



Antonio Juan García Fernández, Profesor Titular y Responsable del Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense de la Universidad de Murcia, en respuesta a la demanda de investigación analítica y pericial solicitada por la Universidad de León sobre las muestras de buche e hígado de 28 palomas muertas por la supuesta ingestión de granos de cereal impregnados con sustancias anticoagulantes emite el siguiente

INFORME

Antecedentes

El día 21 de marzo de 2007, el Profesor Rafael Balaña Fouce de la Unidad de Toxicología de la Universidad de León se pone en contacto, vía telefónica, con el Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense de la Universidad de Murcia (STVF-UM), por poseer el reconocimiento de SOS-VENENO (dentro del Programa Antidoto) como laboratorio de referencia para recepcionar, analizar y realizar peritajes de animales y cebos presuntamente envenenados. El motivo del contacto es el de contrastar opiniones y colaborar en la investigación pericial del presente caso.

El día 23 de marzo de 2007 se recibió en el STVF-UM un embalaje procedente de la Universidad de León conteniendo ocho frascos bocales que contenían, a su vez, los respectivos contenidos de buche de ocho palomas muertas que fueron necropsiadas en la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de dicha Universidad.

El día 27 de marzo de 2007 se recibió un segundo embalaje conteniendo 38 bolsas de plástico que contenían, a su vez, individualmente 19 contenidos de buche y 19 muestras de hígado de palomas necropsiadas en la Universidad de León.

A ambos envíos le acompañaban copia de los siguientes documentos: Oficios de remisión de muestras emitidos por D^a María del Carmen Ferreras Estrada, Profesora

Titular de la Universidad de León, Actas de levantamiento de cadáveres animales de la Patrulla Seprona de la Guardia Civil de la Comandancia de Palencia, Oficios de remisión de muestras a la Universidad de León emitidos por la Patrulla Seprona de la Comandancia de Palencia y Mandamientos judiciales emitidos por el Juzgado de instrucción nº 3 de Palencia ordenando la necropsia de las palomas y el examen toxicológico de las mismas.

Las muestras fueron registradas en el Libro de Registro del STVF-UM con las entradas ST-25/07 a ST-52/07 y almacenadas en congelación a -40°C hasta su análisis.

Puestos en contacto, vía telefónica, con la Universidad de León nos adelantan información sobre las lesiones más comúnmente observadas en las palomas necropsiadas y que se resumen en: hemorragias musculares sobre todo en extremidades posteriores, hemorragias subcutáneas muy pronunciadas, hemorragias en cuello y cavidad abdominal, así como en serosas y en tejido pulmonar y cardíaco.

Metodología

Examen del contenido de los buches

De los contenidos de un número representativo de palomas se anotó el peso total obteniendo el valor medio de dicho peso. Se seleccionaron para ello las muestras que presentaban menor suciedad o restos que pudieran distorsionar el cálculo de pesada de los granos de cereales.

Previo al análisis de las muestras remitidas, los contenidos de buche, así como la mucosa del mismo cuando se remitió, fueron examinados bajo lupa binocular. Se cotejaron las observaciones de los contenidos de los buches con la "ceboteca" (muestrario de los cebos más comúnmente utilizados como rodenticidas) del STVF-UM.

Análisis químico-toxicológico

Con el fin de obtener suficiente volumen de muestra de contenido de buche se utilizó, para el análisis químico-toxicológico, el contenido de todos los buches, homogenizándolos y fraccionando posteriormente la mezcla en tres partes. La mitad de las muestras de hígado (9) fueron homogenizadas para su análisis.

Los procedimientos de extracción y purificación sobre las muestras se han realizado siguiendo la técnica descrita por Stahr (1991), la cual está diseñada específicamente para rodenticidas anticoagulantes. La detección por cromatografía en capa fina se ha realizado siguiendo la técnica citada más las descritas por Erdmann *et al.* (1990). Todas las cromatografías se han desarrollado sobre placas de Silicagel 60 fase normal con indicador F₂₅₄, y visualización bajo lámpara a 254 y 360 nm. Cada muestra fue desarrollada por cuadruplicado con las siguientes fases móviles: A) *n*-hexano/acetona 80:20 (v/v); B) tolueno/acetona 95:5 (v/v); C) cloroformo/acetona 50:50 (v/v); y D) tolueno/acetato de etilo/acetona 3/2/1. Los resultados analíticos de las muestras problemas se han cotejado con los obtenidos con patrones puros de los siguientes rodenticidas anticoagulantes: difenacoum, brodifacoum, warfarina, bromadiolona, difacinona y clorofacinona.

