



Manaaki Whenua
Landcare Research

Restauración ecológica de la Isla Floreana: Plan de monitoreo de pesticidas para el rodenticida brodifacoum

Elaborado para: Island Conservation

Noviembre 2017



Restauración ecológica de la Isla Floreana: Plan de monitoreo de pesticidas para el rodenticida brodifacoum

Reporte por contrato: LC3059

Penny Fisher

Manaaki Whenua – Landcare Research

Revisado por:

Lynn Booth

Gerente, Laboratorio de Toxicología

Manaaki Whenua – Landcare Research

Aprobado para entrega por:

Chris Jones

Líder de Portafolio – Manejo de Especies Invasoras

Manaaki Whenua – Landcare Research

Exclusión de Responsabilidad

Este informe fue elaborado por Manaaki Whenua – LandCare Research para Island Conservation. Si es utilizado por otras partes, no se ofrece ninguna garantía ni representación sobre su exactitud y no se acepta ninguna responsabilidad por alguna pérdida o daño que surja directa o indirectamente por depender de la información que contiene.

Contenidos

- Resumen ejecutivo v
- 1 Antecedentes..... 1
 - 1.1 Descripción del sitio: Floreana1
 - 1.2 Erradicación planeada de roedores de Floreana.....1
- 2 Introducción..... 2
- 3 Alcance y objetivos 3
- 4 Estrategia y métodos de muestreo..... 4
 - 4.1 Agua4
 - 4.2 Suelo.....4
 - 4.3 Alimentos humanos producidos por animales.....5
 - 4.4 Fauna silvestre10
 - 4.5 Monitoreo del cebo.....11
- 5 Análisis de laboratorio 11
- 6 Recomendaciones..... 12
- 7 Referencias 12
- Anexo 1 – Etiquetas de muestras 14
- Anexo 2 Formulario de la cadena de custodia..... 15
- Anexo 3 Alcance y términos de referencia para el análisis químico en laboratorio de las muestras para detectar brodifacoum..... 17
- Anexo 4 Resumen de tipos de muestras e intervalos de muestreo propuestos para el monitoreo de brodifacoum residual en Floreana..... 19

Resumen ejecutivo

Las ratas negras y los ratones comunes están incluidos dentro de un programa para erradicar los mamíferos invasores de la Isla Floreana, en las Islas Galápagos. La aplicación de cebo hecho de cereales comprimidos que contienen el rodenticida anticoagulante brodifacoum es uno de los métodos propuestos para eliminar los roedores de la isla. El cebo será aplicado vía aérea en grandes extensiones de la isla y, en áreas seleccionadas alrededor de las viviendas humanas y las fuentes de agua, en estaciones de cebo sobre la tierra.

La aplicación a amplia escala del cebo pesticida en el ambiente plantea interrogantes obvias sobre la posibilidad que se contamine el agua y el suelo, y haya una exposición de la fauna silvestre no objetivo, las personas y sus animales domésticos y ganado. Estas interrogantes podrán abordarse parcialmente monitoreándose el medio ambiente (con análisis químico de muestras) después de aplicar el cebo tóxico, para determinar la presencia de concentraciones residuales del tóxico o si este no se detecta en áreas específicas del medio ambiente.

Este documento propone un plan de monitoreo para brodifacoum, basado en la información disponible sobre las propiedades fisicoquímicas de esta sustancia, sus mecanismos de metabolización y degradación. Para algunos escenarios, se han hecho suposiciones sobre cómo podría trasladarse y degradarse la sustancia en los ambientes de Floreana. Brodifacoum ha sido utilizado previamente en erradicaciones exitosas de roedores en islas, de modo que también existen datos para orientar el plan de monitoreo para Floreana.

No se propone ningún monitoreo del agua para detectar algún residuo de brodifacoum, porque la aplicación manual del cebo en las áreas de exclusión alrededor de los sistemas de agua potable y las fuentes internas de agua reduce significativamente el potencial del ingreso de cebo directamente al agua. Si algún cebo ingresara a una fuente de agua y se desintegrara, liberando el brodifacoum, esto sería una cantidad muy pequeña con relación al volumen de agua. En combinación con la muy baja solubilidad del brodifacoum en agua, es muy improbable que haya concentraciones detectables del brodifacoum en el agua bajo este escenario.

No se propone ningún monitoreo del suelo para detectar algún residuo de brodifacoum porque se prevé que habrá un alto consumo de cebo por los roedores y las especies de fauna silvestre no-objetivo dentro de la primera semana de su aplicación. Esto significa que muy pocos cebos permanecerán sin ser consumidos durante un periodo prolongado como para degradarse bajo condiciones de humedad que permitan que el brodifacoum entre en contacto con el suelo. Si esto ocurriera, se supone que cualquier concentración residual de brodifacoum en el suelo sería extremadamente localizada y en muy bajas concentraciones.

Sí se propone un monitoreo de los huevos, leche y carne producidos por los animales de producción de Floreana, para implementar un modelo de vigilancia que permita evaluar que el confinamiento del ganado como medida para mitigación de riesgo, es una medida efectiva para prevenir la exposición secundaria de seres humanos a algún residuo de brodifacoum.

Se propone hacer monitoreo de las lagartijas de lava en los seis meses siguientes a la aplicación aérea del cebo para indicar el riesgo secundario que estas presenten para el búho de orejas cortas (*Asio flammeus galapagoensis*) y otros predadores, y para comparar los niveles de residuos en las lagartijas de Floreana con las mediciones realizadas después de aplicar el cebo con brodifacoum en las islas Pinzón y Rábida. Se propone igualmente el análisis de los invertebrados recolectados como alimentos para la fauna silvestre en cautiverio para asegurar que no se facilite la exposición secundaria accidental dentro de una acción para mitigar los riesgos. Los datos de estas pruebas también ayudarán a abordar las brechas de información sobre la transferencia de residuos de brodifacoum a diferentes especies de invertebrados en Floreana.

Se hará el monitoreo de animales marino-costeros colectados en Floreana para consumo humano (es decir, peces, pulpos, canchalaguas). Los pescadores locales tomarán las muestras para obtener las especies normalmente pescadas, usando sus métodos y lugares de pesca rutinarios. Se tomarán muestras antes de aplicar el cebo (línea de base) y luego a intervalos hasta 10 semanas posterior a la última aplicación del cebo con brodifacoum. El análisis de estas muestras para detectar brodifacoum permitirá determinar cuándo se podrá volver a reanudar la pesca de las especies marino-costeras para consumo humano sin potencial de exposición secundaria, o, si se detectan residuos, para determinar la continuación del muestreo y análisis hasta que los resultados indiquen 'no se detecta nada' en dos intervalos consecutivos de muestreo.

La ejecución de este plan para lograr datos oportunos y válidos sobre el monitoreo dependerá de la disponibilidad de instalaciones idóneas en Floreana para mantener las muestras congeladas para su almacenamiento y transporte, y el establecimiento de la capacidad analítica química, idealmente dentro de Galápagos.

1 Antecedentes

1.1 Descripción del sitio: Floreana

Ubicada en el archipiélago de Galápagos, la Isla Floreana es la cuarta isla más grande de las cinco habitadas y la sexta más grande dentro del Archipiélago. La isla tiene 17.253 ha, con una elevación máxima de 640 m.s.n.m. en el Cerro Pajas. Hay dos tipos de hábitat en general: baja, seca y árida (12.654 ha), y una parte central alta más húmeda (4.599 ha).

Floreana experimenta una variabilidad climática leve, con una temporada seca con poca o ninguna lluvia desde octubre hasta mediados de enero y una temporada húmeda y cálida desde mediados de enero hasta junio, con un clima casi tropical de lluvia diaria y nubosidad más consistente. También hay una época de garúa desde julio hasta septiembre, con un aire marino denso, nubosidad más consistente y común presencia de niebla, que es especialmente espesa en las partes altas. Las temperaturas del aire van desde los 21°C hasta 30°C, mientras la temperatura del mar permanece entre 21°C y 25°C. Es de esperar una transición climática hacia lluvias frecuentes y fuertes durante los eventos de El Niño, mientras que las condiciones áridas y la sequía se presentan durante los eventos de La Niña. La isla tiene múltiples lagunas y estanques, con tres fuentes de agua potable de manantiales en la parte alta.

