Wildl Dis* 17:423-431
- HOFFMAN D.J., RATTNER B.A., SCHEUNERT I., KORTE F. 2001. Environmental contaminants. En: Shore R.F., Rattner B.A. (Eds). *Ecotoxicology of wild mammals*. John Wiley and Sons, Chichester, pp 1-49
- HOFFMAN D.J., RICE C.P., KUBIAK T.J. 1996. PCBs and Dioxins in birds. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. Lewis, Boca Raton, Florida, pp 165-209
- HOLLIS L., HOGSTRAND C., WOOD C.M. 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile Rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:468-474
- HOLOUBEK I. 2001. Polychlorinated biphenyl (PCB) contaminated sites worldwide. En: Robertson L.W., Hansen L.G. (Eds). *PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects*. The University Press of Kentucky, pp 17-26
- HONDA K., MIN B.Y., TATSUKAWA R. 1986. Distribution of heavy metals and their age-related changes in the eastern Great white egret, *Egretta alba modesta*, in Korea. *Arch Environ Contam Toxicol* 5:185-197



- HOOPER K., McDONALD T.A. 2000. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast milk monitoring programs. *Environ Health Perspect* 108:387-392
- HOTCHKISS N., POUGH R.H. 1946. Effect on forest birds of DDT used for gypsy moth control in Pennsylvania. *J Wildl Manag* 10:202-207
- HOYER P. 2001. Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-1564
- HOYT D.F. 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. *The Auk* 96:73-77
- HUCKLE K.R., HUTSON D.H., LOGAN C.J., MORRISON D.J., WARBURTON P.A. 1989. The fate of the rodenticide flocoumafen in the rat: Retention and elimination of a single oral dose. *Pestic Sci* 25:297-312
- HUCKLE K.R., WARBURTON P.A. 1989. Studies on the fate of flocoumafen in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Xenobiotica* 19:51-62
- HUNTER B., HAIGH J.C. 1978. Demyelinating peripheral neuropathy in a Guinea hen associated with subacute lead intoxication. *Avian Dis* 22:344-349
- HUNTER B., WOBESER G. 1980. Encephalopathy and peripheral neuropathy in lead-poisoned Mallard ducks. *Avian Dis* 24:169-178
- HUNTER K. 1985. High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide residues in animal tissues. *J Chrom* 321:255-272
- HUTTON M., GOODMAN G.T. 1980. Metal contamination of Feral pigeons *Columba livia* from the London area: part 1-Tissue accumulation of lead, cadmium and zinc. *Environ Pollut* 22A:207-217





- IVINS G.K., WEDDLE G.D., HALLIWELL W.H. 1986. Hematology and serum chemistries in birds of prey. En: Fowler M.E. (Ed). *Zoo and Wildlife Medicine 2nd edition*. Philadelphia, WB Saunders, pp 286-290
- JACOFF F.S., SCARBERRY R., ROSA D. 1986. Source assessment of hexachlorobenzene from the organic chemical manufacturing industry. En: Morris C.R., Cabral J.R.P. (Eds). *Hexachlorobenzene: Proceedings of an international symposium, vol. 77*. IARC Sci Publ, Lyon. pp 31-37
- JAKSZYN P., GOÑI F., ETXEANDIA A., VIVES A., MILLÁN E., LÓPEZ R., AMIANO P., ARDANAZ E., BARRICARTE A., CHIRLAQUE M.D., DORRONSORO M., LARRAÑAGA N., MARTÍNEZ C., NAVARRO C., RODRÍGUEZ L., SÁNCHEZ M.J., TORMO M.J., GONZÁLEZ C.A., AGUDO A. 2009. Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere* 76:1518-1524
- JANSSON B., JENSEN S., OLSSON M., RENBERG L., SUNDSTRÖM G., VAZ R. 1975. Identification by GC-MS of phenolic metabolites of PCB and pp'-DDE isolated from Baltic guillemot and seal. *Ambio* 4:93-96
- JARMAN W.M., BURNS S.A., BACON C.E., RECHTIN J., DEBENEDETTI S., LINTHICUM J.L., WALTON B.J. 1996. High levels of HCB and DDE associated with reproductive failure in Prairie falcons (*Falco mexicanus*) from California. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:8-15
- JASPERS V., COVACI A., MAERVOET J., DAUWE T., VOORSPOELS S., SCHEPENS P., EENS M. 2005. Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in eggs of little owls (*Athene noctua*) from Belgium. *Environ Pollut* 136:81-88
- JENNINGS I.V. 1996. Appendix 8.1 Haematology and clinical chemistry values. En: Beynon P.H., Forbes N.A., Harcourt-Brown N.H. (Eds). *Manual of raptors, pigeons and waterfowl*. Cheltenham, UK, British Small Animal Vet Assoc Ltd, pp 75-78
- JENSEN A.A. 1983. Chemical contaminants in human milk. *Residue Rev* 89:1-128



- JENSEN L.S., MAURICE D.V. 1978. Effect of methionine on copper-induced growth depressions and gizzards erosion. *Poultry Sci* 57:1530-1532
- JIN M.C., REN Y.P., XU X.M., CHEN X.H. 2007. Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 171:52-56
- JOERMAN G. 1998. A review of secondary-poisoning studies with rodenticides. *EPPO Bulletin* 28:157-176
- JOSEPH V. 1999. Raptor haematology and chemistry evaluation *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2:689-699
- KACEW S., SINGHAL R.L. 1974. Role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the action of 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) on hepatic and renal metabolism. *Biochem J* 142:145-152
- KARAMI-MOHAJERI S., ABDOLLAHI M. 2010. Toxic effects of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A comprehensive review. *Hum Exp Toxicol* 0:1-22
- KARASOV W.H. 1990. Digestion in birds: chemical and physiological determinants and ecological implications. *Stud Avian Biol* 13:391-415
- KAUKINEN D. 1982. A review of the secondary poisoning hazard potential to wildlife from the use of anticoagulant rodenticides. En: Marsh R.E. (Ed). *Proceedings of the Tenth Vertebrate Pestic Conference* Hyatt Del Monte, Monterey, California, pp 151-158
- KAWAI S., FUKUSHIMA M., MIYAZAKI N., TATSUKAWA R. 1988. Relationship between lipid composition and organochlorine levels in tissues of Striped dolphin. *Mar Pollut Bull* 19:129-133
- KELLER E. 1970. The DDT story. *Chemistry* 43:8-12
- KELLER W.C., YEARY R.A. 1980. A comparison of the effects of mineral oil, vegetable oil and sodium sulphate on the intestinal absorption of DDT in rodent. *Clin Toxicol* 16:223-231



- KENDALL R.J., LACKER T.E., BUNCK C., DANIEL B., DRIVER C., GRUE C.E., LEIGHTON F., STANLEY W., WATANABE P.G. WHITWORTH M. 1996. An ecological risk assessment of lead shot exposure in non-waterfowl avian species: Upland game birds and raptors. *Environ Toxicol Chem* 15:4-20
- KENDALL R.J., SCANLON P.F. 1981. Effects of chronic lead ingestion on reproductive characteristics of Ringed turtle doves (*Streptopelia risoria*) and on tissue lead concentrations of adults and their progeny. *Environ Pollut* 26A:203-214
- KENDALL R.J., SCANLON P.F. 1984. The toxicology of lead shot ingestion in ringed turtle doves under conditions of cold exposure. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 5:183-192
- KENNEDY S.W., FOX G.A., TRUDEAU S., BASTIEN L.J., JONES S.P. 1998. Highly carboxylated porphyrin concentration: a biochemical marker of PCB exposure in Herring gulls. *Mar Environ Res* 46:65-69
- 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
- KERTÉSZ V., HLUBIK I. 2002. Plasma ALP activity and blood PCV value changes in chick fetuses due to exposure of the egg to different xenobiotics. *Environ Pollut* 117:323-327
- KITO H., OSE Y., MIZUHIRA V., SATO T., ISHIKAWA T., TAZAWA T. 1982. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas. *Comp Biochem Phys* 73C:121-127
- KLAAS E.E., SWINEFORD D.M. 1976. Chemical residue content and hatchability of Screech owl eggs. *Wilson Bull* 88:421-426
- KLAAS E.E., WIEMEYER S., OHLENDORF H., SWINEFORD D. 1978. Organochlorine residues, eggshell thickness, and nest success in Barn owls from the Chesapeake Bay. *Estuar Coast* 1:46-53



- KNAPEN D., BERVOETS L., VERHEYEN E., BLUST R. 2004. Resistance to water pollution in natural Gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquat Toxicol* 67:155-165
- KNOPPER L.D., MINEAU P., WALKER L.A., SHORE R.F. 2007. Bone density and breaking strength in UK raptors exposed to second generation anticoagulant rodenticides. *Bull Environ Contam Toxicol* 78:249-251
- KOLLER L.D. 1980. Immunotoxicology of heavy metals. *International J Immunopharm* 2:269-279
- KOLLIAS G.V., MCLEISH J. 1978. Effects of ketamine hydrochloride in Red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*), biochemical and hematology. *Comp Biochem Physiol* 60C:211-213
- KORACH K.S., SARVER P., CHAE K., MCLACHLAN J.A., MCKINNEY J.D. 1988. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 33:120-126
- KORANDA J., MOORE K., STUART M., CONRADO C. 1979. Dietary effects on lead uptake and trace element distribution in Mallard ducks dosed with lead shot. *Lawrence Livermore Laboratory Report*
- KRAMER J.L., REDIG P.T. 1997. Sixteen years of lead poisoning in eagles, 1980-1995: an epizootiologic view. *J Raptor Res* 31:327-332
- KREITZER J.F. 1972. The effect of embryonic development on the thickness of egg shells of Coturnix quail. *Poult Sci* 51:1764-1765
- KUBIAK T.J., HARRIS H.J., 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* 18:706-727
- KUBISTOVA I., VAVROVA M., LITERAK I. 2003. Polychlorinated biphenyls in raptor and owl eggs in the Czech Republic. *Vet Med* 48:363-368



- KUMAR D., SAXENA Y. 1993. Hepatotoxic effects of bromadiolone in *Rattus rattus rufescens*. *J Anim Morphol Physiol* 40:1-6
- KUNISUE T., BINH-MINH T., FUKUDA K., WATANABE M., TANABE S., TITENKO A. 2002. Seasonal variation of persistent organochlorine accumulation in birds from Lake Baikal, Russia, and the role of the South Asian Region as a source of pollution for wintering migrants. *Environ Sci Technol* 36:1396-1404
- KUTLU S., COLAKOGLU N., HALIFEOGLU I., SANDAL S., SEYRAN A.D., AYDIN M., YILMAZ, B. 2007. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochem Funct* 25:167-172
- LA GUARDIA M.J., HALE R.C., HARVEY E. 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ Sci Technol* 40:6247-6254
- LALIBERTÉ R., CHAKRABARTI S., BRODEUR J. 1976. The influence of fasting and stress on the response of rats to warfarin. *J Pharmacol Exp Ther* 196:194-203
- LAMBECK R.H.D., NIEUWENHUIZE J., VAN LIERE J.M. 1991. PCB's in oystercatchers (*Haematopus ostralegus*) from Oosterschelde and the Western Wadden Sea that died from starvation during severe winter weather. *Environ Pollut* 71:1-16
- LANGELIER K.M., ANDRESS C.E., GREY T.K., WOOLDRIDGE C., LEWIS R.J., MARCHETTI R. 1991. Lead poisoning in Bald eagles in British Columbia. *Can Vet J* 32:108-109
- LAST J.A. 2002. The missing link: The story of Karl Paul Link. *Toxicol Sci* 66:4-6
- LAWLEY W.J., CHARLTON A.J., HUGHSON E.J., GRUNDY H.H., BROWN P.M., JONES A. 2006. Development of a cell culture/ELISA assay to detect anticoagulant rodenticides and its application to analysis of rodenticide treated grain. *J Agric Food Chem* 54:1588-1593
- LAWTON L.J., DONALDSON W.E. 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res* 28:83-97



- LEE D.H., JACOBS Jr D.R. 2006. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and  $\gamma$ -glutamyltransferase: Results from the national health and examination survey 1999-2002. *Clin Chem* 52:1825-1827
- LEE D.H., JACOBS Jr D.R. 2009. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radic Res* 43:533-537
- LEIBUNDGUT H. 1973. Studien über das Verhalten von Uhus in der Gefangenschaft. *Z Jagdwis* 19:122-131
- LEÓN M., MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F. 2008. Ecología del Búho real (*Bubo bubo*) en el sureste de la Región de Murcia. Distribución, ocupación territorial, parámetros reproductores, dieta y mortalidad. XIX Congreso Español de Ornitología, Santander
- LEATHERLAND J.F. 2000. Contaminant-altered thyroid function in wildlife, chapter 6. En: Guillette L., Crain D.A. (Eds). *Environmental endocrine disrupters, an evolutionary perspective.*: Taylor & Francis, New York, London, pp 155-181
- LEVY P.E. 1987. Toxic action. En: Hodgson E., Levy P.E. (Eds). *A Textbook of Modern Toxicology*. New York: Elsevier Science Publishing Co, pp 133-184
- LEY 7/1995, de 21 de abril, de Fauna Silvestre de la Región de Murcia
- LI Y.F., CAI D.J., SINGH A. 1998. Technical Hexachlorocyclohexane use trends in China and their Impact on the environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:688-697
- LILLIE R.J., CECIL H.C., BITMAN J. 1973. Methoxychlor in chicken breeder diets. *Poult Sci* 52:1134-1138
- LINCER J.L., CLARK R.J. 1978. Organochlorine residues in raptor eggs in the Cayuga Lake Basin. *New York Fish Game J* 25:121-128
- LOCKE L.N., IRBY, H.D., BAGLEY G.E. 1966. Acid-fast intranuclear inclusion bodies in the kidneys of mallards fed lead shot. *J Wildl Dis* 2:127-131



- LONGCORE J.R., LOCKE L.N., BAGLEY G.E., ANDREWS R. 1974. Significance of lead residues in mallard tissues. U.S. Fish and Wildl Serv Spec Scient Report Wildl 182:1-24
- LUMEIJ J.T. 1985. Clinicopathologic aspects of lead poisoning in birds: a review. *Vet Q* 7:133-138
- LUMEIJ J.T., WOLVEKAMP W.T.C., BRON-DIETZ G.M., SCHOTMAN A.J.H. 1985. An unusual case of lead poisoning in a Honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Vet Q* 7:165-168
- LUNDHOLM C.E. 1997. DDE-induced eggshell thinning in birds: Effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp Biochem Physiol* 118C:113-128
- MAINDONALD J., BRAUN J. 2002. Data analysis and graphics using R. Cambridge University Press, Cambridge
- MANDAL P.K. 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol* 175B:221-230
- MAÑOSA S., MATEO R., FREIXA C., GUITART R. 2003. Persistent organochlorine contaminants in eggs of Northern goshawk and Eurasian buzzard from northeastern Spain: temporal trends related to changes in the diet. *Environ Pollut* 122:351-359
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2008. (<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/introregistro.htm>)
- MARIA-MOJICA P. 1996. El Cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) como biomonitor de la contaminación ambiental por insecticidas organoclorados en la Región de Murcia. Tesina de Licenciatura, Universidad de Murcia
- MARÍA-MOJICA P. 1998. Biomonitorización de la exposición a insecticidas organoclorados en aves rapaces de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia
- MARIA-MOJICA P., JIMÉNEZ P., BARBA A., NAVAS I., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2000. Residuos de insecticidas organoclorados en Cernícalo común (*Falco tinnunculus*) de la Región de Murcia. *An Vet* 16:55-66