Resultados

Examen del contenido de los buches

Todas las muestras de contenido de buche examinadas constaban en su mayor parte, y en muchos casos de forma exclusiva, de granos de cebada con la superficie de color rosado a rojo pálido. Algunas de las muestras remitidas (cuatro) incluían parte del buche, observándose en la mucosa de todos ellos zonas amplias de hemorragia. El peso medio de granos de cebada por muestra fue de 7.14 gramos.

El cotejo de los granos de cebada con la "ceboteca", basado en el color y la forma de presentación, orientó desde el primer momento la posibilidad de tratarse de un

cebo con rodenticidas anticoagulantes y, con mayor probabilidad de tratarse de clorofacinona.

Análisis químico-toxicológico

El resultado analítico fue positivo a clorofacinona, tanto en el homogenizado de contenido de buches como en el de hígados.

Valoración y discusión de los resultados

La clorofacinona (2-[(p-clorofenil)fenilacetil] 1,3-indandiona) es un agente de uso común en el control de vertebrados, aplicado sobre una amplia variedad de plagas de roedores, así como topos y mamíferos insectívoros. Se presenta formulado en polvo, cebos con base de granos de cereales, gránulos, pellets o bloques parafinados. Los cebos se formulan habitualmente con una concentración de producto activo del 0.005%, pero en algunos casos también al 0.01% y hasta el 0.025% (EPA, 1998; Petterino y Paolo, 2001). La clorofacinona es normalmente usada para el control de roedores dentro y en los alrededores de edificaciones, áreas domésticas, tierras agrícolas no cultivadas, tierras no agrícolas, en el sector transporte, áreas industriales y zonas de manipulación, almacenado y procesado de alimentos, etc.

La presencia de granos de cebada en cantidades suficientes como para considerar repletos los buches de las 28 palomas objeto del estudio, así como el hecho de que estos granos presentaran su superficie de color rojo-rosada, característica de los cebos impregnados con clorofacinona, sugieren que la muerte de las palomas se produjo poco tiempo después de haber ingerido el cebo o alimento, sin tiempo suficiente para su digestión. Esta circunstancia (buche repleto de cebo) sugiere dos posibles causas que explicarían la muerte: *Hipótesis 1)* la ingestión de un producto de extremada toxicidad, de cinética muy rápida y de mecanismo de acción rápido e incompatible con la vida en pocos minutos; o *Hipótesis 2)* la ingestión durante varios días o semanas del cebo cuyo producto tóxico ejerce su acción de manera más lenta provocando la muerte días después y, dándose la circunstancia de una coincidencia en el tiempo entre la muerte y

la ingestión de la última comida, con independencia de que esa última ingesta fuera o no portadora de sustancia química tóxica.

Con respecto a la primera hipótesis de causa de muerte, ninguno de los productos que habitualmente se asocian a intoxicaciones o envenenamientos en los mencionados términos (carbamatos, estricnina, metaldehído, etc) cursa con un cuadro de hemorragias tan característico como el descrito en este caso en el apartado de antecedentes (información ofrecida por la Universidad de León tras la necropsia de las palomas). Los productos anteriormente citados, y otros de características toxicológicas similares suelen provocar cuadros nerviosos violentos y raras veces acompañados de hemorragias; y en caso de darse, no serían masivas. A ello se suma, nuestra observación directa de las amplias hemorragias que se apreciaban en las muestras de mucosa de buche de las palomas remitidas. Así pues la relación causa-efecto para estos productos no existiría y, por tanto, esta primera hipótesis carecería de credibilidad.

