



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

Departamento de Recursos Naturales y Gestión Ambiental
Estación Experimental Agropecuaria Paraná
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina

Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctor/a en Ciencias Veterinarias

***“Caracterización de la exposición y el peligro de
insecticidas neonicotinoides usados como tratamiento de
semillas en aves granívoras”***

Autor: Lic. Laura M. Addy Orduna

Director: Dr. Rafael Mateo Soria

Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética
Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos
Universidad de Castilla - La Mancha, España

Codirectora: Dra. Jimena Cazenave

Laboratorio de Ictiología
Instituto Nacional de Limnología
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

Octubre 2022

“Viditque Deus cuncta quæ fecerat, et erant valde bona”.

Gn. 1,31.

*“(Al arrepentido) Dios perdona siempre; el Hombre, a veces; la Naturaleza,
nunca”.*

Anónimo.

Dedicatoria

*A mi esposo y a nuestros hijos
les dedico esta tesis terminada, en restitución
de la atención que por ella les he robado.*

Agradecimientos

Al INTA, por brindarme la posibilidad de capacitarme y financiar las actividades; y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por aceptarme como doctoranda.

A mi director de tesis, Dr. Rafael Mateo, por su invaluable soporte, generosidad y compromiso.

A mi codirectora de tesis, Dra. Jimena Cazenave, por su siempre animada disposición y ayuda.

A María Elena Zaccagnini, Pierre Mineau y Julie Brodeur, por sus aportes en el plan de tesis.

Al jurado de esta tesis, por su tiempo y aportes.

A todos mis colegas y compañeros de INTA y otras instituciones, tanto profesionales, como técnicos y de apoyo, que siempre estaban allí para lo que necesitara. Gracias Alfredo Coassolo, Yamil Arener, Jeremías Mancini, Rubén Velázquez, Quique Alva, Ricardo De Carli, Sonia Canavelli, Sebastián Dardanelli, Noelia Calamari, Norberto Álvarez, Ramiro López, Paula Muñoz, Diego Santos, Dante Bedendo, Gloria Pausich, Marcelo Wilson, Adriana Saluso, Beatriz Trulls, Juan Manuel Pautasso, Sergio Milera, Alejandra Cuatrin, Gerardo Cueto, Ricardo Melchiori y tantas otras personas que prestaron su ayuda o conocimiento para la concreción de estos trabajos.

A los productores, que me brindaron desinteresadamente sus campos para las evaluaciones.

Al programa EMHE-CSIC “Enhancing Mobility between Latin-American y Caribbean countries y Europe, 2018-2020”, el cual permitió la visita de mi director de tesis al INTA, la visita de mi co-directora de tesis al IREC y mis dos estancias en el IREC por tres meses/año durante 2018 y 2019.

A los compañeros del IREC, por recibirme tan cálidamente durante mis estancias allí.

A mi madre, por transmitirme su amor al conocimiento.

A mi esposo y a mis hijos, por su paciencia y apoyo incondicional.

A Dios y a su Madre, por ponerme en el camino a los que nombré y a otros indispensables.

Índice general

Dedicatoria	I
Agradecimientos.....	II
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	XI
Abreviaturas y símbolos	XV
RESUMEN GENERAL	XVII
GENERAL ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Hipótesis.....	10
Hipótesis generales	11
Hipótesis de trabajo y predicciones derivadas	11
Objetivos del trabajo	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos (ordenados según los capítulos).....	13
CAPÍTULO 1: Toxicidad oral aguda de imidacloprid, tiametoxam y clotianidin en torcazas.....	14
Resumen	15
Introducción	15
Materiales y métodos.....	17
Químicos	17
Aves experimentales y condiciones de alojamiento	18
Diseño experimental.....	18
Número de semillas tratadas necesarias para alcanzar los DL50	21
Consumo de semillas de sorgo no tratadas	22
Análisis de datos	23
Resultados.....	23