- MARÍA-MOJICA P., ROMERO D., MOTAS-GUZMÁN M., NAVAS I., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 1998. A retrospective study of poisoning cases in pets and birds in Southeastern Spain. *Rev Toxicol* 15:105-109
- MARKS G.S. 1985. Exposure to toxic agents: the heme biosynthetic pathway and hemoproteins as indicator. *Crit Rev Toxicol* 15:151-179
- MARM (Ministerio de Medio Rural y Marino, Gobierno de España). 2010. Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes. <http://www.prtr-es.es/informes/pollutant.aspx>
- MARM. 2011. Brodifacoum  
<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=113>  
Bromadiolona  
<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=115>  
Clorofacinona <http://marm.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=175>  
Difenacoum <http://marm.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=229>
- MARTÍ R., DEL MORAL J.C. 2003. Atlas de las Aves Reproductoras de España. Ministerio de Medio Ambiente. SEO/BirdLife, Madrid
- MARTIJN A., BAKKER H., SCHREUDER R. 1993. Soil persistence of DDT, dieldrin, and lindane over a long period. *Bull Environ Contam Toxicol* 51:178-184
- MARTÍNEZ J.A., IZQUIERDO A., IZQUIERDO J., LÓPEZ G. 1996. Causas de mortalidad de las rapaces nocturnas en la Comunidad Valenciana. *Quercus* 126:18-19
- MARTÍNEZ J.A., IZQUIERDO A., ZUBEROGOITIA I. 2001. Causes of admission of raptors in rescue centres of the east of Spain and proximate causes of mortality. *Biota* 2:163-169
- MARTÍNEZ J.A., SERRANO D., ZUBEROGOITIA I. 2003. Predictive models of habitat preferences for the Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*): a multiscale approach. *Ecography* 26:21-28





- MARTÍNEZ J.A., ZUBEROGOITIA I. 2001. The response of the Eagle owl (*Bubo bubo*) to an outbreak of the rabbit haemorrhagic disease. *Journal für Ornithologie* 142:204-211
- MARTÍNEZ J.A., ZUBEROGOITIA I. 2003. Búho real *Bubo bubo*. En: Martí R., del Moral J.C (Eds). *Atlas de las Aves Reproductoras de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Sociedad Española de Ornitología, Madrid, pp 316-317
- MARTÍNEZ J.A., ZUBEROGOITIA I., ALONSO R. 2002. Rapaces Nocturnas. Guía para la determinación de la edad y el sexo en las estrigiformes ibéricas. Monticola, Madrid
- MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F. 2001. Diet and breeding succes of the Eagle owl in southeastern Spain: effect of rabbit haemorrhagic disease. *J Raptor Res* 35:259-262
- MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F. 2006. Búho real *Bubo bubo* (LINNAEUS, 1758). En: Robledano F., Calvo J.F., Aledo E. (Eds). *Libro Rojo de los Vertebrados de la Región de Murcia*, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Industria y Medio Ambiente, Dirección General del Medio Natural, Región de Murcia, Eds, Murcia, Spain, pp 182-183
- MARTÍNEZ J.E., SÁNCHEZ M.A., CARMONA D., SÁNCHEZ J.A., ORTUÑO A., MARTÍNEZ R. 1992. Ecology and conservation of the Eagle owl *Bubo bubo* in Murcia, south-east Spain. En: Galbraith C.A., Taylor I.R., Percival S. (Eds). *The ecology and conservation of European owls*, Joint Nature Conservation Committee. Peterborough, pp 84-88
- MARTÍNEZ-LÓPEZ E. 2005. Evaluación de la exposición a contaminantes ambientales persistentes (cadmio, plomo y compuestos organoclorados) en rapaces forestales y uso de células sanguíneas para evaluar sus efectos. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia
- MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARÍA-MOJICA P., MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F., ROMERO D., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2005. Cadmium in feathers of adults and blood of nestlings of three raptor species from a nonpolluted Mediterranean forest, Southeastern Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 74:477-484



- MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARIA-MOJICA P., MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F., WRIGHT J., SHORE R.F., ROMERO D., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2007. Organochlorine residues in Booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) and Goshawk (*Accipiter gentilis*) eggs from Southeastern Spain. *Environ Toxicol Chem* 26:2373-2378
- MARTÍNEZ-LÓPEZ E., MARÍA-MOJICA P., MARTÍNEZ J.E., PEÑALVER J., PULIDO M., CALVO J.F., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2004. Lead in feathers and  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in three raptor species from an unpolluted mediterranean forest (Southeastern Spain). *Archiv Environ Contam Toxicol* 47:270-275
- MARTÍNEZ-LÓPEZ E., ROMERO D., MARÍA-MOJICA P., MARTÍNEZ J.E., CALVO J.F., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2009. Changes in blood pesticide levels in Booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) associated with agricultural land practices. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:45-50
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ M.J., PÉREZ-SIRVENT C. 2009. Análisis del estado de contaminación del suelo en el Sistema de Campo de Cartagena-Mar Menor. En: Cabezas Calvo-Rubio F. (Eds.) *El Mar Menor: Estado actual del conocimiento científico*. Instituto Mediterráneo del Agua, Murcia, pp 207-243
- MATEO R., BEYER W.N., SPANN J.W., HOFFMAN D.J. 2003a. Relation of fatty acid composition in lead-exposed mallards to fat mobilization lipid peroxidation and alkaline phosphatase activity. *Comp Biochem Physiol* 135C:451-458
- MATEO R., BEYER W.N., SPANN J.W., HOFFMAN D.J., RAMIS A. 2003b. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J Toxicol Environ Health* 66A:1371-1389
- MATEO R., ESTRADA J., PAQUET J.Y., RIERA X., DOMINGUEZ L., GUITART R., MARTÍNEZ-VILALTA A. 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. *Environ Pollut* 104:435-440
- MATOLESY G., NADASY M., ANDRIASKA V. 1988. Rodenticides. En: Matolesy G., Nadasy M., Andriaska V. (Eds). *Pesticide Chemistry*. Elsevier Science Publishing Co, Amsterdam, Netherlands, pp 261-271



- MATSUMURA F. 1985. Toxicology of insecticides. Plenum Press, New York.
- MATTHEWS H.B., DOMANSKI J.J., GUTHRIE F.E. 1976. Hair and its associated lipids as an excretory pathway for chlorinated hydrocarbons. *Xenobiotica* 6:425-426
- MAUTINO M. 1997. Lead and zinc intoxication in zoological medicine: a review. *J Zoo Wildl Med* 28:28-35
- McARTHUR M.L.B., FOX G.A., PEAKALL D.B., PHILOGENE B.J.R. 1983. Ecological significance of behavioral and hormonal abnormalities in breeding ring doves fed an organochlorine chemical mixture. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:343-353
- McBRIDE T.J., SMITH J.P., GROSS H.P., HOOPER M.J. 2004. Blood-lead and ALAD activity levels of Cooper's Hawks (*Accipiter cooperii*) migrating through the southern rocky mountains. *J Raptor Res* 38:118-124
- McCARTY J.P., SECORD A.L. 1999. Nest-building behavior in PCB-contaminated Tree swallows. *The Auk* 116:55-63
- McDONALD R.A., HARRIS S., TURNBULL G., BROWN P., FLETCHER M. 1998. Anticoagulant rodenticides in Stoats (*Mustela erminea*) and Weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environ Pollut* 103:17-23
- McDONALD T.A. 2002. A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere* 46:745-755
- McKERNAN M.A., RATTNER B.A., HALE R.C., OTTINGER M.A. 2009. Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (DE-71) in Chicken (*Gallus gallus*), Mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchings. *Environ Toxicol Chem* 28:1007-1017
- McLANE M.A.R., HALL L.C. 1972. DDE thins Screech owl eggshells. *Bull Environ Contam Toxicol* 8:65-68
- McLANE M.A.R., HUGHES D.L. 1980. Reproductive success of Screech owls fed Aroclor 1248. *Arch Environ Contam Toxicol* 9:661-665



- MENDENHALL V.M., KLAAS E.E., McLANE M.A.R. 1983. Breeding success of Barn owls (*Tyto alba*) fed low levels of DDE and dieldrin. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:235-240
- MENDENHALL V.M., PANK L.F. 1980. Secondary poisoning of owls by anticoagulant rodenticides. *Wildlife Soc* 8B:311-315
- MERSON M.H., BYERS R.E., KAUKAINEN D.E. 1984. Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. *J Wildlife Manage* 48:212-216
- MIKKOLA H. 1995. Rapaces nocturnas de Europa. Ed Perfils, Lleida
- MINEAU, P. 1982. Levels of major organochlorine contaminants in sequentially-laid herring gull eggs. *Chemosphere* 11:679-685
- MMA (Ministerio de Medio Ambiente, Subdirección General de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos del Ministerio del Medio Ambiente). 2004. Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes
- MOLINA C., FALCÓN M., BARBA A., CÁMARA M.A., OLIVA J., LUNA A. 2005. HCH and DDT residues in human fat in the population of Murcia (Spain). *Ann Agric Environ Med* 12:133-136
- MOORE N.W. 1966. A pesticide monitoring system with special reference to the selection of indicator species. *J Appl Ecol* 3:261-269
- MORA M., AUMAN H., LUDWIG J., GIESY J., VERBRUGGE D., LUDWIG M. 1993. Polychlorinated biphenyls and chlorinated insecticides in plasma of Caspian terns: Relationships with age, productivity, and colony site tenacity in the great lakes. *Arch Environ Contam Toxicol* 24:320-331
- MORENO-MARÍ J., LÓPEZ-FERRER J., JIMÉNEZ-PEYDRÓ R. 2004. El control de los roedores: revisión de los rodenticidas registrados en el ámbito de la sanidad ambiental en España. *Rev Esp Salud Pública* 78:5-16



- MORIARTY F. 1999. Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems. Academic Press, London
- MORILLO C. 1976. Guía de las Rapaces Ibéricas. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- MORREALE DE ESCOBAR G., OBREGON M.J., ESCOBAR DEL REY F. 2000. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* 85:3975-3987
- MORRISSEY C. A., ELLIOTT J.E., OMEROD S.J. 2010. Diet shifts during egg laying: Implications for measuring contaminants in bird eggs. *Environ Pollut* 158:447-454
- MORTON A.P., PARTRIDGE S., BLAIR J.A. 1985. The intestinal uptake of lead. *Chem Brit* 21:923-927
- MUÑOZ-ARNANZ J., SÁEZ M., AGUIRRE J.I., HIRALDO F., BAOS R., PACEPAVICIUS G., ALAEE M., JIMÉNEZ B. 2011. Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of White stork (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain. *Environ Int* 37:572-576
- MURPHY M.J. 2007. Anticoagulant rodenticides. En: Gupta R.C. (Ed). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. Academic Press
- MURPHY M.J., TALCOTT P.A. 2001. Anticoagulant rodenticides. En: Peterson ME, Talcott PA (Eds). *Small mammal toxicology*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp 406-419
- NAKATSUGAWA T., ISHIDA M., DAHM P.A. 1965. Microsomal epoxidation of cyclodien insecticides. *Biochem Pharmacol* 14:1853-1865
- NARAHASHI T. 2001. Neurophysiological effects of insecticides. En: Krieger T. (Ed) *Handbook of pesticide toxicology: Principles*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp 335-351
- NAS (National Academy of Sciences). 1979. Zinc. United States National Academy of Sciences, National search Council, Subcommittee on Zinc. University Park Press, Baltimore, Md



- NEWTON I. 1988. Determination of critical pollutant levels in wild populations, examples from organochlorine insecticides in birds of prey. *Environ Pollut* 55:29-40
- NEWTON I., BOGAN J. 1974. Organochlorine residues, eggshell thinning and hatching success in British sparrowhawks. *Nature* 249:582-583
- NEWTON I., DALE L., FINNIE J. K., FREESTONE P., WRIGHT J., WYATT C., WYLLIE I. 1998. Wildlife and Pollution: 1997/98. Annual Report. JNCC Report No. 285. pp 61. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough, UK
- NEWTON I., SHORE R.F., WYLLIE I., BIRKS J.D.S., DALE L. 1999. Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals. En: Coward D.P. and Feare C.J. (Eds). *Advances in vertebrate pest management*. Filander Verlag, Fürth, Germany, pp 347-367
- 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
- NEWTON I., WYLLIE I., DALE L. 1997. Mortality causes in British Barn owls (*Tyto alba*), based on 1,101 carcasses examined during 1963-1996. U.S Forest Service General Technical Report NC 190:299-307
- NEWTON I., WYLLIE I., FREESTONE P. 1990. Rodenticides in British Barn owls. *Environ Pollut* 68:101-118
- NEWTON I., WYLLIE I., GRAY A., EADSFORTH C.V. 1994. The toxicity of the rodenticide flocoumafen to Barn owls and its elimination via pellets. *Pestic Sci* 41:187-193
- NOBLE D.G., ELLIOTT J.E. 1990. Levels of contaminants in Canadian raptors, 1966 to 1988: effects and temporal trends. *Can Field Nat* 104:222-243
- NORDBERG G.F. 1974. Health hazards of environmental cadmium pollution. *Ambio* 3:55-66
- NORDBERG G.F., GOYER R.A., NORDBERG M. 1975. Comparative toxicity of cadmium metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch Pathol* 99:192-197



- NORSTROM R.J. 1988. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in Canadian wildlife. En: Crine J.P. (Ed). *Hazards, decontaminations and replacement of PCBs*. Plenum Publishing, New York, NY, USA pp 85-100
- NORSTROM R.J. 2002. Understanding bioaccumulation of POPs in food webs. *Environ Sci Pollut Res* 9:300-303
- NRC (U.S. National Research Council). 1987. Committee on biological markers. *Environ Health Perspect* 74:3-9
- NRC (U.S. National Research Council). 1991. Animals as sentinels of environmental health hazards. National Academy Press, Washington
- OEHME M., LUND W. 1979. Comparison of digestion procedures for the determination of heavy metals (Cd, Cu, Pb) in blood by anodic stripping voltametry. *Fresenius Z Anal Chem* 298:260-268
- ÓLAFSDÓTTIR K., PETERSEN Æ., MAGNÚSDÓTTIR E.V., BJÖRNSSON T., JÓHANNESSON T. 2005. Temporal trends of organochlorine contamination in Black guillemots in Iceland from 1976 to 1996. *Environ Pollut* 133:509-515
- OLEA P.P., SÁNCHEZ-BARBUDO I.S., VIÑUELA J., BARJA I., MATEO-TOMÁS P., PIÑEIRO A., MATEO R., PURROY F.J. 2009. Lack of scientific evidence and precautionary principle in massive release of rodenticides threatens biodiversity: old lessons need new reflections. *Environ Conserv* 36:1-4
- OLIVER A.J., WHEELER S.H. 1978. Toxicity of the anticoagulant pindone to the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus* and the Sheep, *Ovis aries*. *Aust Wildl Res* 5:135-142
- OLSSON V. 1997. Breeding success, dispersal and long-term changes in a population of Eagle owl (*Bubo bubo*) in southeastern Sweden 1952-1996. *Ornis Svecica* 7:49-60
- OMS. 1992. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Organización mundial de la salud, Ginebra