Con respecto a la segunda hipótesis, y siguiendo el mismo criterio que en la anterior, las lesiones descritas por la Universidad de León (hemorragias musculares en extremidades posteriores, subcutáneas muy pronunciadas, en cuello y cavidad abdominal, en serosas y en tejidos pulmonar y cardíaco) son compatibles con el mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes, con independencia de la especie a la que afecten. No obstante el estudio realizado por Ratvanyi *et al.* (1988) en cernicalos (*Falco sparverius*) cautivos expuestos experimentalmente a clorofacinona mostró lesiones muy similares. El principal mecanismo de acción de estos productos se basa en la inhibición de la enzima K_1 epóxido reductasa en los hepatocitos, tanto en aves como en mamíferos (Petterino y Paolo, 2001). La vitamina K tiene un importante papel en la activación de los factores hepáticos necesarios para la coagulación sanguínea. Estos factores vitamina-K-dependientes son de gran importancia en las vías metabólicas del sistema de coagulación; y entre ellos destacan el II (protrombina), VII (proconvertina), IX y X. La reacción que transforma los precursores proteicos inactivos en los factores de coagulación citados requiere de la participación de la forma hidroquinona de la vitamina K_1 o reducida. Una vez que se produce esta participación de la hidroquinona, ésta pasa a ser Vitamina K_1 2,3-epóxido (inactiva), la cual a través de la acción de la enzima epóxido reductasa transformará la vitamina inactiva a forma quinona y de ésta, por acción de vitamina K reductasa y DT diaforasa, a forma

hidroquinona nuevamente para cerrar así el ciclo de la vitamina K (Petterino y Paolo, 2001). Así pues, el mecanismo comentado anteriormente de inhibición de la enzima K₁ epóxido reductasa no hará otra cosa que impedir que haya suficiente vitamina K₁ en forma hidroquinona para generar la producción de los factores de coagulación. El resultado final será por tanto una coagulopatía cuya expresión clínica y lesional será de hemorragias internas asociadas a alteraciones de la permeabilidad capilar.

Una vez argumentada la relación causa-efecto entre rodenticidas anticoagulantes y las lesiones hemorrágicas observadas en las palomas, quedaría por explicar si, de estos rodenticidas, la clorofacinona es capaz de matar a las palomas, y de ser así, cuales serían las condiciones de exposición que permitirían tal situación.

La EPA (1998) ha clasificado a la clorofacinona como “moderadamente tóxica” (rango entre 51 y 500 mg/kg) para las aves, a partir del estudio realizado por Fletcher y Pedersen (1989a), que obtuvieron una dosis letal 50 (DL50) de 258 mg/kg de clorofacinona grado técnico (100% de pureza) sobre una especie de codorniz (*Colinus virginianus*). Es relevante tener en cuenta que los datos sobre clorofacinona en especies aviares son muy escasos y que la codorniz sería la especie más cercana a la paloma en cuanto hábito en el consumo de alimento. En este sentido el dato de DL50 genera pocas incertidumbres a la hora de extrapolarlo a las palomas. El ensayo realizado por estos autores fue de toxicidad oral aguda aviar, lo que significa que las codornices fueron tratadas con una dosis única al inicio del experimento y se mantuvieron bajo observación durante 30 días. Veintiocho de las 50 aves tratadas murieron durante los cinco primeros días del periodo de observación. Además de estos estudios existen datos de reevaluación del producto realizados en Canadá, en 1972, que cifran la DL50 para distintas especies de aves entre 100 y 430 mg/kg; en cualquier caso, dentro del mismo rango de sustancia “moderadamente tóxica” que utiliza la EPA. Estos datos tienen su interés en cuanto suponen que la variación inter-especie es baja y, por tanto, aportan mayor relevancia a la extrapolación de los datos a las palomas objeto de esta investigación.

Ahora bien, los datos comentados del estudio de Fletcher y Pedersen (1989a) se refieren como decíamos a *dosis única al inicio del experimento*, por lo que el día 5 (último día en el que aparecían animales muertos en sus experimentos) los contenidos

de los buches de los animales no deberían contener, bajo ninguna circunstancia, clorofacinona, con independencia de que presentaran comida o no. Esta observación contrasta radicalmente con el caso que nos ocupa, ya que recordemos que todas las palomas tenían cebada impregnada con clorofacinona en el buche en el momento de la muerte. Esto significa que la clorofacinona presente en el buche de las palomas el día de su muerte no sería la que produjo el cuadro hemorrágico fatal y, por tanto, lo único razonable es pensar que el consumo de cebada impregnada hubiera sido continuado durante varios días. En otras palabras, resulta lógico asumir un patrón de exposición (ingestión) subagudo o subcrónico de clorofacinona por parte de las palomas.