Mortalidad.....	23
Signos de intoxicación: inicio, intensidad y tiempo de recuperación ...	25
Consumo de alimentos y peso corporal	44
Estimación de la masa y el número de semillas tratadas necesarias para alcanzar las DL50.....	46
Consumo de semillas de sorgo no tratadas por torcazas cautivas.....	47
Discusión	48
Conclusiones	51
CAPÍTULO 2: Comportamiento antidepredador de la perdiz roja dosificada con imidacloprid ante simulación de depredadores	52
Resumen	53
Introducción	53
Materiales y métodos.....	54
Aves experimentales y condiciones de alojamiento	54
Tratamientos	55
Diseño experimental.....	55
Análisis de datos	58
Resultados.....	59
Discusión	70
Conclusión.....	72
CAPÍTULO 3: Evitación de semillas y cotiledones tratados con neonicotinoides por torcazas cautivas.....	73
Resumen	74
Introducción	74
Materiales y métodos.....	77
Aves experimentales y condiciones de alojamiento	77
Diseño experimental.....	78

Experimento de evitación de semillas de sorgo tratadas con neonicotinoides.....	82
Experimento de evitación de semillas de soja tratadas con neonicotinoides.....	83
Experimento con cotiledones de soja tratados con neonicotinoides ...	85
Hematocrito y estrés oxidativo en torcazas expuestas a cotiledones de semillas tratadas.....	86
Análisis de neonicotinoides en semillas, cotiledones e hígados de aves muertas	87
Análisis de datos	87
Resultados.....	89
Contenido de neonicotinoides en semillas y cotiledones ofrecidos	89
Evitación de las torcazas al sorgo tratado	91
Evitación de torcazas a semillas de soja tratadas	102
Evitación de torcazas a los cotiledones de soja tratados	103
Discusión	105
Conclusiones	109
CAPÍTULO 4: Evitación y riesgo de semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid para aves que comen semillas.....	110
Resumen	111
Introducción.....	111
Materiales y método	113
Lugar de estudio.....	113
Diseño Experimental	113
Relevamiento de las semillas no enterradas disponibles para las aves	115
Relevamiento de los daños causados en los cotiledones de las plántulas	115
Relevamiento de las aves	116

Evaluación determinística del riesgo	116
Análisis de datos	117
Resultados.....	118
Disponibilidad de semillas	118
Daño en las plántulas de soja	119
Presencia de aves	120
Evaluación de riesgo agudo	125
Discusión	128
Conclusiones	132
CAPÍTULO 5: Disponibilidad y riesgo para aves en el campo por el consumo de semillas de maíz, sorgo y soja tratadas con neonicotinoides	133
Resumen	134
Introducción	135
Materiales y métodos.....	137
Sitio de estudio	137
Relevamiento de semillas y variables de estudio	138
Relevamiento de aves en los campos y categorización trófica	143
Análisis del contenido en el tracto gastrointestinal de torcazas cazadas	143
Residuos de plaguicidas.....	144
Evaluación de riesgo determinístico	144
Análisis de datos	146
Resultados.....	147
Semillas disponibles para aves después de la siembra	147
Neonicotinoides en semillas	149
Aves registradas y su categorización trófica	150
Contenido alimenticio y químico en buches y mollejas de torcazas cazadas	154

Evaluación de riesgo	158
Discusión	159
Conclusiones	163
DISCUSIÓN GENERAL	164
CONCLUSIONES GENERALES	173
Bibliografía	175

Índice de tablas

Tabla I.1. Dosis letales medias (DL50) de tres neonicotinoides de uso frecuente en distintas especies de aves.....	4
Tabla I.2. Variables medidas para contestar las preguntas de cada capítulo de la tesis, vinculadas al peligro (efectos), a la exposición (concentración química) y al riesgo.	9
Tabla 1.1. Dosis letal 50 (DL50) expresada en mg i.a./kg PC, y pendiente de las curvas dosis-respuesta calculadas en torcazas (<i>Zenaida auriculata</i>) expuestas mediante sonda a formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.	25
Tabla 1.2. Tiempo de muerte, inicio e intensidad de signos de intoxicación y tiempo de recuperación en torcazas (<i>Zenaida auriculata</i>) expuestas mediante gavage a formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.....	27
Tabla 1.3. Número estimado de semillas tratadas de sorgo, soja y maíz equivalentes a la dosis administrada por gavage y signos de intoxicación observados en las torcazas expuestas a los neonicotinoides (una fila por ave). .	28
Tabla 1.4. Masa y número de semillas de soja, sorgo y maíz tratadas con neonicotinoides, necesarias para alcanzar las DL50 en torcazas para los diferentes tratamientos de semillas de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.....	47
Tabla 2.1. Número y porcentaje (entre paréntesis) de individuos tratados con imidacloprid (n=12 por tratamiento) que mostraron comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos amenazantes en el experimento grupal.	61
Tabla 2.2. Número y porcentaje (entre paréntesis) de individuos tratados con imidacloprid (n=10 por tratamiento) que mostraron comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos amenazantes en el experimento individual.	63
Tabla 2.3. Latencia y tiempo (s, media \pm SE) invertido por las perdices expuestas a imidacloprid (n=12 por tratamiento) en los comportamientos antidepredador ante diferentes estímulos en los ensayos grupales.....	64