- ONALAJA A.O., CLAUDIO L. 2000. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect* 108:23-28
- ONTIVEROS D. 1999. Selection of nest cliffs by Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) in southeastern Spain. *J Raptor Res* 33:110-116
- ORDEN DE 1 DE FEBRERO DE 1991 por la que se modifica el anexo de la de 7 de septiembre de 1989, sobre prohibición de la comercialización y utilización de ciertos productos fitosanitarios en aplicación de las Directivas 90/335/CEE y 90/533/CEE
- ORDEN DE 1 DE FEBRERO DE 2006, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se convocan ayudas para el fomento del cultivo y explotación en común de las plantaciones de cítricos y otras especies leñosas. DOCV. Diari Oficial de la Comunitat Valenciana núm. 5194, 8 de Febrero de 2006  
[http://www.docv.gva.es/datos/2006/02/08/pdf/2006\\_1334.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2006/02/08/pdf/2006_1334.pdf)
- ORDEN DE 11 DE JUNIO DE 2008, de la Consejería de Desarrollo Sostenible y Ordenación del Territorio sobre periodos hábiles de caza para la temporada 2008/2009 en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. BORM. Boletín Oficial de la Región de Murcia número 137, 14 de junio de 2008  
<http://www.carm.es/borm/documento?obj=bol&id=33671>
- ORDEN DE 26 DE NOVIEMBRE DE 2007 por la que se regulan las normas técnicas de producción integrada en el cultivo de melón-sandía. BORM. Boletín Oficial de la Región de Murcia número 287, 14 de diciembre de 2007
- ORDEN DE 4 DE FEBRERO DE 1994 por la que se prohíbe la comercialización y utilización de plaguicidas de uso ambiental que contienen determinados ingredientes activos peligrosos. BOE. Boletín Oficial del Estado número 41, de 17 de febrero de 1994.  
<http://www.boe.es/boe/dias/1994/02/17/pdfs/A05132-05132.pdf>
- OSOFSKY A., JOWETT P.L.H, HOSGOOD G., TULLY T.N. 2001 Determination of normal blood concentrations of lead, zinc, copper, and iron in Hispaniolan amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Avian Med Surg* 15:31-36





- PAIN D.J. 1987. Lead poisoning in waterfowl: Sources and screening techniques. PhD Thesis. Oxford University, Oxford, UK
- PAIN D.J., AMIARD-TRIQUET C. 1993. Lead poisoning of raptors in France and elsewhere. *Ecotoxicol Environ Safety* 25:183-192
- PAIN D.J., RATTNER B.A. 1988. Mortality and hematology associated with the ingestion of one number four lead shot in Black ducks, *Anas rubripes*. *Bull Environ Contam Toxicol* 40:159-164
- PALACE V.P., KLAVERKAMP J.F., BARON C.L., BROWN S.B. 1997. Metabolism of <sup>3</sup>H-retinol by Lake trout (*Salvelinus namaycush*) pre-exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126). *Aquat Toxicol* 39:321-332
- PALIN K.J., WILSON C.G., DAVIS S.S., PHILLIPS A.J. 1982. The effects of oil on the lymphatic absorption of DDT. *J Pharm Pharmacol* 34:707-710
- PATRICK L. 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev* 11:114-127
- PATTEE O.H. 1984. Eggshell thickness and reproduction in American kestrels exposed to chronic dietary lead. *Arch Environ Contam Toxicol* 13:29-34
- PATTEE O.H. WIEMEYER S.N., MULHERH B., SILEO L. 1981. Experimental lead-shot poisoning in Bald eagles. *J Wildl Manag* 45:806-810
- PATTEE O.H., CARPENTER J.W., FRITTS S.H., RATTNER B.A., WIEMEYER S.N., ROYLE J.A., SMITH M.R. 2006. Lead poisoning in captive Andean condors (*Vultur gryphus*). *J Wildl Dis* 42:772-779
- PATTEE O.K., HENNES S.K. 1983. Bald eagles and waterfowl: The lead shot connection. *Trans N Am Wildl Nat Res Cof* 48:230-237
- PAVETTI F.G., CONESA-ALCARAZ M., FAZ-CANO A., ARNALDOS R., GARCÍA G. 2006. Contaminación por metales pesados en la rambla de El Gorguel (SE Península Ibérica). *Terra* 24:171-178



- PEAKALL D.B. 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman and Hall, London
- PEAKALL D.B. 1996. Dieldrin and other cyclodiene pesticides in wildlife. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. Lewis, Boca Raton, Florida, pp 73-99
- PEAKALL D.B., CADE T.J., WHITE C.M., HAUGH J.R. 1975. Organochlorine residues in Alaskan peregrines. *Pestic Monit J* 8:255-260
- PEAKALL D.B., GILMAN A.P. 1979. Limitations of expressing organochlorine levels in eggs on a lipid-weight basis. *Bull Environ Contam Toxicol* 23:287-290
- PEAKALL D.B., LINCER J.L., RISEBROUGH R.W., PRITCHARD J.B., KINTER W.B. 1973. DDE-induced eggshell thinning: structural and physiological effects. *Comp Gen Pharmac* 4:305-313
- PELZ H.J. 2007. Spread of resistance to anticoagulant rodenticides in Germany. *Int J Pestic Manage* 53:299-302
- PENTERIANI V., GALLARDO M., ROCHE P. 2002. Landscape structure and food supply affect Eagle owl (*Bubo bubo*) density and breeding performance: a case of intra-population heterogeneity. *J Zool* 257:365-372
- PÉREZ-GARCÍA J.M., BOTELLA F., SÁNCHEZ-ZAPATA J.A., HIRALDO F., DONÁZAR J.A., SAYAGO J.M. 2010. Broods of five fledglings in the Eagle owl. *J Raptor Res* 44:161-163
- PÉREZ-LÓPEZ M., HERMOSO DE MENDOZA M., LÓPEZ-BECEIRO A., SOLER-RODRÍGUEZ F. 2008. Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicol Environ Saf* 70:154-162
- PHILLPOTS C.J. 1979. Retention of cadmium in the duodenum of the rat following oral administration. *Toxicology* 14:245-253.
- PLATT S.R., HELMICK K.E., GRAHAM J., BENNETT R.A., PHILLIPS L., CHRISMAN C.L., GINN P.E. 1999. Peripheral neuropathy in a Turkey vulture with lead toxicosis. *J Am Vet Med Assoc* 214:1218-1220



- PORTERFIELD S.P. 2000. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals potential impact on brain development. *Environ Health Perspect* 108:433-438
- POUPOULIS C., JENSEN L.S. 1976. Effect of high dietary copper on gizzard integrity of the chick. *Poult Sci* 55:113-121
- PRESTT I., JEFFERIES D.J., MOORE N.W. 1970. Polychlorinated biphenyls in wild birds in Britain and their avian toxicity. *Environ Pollut* 1:3-26
- PROKOP Z., CUPR P., ZLEVOROVA-ZLAMALIKOVA V., KOMAREK J., DUSEK L., HOLOUBEK I. 2003. Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environ Res* 91:119-126
- QIU X., ZHU T., YAO B., HU J., HU S. 2005. Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China. *Environ Sci Technol* 39:4385-4390
- RADOMSKI J.L., ASTOLFI E., DEICHMANN W.B., REY A.A. 1971. Blood levels of organochlorine pesticides in Argentina: occupationally and nonoccupationally exposed adults, children and newborn infants. *Toxicol Appl Pharmacol* 20:186-193
- RADVANYI A., WEAVER P., MASSARI C., BIRD D., BROUGHTON E. 1988. Effects of chlorophacinone on captive kestrels. *Bull Environ Contam Toxicol* 41:441-448
- RAHMAN F., LANGFORD K. H., SCRIMSHAW M.D., LESTER J.N. 2001. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci Total Environ* 275:1-17
- RATCLIFFE D.A. 1970. Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds. *J Appl Ecol* 7:67-115
- RATTNER B.A., GOLDEN N.H., TOSCHIK P.C., MCGOWAN P.C., CUSTER T.W. 2008. Concentrations of metals in blood and feathers of nestling Ospreys (*Pandion haliaetus*) in Chesapeake and Delaware Bays. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:114-122
- REAL DECRETO 439/1990, de 30 de marzo, por el que se regula el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas



REAL DECRETO 785/2001, de 6 de julio, por el que se adelanta la prohibición de comercialización de las gasolinas con plomo y se establecen las especificaciones de las gasolinas que sustituirán a aquéllas

REBECCA G.W., BAINBRIDGE I.P. 1998. The breeding status of the Merlin (*Falco columbarius*) in Britain in 1993-94. *Bird Study* 45:172-187

REDIG P.T., ARENT L.R. 2008. Raptor Toxicology. *Vet Clin N Am Exot Anim Pract* 11:261-282

REDIG P.T., LAWLER E.M., SCHWARTZ S., DUNNETTE J.L., STEPHENSON B., DUKE G.E. 1991. Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in Red-tailed hawks. *Archiv Environ Contam Toxicol* 21:72-77

REDIG P.T., STOWE C.M., BARNES M., ARENT T.D. 1980. Lead toxicosis in raptors. *J Am Vet Med Assoc* 177:941-943

REED D., BOOTH N.H., BUSH P.B., GOETSCH D.D., KIKER J. 1977. Residues in broiler chickens fed low levels of hexachlorobenzene. *Poultry Sci* 56:908-911

REGLAMENTO (CE) 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

RESOLUCIÓN DE 28 DE MARZO DE 2007, de la Dirección General de Modernización de Explotaciones y Capacitación Agraria por la que se modifican los Anexos IV, V y VI de la Orden de 24 de abril de 2002, modificados por Resolución de 21 de marzo de 2006 por la que se regulan las normas técnicas de producción integrada en el cultivo de cítricos. BORM. Boletín Oficial de la Región de Murcia, 2007 <http://www.carm.es/borm/documento?obj=anu&id=368859>

RESOLUCIÓN DE 9 DE ABRIL DE 2001, de la Secretaría General de Medio Ambiente, por la que se dispone la publicación del Acuerdo de Consejo de Ministros, de 6 de abril de 2001, por el que se aprueba el Plan Nacional de Descontaminación y Eliminación de



Policlorobifenilos (PCB), Policloroterfenilos (PCT) y Aparatos que los Contengan (2001-2010)

- RIBAROV S.R., BOCHEV P.G. 1982. Lead-hemoglobin interaction as a possible source of reactive oxygen species-a chemiluminescent study. *Arch Biochem Biophys* 213:288-292
- RICE C.P., O'KEEFE P.W., KUBIAK T.J. 2003. Sources, pathways and effects of PCBs, dioxins and dibenzofurans. En: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J.Jr (Eds). *Handbook of ecotoxicology 2<sup>nd</sup> edition*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 501-573
- RICHARDS M.P., ROSEBROUGH R.W., STEELE N.C. 1987. Effects of starvation and refeeding on tissue zinc, copper and iron in turkey poults. *J Nutr* 117:481-499
- RICHARDSON M.E., FOX M.R.S. 1974. Dietary cadmium and enteropathy in the Japanese quail. *Lab Invest* 31:722-731
- RIEDEL M., RIEDEL B., SCHLEGELMILCH H.1991. [Risk of secondary intoxication for birds of prey and owls following use of chlorophacinone baits against common voles.] (in German). Unpubl. Report
- RISEBROUGH R.W. 1972. Effects of environmental pollutants upon animals other than man. En: Le Cam L.M., Neyman J., Scott E.L. (Eds). *Proceedings of the Sixth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 6: Effects of Pollution on Health*. University of California Press, Berkeley, California, pp 443-463
- ROCKE T.E., SAMUEL M.D. 1991. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the Mallard immune system. *J Wildl Dis* 27:1-9
- ROESIJADI G.1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 22:81-114
- ROMERO D., HERNÁNDEZ-GARCÍA A., TAGLIATI C.A., MARTÍNEZ-LÓPEZ E., GARCÍA-FERNÁNDEZ A.J. 2009. Cadmium- and lead-induced apoptosis in Mallard erythrocytes (*Anas platyrhynchos*). *Ecotoxicol Environ Saf* 72:37-44



- ROSS M.S., VERREAULT J., LETCHER R.J., GABRIELSEN G.W., WONG C.S. 2008. Chiral organochlorine contaminants in blood and eggs of Glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian Arctic. *Enviro Sci Technol* 42:7181-7186
- ROWE F.P., PLANT C.J., BRADFIELD A. 1981. Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus L.*). *J Hyg* 87:171-177
- ROZMAN R.S., LOCKE L.N., MCCLURE S.F. 1974. Enzyme changes in Mallard ducks fed iron or lead shot. *Avian Dis* 18:435-445
- RUTTEN A.A.J.J.L., FALKE H.E., CATSBURG J.F., TOPP R., BLAAUWBOER B.J., VAN HOLSTEIN I., DOORN J., VAN LEEUWEN F.X.R. 1987. Interlaboratory comparison of microsomal ethoxyresorufin and pentoxyresorufin O-dealkylation determinations: Standardization of assay conditions. *Arch Toxicol* 66: 237-244
- SAFE S. 1990. Polychlorinated bphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of Toxic Equivalency Factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 21:51-88
- SAGERUP K., HENRIKSEN E.O., SKORPING A., SKAARE J.U., GABRIELSEN G.W. 2000. Intensity of parasitic nematodes increases with organochlorine levels in Glaucous gull. *J Appl Ecol* 37:532-539
- SAMOUR J.H., D'ALOIA M.A. 1996. Normal blood chemistry of Saker falcon (*Falco cherrug*). *Avian Pathol* 25:175-178
- SÁNCHEZ-GELABERT J.I., NÚÑEZ-NAVARRO E., VALOR HERENCIA I. 2008a. Plaguicidas organoclorados (aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin, heptacloro, mirex, toxafeno y hexaclorobenceno). En: Sánchez-Gelabert, J.I., Núñez-Navarro, E., Valor Herencia, I. (Eds). *Compuestos Orgánicos Persistentes en la Región de Murcia (I)*. Calidad Ambiental, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: Murcia, Spain, pp 28-34
- SÁNCHEZ-GELABERT J.I., NÚÑEZ-NAVARRO E., VALOR HERENCIA I. 2008b. Bifenilos policlorados (PCBs). En: Sánchez-Gelabert, J.I., Núñez-Navarro, E., Valor Herencia, I.