Por otro lado, la revisión de la EPA (1998) cita que el 90% de la clorofacinona ingerida de una sola vez se elimina en un 90% en dos días; mientras que los estudios subcrónicos (ingestión diaria de dosis bajas durante varias semanas) indican una potencial acumulación. En estas condiciones de subcronicidad se citan muertes del 100% de los animales en un periodo entre 29 y 82 días con dosis de clorofacinona de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. Estos datos de subcronicidad y potencial acumulación serían compatibles con la detección de clorofacinona en hígado como se ha podido comprobar en los análisis realizados a las palomas.

A la vista de lo comentado, es necesario basar el riesgo y la implicación de la clorofacinona en el proceso desde el punto de vista de un patrón de exposición subagudo o subcrónico. En este sentido los datos obtenidos por Fletcher y Pedersen (1989b) sobre *Colinus virginianus* y sobre ánade real (*Anas platyrhynchos*) expuestos diariamente durante 5 días a clorofacinona grado técnico (100% de pureza) ofrecen unas concentraciones letales 50 (CL50) de 56 y 172 ppm para ambas especies, respectivamente. Estas concentraciones, siguiendo el criterio de la EPA para estudios de toxicidad subaguda, clasificarían a la clorofacinona como "altamente tóxica" en contraposición a la clasificación de "moderadamente tóxica" que se asume para patrones de exposición aguda. Además, los estudios de Fletcher y Pedersen (1989b) demuestran que las codornices murieron dentro de los 9 días tras el inicio de la primera de las cinco dosis diarias experimentales.

Riesgo para especies no diana (aves y mamíferos)

Aunque no son muchos, existen algunos trabajos que abordan el problema de intoxicación secundaria causada por el consumo de rodenticidas anticoagulantes al ingerir presas contaminadas. Así por ejemplo se pueden citar los trabajos de Savarie *et al.* (1979) en águila real (*Aquila chrysaetos*), de Mendenhall y Pank (1980) en lechuzas (*Tyto alba*), el de Radvanyi *et al.* (1988) en cernícalo americano (*Falco sparverius*) o el de Merson *et al.* (1984) en búho chico (*Otus asio*).

En primer lugar es de destacar que la EPA (1998) recomienda, en relación a los peligros ambientales del uso de la clorofacinona, que todos los cebos que tengan como base un alimento (por ejemplo granos de cereales, como trigo o cebada), se etiqueten con la siguiente frase: "*Los mamíferos y aves predatoras y carroñeras pueden intoxicarse si se alimentan de animales que se han intoxicado por este producto*". Así pues, la EPA considera que el riesgo de intoxicaciones secundarias (intoxicación de animales no diana del uso del producto) cuando se usan rodenticidas anticoagulantes, sobre todo en áreas rurales, existe y que, en el caso concreto de la clorofacinona, este riesgo debe asumirse en predadores aviares y mamíferos.

A pesar de lo comentado, existen algunas diferencias en este sentido entre los dos grupos más importantes de rodenticidas anticoagulantes: los rodenticidas de segunda generación derivados de la cumarina y los derivados de la indandiona. Los anticoagulantes derivados de la indandiona (clorofacinona y difacinona) tienden a ser menos tóxicos para las aves, menos persistentes en los tejidos de los consumidores primarios (roedores, topes, conejos, palomas, etc) y es necesario que se consuman durante varios días para llegar a ser letales, tal y como argumentábamos en el apartado anterior. En otras palabras, un predador que se alimente una sola vez de un cadáver puede no morir si el rodenticida que mató a la presa fue uno de estos derivados de indandiona (EPA, 1998). Ahora bien, hecha esta salvedad sobre la menor toxicidad relativa de la clorofacinona (para víctimas de intoxicación secundaria) con respecto a otros compuestos con el mismo mecanismo de acción, no es razón suficiente para considerarla exenta de riesgo por sí misma. Es más, las condiciones de subcronicidad que se han argumentado pudieron darse en el proceso padecido por las palomas apuntan

a un mayor riesgo para los predadores al consumir con mayor frecuencia y durante más tiempo presas probablemente contaminadas.