Tabla 2.4. Latencia y tiempo (s, media \pm SE) invertido por las perdices tratadas con imidacloprid (n=10 por tratamiento) en los comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos en el experimento individual.	67
Tabla 2.5. Diferencias estadísticas (letras diferentes) en el número de individuos con comportamientos antidepredador (casos) y la duración del comportamiento entre los diferentes estímulos amenazantes (A1, A2, R1, R2, FX) y ubicación de las aves en la jaula en el momento del estímulo (zona).	69
Tabla 3.1. Registros de temperatura y humedad máxima y mínima y amplitud térmica media diaria en cada período de cada experimento de exposición de torcazas a sorgo, semillas o cotiledones de soja tratados con neonicotinoides... ..	78
Tabla 3.2. Consumo de semillas de soja sin tratar por torcazas (12 de las 40) durante el período Pre-exposición,.....	84
Tabla 3.3. Concentración de neonicotinoides en el alimento de prueba de cada tratamiento y medidas de evitación en las torcazas.	90
Tabla 3.4. Consumo medio en gramos (media \pm SE) de alimentos de prueba y consumo total (gramos de alimentos de prueba + gramos de alimento de mantenimiento) de torcazas durante los períodos de exposición a neonicotinoides.	94
Tabla 3.5. Masa media en gramos de semillas y cotiledones.	94
Tabla 3.6. Registros de grabaciones en vídeo del comportamiento de algunas torcazas durante los primeros 15 minutos de exposición a los alimentos en los diferentes tratamientos y periodos.	96
Tabla 3.7. Índice de masa escalado (SMI) de las torcazas al inicio y al final de cada tratamiento en los tres experimentos.	102
Tabla 3.8. Consumo de soja tratada con imidacloprid y consumo total (soja + alimento de mantenimiento) por parte de las tres torcazas evaluadas (media \pm SE).	103
Tabla 4.1. Número de semillas de soja/m ² (media \pm SD) en cada relevamiento.	119
Tabla 4.2. Grupos y subgrupos alimenticios y abundancia de las especies de aves observadas en el total de los campos evaluados sembrados con soja con y sin imidacloprid.	121

Tabla 4.3. Ecuaciones, variables y resultados de la evaluación de riesgos de semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid para la torcaza.....	126
Tabla 5.1. Variables registradas vinculadas al diseño del estudio, a las características y condiciones del lote, al proceso de la siembra o a aspectos del relevamiento de los 43 campos sembrados con maíz, sorgo o soja en los departamentos Paraná y Diamante de la provincia de Entre Ríos.	139
Tabla 5.2. Modelos estadísticos utilizados para evaluar la incidencia de los diferentes grupos de variables explicativas sobre la densidad de semillas no enterradas después de la siembra.	147
Tabla 5.3. Concentraciones (media \pm SE, <i>máxima</i> ; mg i.a./kg semillas) de neonicotinoídes en las semillas de los campos evaluados y porcentajes de muestras por cultivo que contuvieron imidacloprid (M_{imi}), clotianidín (M_{cloti}) y tiametoxam (M_{tia}).	150
Tabla 5.4. Aves registradas en los 25 campos evaluados, 12 del departamento Paraná y 13 del departamento Diamante.....	151
Tabla 5.5. Masa seca promedio por torcaza cazada de cada componente en buche y molleja y la proporción media y máxima del componente respecto al contenido total por ave en las cuatro batidas de Paraná y Diamante	155
Tabla 5.6. Combinaciones de semillas halladas en los tractos gastrointestinales de las aves en orden decreciente de frecuencia de aparición.....	156
Tabla 5.7. Residuos de imidacloprid en buches y mollejas de las torcazas cazadas en las cuatro batidas.	157
Tabla 5.8. Valores TER de cada neonicotinoíde en los tres cultivos para las especies focales genéricas de la evaluación de primer nivel.	158