(Eds). *Compuestos Orgánicos Persistentes en la Región de Murcia (I)*. Calidad Ambiental, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: Murcia, Spain, pp 22-25

SÁNCHEZ-GELABERT J.I., NÚÑEZ-NAVARRO E., VALOR HERENCIA I. 2008c. Inventario regional de las actividades que usan y/o generan hexabromobifenilo, pentabromodifenil éter y octabromodifenil éter en la Región de Murcia con indicación de los compartimentos ambientales afectados. En: Sánchez-Gelabert, J.I., Núñez-Navarro, E., Valor Herencia, I. (Eds). *Compuestos Orgánicos Persistentes en la Región de Murcia (II)*. Calidad Ambiental, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, pp 116-146

SÁNCHEZ-ZAPATA J.A. 1999. Las aves rapaces y su relación con la estructura del paisaje en ambientes mediterráneos semiáridos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Murcia

SARKAR B., LAUSSAC J.P., LAU S. 1983. Transport forms of copper in human serum. En: Sarkar B. (Ed). *Biological aspects of metals and metal related diseases*. Raven Press, New York, pp 23-40

SASSA S., GRANIK S., KAPPAS A. 1975. Effect of lead and genetic factors on heme biosynthesis in the human red cell. *Ann NY Acad Sci* 244:419-440

SAUTER E.A., STEELE E.E. 1972. The effect of low level pesticide feeding on the fertility and hatchability of chicken eggs. *Poult Sci* 51:71-76

SAVARIE P.J., HAYES D.J., MCBRIDE R.T., ROBERTS J.D. 1979. Efficacy and safety of diphacinone as a predacide. En: Kenaga E.E. (Ed). *Avian and mammalian wildlife toxicology*. Am. Soc. for Testing and Materials, Spec. Tech. Publ, pp 69-79

SCHARENBERG W. 1991. Prefledgling terns (*Sterna adisaea*, *Sterna hirundo*) as bioindicators for organochlorine residues in the German Wadden Sea. *Arch Environ Contam Toxicol* 21:102-105

SCHEUHAMMER A.M. 1987a. Erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in birds I. The effects of lead and others metals *in vitro*. *Toxicology* 45:155-163

SCHEUHAMMER A.M. 1987b. Erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase in birds II. The effects of lead exposure *in vivo*. *Toxicology* 45:165-175



- SCHEUHAMMER A.M. 1987c. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environ Pollut* 46:263-295
- SCHEUHAMMER A.M. 1988. The dose-dependent deposition of cadmium into organs of Japanese quail following oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 95:153-161
- SCHEUHAMMER A.M. 1989. Monitoring wild bird populations for lead exposure. *J Wildl Manag* 53:759-765
- SCHEUHAMMER A.M. 1996. Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminium in birds. *Environ Pollut* 94:337-343
- SCHEUHAMMER A.M., NORRIS S.L. 1996. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. *Ecotoxicology* 5:279-295
- SCHEUHAMMER A.M., TEMPLENTON D.M. 1990. Metallothionein production: similar responsiveness of avian liver and kidney to chronic cadmium administration. *Toxicology* 60:151-160
- SCHOWING J. 1984. Teratogenic effects of cadmium acetate and sulphate upon development of the chick embryo. *Acta Morphol Hung* 32:37-46
- SCHWETZ B.A., NORRIS J.M., KOCIBA R.J., KEELER P.A., CORNIER R.F., GEHRING P.J. 1974. Reproduction study in Japanese quail fed hexachlorobutadiene for 90 days. *Toxicol Appl Pharmacol* 30:255-265
- SCOTT M.L. 1977. Effects of PCBs, DDT and mercury compounds in chickens and Japanese quail. *Fed Proc* 36:1888-1893
- SEIDENSTICKER J.C., REYNOLDS H.V. 1971. The nesting, reproductive performance, and chlorinated hydrocarbon residues in the Red-tailed hawk and Great horned owl in southcentral Montana. *Wilson Bull* 83:408-418
- SELYE H. 1973. The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61:692-699





- SHARMA R.P. 1973. Brain biogenic amines: depletion by chronic dieldrin exposure. *Life Sci* 13:1245-1251
- SHARMA R.P., WINN D.S., LOW J.B. 1976. Toxic, neurochemical and behavioral effects of dieldrin exposure in Mallard ducks. *Arch Environ Contam Toxicol* 5:43-53
- SHORE R.F., BIRKS J.D., AFSAR A., WIENBURG C.L., KITCHENER A.C. 2003. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environ Pollut* 122:183-193
- SILEO L., BEYER N.W., MATEO R. 2004. Pancreatitis in wild zinc-poisoned waterfowl. *Avian Pathol* 32:655-660
- SMITH A.G. 1991. Chlorinated hydrocarbon insecticides. En: Hayes W.J.J., Laws E.R.J. (Eds). *Handbook of pesticides toxicology*, Academic Press, San Diego, pp 731-915
- SMITH A.G. 2004. Toxicology of organochlorine insecticides. En: Marrs T.C., Ballantyne B. (Eds). *Pesticide toxicology and international regulation*, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England, pp 25-87
- SNOEIJIS T., DAUWE T., PINXTEN R., VANDESANDE F., EENS M. 2004. Heavy metal exposure affects the humoral immune response in a free-living small songbird, the Great tit (*Parus major*). *Arch Environ Contam Toxicol* 46:399-404
- SÖDERSTRÖM G., SELLSTRÖM U., DEWIT C., TYSKLIND M. 2004. Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE209). *Environ Sci Technol* 38:127-132
- SONNE C., BUSTNES J.O., HERZKE D., JASPERS V., COVACI A., HALLEY D.J., MOUM T., EULAERS I., EENS M., IMS R.A., HANSSSEN S.A., ERIKSTAD K.E., JOHNSEN T., SCHNUG L., RIG F.F., JENSEN A.L. 2010. Relationships between organohalogen contaminants and blood plasma clinical-chemical parameters in chicks of three raptor species from Northern Norway. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:7-17
- SONNE C., DIETZ R., KIRKEGAARD M., LETCHER R.J., SHAHMIRI S., ANDERSEN S., MØLLER P., OLSEN A.K., JENSEN A.L. 2008a. Effects of organohalogen pollutants on



haematological and urine clinical-chemical parameters in Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*), *Ecotoxicol Environ Saf* 69:381-390

- SONNE C., LEIFSSON P.S., RUNE D., KIRKEGAARD M., JENSEN A.L., SHAHMIRI S., LETCHER R.J. 2008b. Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*) develop liver lesions when exposed to a chronic and dietary low dose of an environmental organohalogen cocktail. *Environ Res* 106:72-80
- SOONTORNCHAT S., LI M.H., COOKE P.S., HANSEN L.G. 1994. Toxicokinetic and toxicodynamic influences on endocrine disruption by polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* 102:568-571
- SOTO A.M., LIN T.M., JUSTICIA H., SILVIA R.M., SONNENSCHNEIN C. 1992. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (e-screen). En: Mehlman M.A. (Ed). *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Vol XXI. Princeton Scientific Publishing, pp 295-310
- SPAGNOLO V., CRIPPA V., MARZIA A., ALBERTI I., SARTORELLI P. 2008. Hematologic, biochemical, and protein electrophoretic values in captive Tawny owls (*Strix aluco*). *Vet Clin Pathol* 37:225-228
- SPAHN S.A., SHERRY T.W. 1999. Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of Little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:337-384
- SPEAR P.A., BILODEAU A.Y., BRANCHAUD A. 1992. Retinoids: From metabolism to environmental monitoring. *Chemosphere* 25:1733-1738
- SPEAR P.A., NORSTROM R.J., MOON T.W. 1990. Yolk retinoids (Vitamin A) in eggs of the Herring gull and correlations with polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Environ Toxicol Chem* 9:1053-1061
- SPRINGER M.A. 1980. Pesticide levels, egg and eggshell parameters of Great horned owls. *Ohio J Sci* 80:184-187



- STAPLETON H.M., ALAEE M., LETCHER R., BAKER J. 2004. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environ Sci Technol* 38:112-119
- STELLMAN S.D., DJORDJEVIC M.V., MUSCAT J.E., GONG L., BERNSTEIN D., CITRON M.L., WHITE A., KEMENY M., BUSCH E., NAFZIGER A.N. 1998. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:489-496
- STENDELL R.C. 1980. Dietary exposure of kestrels to lead. *J Wildl Manag* 44:527-530
- STENDELL R.C., BEYER W.N., STEHN R.A. 1989. Accumulation of lead and organochlorines residues in captive American kestrels fed pine voles from apple orchards. *J Wildl Dis* 25:338-391
- STENDELL R.C., SMITH R.I., BURNHAM K.P., CHRISTENSEN R.E. 1979. Exposure of waterfowl to lead: a nationwide survey of residues in wing bones of seven species, 1972-1973. U.S. Fish Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep. Wildl. 223:1-12
- STERNLIEB I. 1988. Copper and zinc. En: Arias I.M., Jakoby W.B., Popper H., Schachter D., Shafritz D.A. (Eds). *The liver: biology and pathobiology*. 2<sup>nd</sup> Edition, Raven Press, New York, pp 525-533
- STEWART F.M., FURNESS R.W., MONTEIRO L.R. 1996. Relationships between heavy metal and metallothionein concentrations in Lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:299-305
- STOHS S.J., BAGCHI D., HASSOUM E., BAGCHI M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:201-213
- STONE W., OKONIEWSKI J., STEDELIN J.R. 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis* 35:187-193
- STONE W.B., OKONIEWSKI J.C., STEDELIN J.R. 2003. Anticoagulant rodenticides and raptors: Recent findings from New York, 1998-2001. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:34-40



- STOUT J.D., BRINKER D.F., DRISCOLL C.P., DAVISON S., MURPHY L.A. 2010. Serum biochemistry values, plasma mineral levels, and whole blood heavy metal measurements in wild Northern goshawks (*Accipiter gentilis*). *J Zoo Wildl Med* 41:649-655
- STRAUSE K.D., ZWIERNIK M.J., IM S.H., BRADLEY P.W., MOSELEY P.P., KAY D.P., PARK C.S., JONES P.D., BLANKENSHIP A.L., NEWSTED J.L., GIESY J.P. 2007. Risk assessment of Great horned owls (*Bubo virginianus*) exposed to polychlorinated biphenyls and DDT along the Kalamazoo River, Michigan, USA. *Environ Toxicol Chem* 26:1386-1398
- 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
- SVENDSEN T.C., VORKAMP K., FREDERIKSEN M., RONSHOLDT B., FRIER J.O. 2007. Body burdens of persistent halogenated compounds during different development stages of anadromous Brown trout (*Salmo trutta*). *Environ Sci Technol* 41:5980-5985
- ŚWIERGOSZ R., KOWALSKA A. 2000. Cadmium accumulation and its effects on growing Pheasants *Phasianus colchicus* (L.) *Environ Toxicol Chem* 19:2742-2750
- SZADKOWSKI D. 1972. Cadmium-eine ökologische Noxe am Arbeitsplatz. [Cadmium-an ecological noxa at the working place]. *Med Monatsschr* 26: 553-556
- TANABE S. 1989. A need for reevaluation of PCB toxicity. *Mar Pollut Bull* 20:247-248
- THOMAS P.J., MINEAU P., SHORE R.F., CHAMPOUX L., MARTIN P.A., WILSON L.K., FITZGERALD G., ELLIOTT J.E. 2011. Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: Probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ Int* 37:914-920
- THRALL M.A., BAKER D.C., CAMPBELL T.W., DENICOLA D.B., FETTMAN M.J., LASSEN E.D., REBAR A., WEISER A. 2006. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations Set*, Blackwell Publishing, Iowa, USA



- TOLA S., HUMBERG S., ASP S., NIKKANEN J. 1973. Parameters indicative of absorption and biological effect in the new lead exposure: a perspective study. *Br J Ind Med* 30:134-141
- TOM K., CHEN M., GOETTLICH-RIEMANN W., TANIMOTO J., GREY S., WAKE D., RUCKER R.E. 1977. Collagen and elastin metabolism in relation to dietary zinc and copper in the chick and rat. *Nutr Rep Int* 15:191-198
- TRUST K.A., MILLER M.W., RINGELMAN J.K, ORME I.M. 1990. Effects of ingested lead on antibody production in Mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Wildl Dis* 26:316-322
- TSUCHIYA K. 1986. Lead. En: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. (Eds). *Handbook on the Toxicology of metals, vol II, specific Metals*, Elsevier, New York, pp 298-340
- TURTLE E.E., TAYLOR A., WRIGHT E.N., THEARLE R.J.P., EGAN H., EVANS W.H., SOUTAR N.M. 1963. The effects on birds of certain chlorinated insecticides used as seed dressings. *J Sci Food Agric* 14:567-577
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 2001. The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://www.chem.unep.ch/sc/default.htm>
- UNEP. 2005. Ridding the World of POPs: A Guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. United Nations Environment Programme Chemicals, Geneva, Switzerland
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1980. Ambient water quality criteria for copper. U.S. Environmental Protection Agency Report 440/5-80-036
- VALCHEV I., BINEV R., YORDANOVA V., NIKOLOV Y. 2008. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals-a review. *Turk J Vet Anim Sci* 32:237-243
- VAN DEN BERG H. 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect* 117:1656-1663
- VAN DEN BERG M., BIRNBAUM L., BOSVELD A.T., BRUNSTROM B., COOK P., FEELEY M., GIESY J.P., HANBERG A., HASEGAWA R., KENNEDY S.W., KUBIAK T., LARSEN J.C., VAN LEEUWEN F.X., LIEM A.K., NOLT C., PETERSON R.E., POELLINGER L.,



- SAFE S., SCHRENK D., TILLITT D., TYSKLIND M., YOUNES M., WAERN F., ZACHAREWSKI T. 1998. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106:775-792
- VAN DEN BERG M., CRAANE B.L.H.J., SINNIGE T., VAN MOURIK S., VAN DER GAAG M., LUTKE-SCHIPHOLT I.J., SPENKELINK B., BROUWER A., DIRKSEN S., BOUDEWUN T. 1994. Biochemical and toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-P-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the Cormorant (*Phalacrocorax carbo*) after *in ovo* exposure. *Environ Toxicol Chem* 13:803-816
- VAN DEN BRINK N.W., DE RUITER-DIJKMAN E.M., BROEKHUIZEN S., REIJNDERS P.J.H. BOSVELD, A.T.C. 2000. Polychlorinated biphenyls pattern analysis: Potential nondestructive biomarker in vertebrates for exposure to cytochrome P450-inducing organochlorines. *Environ Toxicol Chem* 19:575-581
- VAN DEN BRINK N.W., VAN FRANEKER J.A., DE RUITER-DIJKMAN E.M. 1998. Fluctuating concentrations of organochlorine pollutants during a breeding season in two Antarctic seabirds: Adélie Penguin and Southern Fulmar. *Environ Toxicol Chem* 17:702-709
- VAN DEN STEEN E., PINXTEN R., JASPERS V.L., COVACI A., BARBA E., CARERE C., CICHÓN M., DUBIEC A., EEVA T., HEEB P., KEMPENAERS B., LIFJELD J.T., LUBJUHN T., MÄND R., MASSA B., NILSSON J.A., NORTE A.C., ORELL M., PODZEMNY P., SANZ J.J., SENAR J.C., SOLER J.J., SORACE A., TÖRÖK J., VISSER M.E., WINKEL W., EENS M. 2009. Brominated flame retardants and organochlorines in the European environment using Great tit eggs as a biomonitoring tool. *Environ Int* 35:310-317
- VAN DROOGE B., MATEO R., VIVES Í., CARDIEL I., 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* 153:84-91
- VAN WYK E., BOUWMAN H., VAN DER BANK H., VERDOORN G.H., HOFMANN D. 2001. Persistent organochlorine pesticides detected in blood and tissue samples of vultures from different localities in South Africa. *Comp Biochem Physiol* 129A:243-264



- VAN WYK E., VAN DER BANK H., VERDOORN G.H. 1998. Dynamics of haematology and blood biochemistry in free-living African whitebacked vulture (*Pseudogyps africanus*) nestlings. *Comp Biochem Physiol* 120A:495-508
- VANPARYS C., DAUWE T., VAN CAMPENHOUT K., BERVOETS L., DE COEN W., BLUST R., EENS M. 2008. Metallothioneins (Mts) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in Great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Sci Tot Env* 401:184-193
- VEIT H.P., KENDALL R.J., SCANLON P.F. 1982. The effect of lead shot ingestion on the testes of adult Ringed turtle doves (*Streptopelia risoria*). *Avian Dis* 27:442-452
- VILLEGAS A., SÁNCHEZ J.M., COSTILLO E., CORBACHO C. 2002. Blood chemistry and haematocrit of the Black vulture (*Aegyptius monachus*). *Comp Biochem Physiol* 132A:489-497
- VOOUS K.H. 1960. Atlas of European Birds. Nelson, London
- VOS J.G., DYBING E., GREIM H.A., LADEFOGED O., LAMBRÉ C., TARAZONA J.V., BRANDT I., VETHAAK A.D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30:71-133
- VOS V.J., LUSTER M.I. 1989. Immune alterations. En: Kimbrough R.D., Jensen A.A. (Eds). *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphtalenes, dibenzodioxin, and related products*. Elsevier Science, New York, pp 295-322
- WALKER C.H. 1980. Species variations in some hepatic microsomal drug metabolising enzymes. *Prog Drug Metab* 5:113-164
- WALKER C.H. 1983. Pesticides and birds-mechanisms of selective toxicity. *Agric Ecosys Environ* 9:211-226
- WALKER C.H. 1990. Persistent pollutants in fish-eating sea birds- bioaccumulation, metabolism and effects. *Aquatic Toxicol* 17:293-324