Riesgos para la salud humana

En el ser humano, las vías de absorción serían las mismas que para las especies diana y las aves y mamíferos no diana. Sobre la dosis de riesgo no existe información publicada, pero se asume que, dada la baja concentración de producto tóxico en los cebos y la naturaleza de los efectos tóxicos, sería preciso ingerir elevadas cantidades de cebo (hasta 1 kg) para producir los efectos tóxicos. Sin embargo, las personas con historia de problemas de coagulación deberían evitar su contacto (EPA, 1998). Por otro lado, y concretando en el caso que nos ocupa, ha de tenerse presente que la potencial acumulación descrita en el primer apartado de esta discusión, podría dar como consecuencia, en caso de consumo de varias palomas, a una ingesta que podría entrañar riesgos para la salud humana aún incluso en individuos sanos y, especialmente, en niños. No existe información a este respecto, pero, precisamente por tal motivo, el principio de cautela en materia de seguridad alimentaria aconsejaría el evitar el consumo de las palomas mientras exista el riesgo de ingestión de cebo por parte de estas. Asimismo es aconsejable extender esta cautela a cualquier otra especie susceptible de ser consumida por el ser humano y que tuviera hábitos de consumo de alimento que incluyeran los granos de cereales.

Conclusiones

A tenor de la información disponible para la realización de esta investigación, los resultados obtenidos y la discusión y valoración de los mismos, se concluye que:

1. Es altamente probable que la ingestión de clorofacinona por parte de las palomas siguiera un patrón de exposición oral subagudo o subcrónico que explicaría las lesiones y la muerte de las mismas.
2. El riesgo de intoxicación secundaria para especies no diana debe ser tenido en consideración, con especial atención a las de hábitos predadores y carroñeros.

3. El riesgo de intoxicación secundaria en el ser humano, siendo menos probable, no debe ser infravalorado a tenor de la escasa información disponible, en cualquier caso ha de tenerse en cuenta el grupo de riesgo de individuos con patologías de la coagulación.

Es cuanto puedo informar, en Murcia, a 10 de mayo de 2007.

SERVICIO DE TOXICOLOGIA Y VETERINARIA FORENSE
STVF-UM
UNIVERSIDAD DE MURCIA
Antonio Juan García Fernández
FACULTAD DE VETERINARIA



Anexo de Referencias

- EPA (1998). R.E.D. (Reregistration Eligibility Decision). Rodenticide Cluster. EPA738-R-98-007.
- Erdmann, F., Borse, C., Schültz, H. (1990). A TLC screening program for 170 commonly used pesticides using the corrected R_f value (R_f^c value). *International Journal of Legal Medicine* 104: 25-31.
- Fletcher, D., Pedersen, C. (1989a). Chlorophacinone: 30-Day Acute Oral LD50 Study in Bobwhite Quail: Lab Project No: 87 QD 106. Unpublished study prepared by Bio-Life Associates, Ltd. 42 p.
- Fletcher, D., Pedersen, C. (1989b). Chlorophacinone: 30-Day Acute Dietary LC50 Study in Bobwhite Quail and Mallard: Lab Project No: 87 QC 105. Unpublished study prepared by Bio-Life Associates, Ltd. 41 p.
- Mendenhall, V.M., Pank, L.F. (1980) Secondary poisoning of owls by anticoagulant rodenticides. *Wildlife Society Bulletin* 8(4):311-315
- Merson, M.H., Byers, R.E., Kaukeinen, D.E. (1984) Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. *Journal of Wildlife Management* 48(I):213-216
- Petterino, C., Paolo, B. (2001). Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Veterinary and Human Toxicology*, 43(6): 353-360.
- Radvanyi, A., Weaver, P., Massari, C., Birdt, D., Broughton, E. (1988). Effects of chlorophacinone on Captive Kestrels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41:441-448
- Savarie, P.J., Hayes, D.J., McBrice, R.T., Roberts, J.D. (1979) Efficiency and safety of diphacinone as a pesticide. In: E.E. Kenga (ed) Avian and mammalian wildlife toxicology. *American Society for Testing and Materials. Special Technical Publication* 693. pp 69-79
- Stahr, H.M. (1991). Anticoagulant rodenticides in liver, blood and feed: thin-layer chromatography and spectrofluorophotometry. In *Analytical Methods in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.