Índice de figuras

Fig. I.1. Estructura química de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.	4
Fig. 1.1. Procedimiento de la prueba de dosis límite, dependiendo del número de muertes por dosis límite (A), y del diseño secuencial para la prueba de pendiente y DL50, dependiendo de las reversiones y las muertes parciales (B).....	20
Fig. 1.2. Supervivencia acumulada de torcazas a lo largo del tiempo para cada rango de neonicotinoides.	24
Fig. 1.3. Niveles de intensidad de los signos de intoxicación observados en torcazas expuestas mediante sonda intra-gástrica a formulaciones de neonicotinoides. ...	26
Fig. 1.4. Consumo medio de alimentos de las torcazas durante los días de prueba después de su única dosis de neonicotinoide.	45
Fig. 1.5. Medias del peso corporal de torcazas tratadas vía gavage con formulaciones de neonicotinoides.	46
Fig. 2.1. Diagrama de la clausura donde se llevaron a cabo los ensayos de comportamiento de perdices rojas dosificadas con dosis subletales de imidacloprid.	57
Fig. 2.2. Secuencia y duración de la exposición de perdices rojas a los estímulos amenazantes en el experimento grupal e individual.....	57
Fig. 2.3. Duración (media \pm IC 95%) del comportamiento de agachamiento (Fc) de las perdices rojas en cada tratamiento ante los estímulos visuales R1 (“rapaz” yendo), R2 (“rapaz” volviendo) y FX (“zorro”) en el experimento grupal. C: control, T1: 0 mg i.a./kg PC, T1: 1 mg i.a./kg PC, T2: 6 mg i.a./kg PC.....	60
Fig. 2.4. Duración (media \pm SE) del comportamiento de vigilancia sin desplazamiento (V), de los comportamientos antidepredador pasivos (CAPP) y de las respuestas antidepredador (Rtas AP) en cada tratamiento (C=0 mg i.a./kg PC, T1=1 mg i.a./kg PC, T2=6 mg i.a./kg PC) ante el estímulo alarma intraespecífica (A1) en el experimento individual.	61
Fig. 3.1. Modelo conceptual de evitación de aves a químicos con propiedades repelentes.....	75

Fig. 3.2. Diagrama de experimento de evitación de torcazas a semillas de sorgo tratadas con neonicotinoides.....	80
Fig. 3.3. Diagrama de experimento de evitación de torcazas a semillas (A) y cotiledones (B) de soja tratados con neonicotinoides.	81
Fig. 3.4. Consumos de sorgo (subíndice "sg") y alimentos totales (subíndice "t"=sorgo + alimentos de mantenimiento) por parte de las torcazas (media \pm SE) a lo largo del experimento de evitación al sorgo tratado.	93
Fig. 3.5. Peso corporal de torcazas sobrevivientes y muertas del experimento de evitación a sorgo tratado con neonicotinoides.....	95
Fig. 3.6. Frecuencia de los signos de intoxicación observados en torcazas a lo largo de los días en cada tratamiento durante los períodos de Exposición 1 (A) y Exposición 2 (B) del experimento de sorgo.....	95
Fig. 3.7. Diferencia de peso corporal (PC al final del período - PC al comienzo del período) en las torcazas dentro de cada tratamiento de los experimentos de sorgo (A), soja (B) y cotiledón (C).....	101
Fig. 3.8. Consumo (media \pm SE) de cotiledones de soja (subíndice "c") y de alimento total (subíndice "t"=cotiledones más alimentos de mantenimiento) por parte de torcazas a lo largo de los días del experimento de exposición a cotiledones provenientes de semillas tratadas con neonicotinoides..	104
Fig. 3.9. Estrés oxidativo en muestras de hígado y cerebro de torcazas expuestas a cotiledones de soja tratados con neonicotinoides.	105
Fig. 4.1. Dibujo de las superficies de campos 1, 2 y 3 utilizados para las mediciones de cantidad de semillas no enterradas post-siembra, cotiledones dañados y número y especies de aves que comen semillas..	114
Fig. 4.2. Densidad media (\pm SE) de semillas de soja en la superficie de las parcelas sembradas con semillas sin imidacloprid (Control) y sembradas con semillas tratadas con imidacloprid (Tratado) en cada sector del campo (cabecera o interior).	118
Fig. 4.3. Porcentaje de plántulas de soja con algún tipo de daño en sus cotiledones entre parcelas control y tratadas con imidacloprid.	120