- WALKER C.H. 1992. Biochemical responses as indicators of toxic effects in ecosystems. *Toxicol Lett* 64/65:527-533
- WALKER C.H. 2003. Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology* 12:307-316
- WALKER C.H., HOPKIN S.P., SIBLY R.M., PEAKALL D.B. 1996. Biomarkers. En: Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. (Eds). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London, 175-194
- WALKER C.H., NEWTON I., HALLAM S.D., RONIS J.J. 1987. Activities and toxicological significance of hepatic microsomal enzymes of the Kestrel (*Falco tinnunculus*) and Sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Comp Biochem Physiol* 86C:379-382
- WALKER L.A., LAWLOR A.J., LLEWELLYN N., PERÉIRA M.G., POTTER E., TOWNSEND J., TURK A., SHORE R.F. 2010a. The Predatory Bird Monitoring Scheme (PBMS) Report 2006-7. A contract report from the Centre for Ecology & Hydrology to Natural England
- WALKER L.A., LLEWELLYN N.R., PEREIRA M.G., POTTER E.D., MOLENAAR F.M., SAINSBURY A.W. SHORE R.F. 2010b. Anticoagulant rodenticides in predatory birds 2007 & 2008: a Predatory Bird Monitoring Scheme (PBMS) report. Centre for Ecology & Hydrology, Lancaster, UK
- WALKER L.A., LLEWELLYN N.R., PEREIRA M.G., POTTER E.D., SAINSBURY A.W., SHORE R.F. 2010c. Anticoagulant rodenticides in predatory birds 2009: a Predatory Bird Monitoring Scheme (PBMS) report. Centre for Ecology & Hydrology, Lancaster, UK
- WALKER L.A., TURK A., LONG S.M., WIENBURG C.L., BEST J., SHORE R.F. 2008. Second generation anticoagulant rodenticides in Tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 392:93-98
- WALSH P.M. 1990. The use of seabirds as monitors of heavy metals in the marine environment. En: Furness R.W., Rainbow P.S. (Eds). *Heavy metals in the marine environment. environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 183-204





- WARREN M.J., COOPER J.B., WOOD S.P., SHOOLINGIN-JORDAN P.M. 1998. Lead poisoning, haem synthesis and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci* 23:217-221
- WATANABE K.P., SAENGTIENCHAI A., TANAKA K.D., IKENAKA Y., ISHIZUKA M. 2010. Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp Biochem Physiol* 152C:114-119
- WEBER P. 2001. Vitamin K and bone health. *Nutrition* 17:880-887
- WEISS B., LATIES V. 1975. Behavioral toxicology. New York, Plenum Press
- WENZEL C., ADELUNG D., THEEDE H. 1996. Distribution and age-related changes of trace elements in Kittiwake *Rissa tridactyla* nestlings from an isolated colony in the German Bight, North Sea. *Sci Total Environ* 193:13-26
- WHITE D.H., FINLEY M.T. 1978. Uptake and retention of dietary cadmium in Mallard duck. *Environ Res* 17:53-59
- WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION). 1995. Environmental health criteria 175: anticoagulant rodenticides, Geneva
- WHO. 2001. Action plan for the reduction of reliance on DDT in disease vector control. Protection of the Human Environment Water, Sanitation and Health. Geneva, 2001
- WHO/ICPS. 1994. Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers. World Health Organization, Geneva
- WIEMEYER S. 1996. Other organochlorine pesticides in birds. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (Eds). *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. Lewis, Boca Raton, Florida, pp 99-115
- WIENBURG C.L., SHORE R.F. 2004. Factors influencing liver PCB concentrations in Sparrowhawks (*Accipiter nisus*), Kestrels (*Falco tinnunculus*) and Herons (*Ardea cinerea*) in Britain. *Environ Pollut* 132:41-50



- WIESMÜLLER T., SCHLATTERER B., WUNTKE B., SCHNEIDER R. 1999. PCDDs/PCDFs, coplanar PCBs and PCBs in Barn owl eggs from different areas in the State of Brandenburg, Germany. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:15-24
- WIESMÜLLER T., SÖMMER 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
- WILLDEN E.G. 1973. Urinary and whole blood cadmium concentrations in renal disease. *Ann Clin Biochem* 10:107-110
- WOODFORD J.E., KARASOV W.H., MEYER M.W., CHAMBERS L. 1998. Impact of 2,3,7,8-TCDD exposure on survival, growth and behavior of Ospreys breeding in Wisconsin, USA. *Environ Toxicol Chem* 17:1323-1331
- WOOLLEY D., ZIMMER L., DODGE D., SWANSON K. 1985. Effects of lindane-type insecticides in mammals: unsolved problems. *Neurotoxicol* 6:165-192
- YOCCOZ N.G., BUSTNES J.O., BANGJORD G., SKAARE J.U. 2009. Reproduction and survival of Tawny owls in relation to persistent organic pollutants. *Environ Int* 35:107-112
- YU S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, U.S.
- ZDZIARSKI J. M., MATTIX M., BUSH R.M., MONTALI, R.J. 1994. Zinc toxicosis in Diving Ducks. *J Zoo Wildl Med* 25:438-445
- ZILE M.H. 1992. Vitamin A homeostasis endangered by environmental pollutants. *Proc Soc Exper Biol Med* 201:141-153



## **VII. RESUMEN**



La exposición crónica a determinados contaminantes ambientales se ha relacionado con declives poblacionales en un número importante de especies. Para evaluar el grado de contaminación ambiental por estos compuestos y las consecuencias que puedan tener sobre la salud humana y ambiental se llevan a cabo los estudios de biomonitorización. El valor de las aves como biomonitores en este tipo de estudios ha sido ampliamente reconocido, y la existencia de numerosos programas establecidos por instituciones gubernamentales son la prueba de ello. En concreto, las aves rapaces son especialmente adecuadas para la monitorización de contaminantes bioacumulables y biomagnificables, tales como algunos metales pesados y compuestos organohalogenados, principalmente debido a su elevada posición en la cadena trófica y su capacidad para acumular e integrar contaminantes a lo largo del tiempo.

La medición de los contaminantes puede hacerse directamente en muestras de origen animal. Sin embargo, la monitorización de las respuestas biológicas que provocan mediante el uso de biomarcadores proporciona una información más directa de las alteraciones y las posibles consecuencias toxicológicas de estos compuestos. Así por ejemplo, la inhibición de la  $\delta$ -ALAD inducida tras la exposición a plomo o la disminución del grosor de cáscara del huevo por exposición crónica a DDE son considerados útiles biomarcadores específicos en aves.

Según las consideraciones hechas por la NRC (1991), el Búho real (*Bubo bubo*) podría ser considerada una buena especie centinela para la monitorización de contaminantes ambientales en nuestra zona de estudio, el Sureste español. Por este motivo, en el presente trabajo se ha evaluado el grado de exposición a plomo, cadmio, zinc, cobre, insecticidas organoclorados, PCBs, PBDEs y rodenticidas anticoagulantes, así como las tendencias temporales y espaciales de dicha exposición utilizando muestras de sangre (n=366) procedentes de pollos y adultos, huevos no eclosionados (n=58) e hígado (n=18) de individuos de esta especie. Además de la actividad  $\delta$ -ALAD y la medición del grosor de la cáscara de huevo, en este trabajo se han obtenido valores de diversos parámetros bioquímicos sanguíneos (n=503) con el fin de ampliar la información relacionada con el riesgo de efectos como consecuencia de la exposición a estos contaminantes en la población de Búho Real. Las muestras utilizadas fueron obtenidas entre 2003 y 2010 gracias a la colaboración de los grupos de investigación "Ecosistemas Mediterráneos" de la Universidad de Murcia y el "Área de Ecología" de la Universidad Miguel Hernández, en dos zonas diferenciadas, principalmente, por los



usos agrícolas, las características del terreno y la disponibilidad de presas. Las muestras de hígado se obtuvieron de individuos ingresados entre 2003 y 2010 en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “Santa Faz” de Alicante, dependiente de la Generalitat Valenciana.

Puesto que se ha demostrado que los animales centinelas pueden ser útiles para cuantificar la biodisponibilidad de los contaminantes ambientales para otras especies expuestas a las mismas fuentes, la información obtenida en el presente trabajo podría ser de utilidad para evaluar los posibles riesgos para especies más sensibles o en situación delicada de conservación. De igual manera, la información podría ser utilizada como base de datos útiles en la estimación de riesgos para la especie humana.

Se puede considerar que el conjunto de la población de pollos de Búho real del Sureste de España está expuesta a bajas concentraciones de metales en sangre. Sin embargo, en el caso del plomo, los niveles fueron significativamente superiores en los individuos nacidos en una antigua zona minera y su área de influencia que en el resto del área de estudio. Este hecho sugiere la utilidad de las muestras de sangre de pollos de Búho real para la biomonitorización de la contaminación por plomo. Por otro lado, la correlación encontrada entre los niveles de plomo y la actividad  $\delta$ -ALAD en sangre de pollos de Búho real, incluso a niveles de este metal inferiores al límite descrito por otros autores, sugiere que esta enzima puede ser utilizada como un biomarcador sensible de exposición y efecto a plomo en esta especie.

En el caso de la exposición a insecticidas organoclorados, las concentraciones encontradas en la sangre se consideran bajas y además tienden a disminuir con el tiempo, siendo lindano, endosulfán, p,p'-DDE y dieldrín los compuestos más frecuentes y abundantes. El hecho de que lindano y endosulfán sean los insecticidas organoclorados más recientemente prohibidos, y p,p'-DDE y el dieldrín los más persistentes en el medio, corrobora la utilidad de la sangre de pollos de rapaces y, en concreto, de Búho real como muestra de obtención nada o poco cruenta para evaluar la exposición a insecticidas organoclorados. Además, la relación encontrada entre los niveles de endosulfán y p,p'-DDT en sangre de pollos de Búho real con la superficie destinada a cultivos relacionados con el uso de dicofol y endosulfan, sugiere que la sangre de pollos de esta especie puede ser considerada una buena unidad para monitorizar el uso de productos fitosanitarios en las prácticas agrícolas.



Respecto a los residuos de compuestos organohalogenados en huevos no eclosionados, PCBs y p,p'-DDE son los más frecuentes y abundantes. Al contrario que en las muestras de sangre, las tendencias de algunos de estos compuestos fueron significativamente diferentes entre subáreas. Mientras que las concentraciones de HCB, p,p'-DDE,  $\beta$ -HCH, PCBs y PBDEs tienden a disminuir en la subárea Norte, en la subárea Sur tienden a aumentar. Las posibles causas del aumento en el Sur pueden ser tanto por un aumento de la contaminación como por un cambio en la dieta con incremento en la ingesta de aves.

En general, los niveles medios de organohalogenados en huevos no eclosionados se encuentran por debajo de los límites correspondientes a efectos tóxicos en rapaces nocturnas. Sin embargo, estos límites fueron sobrepasados en algunos huevos. Además, se encontró una correlación negativa entre los TEQs y la fracción de PCBs metabolizables, la cual puede ser indicativa de la inducción de enzimas hepáticas, hecho normalmente reconocido como una señal temprana de aviso de los efectos tóxicos causados por la activación del receptor arilo por parte de los PCBs y otros compuestos relacionados. Por otro lado, el grosor de cáscara de huevo disminuyó conforme aumentaron las concentraciones de p,p'-DDE, alcanzando una disminución del 17% (disminución relacionada con declives poblacionales en aves) cuando los niveles de este metabolito sobrepasaron los 100 ng/g de peso de lípidos.

Mediante la puesta a punto de una nueva técnica rápida, sencilla y de bajo coste se han detectado residuos de cinco rodenticidas anticoagulantes en un elevado porcentaje de individuos ingresados en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre "Santa Faz" de Alicante. La frecuencia de detección de los tres rodenticidas más comercializados en nuestro país (difenacoum, brodifacoum y bromadiolona) parece reflejar la frecuencia de uso de estos compuestos en el ámbito rural. Aunque no se ha podido atribuir la presencia de rodenticidas anticoagulantes como causa directa de muerte de los individuos estudiados, podemos sugerir que los residuos encontrados pudieron tener cierto papel en el desencadenamiento de la muerte.

Gracias a la disponibilidad de un elevado número de muestras de suero de Búho real se ha podido proporcionar información sobre parámetros bioquímicos utilizados rutinariamente en la evaluación del estado de salud de los individuos en adultos y pollos de Búho real de vida libre. A pesar de que la exposición a insecticidas organoclorados y metales sea baja en la población estudiada, podemos sugerir que los niveles de algunos



parámetros bioquímicos, en especial fosfatasa alcalina, triglicéridos, AST,  $\gamma$ -GT y proteínas totales pueden ser de utilidad en la evaluación de riesgos asociados a la exposición a organoclorados, mientras que ácido úrico y calcio y albúmina y glucosa pueden ser utilizados para evaluar la exposición a cadmio y plomo, respectivamente.

Aunque el Búho real se considera una especie abundante en nuestra zona de estudio, las tendencias poblacionales están todavía bajo estudio. Por tanto la continuación del muestreo y análisis en años posteriores serían necesarios para validar las tendencias y evaluar el riesgo que puede suponer para la especie un aumento de concentraciones de contaminantes.



## **VIII. EXTENDED SUMMARY**





## **THE EAGLE OWL (*Bubo bubo*) AS BIOMONITORING SPECIES FOR PERSISTENT ENVIRONMENTAL POLLUTANTS IN SOUTHEASTERN SPAIN**

Author: Pilar Gómez-Ramírez

Promotors: Antonio Juan García-Fernández and Emma Martínez-López

### **INTRODUCTION**

Exposure to environmental pollutants like organohalogen compounds and heavy metals has frequently been associated to population declines in several bird species (Mora *et al.*, 1993; Henny and Elliott, 2007). This has led to legal restrictions and subsequent decreases of pollutant concentrations both in the environment and in bird tissues (Bustnes *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). However, due to their high persistence and ability to bioaccumulate and biomagnify through the trophic chain, environmental concentrations of these compounds may still be important and exert potential risks. Therefore, the need for a knowledge of present levels of environmental pollutants and possible long term effects on the environment remains, and this demands specific monitoring programs, which are frequently undertaken utilizing sentinel animals (García-Fernández and María-Mojica, 2000).

The value of birds as biomonitors of environmental pollution has been broadly recognised and several governmental established monitoring programmes are proof of this (Becker, 2003). In the case of Spain, no national monitoring scheme has been established and therefore the research carried out has been sporadic in terms of spatial and temporal trends (García-Fernández *et al.*, 2008).

Among birds, raptors are considered especially suitable for monitoring bioaccumulable and biomagnifiable pollutants, mainly due to their position at the top of the trophic chain and their susceptibility to bioaccumulate and integrate contaminants over time (Furness, 1993). In our study area, the Eurasian Eagle owl complies with the National Research Council requirements (National Research Council, 1991) to be considered a suitable sentinel avian species for monitoring environmental pollutants, because it is an abundant species, relatively easy to capture and is exposed to



environmental pollutants. Moreover, this nocturnal raptor species is territorial year-round and long-living, and therefore likely to reflect local pollution.

Direct measurement of contaminants in fluids and tissues can reflect their exposure, absorption and accumulation in organisms. However, monitoring the biological responses would give more direct information about their alterations and toxicological consequences (Vanparrys *et al.*, 2008). These responses induced by xenobiotics are called biomarkers and comprise any alteration in cellular or biochemical components or processes, structures or functions, which are measurable in a biological system or sample (National Research Council, 1987). Ideal biomarkers are detected early and show adverse effects before they become irreversible. They include modifications in blood composition or specific enzyme activities (Gil and Pla, 2001). This is the case of the inhibition on the  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALAD) by lead exposure and eggshell thinning related to pp'-DDE, which have been described as suitable biomarkers in birds (Dieter *et al.*, 1976; Scheuhammer, 1987a,b; Walker *et al.*, 1996).