Aproximadamente 160 personas residen en la Isla Floreana, el 60% de ellas adultas. El flujo turístico acrecienta grandemente la población de la Isla: en el 2013, se calculó que un promedio de 1.800 turistas ingresó mensualmente a la isla, y la quinta parte pernoctaron allí. La comunidad de Floreana depende del turismo, la agricultura y un poco de la pesca para el consumo local. Las viviendas humanas en Floreana se ubican principalmente en una zona urbana de 38,6 ha en la población de Puerto Velasco Ibarra, con la agricultura ocurriendo en la zona rural a mayor altura. Los animales criados para alimentación humana incluyen vacas, cerdos y gallinas. Los animales domésticos y de compañía incluyen perros, gatos, caballos y burros. Las especies marino-costeras más comúnmente colectadas para alimento humano son langostas (tres especies), canchalaguas y pulpos. También se cosechan especies de peces pequeños como lisa y arenque en las áreas costeras, para usarlas como carnada.

La isla alberga muchas especies únicas de fauna silvestre, algunas endémicas de la isla, como el pinzón mediano de árbol, y otras endémicas del Archipiélago, como el petrel de Galápagos, cuya colonia más grande se reproduce en Floreana. Una serie de especies invasoras amenazan a las plantas y animales nativos mediante su depredación y competencia por los recursos. El Cucuve de Floreana, en Peligro Crítico de Extinción, ya no puede reproducirse en la Isla Floreana por los gatos ferales y ratas invasoras, y está restringido actualmente a dos pequeños islotes cercanos, Champion y Gardner.

1.2 Erradicación de roedores de Floreana planificada

Se propone erradicar los roedores invasores (rata negra *Rattus rattus* y ratón común *Mus musculus*) de Floreana mediante la aplicación en toda la isla de un cebo que contiene el rodenticida anticoagulante, brodifacoum. El cebo (Conservation 25D, producido por la Bell Laboratories Inc.) es en forma de un comprimido de cereales que contienen 25 ppm de brodifacoum, y cada uno pesa aproximadamente 1g. Los comprimidos contienen un colorante azul que brinda una apariencia distintiva a los cebos tóxicos, y este colorante también puede actuar como marcador de ingesta del cebo porque puede ser visible en el contenido intestinal y las heces.

Como se describe en el plan operativo (Island Conservation 2016), se harán dos diferentes aplicaciones en toda la isla para aplicar suficiente cebo sobre cada territorio potencial de roedores en la isla. Una

tercera aplicación se enfocará en las áreas consideradas como de riesgo alto de albergar a los roedores sobrevivientes. El cebo se aplicará sobre el área terrestre mediante tres métodos de dispersión: dispersión aérea, dispersión manual, y estaciones de cebo para roedores. Por el tamaño de Floreana, la topografía accidentada y las áreas inaccesibles, la mayoría del cebo se aplicará desde el aire, usando un balde dispersor suspendido debajo de un helicóptero.

La dispersión manual se utilizará para tratar las áreas inalcanzables por dispersión aérea, y en las zonas de exclusión específicas que requieren más exactitud en la aplicación del cebo de la que sería posible con la aplicación aérea. La distribución manual del cebo se utilizará en lugares específicos, incluyendo alrededor de los estanques de agua dulce, los corrales de contención de especies para mitigación, dentro de las estructuras abandonadas, debajo de techos exteriores y mediaguas, dentro de cavernas conocidas, en sitios comensales de alto riesgo, y otras áreas donde es crucial la precisión al colocar el cebo. Algunas áreas pequeñas y sensibles (como estanques, las dos fuentes de agua dulce, y los corrales con especies no objetivo en cautiverio) serán cubiertas y la aplicación será por dispersión aérea para reducir la complejidad de la aplicación de cebo. Durante las inspecciones de seguimiento, se eliminará cualquier cebo hallado accidentalmente en el agua dulce o en los encierros y corrales de mitigación.

2 Introducción

El brodifacoum es un compuesto sintético desarrollado en los años 1970 y ahora se comercializa ampliamente en todo el mundo como el agente activo en productos de venta libre para control de roedores comensales como la rata noruega, la rata (negra) de tejados, y el ratón común (en alcantarillas, vehículos de carga, y alrededor de casas y otras edificaciones agrarias). La acción tóxica del brodifacoum inhibe la síntesis de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K en el hígado de los animales (Hadler y Shadbolt 1975). Si se recibe una dosis suficiente de brodifacoum, el tiempo de coagulación se alarga hasta que no se presenta coagulación. En este estado, los animales no pueden impedir el flujo de sangre durante la reparación normal de sus tejidos, y pueden morir de hemorragia interna o externa.

El brodifacoum es un anticoagulante de segunda generación y es altamente eficaz contra ratas y ratones, incluyendo las genéticamente resistentes a los anticoagulantes de primera generación como la Warfarina. La mayor potencia de los anticoagulantes de segunda generación como brodifacoum a comparación de los de primera generación (como Warfarina y difacinona) se debe a su afinidad vinculante a nivel hepático. Los anticoagulantes comparten un sitio vinculante común en el hígado, pero los de segunda generación tienen una mayor afinidad vinculante que los de primera generación (Parmar et al. 1987). Además, a diferencia de los anticoagulantes de primera generación, los de segunda generación podrían matar a los roedores luego de una sola ingesta de cebo. Por eso, se considera menos probable que las especies objetivo adquieran menor timidez a consumir el cebo con brodifacoum, a comparación de los cebos con tóxicos de acción más inmediata (Morgan 1996).

Un pesticida para vertebrados efectivo requiere que presente una alta toxicidad en las especies objetivo para ser eficaz. Sin embargo, el brodifacoum es de amplio espectro, lo que plantea un peligro indeseable para las especies no-objetivo que ingieran el cebo (exposición primaria) o que ingieran los tejidos de animales que contengan brodifacoum (exposición secundaria). Una proporción del brodifacoum ingerido se vincula fuertemente en el tejido hepático de mamíferos y aves, eliminándose muy lentamente. Las concentraciones residuales pueden persistir durante meses en los hígados de animales luego de su exposición subletal al brodifacoum (Erickson y Urban 2002). En contraste, se

elimina el brodifacoum de la sangre y el tejido muscular de animales vivos más rápidamente, usualmente en pocos días.

El brodifacoum presenta un riesgo relativamente alto de envenenamiento secundario a comparación de otros rodenticidas (Erickson y Urban 2002). Los tejidos de roedores envenenados –en particular el hígado o cebo parcialmente digerido en el intestino– podrá transferir brodifacoum a las especies depredadoras o carroñeras no objetivo. Los invertebrados también podrán transferir residuos de brodifacoum a insectívoros (Dowding et al. 2006).

El brodifacoum ya se usa en Floreana para el control continuo de roedores en forma de bloques parafinados de Klerat (50 ppm brodifacoum) en estaciones de cebo. El cebo se aplica todo el año en y alrededor de las viviendas y demás estructuras, y también en las fincas para proteger los cultivos. De abril a diciembre, también se aplica el cebo alrededor de las colonias de petreles para proteger los huevos y pichones de la depredación por ratas. Como resultado, es posible que existan ya residuos de brodifacoum como ‘línea de base’ en el medio ambiente de Floreana.