Fig. 4.4. Rango-abundancia de especies de aves en pre-siembra, siembra, post-siembra y emergencia, considerando parcelas C y T y todos los campos.	124
Fig. 4.7. Abundancia y riqueza de los diferentes grupos de aves según su tipo de alimento, presente en que campos con o sin tratamiento en los cuatro períodos estudiados.	125
Fig. 5.1. Sitio de estudio.	137
Fig. 5.2. Esquema del diseño de muestreo con transectas para evaluar el número de semillas no enterradas mediante un aro metálico (foto) y las aves en cada sector (cabecera o interior) del campo.	139
Fig. 5.3. Densidad de semillas no enterradas (media \pm SE) en cada cultivo (A) y en cabeceras e interior del lote (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga.	148
Fig. 5.4. Densidad de semillas no enterradas (media \pm error) en lotes sin y con curvas de nivel (A) y en función del porcentaje de suelo cubierto (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga.	149
Fig. 5.5. Densidad de semillas no enterradas (media \pm error) sin y con siembra contratada (A) y en función del tipo de dosificador de la sembradora (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga.	149
Fig. 5.6. Abundancia (número de individuos de una especie/transecta) y riqueza (número de especies/transecta) de las aves “S” que comen semillas en alguna proporción de su dieta.	153
Fig. 5.7. Abundancia de especies “S” frente a la presencia de semillas de otros cultivos sobre el suelo del lote (A) y de la riqueza de especies “S” en cada sector del campo (B).	153
Fig 5.8. Tendencia observada entre la riqueza de especies “S” y el porcentaje de borde vegetado de los lotes (A) y la densidad de semillas/m ² del cultivo sembrado (B).	153
Fig. 5.9. Media y error estándar del porcentaje de cada componente considerando todos los t.g.i. de todas torcazas evaluadas (n=200).	154
Fig. 5.10. Contenido del buche (papel aluminio izquierda) y de la molleja (papel aluminio derecho) de una torcaza cazada en la batida de septiembre.	157

Fig. 5.11. Valores de TER agudo refinado de los neonicotinoides para las composiciones de dieta halladas en los t.g.i. de las torcazas de las distintas batidas 159

Abreviaturas y símbolos

AMEn: *Apparent Metabolizable Energy* corrected for nitrogen en inglés, es decir energía metabolizable aparente corregida para la retención de nitrógeno.

BE: zona de baja exposición.

CAT: enzima catalasa.

CT: concentración teórica.

DL50: dosis letal media.

EFSA: *European Food Safety Authority* en inglés, es decir Autoridad Europea de Seguridad de los Alimentos.

GLM: *Generalized Lineal Model* en inglés, es decir modelo lineal generalizado.

GLMM: *Generalized Lineal Mix Model* en inglés, es decir modelo mixto lineal generalizado.

GST: enzima glutatión S-transferasa.

HPLC-DAD: *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection* en inglés, es decir cromatografía líquida de alto rendimiento-detector de matriz de diodos.

Hto: hematocrito.

i.a.: ingrediente activo.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

IR: *Incorporation Rate* en inglés, es decir tasa de incorporación de semillas en el suelo después de la siembra.

IREC: Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos.

L: longitud del tarso.

LC-MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* en inglés, es decir cromatografía líquida-espectrometría de masas.

MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina.

MDA: malondialdehído.

nAChR: *Nicotinic Acetylcholine Receptors* en inglés, es decir receptores nicotínicos de acetilcolina.

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* en inglés, es decir Nivel de Efecto Adverso No Observable (dosis más alta a la que no se observó un efecto tóxico o adverso).

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development* en inglés, es decir Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.

PC: peso corporal.

ppm: partes por millón.

RMA: *Reduced Major Axis* en inglés, es decir eje mayor reducido.

FMR: *Field Metabolic Rate* en inglés, es decir tasa metabólica de campo.