Anticoagulant rodenticides have not been routinely included in biomonitoring studies. Nevertheless this type of toxicants may pose a risk for birds, especially those that mainly feed on rodents. In fact, these compounds have shown a high frequency of detection in bird samples from UK and USA, including in animals without haemorrhages (Stone *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2010b). In contrast, data regarding rodenticide levels in Spanish raptors are restricted to cases of suspected poisoning (María-Mojica *et al.*, 1998) or after use to eradicate plagues (Olea *et al.*, 2009). Because the Eurasian Eagle owl in our study area is an abundant species that may be found close to agricultural areas where this type of biocides can be used, continued study of rodenticides is suggested.

It has been proven that sentinel animals could serve to quantify bioavailability of contaminants to other species exposed to same sources (Beeby, 2001). Hence the information gathered in this study could be useful to assess possible risks for other sensitive species, including human beings (National Research Council 1991; García-Fernández and María-Mojica, 2000).



## **OBJECTIVES**

### **1. Assessment of heavy metal exposure (Cd, Pb, Cu y Zn) in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain**

- 1.1. To know the degree of exposure to cadmium, lead, zinc and copper in blood from Eagle owl chicks born between 2003 and 2007.
- 1.2. To evaluate the influence of an ancient mining site and the surroundings on the levels of metals in blood and estimate the possible detrimental effects associated.

### **2. Assessment of organochlorine insecticides in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain**

- 2.1. To know the degree of exposure to 14 organochlorine insecticides in Eagle owl chicks born between 2003 and 2007.
- 2.2. To assess the usefulness of blood samples as a monitoring unit to indicate changes in levels associated to legal restrictions or shifts in agricultural practices.

### **3. Study of organohalogen compounds levels in Eurasian Eagle owl unhatched eggs: Temporal-spatial trends and risk assessment**

- 3.1. To know the levels of organohalogen contaminants in Eurasian Eagle owl unhatched eggs collected between 2004 and 2009.
- 3.2. To assess temporal and spatial trends of organohalogen compounds in the study area.
- 3.3. To evaluate the relation between organohalogen exposure and reproductive failure.



#### **4. Assessment of exposure to anticoagulant rodenticides in Eurasian Eagle owls from Southeastern Spain**

- 4.1. To know the degree of exposure to anticoagulant rodenticides in the Eurasian Eagle Owls from Southeastern Spain developing a new easy, low-cost technique to detect five anticoagulant rodenticides.
- 4.2. To relate these residues to their availability on the Spanish market and to estimate the risks associated in this species.

#### **5. Study of serum biochemical parameters and the relationship with levels of environmental pollutants in blood from Eurasian Eagle owls from Southeastern Spain**

- 5.1. To provide new information regarding levels of serum biochemical parameters in adults and chicks Eagle owls.
- 5.2. To relate to levels of environmental pollutants in blood to variations in biochemical parameters.

### **MATERIAL AND METHODS**

#### *Study area and species of study*

The study area comprises the Escalona, Altaona, Monte el Valle, Columbares, Sierra Minera Cartagena-La Union, La Muela-Cabo Tiñoso and Almenara mountains (37°45'N, 0°57'W), in the south of the province of Alicante and the east of Region of Murcia, in South-eastern Spain. The study area is relatively large and some differences in land use are known. Therefore, and for statistical analyses, this area was divided in two subareas. In the Northern subarea (Escalona, Altaona, Monte el Valle and Columbares), land is mainly dedicated to citrus and dry farming, and the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is very abundant (71% of the Eurasian Eagle owls' prey) (León *et al.*, 2008). In the Southern subarea, some fields are dedicated to irrigation farming, with intensive use of pesticides. Most nests are located around 16 Km from Cartagena, an important industrial city and some ancient mining sites are found in this subarea, in the Sierra Minera de Cartagena-La Unión range. The European Rabbit is



less abundant (35% of the Eagle owls' diet), and the diet is completed with rats (*Rattus rattus* and *R. norvegicus*), pigeons (*Columba spp.*), partridges (*Alectoris rufa*), hedgehogs (*Erinaceus europeus* and *Atelerix algirus*) and yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) (León *et al.*, 2008).

Eagle owl population in our study area is abundant and has been estimated at approximately 240-270 pairs, some 10-12% of the total population of this species in Spain (Martínez and Calvo, 2006; Martínez and Zuberogoitia, 2003).

#### *Sample collection*

The sample collection was performed in collaboration with ecology researchers from the "Mediterranean Ecosystems" (University of Murcia) and "Area of Ecology" (Miguel Hernández University) research teams.

Reproductive activity was rigorously monitored from December until fledging, to determine the exact ages of the nestlings before blood sampling. A total of 513 blood samples were obtained from 28-30 day-old Eurasian Eagle owl chicks born between 2003 and 2010 in South-eastern Spain. All samples were transported in a cool bag with ice and stored frozen in the laboratory at -40°C until processing. These samples were analysed for lead, cadmium, zinc, copper, 14 organochlorine insecticides and 5 anticoagulant rodenticides.

In order to evaluate anticoagulant rodenticides exposure in older individuals from the same species, liver samples were obtained during necropsy from 18 Eagle owls that arrived dead or died at the Wildlife Rehabilitation Centre "Santa Faz" (Alicante). These samples were stored frozen in the laboratory at -40°C until processing. Additionally, blood samples from 9 adult Eagle owls that were caught between 2008 and 2010 were also analysed for rodenticides.

Organohalogen contaminants were studied in fifty-eight unhatched eggs laid between 2004 and 2009. These eggs were preserved in the same conditions as the blood.



## Heavy metal analyses

Following the method described by García-Fernández *et al.* (1995), cadmium, lead, zinc and copper were analysed in 220 blood samples from Eurasian Eagle owl chicks born between 2003 and 2007, using an anodic stripping voltammeter (VA-757 Computrace Workstation; Metrohm, Switzerland), prior elimination of impurities by a complete high temperature digestion with a mixture of acids. Quality control analyses, linearity, recovery and reproducibility were performed previously.

## Determination of $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALAD)

Delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALAD) activity was determined in 220 blood samples from chicks born between 2003 and 2007, using the method described by Scheuhammer (1987a,b). Quantification was based on measuring the colour of the product the enzyme (porphobilinogen, PBG) forms with dimethylaminobenzaldehyde using a UV-spectrophotometer.  $\delta$ -ALAD activity was expressed in  $\mu\text{mol}$  PBG per hour per liter of red blood cells (RBC).

## Analysis of organochlorine insecticides in blood

A total of 14 organochlorine insecticides ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\delta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH or lindane, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan I, endosulfan II, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, heptachlor and heptachlor-epoxide) were analysed in 316 blood samples from Eagle owl chicks born between 2003 and 2007, following the method described by Martínez-López *et al.* (2009). According to this method, 200  $\mu\text{l}$  of blood were extracted with organic solvents. Residues were analysed with a gas chromatograph with an electron capture detector (GC-ECD 17 Shimadzu) using a SPB-608 (Supelco<sup>®</sup>) at 30 m long, 0.25 mm i.d. and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness. Quality control analyses, linearity, recovery and reproducibility were performed previously.

## Analysis of organohalogen compounds in unhatched eggs

Egg length (L) and width (W) were measured with a digimatic caliper (Instrumentación Científica Técnica SL, Lardero, La Rioja, Spain) to the nearest 0.01 mm. Eggs were opened and their contents emptied into flasks, weighed, and kept frozen



until analysis. Egg shells were dried to constant weight and weighed (SW) The shell index was computed as SW/LxW (Ratcliffe, 1970). Eggshell thickness was estimated as the average of five measurements taken on the equator of the egg with a digimatic caliper to the nearest 0.01 mm.

Analyses of 58 unhatched eggs contents were performed at Alterra (Wageningen UR) in Wageningen (The Netherlands) under the supervision of Dr. Nico W. van den Brink.

After thawing, egg contents were homogenized and a subsample was processed with n-Hexane using Soxtherm. Extracts were cleaned up by gel permeation chromatography using a Bio Beads SX3 column. Compound residue quantification was performed using a gas chromatograph-mass spectrometer (Agilent 6890 Series GC System; 5973 Network Mass Selective Detector), with a column Varian cpsil5-C18 for PCB 100 m x 0.25 m, df = 0.1  $\mu$ m, to analyse 21 polychlorinated biphenyls (PCBs) congeners (metabolisable: 8, 31, 44, 52, 70, 101, 149, 151 and non-metabolisable: 28, 105, 153, 138, 180, 195, 194, 118, 170, 77, 128, 126, 156, 169) and a column DB5-MS 30 m x 0.32 mm, df=0.25  $\mu$ m for organochlorine insecticides (OCs) (Hexachlorocyclohexanes (HCHs):  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH (lindane),  $\delta$ -HCH,  $\epsilon$ -HCH; cyclodienes: heptachlor, heptachlor-epoxide (HE), aldrin, isodrin, dieldrin, endrin, endosulfan, chlordane cis and trans; diphenylaliphatics: o,p'-DDT, o,p'-DDD, o,p'-DDE and p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE; hexachlorobenzene (HCB), methoxychlor and mirex) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) 28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183. Data were processed with Masshunter Workstation Software (Quantitative analysis for GC-MS, version B.04.00, Agilent Technologies). Quality control analyses, linearity, recovery and reproducibility were performed previously.

### **Anticoagulant rodenticides analyses**

Anticoagulant rodenticides were analysed in 18 liver samples from adult Eagle owls that arrived dead or died at the Wildlife Rehabilitation Center "Santa Faz" (Alicante) and in 50 blood samples (9 adults caught between 2008 and 2010 and 41 chicks born between 2008 and 2010).



Two grams of liver or blood were extracted with acetonitrile following a modified Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) method, with a Sigma-Aldrich® kit. Compound residue quantification of warfarin, chlorofacinone, bromadiolone, difenacoum and brodifacoum was performed using LC-MS/MS (Agilent VL) with a column Waters Sunfire C8 5µm 4.6 x150 mm at 25° C. Mobile phase consisted of (A) water with ammoniac acetate 20 mM and (B) methanol with ammoniac acetate 20 mM. The rodenticides were detected with negative electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring scanning mode (MRM). Quality control analyses, linearity, recovery and reproducibility were performed previously.

### **Analyses of biochemical parameters**

Albumin, calcium, inorganic phosphate, aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AP), cholesterol, triglycerides (TGL), creatine kinase (CK),  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), glucose, lactate dehydrogenase (LDH), total proteins (TP) and uric acid in serum were analysed in 513 serum samples (18 adults and 485 chicks) using an automated spectrophotometrical analyser (A25 de Atom®).

### **Statistical analyses**

Statistical analysis was performed using SPSS v15.0 statistical software (SPSS Inc., 1989-1999). According to the Kolmogorov-Smirnov test, all the contaminants and most of the biochemical parameters were not normally distributed. Hence, the Kruskal-Wallis Test was applied in order to compare mean levels between years, nests and sampling subarea, with the exception of triglycerides, LDH and uric acid, which were normally distributed, and the t-Student test was used. However, in order to correlate  $\delta$ -ALAD activity with lead levels, and p,p'-DDE with eggshell thickness, the values were log-transformed and Pearson's correlation coefficient was applied.

Organochlorine blood levels were also normalised to compare mean values between sampling years using mixed linear models, where "territory" was a random variable and "year" and "subarea" were fixed variables. Variations due to breeding period and nest location were analysed with R statistical software (Maindonald and Braun, 2002) using model selections based on the information theory of Burnham and Anderson (2002), and considering three explanatory variables: Territory, year (2003-





2007) and subarea (Northern and Southern). Each of the organochlorines analysed were considered as response variables.

Residual organohalogen compounds in unhatched eggs were calculated on a lipid-normalized basis (lipid weight: lw), although for comparison with other studies, some data have been calculated in wet weight corrected for moisture loss according to Hoyt (1979). Clutch average concentrations were calculated and general linear models (GLMs), applying a log-link function, were applied to analyse spatial and temporal trends in concentrations, using the statistical package GenStat®, version 13.2 (VSN International, Hertfordshire, UK). Trends in percentages for metabolisable-PCB fraction were analysed with log-linear models.

Spearman's rank correlation coefficient was applied to study correlations among metals and between contaminants and biochemical parameters. Level of significance was set at  $\alpha=0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Assessment of heavy metal exposure (Cd, Pb, Cu y Zn) in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain

#### *Cadmium, lead, copper and zinc in blood*

Mean levels of cadmium and lead for the whole population ( $n=220$ ), ( $0.11\pm 0.26$   $\mu\text{g/dL}$  and  $3.73\pm 4.2$   $\mu\text{g/dL}$  respectively) were similar to or lower than in other raptors inhabiting unpolluted areas (Henny *et al.*, 1994; García-Fernández *et al.*, 1996, 1997; Martínez-López *et al.*, 2004, 2005; McBride *et al.*, 2004). However, about 10% of the samples presented lead levels above 10  $\mu\text{g/dL}$ , and in 8 individuals it was close to or above 15  $\mu\text{g/dL}$ . According to Scheuhammer (1989), these chicks may be abnormally exposed to lead. Although toxic levels have not been established for cadmium in blood of birds, adverse effects have been found in pheasants with 1.7  $\mu\text{g/dL}$  of cadmium in blood (Świergosz y Kowalska, 2000). Sin embargo, se ha propuesto como umbral de toxicidad de cadmio en riñones 40  $\mu\text{g/g}$ , aunque para algunas aves puede ser de tan sólo 10  $\mu\text{g/g}$  (Eisler, 1985; Furness, 1996). However, according to Blanco *et al.* (2004)



and Baos *et al.* (2006) the concentrations of this metal found in our population do not seem to affect the immune system.

Regarding copper and zinc, mean levels for the whole population were  $33.70 \pm 84.04$   $\mu\text{g/dL}$  and  $349.46 \pm 150.36$   $\mu\text{g/dL}$ , respectively. These concentrations fall within the range considered as physiological in birds (Osofsky *et al.*, 2001; García-Fernández *et al.*, 2005b), although 50% of the samples exceeded the range for zinc. Moreover, levels of this essential element were higher than 1000  $\mu\text{g/dL}$  in three chicks and one of them presented 2063  $\mu\text{g/dL}$ , which doubled the range of 1120-1660  $\mu\text{g/dL}$  for intoxicated birds (Zdziarski *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 2004). Nevertheless, most animals can tolerate an excess of zinc in the diet by regulating the levels in the organism (Ewan, 1978; Sileo *et al.*, 2004). Hence, high zinc concentrations are not alarming in terms of toxicological effects (Goede, 1985). Copper levels in about 9% of the chicks studied exceeded the levels found in chicks of other raptor species (Benito *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003; Rattner *et al.*, 2008). Although toxic levels have not been established for blood samples, and in spite of the capacity to regulate levels of these essential metals in the organism, it should be taken into account that high metal levels may pose an additional stress for those animals already facing stressful conditions (Pérez-López *et al.*, 2008), like the case of growing birds.