La aplicación de cebo pesticida a escala amplia (toda la isla) en todo un ambiente plantea interrogantes obvios sobre el potencial de exposición o contaminación del agua, suelo, la fauna silvestre no objetivo, las personas y sus animales domésticos y ganado. Las propiedades físicas y químicas de una sustancia son consideraciones importantes para su comportamiento, movilización, degradación o persistencia en los ambientes naturales. Para un compuesto aplicado en ambientes naturales como pesticida en un cebo formulado, su metabolismo y excreción por los animales que lo consuman también son consideraciones importantes, al evaluar el potencial de que el compuesto o sus productos sean transferidos por las redes tróficas. Las siguientes secciones resumen los conocimientos actuales sobre el destino del brodifacoum en diferentes partes del ambiente (en el agua, suelo y animales), con una estrategia propuesta de monitoreo para cada compartimiento ambiental.

3 Alcance y objetivos

Este plan de monitoreo se vincula con otros documentos que cubren los diferentes aspectos de la erradicación de mamíferos invasores propuesta para Floreana, incluyendo la evaluación de riesgos para las especies no-objetivo de fauna silvestre (Fisher et al. 2017b), la evaluación de riesgos para humanos, animales domésticos y ganado (Fisher et al. 2017a), y planes de manejo para los perros y gatos domésticos (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017a) y para los animales productores de alimentos (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b).

El propósito de este documento es describir la base lógica y estrategia que sostienen un plan para el monitoreo de los residuos de brodifacoum en varias partes del ambiente de Floreana, luego de la aplicación del cebo que contiene brodifacoum.

Los objetivos son:

- dar insumos para el cronograma de ejecución y la duración de las medidas para mitigación de riesgos en Floreana mediante el monitoreo de muestras ambientales o biológicas para detectar el brodifacoum
- describir cuáles tipos de muestras ambientales serán más apropiados para hacer análisis para detectar residuos de brodifacoum, antes y después de la aplicación del cebo en Floreana
- describir la metodología para obtener, almacenar, y analizar químicamente las muestras.

4 Estrategia y métodos de muestreo

4.1 Agua

No se recomienda el monitoreo del agua potable para determinar la presencia de brodifacoum, por varias razones. Primero, hay confianza de poder excluir los cebos con brodifacoum de ingresar a las fuentes de agua potable, al establecer zonas de amortiguamiento alrededor de los sistemas de redes de agua. Ahí no se aplicará el cebo aéreamente, sino a mano o en estaciones de cebo. El brodifacoum es relativamente insoluble en agua (<10 mg/L de agua a un pH de 7, US EPA 1998), de modo que, aunque un cebo entrara de alguna manera a la red de agua potable de Floreana, no se disolvería él brodifacoum. En este caso, se prevé que el cebo absorbería agua, se ablandaría, para luego desintegrarse en unas 24 horas, con el brodifacoum manteniéndose unido con las partículas orgánicas del cebo. El uso de filtros (por ejemplo, de carbón activado) para el agua potable se prevé eliminaría tales partículas.

Sería indicado el monitoreo de muestras de agua potable después de la aplicación del cebo únicamente si hubiera suficiente preocupación por parte de la comunidad de que las medidas de mitigación de riesgo no fueran eficaces para evitar la contaminación del agua potable. Se haría tal monitoreo para dar seguridad de que la red de agua potable en Floreana no contenga concentraciones detectables de brodifacoum, siendo muy baja la expectativa de que esto ocurra. De requerirse, se deberían tomar muestras de 500 mL de agua de cada línea de suministro de agua dulce, en el punto de entrega a la población. Las muestras deben colocarse en recipientes opacos de plástico con tapas rosca, idóneos para almacenarse congelados. Las muestras deben tomarse entre 24 y 48 horas después de terminar cada aplicación aérea en el área de captación de agua y retenerse en almacenamiento, congeladas hasta su análisis.

Si un cebo entrara a un estanque o laguna en Floreana (que no sea utilizado para agua potable humana o de animales) durante su aplicación aérea, se prevé que su formulación de cereal absorbería agua, se ablandaría, para luego desintegrarse en 24 horas. Así, cualquier cantidad de brodifacoum que entrara al agua como resultado de la operación de aplicación del cebo sería relativamente mínima a comparación del volumen de agua, y es improbable que alcance concentraciones detectables en la solución (es decir que no serían detectables en muestras de agua tomadas de la superficie). Esto está respaldado por monitoreos previos realizados en fuentes de agua en otras situaciones después de la aplicación aérea de cebos comprimidos con brodifacoum, donde no se encontró concentraciones detectable en las muestras de agua. En un ejemplo, se tomaron 217 muestras de agua de las quebradas que fluyen a través de una zona de aplicación de cebo en Maungatautari (Nueva Zelanda) a intervalos de hasta 72 horas después de aplicar el cebo, sin que se detectara brodifacoum (Fisher et al. 2011).

4.2 Suelo

No se recomienda el monitoreo del suelo para brodifacoum, por varias razones. Se prevé que una proporción alta (>90%) de los comprimidos de cebo aplicados por dispersion serán consumidos en pocos días, principalmente por roedores objetivo y, en menor grado, por algunos animales no objetivo. Se prevé que aplicar los cebos en estaciones de cebo impida que los cebos hagan contacto con el suelo. Si no son consumidos, los comprimidos de cebo se degradarán naturalmente con el tiempo. El tiempo que requiere el cebo para degradarse se relaciona con las condiciones ambientales (por ejemplo, la precipitación) y la actividad bacteriana y de invertebrados. En los ensayos de campo, Jolley (2012) usó parcelas de exclusión para estimar las tasas de disponibilidad del cebo en la parte baja y alta de Floreana. En la parte baja, el tiempo mínimo para la degradación completa o eliminación por

invertebrados fue de 14 días, pero en algunas parcelas permanecieron cebos parcialmente degradados incluso hasta 63 días después de su colocación. En la parte alta, se degradaron completamente los cebos en algunas parcelas en 8 a 9 días, con un máximo de 14–21 días. Un ritmo más rápido de degradación de los comprimidos de cebo en la parte alta probablemente fue por los mayores niveles de humedad ambiental a comparación de los sitios en la parte baja. En general, se prevé que cantidades relativamente mínimas de brodifacoum entrarían en contacto con el suelo, y esto solo sería únicamente en lugares muy localizados, como resultado de cebos no consumidos degradándose con el tiempo.

De ocurrir así, no se prevé que el brodifacoum se lixivie muy profundamente en el suelo. El brodifacoum probablemente se adsorbe a las partículas del suelo (Organización Mundial de la Salud 1995), y brodifacoum y sus residuos demostraron ser relativamente inmóviles durante 30 días en columnas de arena, arcilla arenosa, arcilla con limo, o suelo arcilloso de Gran Bretaña que recibieron una solución de 50 cm de cloruro de calcio para lixiviación. Después de 30 días, el brodifacoum permaneció esencialmente intacto en el suelo (US EPA 1998). En estudios no publicados, menos del 2% del brodifacoum agregado al suelo se lixivió más de 2 cm en los cuatro tipos de suelo estudiados (Eason y Wickstrom 2001). Brodifacoum tuvo una vida media estimada de 157 días en arena arcillosa, incubada a oscuras a 21°C y 75% de 0.33 bar de su capacidad de humedad (US EPA 1998), mientras datos no publicados indicaron que la media vida en el suelo varía de 12 a 25 semanas, dependiendo del tipo del suelo. Como la mayor parte del brodifacoum liberado de los cebos en el suelo se ligará con el suelo cuando éstos se desintegren, el brodifacoum solo podría llegar al agua por la erosión del suelo después de la aplicación de los cebos.