### ***Assessment of heavy metal exposure in an ancient mining site and surroundings***

As mentioned above, the study area was divided in two subareas. When mean lead levels were compared, significant differences were found between Northern and Southern ( $p < 0.001$ ;  $3.05 \pm 3.4$   $\mu\text{g/dL}$  in Northern and  $6.5 \pm 5.9$   $\mu\text{g/dL}$  in Southern). In the Southern subarea some nests (10%) are located in the 'Sierra Minera Cartagena-La Unión' range or in the surroundings. In this site, lead, zinc, copper, tin, iron, manganese and silver had been extracted for more than 2500 years (Pavetti *et al.*, 2006). According to Martínez-Sánchez and Pérez-Sirvent (2009), concentrations of heavy metals in some points of this ancient mining site (AMS), closed in 1991, are higher than 1000 mg/kg of lead in soil, which exceeds the limits allowed by several governments (Pavetti *et al.*, 2006). Mining industry is an important source of lead contamination and several authors have reported significantly higher lead levels in birds inhabiting mining areas than in those from unpolluted or reference sites (Beyer *et al.*, 1985, 2004; Eisler, 2000; García-



Fernández *et al.*, 2005b; Henny *et al.*, 1994). In our study, when the samples obtained in the AMS were excluded, mean blood lead levels were  $3.18 \pm 3.43$   $\mu\text{g/dL}$ , which is significantly lower than the mean levels found in the AMS ( $p < 0.001$ ) and very similar to those found in Booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) and European buzzard (*Buteo buteo*) nestlings inhabiting an unpolluted area in the Region of Murcia (Southeastern Spain) (Martínez-López *et al.*, 2004). Moreover, mean lead levels in the chicks born in the AMS were still significantly higher than in the rest of the Southern subarea ( $p = 0.013$ ;  $8.61 \pm 6.76$   $\mu\text{g/dL}$ ). In order study heavy metal exposure, the study area was therefore divided into one area polluted by heavy metals (the AMS) and an unpolluted area that comprises the rest of the study area.

Unlike the lead levels, mean concentrations of the rest of the metals did not differ between the two subareas. This is in agreement with other studies on blood levels in polluted and unpolluted areas (Benito *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003; Baos *et al.*, 2006; Rattner *et al.*, 2008; Stout *et al.*, 2010). This could be because levels of these metals can be regulated in the organism, which impedes the detection of environmental variations (Walsh, 1990; Wenzel *et al.*, 1996).

### ***$\delta$ -ALAD activity and correlations between lead and $\delta$ -ALAD in blood***

Average values of  $\delta$ -ALAD activity in blood were  $155.67 \pm 116.33$   $\mu\text{mol PBG/h/L RBC}$ . Knowledge of the basal activity of  $\delta$ -ALAD in different species and at different moments of the birds' life cycle remains scarce and our results are not always comparable with data found in literature because enzymatic activity has been analysed with different techniques. However, differences in enzyme inhibition regarding polluted or unpolluted areas coincide with our samples and the existence of negative correlations with blood lead levels may be sufficient to indicate possible sub-lethal effects. In our study, this negative correlation was found ( $P = -0.137$ ,  $p = 0.044$ ), showing a more significant relation when blood lead levels were higher than  $4$   $\mu\text{g/dL}$  ( $P = -0.341$ ,  $p = 0.006$ ). These results show an inhibition of the enzyme activity, which reached 55% when lead concentrations in blood exceeded  $15$   $\mu\text{g/dL}$ . However, lower concentrations of lead in blood also cause enzymatic inhibition, lower even than the limit established by Henny *et al.* (1994) in American kestrels (*Falco sparverius*) and by Martínez-López *et al.* (2004) in Booted eagles, Goshawks (*Accipiter gentilis*) and European buzzards. It is remarkable



that 31% of enzymatic inhibition was still found when blood lead levels exceeded 10 µg/dL. The sampling site also influenced enzymatic activity, since it decreased about 60% in the polluted area (AMS) in relation to the unpolluted.

Only a 45-59% decrease in δ-ALAD was sufficient in nestlings of American kestrels to cause anaemia due to significant declines in haemoglobin and haematocrit (Hoffman *et al.*, 1985b; Henny *et al.*, 1994). Hence it is plausible that some individuals from our population could suffer from anaemia. Moreover, behavioural deficits and growth retardation has been evidenced in Herring gulls (*Larus argentatus*) with blood lead levels close to the highest found in our population (Burger and Gochfeld, 1996). However, because differences in lead accumulation in the erythrocyte were described among avian species, further research into the Eagle owl is needed.

### **Correlations among metals**

This type of correlations is usually attributed to common metabolic routes where proteins like metallothioneins are involved (Roesijadi, 1992; Wenzel *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2003). While these relations have been frequently studied in tissues (Wenzel *et al.*, 1996; Debacker *et al.*, 2001; Ek *et al.*, 2004), the bibliography related to blood samples of birds is scarce (Blanco *et al.*, 2003).

Correlations between cadmium and essential metals were significant and positive (Cd-Cu:  $Rho=0.16$ ,  $p=0.02$ ; Cd-Zn:  $Rho=0.15$ ,  $p=0.03$ ) but weaker than between lead and copper ( $Rho=0.218$ ,  $p=0.001$ ) or between zinc and copper ( $Rho=0.27$ ,  $p<0.001$ ). These results are similar to those found by Blanco *et al.* (2003) in Black kite (*Milvus migrans*) chicks born close to a solid-waste incinerator. According to these authors, these correlations could suggest that these essential metals could be involved in cadmium detoxification mechanisms probably through metallothionein induction. On the other hand, the strong correlation between zinc and copper suggests a common pattern of metabolic regulation depending on particular physiological features such as general condition (Debacker *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2003). Regarding the correlation between lead and copper, this could be due to the fact that lead can induce an increase may increase the levels of metal-binding proteins such as protoporphyrins and metallothioneins (Elliott *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1996).



On the other hand, and coinciding with the results found by Martínez-López (2005) in Booted eagle chicks, a significant correlation was found between cadmium and lead in blood of Eagle owl chicks ( $Rho=0.145$ ,  $p=0.03$ ). However the relation between cadmium and lead in Booted eagles was 1:10 while in the blood of Eagle owls from the unpolluted area it was 1:30. This difference could be related to the different ability to accumulate metals inside erythrocytes in each avian species, which has been demonstrated by Hernández-García (2010) in experimental *in vitro* studies.

## **2. Assessment of organochlorine insecticides in blood of Eagle owl chicks from Southeastern Spain**

### ***Levels of insecticides in blood***

Frequency of detection of the 14 insecticides analysed was in general low (<20%), with pp'-DDE, lindane and  $\Sigma$ endosulfan I and II being the most frequent. Dieldrin,  $\Sigma$ endosulfan I and II, lindane and diphenylaliphatics were the compounds detected at the highest levels (3.47, 5.33, 0.83 and 2.65  $\mu\text{g/dL}$ , respectively).

Coinciding with the results found by Martínez-López *et al.* (2009) in Booted eagle chicks born in the Region of Murcia Region, lindane was detected in blood more frequently than the rest of HCHs isomers studied. Moreover mean levels found in 2003 in their study were very similar to our mean levels in chicks born in the same year (1.89 vs 1.98  $\mu\text{g/dL}$ , respectively). Lindane was banned for agricultural use in 2000 (Decision 2000/801/EC). Nevertheless, traces of this insecticide could also be due to veterinary use and industrial, domestic and forestry application, which were allowed until 2007 in Europe (Regulation (EC) No 850/2004).

Endosulfan was only recently banned in the study area (Decision 2005/864/EC). Hence, despite its low persistence in the organisms (Wiemeyer, 1996), the detection in our samples was expected. As with lindane, the levels found in samples collected in 2003 and 2004 were similar to those found in Booted eagle chicks born between 2001-2003 in the Region of Murcia, (Martínez-López *et al.*, 2009). In spite of the fact that dieldrin was banned for agricultural use in 1994 in Spain (Orden 4 de Febrero de 1994), the levels found in some samples were similar to other raptor chicks born between 1999-



2003 in South-eastern Spain (Martínez-López, 2005) and even higher than in Bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) caught in 1977 in USA (Henny *et al.*, 1981).

Regarding diphenylaliphatics, p,p'-DDE (mean=2.05 µg/dL) was the most abundant and frequent compound, which coincides with the results found in scavenger raptors from Africa (van Wyk *et al.*, 2001) and Spain (Gómara *et al.*, 2004), with similar levels. Although the profile was different than that in the blood of the European buzzard, Goshawk and Booted eagle chicks born between 1999 and 2003 in Murcia Region (Martínez-López, 2005; Martínez-López *et al.*, 2009), the Eagle owl p,p'-DDE levels fall in the same range. These concentrations are well below the mean found by Donaldson *et al.* (1999) in plasma of Bald eagle chicks without reproductive impairment.

### ***Spatial and temporal trends in organochlorine insecticides in blood***

According to the model selection based on the information theory described by Burnham and Anderson (2002), "year" was the best model in most cases, except for δ-HCH. Thus "year" is considered the most influential variable in blood levels of the compounds analysed. This coincides with the results found by Martínez-López (2005) where the same compounds were analysed in blood of chicks of three raptor species (Booted eagle, Goshawk and European buzzard).

According to linear mixed models, where "territory" was considered a random variable, significant differences among sampling years were also found for all the compounds except for δ-HCH. In general concentrations of insecticides tended to decrease, which is in agreement with the ban on most of them for agricultural use in 1994 in Spain (Orden de 4 de Febrero de 1994). In contrast, levels of heptachlor tended to remain stable.

Although all the HCHs isomers tended to decrease along the study period, the decrease was more evident for lindane. This decrease coincides with the results found by Martínez-López *et al.* (2009) in blood of Booted eagle chicks from the Region Murcia, whose decrease was more pronounced in 2000, coinciding with the legal prohibition.



Like most of the insecticides, levels of aldrin and dieldrin tended to decrease. On the contrary, a trend for dieldrin was not established, due to the high standard deviations found in our samples.

Endosulfan was used for a variety of crops in Spain until its ban in 2005, although it was permitted in Spain until 2007 for cotton, tomato and hazelnut (Decision 2005/864/EC). Hazelnut has not been grown in the study area but using agricultural surface data of tomato and cotton crops from the Murcia Regional Government (CREM, 2011) and matching them against concentrations of endosulfan in blood of Eagle owl chicks, a simultaneous decrease was found between cotton and the insecticide. Because the decrease was appreciated before the legal restriction, the lower levels of endosulfan could be attributed to the lower use of insecticides. Accordingly we could conclude that, like in Booted eagle chicks (Martínez-López *et al.*, 2009), the use of blood from Eagle owl chicks could be considered a suitable monitoring sampling unit to evaluate the use of biocides.

In general, levels of  $\Sigma$ Diphenylaliphatics in blood tended to decrease along the period. Current traces of DDT and related compounds (DDT-r) in the environment have been suggested as being associated to the use of dicofol (Martínez-López *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008), an insecticide permitted until 2009 (Decision 2008/764/EC) recommended in our study area for citrus farming (Orden de 1 de Febrero de 2006; Resolución de 28 de Marzo de 2007) and melon and watermelon crops (Orden de 26 de Noviembre de 2007). As with endosulfan, when mean levels of p,p'-DDT were compared with the surface of land devoted to citrus, melon and watermelon farming, the trends coincided. Hence the decreasing trend found for  $\Sigma$ Diphenylaliphatics and p,p'-DDT may not be directly related to the ban, but to the farming surface. The decrease was more evident in 2005, when the "Health and Plant Protection Service" of the Murcia Regional Government informed about the new classification of dicofol and endosulfan, among other insecticides. According to this, these insecticides that were considered "Toxic" are now considered "Very Toxic" (CARM, 2005), which may have contributed to the decrease in use of insecticides.



### **3. Study of levels of organohalogen compounds in Eurasian Eagle owl unhatched eggs: Temporal-spatial trends and risk assessment**

#### ***Organochlorine insecticides, PCBs and PBDEs levels and profile***

As with other raptor eggs collected during the same decade in Spain and the rest of Europe (Henny *et al.*, 2003; Mañosa *et al.*, 2003; Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2007), p,p'-DDE was predominant in all the samples. Nevertheless, our mean levels (16.3 µg/g lw) were higher than in the studies mentioned, which could be related to the greater agricultural activity with common use of DDT in the past in our study area (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008a). As mentioned above, current traces of DDT and related compounds (DDT-r) in the environment have been suggested as being associated to the use of dicofol (Martínez-López *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). Because recent studies in raptors from Murcia Region have correlated p,p'-DDT levels in blood to the use of dicofol (Martínez-López 2005) and o,p'-DDT and p,p'-DDT have been found in the Eagle owl eggs, we could suggest that application of dicofol was a source of DDT-r in our study area.

Although HCB was detected in all the samples, concentrations were much lower than in other owls from Europe (Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007) but higher than in raptors breeding in a more remote area in Murcia, away from any urban or industrial influence (Martínez-López *et al.*, 2007). HCB is ubiquitous in nearly all environmental media (Barber *et al.*, 2005) but higher levels of HCB have been related to industrial sources in certain Spanish human population (Arrebola *et al.*, 2009; Jakszyn *et al.*, 2009).

The relatively high concentrations of dieldrin, heptachlor epoxide and endosulfan (mean concentrations respectively=448, 352, 166 ng/g lw) compared with the rest of insecticides analysed, make cyclodienes the second main group. Dieldrin has shown long persistence (Martijn *et al.*, 1993), but our mean concentrations were not expected to be as high as in owl eggs collected more than 25 years ago in the US (Henny *et al.*, 1984). Despite the rapid elimination of endosulfan (Wiemeyer, 1996), it was detected, and even at ppm levels, in our samples, probably due to its recent restriction (Decision 2005/864/EC).





Among hexachlorocyclohexanes (HCHs),  $\beta$ -HCH, was the most common and abundant in our samples which coincides with other studies on raptors' eggs (Henny *et al.*, 2003; Mañosa *et al.*, 2003). Our levels were higher than in owls' eggs from other European countries (Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007), especially in the eggs collected from a nest surrounded by intensive agricultural fields in the Northern subarea, which accounted for the highest levels (clutch average=607 ng/g lw). Like p,p'-DDE, the presence of  $\beta$ -HCH has been related to areas of intensive or moderate use of insecticides (Molina *et al.*, 2005; Jakszyn *et al.*, 2009). The low frequency (3.4%) and levels of  $\gamma$ -HCH (2.21 ng/g lw) in our samples seem to be in agreement with the total ban of lindane for agricultural use in 2000 (Decision 2000/801/EC) and the rapid metabolism and excretion in birds.

Compared to other raptors, including owls from other European countries, exposure to PCBs can be considered intermediate (Wiesmüller *et al.*, 1999; Kubistova *et al.*, 2003; Jaspers *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2007). Coinciding with these studies, PCB 138, 153 and 180 were the most abundant.

Levels of PBDEs (median  $\Sigma$ PBDEs 19.58 ng/g lw) were very low in comparison with other studies on raptor eggs (Jaspers *et al.*, 2005; Chen and Hale 2010) but similar to the levels found in Tawny owl eggs from Central Norway collected between 2001 and 2004 (Bustnes *et al.*, 2007). The profile is characteristic of terrestrial birds (Chen and Hale, 2010), and coincides with Little owl eggs from Belgium (Jaspers *et al.*, 2005), where BDE 99, 47 and 100 also dominated.

### **Temporal and spatial changes of organohalogen compounds**

When GLM were applied, significant interactions between area (Northern and Southern subareas) and year were found for concentrations of pp'-DDE ( $F_{\text{prob overall analysis}}=0.027$ ,  $t_{\text{prob interaction term year*subarea}}=0.025$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.014$ ,  $t_{\text{prob subarea}}=0.025$ ),  $\beta$ -HCH ( $F_{\text{prob overall analysis}}=0.045$ ,  $t_{\text{prob interaction term year*subarea}}=0.072$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.011$ ,  $t_{\text{prob subarea}}=0.072$ ), HCB ( $F_{\text{prob overall analysis}}=0.002$ ,  $t_{\text{prob interaction term year*subarea}}=0.027$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.46$ ,  $t_{\text{prob subarea}}=0.027$ ), total PCBs ( $F_{\text{prob overall analysis}}<0.001$ ,  $t_{\text{prob interaction term year*subarea}}=0.05$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.81$ ,  $t_{\text{prob subarea}}=0.05$ ) and total PBDEs ( $F_{\text{prob overall analysis}}<0.001$ ,  $t_{\text{prob interaction term year*subarea}}=0.007$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.198$ ,  $t_{\text{prob subarea}}=0.007$ ). Temporal trends for HCB, pp'-DDE,  $\beta$ -



HCH, PCBs and PBDEs were significantly different in each subarea. While concentrations in the Southern subarea tended to increase through the study period, levels in the Northern tended to decrease, except in the case of total PCBs and HCB, which remained stable.