El monitoreo en otras situaciones indica que ocurrirán concentraciones relativamente bajas de brodifacoum en el suelo debajo de cebos degradados. A continuación, daremos unos breves detalles, pero en general las concentraciones medidas en el suelo han sido de 0.03 a 0.9 ppm. A comparación, los comprimidos de cebo contienen 25 ppm de brodifacoum, de modo que los residuos medidos en el suelo han estado entre aproximadamente 28 y 830 veces menores a las concentraciones del cebo. En un estudio en Nueva Zelanda, se midió el brodifacoum en un 69% de las muestras (Craddock 2003), con la concentración más alta de 0.2 ppm al día 84. Después de 110 días, todas las concentraciones en el suelo estuvieron inferiores al límite de detección. Un monitoreo después de la aplicación aérea del cebo en la Isla Little Barrier (Nueva Zelanda) encontró que el suelo, debajo de comprimidos en terreno con pastos, tenía residuos de 0.2 ppm al día 56 y 0.03 ppm al día 153. El suelo tomado de debajo de los cebos en el bosque tenía residuos de 0.9 ppm al día 56 y 0.07 ppm al día 153 (Fisher et al. 2011). En un monitoreo similar en las islas de Ipipiri (Nueva Zelanda), las muestras tomadas del suelo debajo de comprimidos de cebo bien degradados tuvieron concentraciones de brodifacoum de 0.0012 a 0.009 ppm (datos inéditos, Departamento de Conservación, Nueva Zelanda). El monitoreo del suelo en el Atolón Palmyra (en el Océano Pacífico) tomó muestras antes de aplicar el cebo y a los 11 días después de la aplicación de cebo con brodifacoum, continuando las muestras durante 11 semanas (Pitt et al. 2015). Dos de las siete muestras del suelo (28.5%) tomadas antes de la aplicación, y siete de las 21 muestras del suelo (33.3%) tomadas después, contenían residuos de brodifacoum detectables. El mayor residuo detectado en el suelo después de la aplicación del cebo fue de 0.056 ppm. Entre todas las muestras posteriores a aplicar el cebo, nueve de cuatro lugares tenían residuos detectables de brodifacoum, con concentraciones en promedio de 0.007 a 0.018 ppm (Pitt et al. 2015).

4.3 Alimentos humanos producidos por animales

El plan de mitigación de riesgos para el ganado en Floreana que incluye gallinas, cerdos y vacas mantenidos en Floreana para producir alimentos (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b) especifica su confinamiento en corrales construidos con ese propósito como medio para evitar la exposición primaria al cebo de brodifacoum. El ganado vacuno podrá regresar a pastizales cercados

cuando el cebo ya no esté disponible en el ambiente, el cual se determinará en base a los resultados de las parcelas de monitoreo del cebo. Para las gallinas y los cerdos, hay potencial de exposición secundaria si comen los restos de los animales o invertebrados envenenados que contengan brodifacoum residual. El monitoreo de residuos en pollos y cerdos centinelas que se mantengan sueltos para forrajear en corrales exteriores permitirá informar cuándo se podrá permitir que pollos y cerdos destinados al consumo humano estén en estos corrales sin peligro de su exposición secundaria. Se tomarán muestras de leche de las vacas, huevos de las gallinas y carne de los cerdos, pollos y vacas en las fincas donde se produce, a medida que sean disponibles para abastecer la demanda local.

Por el uso previo y continuo del brodifacoum en Floreana, se deberán tomar muestras para análisis en los 12 meses antes de la aplicación aérea del cebo, porque pueden existir residuos en algunas partes del medio ambiente como línea base.

Cuando comience la aplicación del cebo, deberán tomarse muestras de la leche, los huevos y la carne de los pollos en forma semanal. Después de terminar la última aplicación aérea del cebo, deben tomarse muestras a las 1, 2, 4, 6 y 10 semanas. Muestras de cerdos y ganado bovino deben tomarse cuando estos sean faenados para el consumo humano durante su procesamiento, continuándose el muestreo hasta que se hayan faenado cinco cerdos y dos reses después de la última aplicación aérea del cebo. Aunque no se analicen todas las muestras recolectadas, es prudente tomar muestras en una gama de intervalos posteriores a la aplicación, y tenerlos en almacenamiento en caso de requerir una certeza adicional para confirmar que no hubo residuos detectables en los alimentos producidos por animales para el consumo humano.

Todas las muestras de animales (cuerpos enteros o tejidos) deben empaquetarse en bolsas “ziplock” de plástico grueso o recipientes plásticos robustos y que resisten el congelamiento, con tapas rosca que no permitan fugas. Cada muestra debe estar al menos en doble funda, con la bolsa *ziplock* exterior etiquetada con marcador permanente, con la fecha, el lugar de muestreo (idealmente con sus coordenadas GPS, o con una descripción del sitio o la finca), el peso en el momento del muestro, y el nombre de la especie y el tipo de tejido (por ejemplo, hígado de pollo). Además, otra etiqueta con la misma información debe anotarse en un rótulo plástico flexible o en papel impermeable, usando un marcador indeleble a prueba del agua. Este rótulo adicional debe colocarse entre la primera funda / recipiente y la segunda funda *ziplock* exterior que protege la muestra.

Una vez empaquetadas, las muestras deben congelarse lo antes posible hasta, al menos, -4°C e idealmente -20°C , y transportarse congeladas hasta el laboratorio de destino.

4.3.1 Gallinas y Pollos

Las fincas y familias en Floreana crían gallinas para sus huevos y carne, y el plan de manejo de riesgos para estos animales (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b) especifica que todas las aves que serán aprovechadas para consumo humano deben confinarse para que no puedan pasearse libremente y no tengan acceso al cebo tóxico. También existe una población de gallinas ferales que a veces son capturadas por los humanos y, por el potencial de que éstas estén expuestas al brodifacoum, el plan de manejo de ganado especifica que no se capturaran más gallinas ferales para el consumo humano después de aplicar el cebo. Por lo tanto, se propone el monitoreo únicamente para las aves domésticas confinadas, tomando muestras de huevos, músculo (carne) e hígados.

Se deben tomar muestras, de huevos y/o carne de pollo, de cada finca que se abastece a sí misma y a la comunidad local. De cada finca avícola, se debe tomar como muestra un huevo limpio y recién puesto, al azar. Debe romperse, para colocar la yema y el albumen en el recipiente de la muestra, descartándose la cáscara. De cada productor de pollos de carne, debe seleccionarse aleatoriamente un pollo que se ha de faenar ese día, para tomarle muestras de sus tejidos durante su preparación. Los

hígados deben ser diseccionados enteros, tomándose como muestras por separado aproximadamente 50 g de músculo de la pechuga y 50 g de grasa corporal.

Las muestras deben analizarse lo más pronto posible para verificar las concentraciones de brodifacoum, dando prioridad a los análisis de las muestras de huevos e hígados primero. El laboratorio de análisis deberá dividir todo el hígado en dos submuestras, y retener una porción congelada, almacenada como respaldo potencial para replicar el análisis. Si se detectan concentraciones en el hígado, entonces deben analizarse también las muestras correspondientes de huevo, músculo y la otra mitad del hígado. Si la primera muestra de hígado analizada no tiene concentraciones detectables de brodifacoum, entonces las correspondientes muestras de huevo, músculo y el respaldo del hígado no deben analizarse, sino sólo retenerse congeladas hasta que se complete el programa de muestreo.

Si se detecta brodifacoum en análisis duplicados de las muestras de huevos o tejido de los pollos, deben tomarse más muestras inmediatamente de ese productor para determinar si ocurrió exposición a brodifacoum en otras aves, y si se requiere un monitoreo más intensivo.

4.3.2 Cerdos

Hay siete fincas en Floreana (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b), con cerdos que circulan libremente buscando su comida, con alimentación complementaria (mezcla de cereales más desperdicios de cocinas familiares y de restaurantes). El plan de manejo de riesgos para animales (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b) especifica que todos los cerdos que serán aprovechados para consumo humano deben confinarse para que no puedan pasearse libremente y no tengan acceso al cebo tóxico ni a otros animales que contengan residuos de brodifacoum. El tiempo cuando se permita que los cerdos confinados busquen alimentos en corrales exteriores sin exposición secundaria al brodifacoum será evaluado usando un sistema de monitoreo de cerdos centinelas, dejando que cerdos marcados busquen su alimento en corrales exteriores, y se tomen muestras de por lo menos dos cerdos a los tres meses después de la última aplicación del cebo con brodifacoum. Se deben tomar muestras de (al menos) dos cerdos adicionales a los seis meses después de la última aplicación de cebo. Si no se detecta brodifacoum en ninguna de las muestras de los cerdos a los tres y seis meses, esto indicará que los cerdos confinados podrán liberarse a corrales exteriores para buscar su alimento. Si se detecta brodifacoum en alguno de los cerdos a los tres o los seis meses, se deben tomar muestras de otros dos cerdos más, a los 12 meses después de la última aplicación de cebo. Los resultados de esos análisis serán considerados en ese momento para determinar si se necesita continuar el monitoreo de cerdos centinelas.

Deben tomarse muestras adicionales cuando se faene un cerdo, dentro del período entre el comienzo de la aplicación aérea del cebo y 10 semanas después de la última aplicación aérea del cebo. Deben matarse los cerdos usando el método normal usado por los productores, y desangrarlos. Las muestras (unos 50 g cada una) de hígado, músculo (del muslo) y grasa (subcutánea) deben tomarse y luego se procesa la canal según la práctica usual. Las muestras deben analizarse lo más pronto posible para verificar las concentraciones de brodifacoum, analizando primero las muestras de hígado. El laboratorio de análisis deberá dividir toda la muestra del hígado en dos submuestras, y retener una porción congelada, almacenada como respaldo potencial para replicar el análisis. Si se detectan concentraciones en la muestra de hígado, entonces deben analizarse también las muestras correspondientes de músculo, grasa y la otra mitad de la muestra del hígado. Si la primera muestra analizada de hígado no tiene concentraciones detectables de brodifacoum, entonces las correspondientes muestras de tejido no deben analizarse, sino sólo retenerse congeladas hasta que se complete el programa de muestreo.

4.3.3 Ganado vacuno

Cinco ranchos en Floreana crían ganado bovino para abastecer a la Isla de carne y leche, y exportar una parte a otras islas y otra parte a embarcaciones turísticas que visitan la Isla. Según la información facilitada por la Agencia de Bioseguridad y Control de Cuarentena para las Galápagos (ABG), en 2015 Floreana tenía un total de 186 cabezas de ganado, propiedad de ocho dueños en cinco fincas. Varias fincas dan sus pastizales en arriendo para ganado ajeno. El plan de manejo de riesgos para ganado (Dirección del Parque Nacional Galápagos et al. 2017b) especifica que todo ganado bovino en Floreana se confine para que no pueda circular libremente y por tanto no pueda acceder al cebo con brodifacoum. Está planificándose el diseño y construcción de establos y corrales que sean idóneos para contener al ganado bovino, así como los caballos, burros y mulas (para los cuales no se propone hacer análisis de residuos).

Hay una sola finca que vende leche, usualmente cada dos a tres días, de modo que las muestras deben tomarse en un día de ordeño. Cada muestra de leche debe constar de 100 mL de cada vaca ordeñada en el día de ordeño. Cien mililitros de leche de cada vaca deben ponerse en un recipiente robusto plástico de tamaño idóneo, sellado con una tapa rosca hermética, y mezclarla a fondo. Nótese que los recipientes de vidrio no deben usarse para las muestras de leche. El recipiente plástico para muestras debe etiquetarse con marcador permanente, incluyendo la identificación de la vaca que la produjo, y ponerse en una bolsa plástica adicional, antes de congelarse para almacenarlo.

Así como para los cerdos, deben tomarse muestras del ganado en la faena, de manera normal, justo antes de procesar la canal. Deben matarse las vacas usando el método normal, y desangrarlas. Las muestras (unos 50 g cada una) de hígado, músculo (muslo) y grasa (subcutánea) deben tomarse y luego se procesa la canal según la práctica usual, y se retienen las muestras, congeladas, en almacenamiento hasta que estén disponibles los resultados de los análisis. Con un laboratorio establecido en las islas Galápagos, estas muestras podrían procesarse dentro de un mínimo de tres días de recibirlas.

Las muestras deben analizarse lo más pronto posible para verificar las concentraciones de brodifacoum, haciendo primero las muestras de hígado. El laboratorio de los ensayos deberá dividir cada hígado entero en dos submuestras, y retener una porción congelada, almacenada como respaldo potencial para replicar el análisis. Si se detectan concentraciones en el hígado, entonces deben analizarse también las muestras correspondientes de músculo, grasa y la otra mitad de la muestra del hígado. Si la primera muestra analizada de hígado no tiene concentraciones detectables de brodifacoum, entonces las correspondientes muestras de tejido no deben analizarse, sino sólo retenerse congeladas hasta que se complete el programa de muestreo.

4.3.4 Especies marino-costeras

La evaluación de riesgos para las especies no-objetivo de fauna en Floreana (Fisher et al. 2017b) identificó las potenciales vías para que brodifacoum entre en el ambiente marino-costero, de modo que se indica hacer monitoreo para incrementar la confianza de que esto no produzca la exposición potencial a los seres humanos por mariscos colectados en Floreana. Las especies colectadas incluyen la langosta roja (*Panulirus penicillatus*), langosta verde (*Panulirus gracilis*) y langosta china (*Scyllarides astori*), que se capturan manualmente por buzos, buceando libremente con máscara, o usando un tanque de aire. Se capturan pulpos (*Octopus oculifer*) buceando o recolectándolos directamente cerca a la costa, y la canchalagua (*Chiton goodallii*) se recoge directamente de las rocas cerca de la costa. Los pescadores también capturan pequeños peces costeros con redes, incluyendo la lisa agugú (*Xenomugil thoburni*), lisa de Galápagos (*Mugil galapagensis*), salema de rayas negras (*Xenocys jessiae*) y el arenque de Galápagos (*Opisthonema berlangai*). Puede ser que esta lista no sea exhaustiva (puede que otras especies también sean pescadas para consumo humano).

Las muestras serán tomadas por pescadores locales. En vez de implementar un plan prescriptivo para el muestreo de ciertas especies marinas para alcanzar un tamaño de muestra específico, cada pescador simplemente debe pescar lo que normalmente tomaría de los lugares de pesca, usando métodos que usaría normalmente para proveer de alimentos a la comunidad de Floreana o a sí mismo y su familia. Esto dará una representación realista de las vías potenciales de exposición para las personas, aunque posiblemente no incluya todas las especies enumeradas anteriormente en cada muestra, y el número de animales varié en cada muestra.

Se requiere una muestra para la línea de base (previa a la aplicación del cebo) seguido de un muestreo realizado a la 1^a semana, 2^{da} semana y 4^{ta} semana después de la última aplicación del cebo. Idealmente, debe haber un centro de coordinación al que lleven los pescadores su pesca en un día de muestreo, para registrar, en un mismo lugar, los detalles del lugar de colecta, la fecha y las especies capturadas por cada persona, y para asignar números de identificación a cada muestra. En este centro, cualquier pez, pulpo o langosta vivos que lleguen serán eutanasiados, destruyendo físicamente el cerebro / sistema nervioso central (por ejemplo, clavando un punzón), o anotarse que llegaron muertos al ser recibidos. Donde existan múltiples individuos de una misma especie marina en la captura de un mismo pescador, deben seleccionarse aleatoriamente un máximo de seis ejemplares de cada especie como submuestras para procesarlos como se describe a continuación.

Cada animal muerto debe pesarse entero, y registrarse su peso antes de empaquetarlo (véase el siguiente párrafo para los detalles) y almacenarlo en congelamiento: al menos -4°C y de ser posible -20°C . Las muestras de canchalagua podrán pesarse, empaquetarse y colocarse directamente en congelamiento para que mueran. Luego de que las muestras estén totalmente congeladas, y estando congeladas, cada animal debe cortarse a la mitad bilateralmente. En lo posible, las dos mitades deben ser un reflejo exacto la una de la otra, con aproximadamente iguales cantidades de vísceras, músculo y otros tejidos en cada mitad. Para facilitar esto para las muestras de pulpos, debe congelarse el animal entero en una posición extendida que permita más tarde cortarle en mitades idénticas.