In the light of other studies concerning raptor eggs from Europe (Helander *et al.*, 2002; Bustnes *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2007), decreasing levels of organohalogen contaminants would be expected. However, DDE could be an exception since stable or even increasing levels have been found in other studies (Bustnes *et al.*, 2007; García-Fernández *et al.*, 2008). As mentioned above, current levels of DDE and other DDT-r could be due to the use of dicofol for citrus farming. This type of agriculture has been especially important in the Northern subarea, but economic causes in recent years may have instigated an abandonment of farm work, especially in lemon trees (Gomez-Ramírez, pers. observ; CARM 2010), which may have led to a reduced use of insecticides. The slightly decreasing levels of p,p'-DDE in the Northern subarea may, therefore, reflect a shift in agricultural practices. However, this decreasing trend is less evident if an outlier from 2005 is excluded, showing levelling concentrations in the Northern subarea, similar to the trends found in Tawny owl eggs from Central Norway (Bustnes *et al.*, 2007). According to these authors, stationary levels of DDE through the study period would be caused by equivalent input and elimination of diphenylaliphatics in the environment. Hence, the use of dicofol for other crops may be the source for DDT-r in the area. Because dietary shifts with a greater amount of birds are suggested as a cause for increasing organochlorine loads in raptors (Gervais and Anthony, 2003; Mañosa *et al.*, 2003; van Drooge *et al.*, 2008), a decrease in the availability of European rabbit, a herbivore species, in the Northern subarea with an increase of the proportion of birds ingested by the breeding females, may counteract a decrease of organohalogen contaminants. However, no evidence of declining European rabbit populations in the area has been reported.

An increase of birds in the diet of Eagle owls from Southern subarea could also explain the increasing levels of p,p'-DDE, PCBs, HCB and PBDEs. Because o,p'-DDT and p,p'-DDT levels also tended to increase in the Southern subarea, increases in the use of dicofol in this subarea would be suggested. Regarding industrial contaminants, it should be mentioned that most of the nests from Southern subarea are located within a



16 Km radius from Cartagena, an important industrial city of the Region of Murcia. In this city a PCB waste management plant has been authorized since 2008 (CARM, 2008). In addition, a greater number of “old transformers” with a high probability of containing PCBs are located in this subarea (Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008b). The voluntary restriction of use of lower brominated compounds could have caused the decrease of PBDE levels in Europe (Bustnes *et al.*, 2007; Chen and Hale 2010). Because these compounds have not been used in industry in the study area (MARM, 2010; Sánchez-Gelabert *et al.*, 2008c), the increasing levels of PBDEs in the Southern population could be due to release of PBDE containing products used in Cartagena.

The significant decrease of cyclodienes in both subareas ( $F_{\text{prob year}}=0.009$ ,  $t_{\text{prob year}}=0.009$ ) was expected because most of these insecticides have not been used in Spain since 1994 (Orden 4 de Febrero de 1994).

### **Residue interpretation and risk assessment**

According to the criteria for risk assessment in Great horned owls (*Bubo virginianus*) (Strause *et al.*, 2007), about 8% of our samples exceeded the NOAEC threshold levels for  $\Sigma$ DDTs (3600 ng/g ww) and one egg presented  $\Sigma$ PCB levels above NOAEC of 7000 ng/g ww. However, about 36% of the eggs exceeded the NOAEC of Total TEQs (135 pg/g ww) and 17% of the samples presented levels above 400 pg/g ww, the LOAEC for Total TEQs (Strause *et al.*, 2007). These samples also contained a low fraction of metabolisable PCBs, which indicates induction of hepatic enzymes, generally regarded as early warning signals for the Ah-receptor-related toxic effects of PCBs and related compounds (van den Brink *et al.*, 2000). In addition, a significant correlation between TEQs values and concentrations of metabolisable PCBs was found ( $F_{\text{prob}}=0.004$ ).

Compared with the Northern subarea, significantly higher values of  $\Sigma$ TEQ ( $\chi^2=15.88$ ,  $p=0.00$ ),  $\Sigma$ DDT ( $\chi^2=8.89$ ,  $p=0.003$ ) and  $\Sigma$ PCB ( $\chi^2=18.02$ ,  $p=0.00$ ) were found in the Southern subarea. In this subarea, the Eurasian Eagle owl density of population is lower, fewer nests have been found and the lower European rabbit availability has been suggested as the main cause (León *et al.*, 2008). The higher



potential for adverse effects of dioxin-like compounds found in the eggs collected from this subarea could be acting as a synergistic factor for population detriment.

Although dieldrin levels in our samples are considered low and did not seem to influence fertilization, two eggs approached the threshold of 700 ng/g ww established by Newton (1988) for population declines in Peregrine falcons (*Falco peregrinus*).

Concentrations of p,p'-DDE were on average below the NOAEC of 12 µg/g ww (Mendenhall *et al.*, 1983). Nevertheless, the levels of this metabolite were correlated to a significant decrease in eggshell thickness ( $P=-0.469$ ,  $p<0.001$ ) reaching a 17% of thinning when DDE levels were higher than 100 µg/g lipid weight (8 µg/g ww). This was shown in 4 eggs from the same clutch laid in a nest surrounded by irrigation agriculture fields in the Northern subarea. Our results are very similar to experimental studies where Barn owls (*Tyto alba*), Eastern screech owls (*Megascops asio*) and Eurasian sparrow hawks (*Accipiter nisus*) were fed diets with DDE (McLane and Hall, 1972; Newton and Bogan, 1974; Mendenhall *et al.*, 1983).

The Eurasian Eagle owl is considered an abundant species in the study area (Martínez and Calvo, 2006), but population trends are under study due to the lack of information about the species from previous years (León *et al.*, 2008). For this reason the influence of eggshell thinning due to DDE should be taken into account and it should be considered that if 18% of eggshell thinning persists over a period of years, it may be associated to population declines (Blus, 2011).

No detrimental effects due to PBDEs are expected in our study because mean total PBDEs are very close to those found in the eggs laid by non-exposed American kestrels (Fernie *et al.*, 2008) and about 1000 folds lower than the lowest-observed-effect-level (LOEL=32 µg/g lw) for PBDEs in kestrels eggs (McKernan *et al.*, 2009). However, interactions with other environmental pollutants may occur and may potentially be responsible for detrimental health effects (Eriksson *et al.*, 2006).



#### **4. Assessment of exposure to anticoagulant rodenticides in Eurasian Eagle owls from Southeastern Spain**

In order to fulfil the objectives of this study, levels of the five most commonly used anticoagulant rodenticides (warfarin, chlorofacinone, bromadiolone, difenacoum and brodifacoum) were analysed in samples from Eagle owls from South-eastern Spain.

While none of these rodenticides were detected in blood samples, about 83% of the liver samples (n=18) presented residues of these compounds, with difenacoum and brodifacoum, followed by bromadiolone, being the most frequently detected (82%, 64% and 17%, respectively). Information regarding the use of rodenticides in the area is scarce. However these most common compounds figure among the highest number of products available on the market in Spain (MARM, 2011), which suggests a higher frequency of use. The fact that these compounds have not been detected in blood could be due to the fast transport to the liver, where they can persist up to a year (Erickson and Urban, 2004).

Levels related to toxic effects in owls have been reported between 100-200 ng/g (Newton *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1999), although concentrations as low as 10 ng/g of brodifacoum have been related to subcutaneous haemorrhage in Great horned owls (Stone *et al.*, 1999).

At necropsy, only one individual from our study presented haemorrhages. Although this owl also presented the highest levels of rodenticides (total=332.78 ng/g), the lesions are probable due to a shot, which caused its admission to the Rehabilitation Centre, and which was revealed by radiography. Levels above 100 ng/g were found in two other owls that died due to electrocution and traumatism.

It should be recalled that the impact of anticoagulant rodenticides must extend well beyond those cases in which acute lethal haemorrhage is the proximal cause of death (Stone *et al.*, 1999). In most cases death is the consequence of a chain of events or the association of several factors (Stone *et al.*, 2003). Sub-lethal haemorrhages may alter locomotion or cause lethargy, predisposing animals to predation, accidental trauma or reduced food intake (Stone *et al.*, 1999).



Electrocution and trauma were the main cause of admission of the owls studied. Because 72% of these individuals presented levels above 10 ng/g associated to subcutaneous haemorrhage (Stone *et al.*, 2003), we could suggest that these compounds could be involved in the cause of death.

##### **5. Study of serum biochemical parameters and the relation with levels of environmental pollutants in blood from Eagle owls.**

The study of serum biochemical parameters is an indirect method of evaluating the health status of the animals but can be useful as physiological indicators in wildlife and conservation programmes (de le Court *et al.*, 1995; van Wyk *et al.*, 1998). However a correct interpretation of results demands the availability of reference values for each species and, ideally, for different life stages, because these parameters may greatly differ due to these factors (Stout *et al.*, 2010). For example levels of AP, glucose, uric acid and inorganic phosphate are higher in growing animals than in adults (Hochleithner, 1989, 1994; Clubb *et al.*, 1991a, b, c; Jennings, 1996; Sonne *et al.*, 2010). In our study, most biochemical parameters presented higher levels in chicks than in adults, although the difference was only significant for AP ( $p<0.001$ ), inorganic phosphate ( $p<0.001$ ), triglycerides ( $p=0.002$ ) and uric acid ( $p=0.001$ ). In contrast, levels of  $\gamma$ -GT were significantly higher in adults.

Interference with enzymatic activities or cell damage caused by heavy metals or organochlorines may alter biochemical parameters (Dieter, 1974; Pattee *et al.*, 1981; Godwin, 2001; Kutlu *et al.*, 2007; Sonne *et al.*, 2008 a, b). Hence, the study of these parameters and the relation to metals and organochlorine insecticides may be useful to monitor exposure to environmental pollutants.

##### ***Correlations between serum biochemical parameters and levels of blood metals***

In our study some significant correlations were found between metals and biochemical parameters. This was the case of uric acid, whose levels increased with levels of cadmium in blood ( $Rho=0.173$ ,  $p=0.017$ ). Although an increase of uric acid above  $>20$  mg/dL in birds may be indicative of renal damage (Campbell, 1987) and about 13% of the samples exceeded this limit, the correlation in our samples is rather



weak and toxicity threshold limits for cadmium in blood of birds have not been established yet (Martínez-López *et al.*, 2005).

The fact that low dietary calcium availability may result in increased uptake and accumulation of non-essential metals like cadmium (Scheuhammer, 1996) may explain the negative correlation between both elements in our samples ( $Rho=-0.21$ ,  $p<0.01$ ). Nevertheless, calcium levels in our owls (mean=9.24 mg/dL) fall within the range found for adults and chicks of several raptor species, including Eagle owls (Kollias and McLeish, 1978; Ivins *et al.*, 1986; García-Rodríguez *et al.*, 1987; Jennings, 1996; Samour and D'Aloia, 1996; Altman *et al.*, 1997; Sonne *et al.*, 2010). Hence, this correlation may not be important from a clinical point of view.

Several biochemical parameters like AP, LDH, glucose, triglycerides, CK, albumin, total proteins, cholesterol and inorganic phosphate have been altered due to lead exposure in experimental studies (Hoffman *et al.*, 1981; Mateo *et al.*, 2003a). Although the lead levels that caused these effects were many times higher than in our study, some of these effects did also appear (Pb-albumin:  $Rho=0.2$ ,  $p=0.02$  and Pb-glucose:  $Rho=0.19$ ,  $p=0.02$ ).

### ***Correlations between serum biochemical parameters and levels of organochlorine insecticides in blood***

Exposure to organohalogen compounds in birds has been related to changes in certain biochemical parameters like CK, AST, ALT, LDH uric acid, triglycerides, albumin, total proteins, inorganic phosphate and calcium (Dieter, 1974, 1975; Dieter and Wiemeyer, 1978; Fox *et al.*, 2007; Sonne *et al.*, 2010). However, the relationships could be variable and increases or decreases of these endpoints may depend on the species, exposure route, feeding habits and the specific compound (Arnold *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1994; Sonne *et al.*, 2010).

In our study, the correlations between organochlorine insecticides and biochemical parameters were, in general, weak and negative. This was the case of AP activity and total proteins, which decreased with increasing levels of  $\Sigma$ total insecticides. Regarding AP, although the mechanism is unknown, the negative correlation with  $\Sigma$ total insecticides is similar to that found by Sonne *et al.* (2010) in chicks of three raptor



species. On the other hand, the correlation found in these species for total proteins was opposite to ours. However, Fox *et al.* (2007) found lower levels of proteins in gulls breeding in a polluted area than in an unpolluted one, which is similar to the results found by Greichus *et al.* (1975) after feeding pelicans with PCBs and diphenylaliphatics mixtures. Although a decrease in serum proteins could also be caused by chronic liver disease, chronic enteropathies, renal diseases, haemorrhages or malnutrition, the individuals from our study appeared to be healthy.

On the other hand, like the results found by Dieter (1974, 1975), Dieter and Wiemeyer (1978) and Sonne *et al.* (2010) in birds, certain enzymatic activities increased due to some insecticides ( $\Sigma$ HCH-ALT:  $Rho=0.751$ ,  $p=0.012$  Lindane-AST:  $Rho=0.156$ ,  $p=0.03$ ; heptachlor-epoxide-AST:  $Rho=0.185$ ,  $p=0.01$ ). Levels of these intracellular enzymes are usually low in serum but may increase due to severe liver damage (Hochleithner, 1994), which has been described after exposure to organohalogen compounds (Ettinger and Feldman, 1995; Thrall *et al.*, 2006).

The effects of organohalogen compounds on glucose and triglycerides levels have been demonstrated in several studies but the relations are sometimes contrary (Gorski and Rozman, 1987; Elliott *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2007; Karami-Mohajeri and Abdollahi 2010; Sonne *et al.* 2010). In our samples, both parameters significantly decreased with  $\Sigma$ HCHs levels ( $\Sigma$ HCHs-TGL:  $Rho=-0.203$ ,  $p=0.007$ ;  $\Sigma$ HCH- glucose:  $Rho=-0.189$ ,  $p=0.012$ ).

Levels of  $\gamma$ -GT are used as a biomarker for liver damage, although its utility in birds is unclear (Hochleithner, 1994). However, because this enzyme is involved in the metabolism of GSH conjugates to detoxify xenobiotics, levels of  $\gamma$ -GT would increase after exposure to contaminants (Lee and Jacobs, 2009). This positive correlation has been found in humans exposed to low levels of organochlorines (Lee and Jacobs, 2006). In our study, the relations are contradictory ( $\gamma$ -GT increased with endosulfan but decreased with DDE), probably because the levels of organochlorines were too low to cause alterations at this level.

Despite the organochlorine insecticide and metal levels in the chicks of Eagle owl from the population studied being low in general, we can suggest that levels of some





biochemical parameters, especially alkaline phosphatase, triglycerides, AST,  $\gamma$ -GT and total proteins could be useful to evaluate risks associated to organochlorine insecticide exposure, while uric acid and calcium and albumin and glucose could be used to evaluate exposure to cadmium and lead, respectively.