Deben empaquetarse las muestras en bolsas plásticas reforzadas de color claro o transparentes, cerrándolas con *ziplock* o amarrándolas con su propia correa plástica. Cada muestra debe estar en doble funda, con la bolsa exterior etiquetada con marcador permanente: el código de identificación de la muestra, la fecha, el lugar de muestreo (idealmente con sus coordenadas GPS, o con una descripción del sitio), el peso en el momento del muestreo, y el nombre de la especie.

Además, otra etiqueta con la misma información debe anotarse en un rótulo plástico flexible o en papel impermeable, usando un marcador indeleble a prueba de agua o un lápiz en caso de usar papel. Este rótulo adicional debe colocarse entre la primera funda y la segunda funda exterior que protege la muestra. Después de partir cada animal en dos mitades, las mitades de las muestras deben empacarse nuevamente por separado (como se indicó anteriormente), etiquetándose 'A' y 'B', más los demás detalles de la identificación de la muestra, fecha, lugar, especie, etc. Hay que tener cuidado de no permitir que las muestras se descongelen significativamente durante el proceso de partirlas en mitades y volver a empacarlas, antes de ponerlos de nuevo en congelación.

Aunque no se necesite analizar todas las muestras recolectadas en caso de obtenerse un resultado que indique que no hay ningún residuo a la primera semana, es prudente tomar muestras en una gama de intervalos posteriores a la aplicación, y tenerlos en almacenamiento, en caso de requerir una certeza adicional para confirmar que no hubo residuos detectables en los productos de mar colectados en Floreana.

4.4 Fauna silvestre

Se tomarán muestras de lagartijas de lava capturadas para detectar residuos de brodifacoum que hayan adquirido durante las semanas inmediatamente después de iniciar la aplicación del cebo. Los métodos de captura, eutanasia y muestreo de tejidos serán los mismos que se utilizaron antes para el monitoreo de las lagartijas de lava en Pinzón y Rábida. Esto dará insumos para evaluar el peligro secundario para los búhos de orejas cortas y otros predadores de lagartijas, y permitirá una comparación con los perfiles de residuos medidos en lagartijas de lava posterior a aplicaciones de cebo en las islas Pinzón y Rábida. Debe capturarse un mínimo de seis lagartijas a cada intervalo de muestreo (y más, de ser factible), con intervalos de muestreo comenzando a partir de la primera semana después de la primera aplicación aérea del cebo, y después cada mes durante seis meses. Deben analizarse las muestras de hígado de cada lagartija, y retenerse el resto del animal congelado en almacenamiento para análisis posterior, de ser requerido.

La mitigación de riesgos para algunas especies no-objetivo de fauna, particularmente algunos pinzones, requerirá tenerlas en cautiverio en Floreana. Esto requerirá un suministro regular de invertebrados vivos para alimentar las aves cautivas, que deberán conseguirse de varias partes de Floreana. Los invertebrados recolectados para alimentar las aves podrán incluir polillas (usando trampas de luz), larvas de moscas (de restos de animales muertos) y larvas de avispa (de sus nidos). Todos los invertebrados capturados para alimentar las aves en cautiverio serán analizados rutinariamente para asegurar que no ocurra una exposición secundaria a brodifacoum residual de las aves mantenidas en cautiverio. Una muestra de los invertebrados colectados en Floreana se condensará en un pool, y 1 g de submuestra de la mezcla de todos los invertebrados colectados ser evaluada antes de darles a las aves en cautiverio. Los datos de estos análisis también indicarán si hubo transferencia ambiental de brodifacoum residual en las especies específicas de invertebrados que son recolectados. Los detalles completos del régimen de muestreo y análisis se incluirán en este plan de monitoreo para pesticidas, una vez que se haya elaborado cada plan de mitigación en cautiverio.

Aunque no se planea hacer búsquedas formales de animales muertos, se prevé que, en los días después de la primera aplicación del cebo con brodifacoum, tanto el personal operativo como la comunidad de Floreana encontrarán oportunamente roedores moribundos y especies de aves no-objetivo y sus cadáveres. Habrá un lugar específico donde la comunidad podrá llevar / reportar animales muertos, o vivos y afectados, y se registrarán los detalles del lugar donde se los halló, quiénes los encontraron, la especie, el sexo, si son adultos / juveniles, y la fecha. Los animales vivos pero afectados serán eutanasiados a menos que la opinión veterinaria al momento indique que puede intentarse realizar un tratamiento, dependiendo de la especie y los síntomas presentados.

Los cadáveres de aves, reptiles o invertebrados grandes hallados después de la aplicación del cebo con brodifacoum que estén en buenas condiciones (es decir, relativamente intactos, con los órganos internos presentes, sin degradación significativa) deberán ser evaluados por un veterinario/a para detectar signos de envenenamiento (posiblemente haciendo una necropsia) y decidir si congelar muestras de los restos para almacenarlos y potencialmente realizar análisis de laboratorio para buscar residuos. Esta decisión dependerá de la especie (¿se preveía que estuviera en riesgo de envenenamiento?), hallazgos al examen y la necropsia, y la fecha y el lugar donde se encontró.

Para los cadáveres que pesen menos de 500 g, debe empaquetarse todo el cadáver como muestra, de la manera descrita previamente para las muestras marinas. En el caso de cadáveres más grandes de reptiles, aves o mamíferos se deberá diseccionar el cadáver para obtener muestras de unos 50 g de músculo y 50 g del hígado – o todo el hígado si pesa <50 g. Estas muestras de tejido deben empacarse y etiquetarse como ya se describió, indicando que son ‘cadáveres de animales encontrados muertos’, y almacenarse congelados antes de transportarlos al laboratorio donde se realizará el análisis.

4.5 Monitoreo del cebo

Se establecerán parcelas para el monitoreo de cebo como referencia para las recomendaciones dentro de los planes de manejo de riesgos relacionados con la duración del peligro primario de cebos tóxicos para mascotas, y para informar cuándo los cebos se han degradado al punto de que el ganado confinado podrá salir a pastar.

Se instalará una serie de parcelas de monitoreo que excluyen aves y mamíferos, pero no invertebrados, para observar la descomposición del cebo en los ambientes de la parte baja y alta de la isla y se evaluará el nivel de degradación a las semanas 1, 2, 4, 6 y 10 después de la aplicación. Nótese que se controlará sólo la condición física del cebo para indicar la reducción del peligro primario: no se harán análisis de muestras del cebo para detectar brodifacoum residual, porque se supone que la toxicidad permanece alta mientras el cebo sea identificable como tal.

5 Análisis de laboratorio

El Anexo 3 detalla la capacidad, equipos y reactivos de laboratorio requeridos para los análisis de las muestras biológicas y ambientales para detectar brodifacoum. Los costos estimados (en US\$) para comprar los equipos de laboratorio requeridos son: agitadora \$3.000, centrífuga \$10.000, detector de fluorescencia \$18.000, y cromatógrafo líquido de desempeño alto (HPLC) \$60.000. Estos costos estimados excluyen los elementos fungibles como probetas de centrífuga, jeringuillas y filtros de jeringuilla. Otras consideraciones para establecer un laboratorio analítico idóneo incluyen la disponibilidad de un cuarto con temperatura controlada con energía eléctrica, agua e instalaciones para almacenar y utilizar gases comprimidos.

El método recomendado emplea cloroformo/acetona/hidróxido de amonio como disolvente de extracción, y análisis por detección de fluorescencia en cromatógrafo HPLC con una técnica de cambio de pH post-columna para explotar la fluorescencia natural de este compuesto, usando difenacoum como estándar interno y en base a las técnicas descritas por Jones (1996) y Primus et al. (2001).

Las muestras del tejido animal (normalmente del hígado) se pican y se mezcla una submuestra de 2 g con sulfato sódico anhidro en un beaker, seguido por 15 mL de cloroformo/acetona/hidróxido de amonio. El contenido de la probeta se homogeniza con un dispersor tisular, se agita y se centrifuga. El líquido sobrenadante se decanta y se repite la extracción dos veces más. Se dejan evaporar los extractos combinados y se captan en cloroformo/hexano para limpieza con Electrolito en Fase Sólida (SPE) en una columna de amino propilo. El analito se eluye de la columna usando 0,005 M de perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) en metanol, que se deja que se evapore y se toma la muestra en una fase móvil de metanol/agua /ácido acético para el análisis HPLC usando detección de fluorescencia. El límite del método de detección dependerá hasta cierto punto de la instrumentación disponible en el laboratorio, pero se prevé que será factible lograr un límite en el rango de 0.1–0.01 µg/mL.

Se recomienda hacer una validación formal del método con otro laboratorio cuando se establezcan estas metodologías por primera vez. Esto incluirá preservar tipos referenciales de muestras (por ejemplo, en base de glicérido, de músculo, hígado, y contenido intestinal) con concentraciones de brodifacoum y calcular las recuperaciones del método empleado e incertidumbre para varios tipos de muestras.

6 Recomendaciones

- No se propone hacer monitoreo de brodifacoum residual en agua potable, cuerpos de agua naturales ni suelo en Floreana.
- Se recomienda hacer el monitoreo de brodifacoum residual en alimentos humanos derivados de la pesca hasta las 10 semanas después de la última aplicación de cebo con brodifacoum.
- Se recomienda el muestreo de aves (huevos y carne de pollo), cerdos (carne) y vacas (leche y carne) para asegurar que las medidas de mitigación propuestas para estos animales hayan prevenido la exposición humana por medio del consumo de estos alimentos.
- Se recomienda el muestreo de lagartijas de lava para detectar brodifacoum residual inmediatamente y durante los seis meses después de la aplicación aérea del cebo. Se podrán tomar muestras de cadáveres hallados después de aplicar el cebo, para análisis de residuos, dependiendo de la evaluación veterinaria. También se analizarán las submuestras de invertebrados vivos que se recolecten para alimentación de la fauna en cautiverio, para detectar brodifacoum residual.

7 Referencias

- Craddock P 2003. Aspects of the ecology of forest invertebrates and the use of brodifacoum. PhD thesis, University of Auckland, New Zealand.
- Dowding JE, Lovegrove TG, Ritchie J, Kast SN, Pucket M 2006. Mortality of northern New Zealand dotterels (*Charadrius obscurus aquilonius*) following an aerial poisoning operation. *Notornis* 53: 235–259.
- Eason C, Wickstrom M 2001. Vertebrate pesticide toxicology manual (poisons). Department of Conservation Technical Series 23. Wellington, Department of Conservation.
- Erickson W, Urban D 2002. Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach. Washington DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- Fisher P, Campbell K, Castano PA 2017a. Revised assessment of risks to food-producing animals, domestic animals and people from proposed aerial application of rodenticide bait containing brodifacoum on Floreana, Galápagos Islands. Landcare Research Contract Report LC2911 prepared for Island Conservation.
- Fisher P, Campbell K, Castano PA 2017b. Revised assessment of risks to non-target wildlife from proposed aerial application of rodenticide bait containing brodifacoum on Floreana, Galápagos Islands. Landcare Research Contract Report LC2776 prepared for Island Conservation.
- Fisher P, Griffiths R, Speedy C, Broome K 2011. Environmental monitoring for brodifacoum residues after aerial application of baits for rodent eradication. In: Veitch CR, Clout MN, Towns DR eds. *Island invasives: eradication and management*. IUCN (International Union for Conservation of Nature), Gland, Switzerland. Pp. 300–304.
- Galapagos National Park Directorate FPC, Agency for Regulation and Control of Biosecurity and Quarantine for Galapagos, Island Conservation 2017a. Management plan for domestic dogs and cats during the eradication of rodents and feral cats from Floreana Island. Unpublished report, 33 p.
- Galapagos National Park Directorate, Floreana Parish Council, Bio-security and Quarantine Regulation and Control Agency for Galapagos, Island Conservation 2017b. Action plan to manage livestock on Floreana Island, to implement rodent and cat eradication. Version 6.

- Hadler MR, Shadbolt RS 1975. Novel 4-hydroxycoumarin anticoagulants active against resistant rats. *Nature* 253: 277–282.
- Island Conservation 2016. Floreana Island ecological restoration: rodent and cat eradication operational plan v.6. Unpublished report, 140 p.
- Jolley W 2012. Trip report: Floreana Island 2012. Unpublished report, Island Conservation. Unpublished report, 25 p.
- Jones A 1996. HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 56: 8–15.
- Morgan DR, Morriss G, Hickling GJ 1996. Induced 1080 bait-shyness in captive brushtail possums and implications for management. *Wildlife Research* 23: 207–211.
- Parmar G, Bratt H, Moore R, Batten PL 1987. Evidence for a common binding site in vivo for the retention of anticoagulants in rat liver. *Human Toxicology* 6: 431–432.
- Pitt WC, Berentsen AR, Shiels AB, Volker SF, Eisemann JD, Wegmann AS, Howald GR 2015. Non-target species mortality and the measurement of brodifacoum rodenticide residues after a rat (*Rattus rattus*) eradication on Palmyra Atoll, tropical Pacific. *Biological Conservation* 185(0): 36–46.
- Primus TM, Eisemann JD, Matschke GH, Ramey C, Johnston JJ 2001. Chlorophacinone residues in rangeland rodents: an assessment of the potential risk of secondary toxicity to scavengers. In: Johnston JJ ed. *Pesticides and wildlife*. ACS Symposium Series 771. Washington DC, American Chemical Society. Pp. 164–180.
- United States Environmental Protection Agency 1998. Reregistration eligibility decision (RED) rodenticide cluster. Prevention, pesticides and toxic substances (7508W). EPA738-R-98007.
- World Health Organisation 1995. Anticoagulant rodenticides. *Environmental Health Criteria* 175. P. 121.

Anexo 1 – Etiquetas de muestras

Este formato de etiqueta, o algo similar, deberá incluirse en el empaquetamiento de cada muestra individual. Los detalles de la etiqueta en cada muestra también deben registrarse en una hoja de datos general (en papel, más una copia electrónica), asignando una identificación única para cada muestra. Los códigos de identificación podrán ser numéricos o una combinación de letras y números. Por ejemplo, en las muestras para el monitoreo biológico del brodifacoum en Pinzón y Rábida se utilizó el siguiente formato: MMDD, dos letras iniciales para la isla, iniciales de la persona que recolectó la muestra, y número de muestra (por ejemplo, 0822FLPC01).

Fecha de toma de muestra:
Lugar (coordenadas GPS o descripción del sitio):
Especie / descripción de la muestra (por ejemplo, hígado de pollo):
Peso de la muestra (para muestras de animales enteros):
Persona que tomó la muestra / identificación de la muestra:

Anexo 2 - Formulario de cadena de custodia

Se podrá agregar un encabezamiento general a este documento con detalles sobre la entidad que remite la muestra (por ejemplo, Island Conservation). Para cada consignación de muestras para enviarlas a otra entidad, como al laboratorio de análisis, necesitan completar este formulario el remitente, el transportador, y la entidad destinataria. Una copia del formulario completo debe permanecer junto a la consignación en todo momento. El destinatario necesitará retener el formulario plenamente completado para futuros rastreos de la muestra, e idealmente también devolverá una copia del formulario completo al remitente, una vez que reciba las muestras.

Muestra(s) que se envían: (Detalles de identificación para cada muestra en la consignación) (Número total y descripción breve de las muestras Por ejemplo, cangrejos, tejido animal, agua) Especificar la finalidad del análisis (por ejemplo, brodifacoum)	Fecha de envío: Detalles de contacto del remitente: (Nombre, entidad, dirección, correo electrónico, teléfono)
Instrucciones específicas para el transporte: Por ejemplo, mantener congelado, almacenar en posición vertical, envío urgente, advertencia de bienes peligrosos	
Transporte / Courier (Detalles del transporte, empresa de entrega rápida) (Identificación para rastreo de la consignación) Persona de contacto:	Fecha de recepción: Fecha entregada al destino:

Laboratorio / entidad destinataria

Fecha de recepción:

Persona de contacto, destinatario:

Confirmar el número e identificación de las muestras recibidas:

(Verificar comparando con los detalles del remitente)

Comentarios sobre la condición de las muestras:

Anexo 3 - Alcance y términos de referencia para el análisis químico en laboratorio de las muestras para detectar brodifacoum

Para el análisis del cebo, el tejido animal o las muestras del agua para detectar brodifacoum, se requieren la siguiente capacidad y equipos de laboratorio.

EQUIPOS

Cromatógrafo HPLC equipado con una columna Alltech 250 × 4.6 mm, 5 µm Alltima C18, un detector de fluorescencia y una bomba de reactivos post-columna
Homogeneizador de tejidos con cabeza de 18 mm
Máquina agitadora
Centrífuga para probetas de 50 mL
Evaporador rotativo con frasco de 100 mL, o evaporador al vacío marca Savant
Filtros de jeringuillas, 0.45 µm Durapore o PTFE, 13 mm
Bloque de calefacción equipado con ventilación
Mezcladora Vortex
Baño de ultrasonido
Cartuchos SPE, NH2 500 mg/4.0 mL
Tubo múltiple de SPE
Centrífuga para probetas de 10 mL
Detector de fluorescencia

CAPACIDAD PARA MANEJAR, ALMACENAR Y ELIMINAR LOS REACTIVOS PELIGROS CON SEGURIDAD

Cloroformo
Acetona
Cloroformo/ acetona / disolvente de extracción de amoniacó
Hexano – grado AR.
Metanol – grado HPLC
Ácido acético
Ácido acético glacial
Sulfato sódico, anhidro
Fosfato dihidrógeno amonio tetrabutilo
Brodifacoum
Difenacoum

El establecimiento y la validación de un método idóneo de análisis requerirá un cargo de gerente de laboratorio o químico Senior. Las especificaciones para este cargo incluyen:

- Título universitario de BSc, MSc o PhD en ciencias químicas
- un mínimo de cinco años de experiencia analítica, con experticia demostrada en los métodos HPLC y la química de pesticidas
- la capacidad de comunicarse claramente, tanto en forma verbal como por escrito
- familiaridad y experiencia con las Prácticas de Buen Manejo de Laboratorios (GLP) y los requisitos para los organismos y esquemas pertinentes de acreditación a nivel nacional e internacional
- ser proactivo en anticiparse a los problemas

- ser auto motivado en cuestiones del aseguramiento de la calidad, exactitud y precisión de los métodos.

Los deberes clave del especialista para este cargo incluyen:

- responsabilidad para el establecimiento y la operación fluida de un laboratorio moderno que utiliza equipos de cromatografía líquida (GLC/HPLC)
- la capacidad de comunicarse y trabajar eficazmente en un equipo para proporcionar apoyo analítico e interpretación de datos para este plan de monitoreo de residuos en el proyecto de restauración de Floreana
- implementar los principios GLP para mantener la validación de métodos, el aseguramiento de la calidad, el manejo de los registros, el reporte de los datos, y las normas de auditoría
- elaborar informes y contribuir a la autoría de publicaciones científicas en revistas indexadas para reportar e interpretar los resultados de laboratorio.

Una vez que se haya establecido y validado el método analítico, el/la químico principal podrá analizar las muestras biológicas enviadas o podrían procesarse en forma rutinaria por alguien que cumpla el rol técnico. Las especificaciones para este cargo técnico incluyen:

- título universitario en bioquímica/química o una ciencia biológica
- experiencia práctica de laboratorio en análisis químico/bioquímico y técnicas de HPLC
- competencia en el uso de computadoras, especialmente en programas para hojas de datos electrónicos y procesamiento de palabras
- familiaridad con los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio, salud y seguridad ocupacional, y la capacidad de trabajar bajo un estándar específico y cumplir con las fechas límite.

Los deberes clave para este cargo incluyen:

- Instrumentación de laboratorio: operación segura de varios tipos de equipos, incluyendo los de cromatografía líquida, gases comprimidos y sistemas para la captación de datos
- analizar las concentraciones de pesticidas: realizar y manejar el análisis rutinario de pesticidas, siguiendo métodos e instrucciones estandarizados – se requiere la extracción cuidadosa de tóxicos de materiales biológicos y cebos
- conducir los análisis según las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), incluyendo el cumplimiento con los requisitos de Aseguramiento de la Calidad, y las normas GLP y de la seguridad de laboratorios
- manejo de datos e informes: crear un manejo apropiado de los datos, mantener resultados claramente documentados, y reportar los resultados según el cronograma establecido
- archivo: gestionar los registros de los resultados según las normas GLP
- mantener la higiene del laboratorio: limpiar el laboratorio y la vidriería y hacer una disposición final apropiada de la basura y los materiales peligrosos; mantener limpias las superficies de las áreas de trabajo, sin materiales innecesarios o equipos o vidriería no requeridos.

Anexo 4 - Resumen de tipos de muestras e intervalos de muestreo propuestos para el monitoreo de brodifacoum residual en Floreana

Especie	Tipo de muestra	Número mínimo que se debe recolectar
Gallinas / pollos (confinados)	Huevo Carne (músculo) Hígado Grasa corporal	Uno de cada tipo de muestra, de cada finca productora, al realizar: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) y aproximadamente a las semanas 1, 2, 4, 6 y 10 después de la última aplicación de cebo
Cerdos (centinelas)	Hígado Carne (músculo) Grasa corporal	Dos de cada tipo de muestra, a los: <ul style="list-style-type: none"> 3 meses después de la última aplicación del cebo 6 meses después de la última aplicación del cebo (?)12 meses después de la última aplicación del cebo
Cerdos (confinados)	Hígado Carne (músculo) Grasa corporal	Uno de cada tipo de muestra, al realizar: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) y de cinco cerdos faenados rutinariamente para procesar su carne después de la última aplicación del cebo
Vacas (confinadas)	Leche	Una muestra de cada día de ordeño al realizar: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) y aproximadamente a las semanas 1, 2, 4, 6 y 10 después de la última aplicación del cebo
Vacas (confinadas)	Hígado Carne (músculo) Grasa corporal	Uno de cada tipo de muestra: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) de dos vacas/reses faenadas rutinariamente para su carne después de la última aplicación del cebo
Peces e invertebrados marino-costeros cosechados para consumo humano	Peces (especies comestibles), chitones, pulpos, langostas Hasta seis ejemplares de cada especie presente en una cosecha	Los pescadores locales recolectan peces y/o invertebrados que cosecharían normalmente en: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) 1 semana después de la aplicación del cebo 2 semanas después de la aplicación del cebo 4 semanas después de la aplicación del cebo
Lagartijas de lava	Hígado Resto del cuerpo	Mínimo de seis ejemplares en: <ul style="list-style-type: none"> la línea de base (antes de aplicar el cebo) Aproximadamente a las semanas 1, 4, 10, 22 y 48 después de la última aplicación del cebo muestras adicionales según indiquen los resultados de análisis anteriores

Otra fauna o animales domésticos hallados muertos	Hígado Músculo Grasa corporal	Según determine el/la veterinario que realiza el examen
---	-------------------------------------	---