RSD: desvío estándar relativo.

SE: *Standard Error* en inglés, es decir error estándar.

SMI: *Scaled Mass Index* en inglés, es decir índice de masa escalada.

SR: *Seeding Rate* en inglés, es decir tasa de siembra.

TBARS: *ThioBarbituric Acid Reactive Substances* en inglés, es decir sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TER: *Toxicity Exposure Ratio* en inglés, es decir tasa de exposición tóxica.

VC: estado fenológico vegetativo cotiledonar

VE: estado fenológico vegetativo en emergencia

WHO: *World Health Organization* en inglés, es decir Organización Mundial de la Salud.

RESUMEN GENERAL

Dado su amplio uso y su química particular, los insecticidas neonicotinoides tienen un alto potencial de afectar especies no blanco como las aves, particularmente a través de su uso como tratamientos de semilla antes de la siembra de un cultivo. Para esclarecer aspectos relacionados al peligro y a la exposición de aves a neonicotinoides, se describió la toxicidad aguda de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam en torcazas (*Zenaida auriculata*). En perdices rojas (*Alectoris rufa*) se evaluó su comportamiento antidepredador luego de una dosificación con dosis subletales de imidacloprid. Para determinar si la aversión a neonicotinoides limita la exposición de las aves, se realizaron experimentos en cautiverio con torcazas expuestas a sorgo (semillas) y soja (semillas y cotiledones) tratados, y un experimento a campo con semillas y cotiledones de soja. Finalmente, se estimó en campo la cantidad de semillas disponibles para las aves que quedan después de la siembra de maíz, sorgo y soja, así como el contenido de semillas de estos cultivos y de neonicotinoides en tracto gastro-intestinal de torcazas cazadas. Imidacloprid (DL50=59 mg/kg) resultó más tóxico que clotianidin y tiametoxam para las torcazas, pero concentraciones de 1 y 6 mg/kg sólo produjeron efectos en comportamientos antidepredador pasivos, no de huida, en perdices rojas. Los neonicotinoides produjeron un fuerte comportamiento de evitación en las aves, tanto en cautiverio como en campo, pero no fue suficiente para evitar la muerte de torcazas expuestas a sorgo tratado. La soja fue el cultivo con la mayor densidad de semillas sin enterrar después de su siembra pero también el menos tratado con neonicotinoides. El cultivo de maíz, 100% tratado con neonicotinoides, fue el que presentó mayor abundancia de aves comedoras de semillas y sus semillas se encontraron en las torcazas cazadas con mayor frecuencia que las de sorgo y soja. El cultivo de sorgo fue el menos extendido territorialmente, pero sus semillas presentaron la mayor concentración de imidacloprid en el campo. Como conclusión, imidacloprid puede estar presente en semillas tratadas no enterradas de sorgo y maíz en cantidades peligrosas, constituyendo un riesgo agudo para las aves que comen semillas.

GENERAL ABSTRACT

Given their wide use and particular chemistry, neonicotinoid insecticides have a high potential to affect non-target species such as birds, particularly through their use as seed treatments before sowing a crop. To clarify aspects related to the hazard and exposure of birds to neonicotinoids, the acute toxicity of imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam in eared doves (*Zenaida auriculata*) was described. In red-legged partridges (*Alectoris rufa*) their antipredator behavior was evaluated after dosage with low doses of imidacloprid. To determine whether aversion to neonicotinoids limits bird exposure, captive experiments were conducted with eared doves exposed to treated sorghum (seeds) and soybeans (seeds and cotyledons), and a field experiment with soybean seeds and cotyledons. Finally, the number of seeds available to the birds that remain after the sowing of corn, sorghum and soybeans was estimated in the field, as well as the seed content of these crops and neonicotinoids in hunted eared doves. Imidacloprid was more toxic than clothianidin and thiamethoxam for eared doves (LD50=59 mg/kg), but concentrations of 1 and 6 mg/kg only produced effects on passive, not flight, antipredator behaviour in red-legged partridges. Neonicotinoids produced strong avoidance behavior in birds, both in captivity and in the field, but it was not enough to prevent the death of eared doves exposed to treated sorghum. Soybeans were the crop with the highest density of unburied seeds after sowing but also the least treated with neonicotinoids. The crop of corn, 100% treated with neonicotinoids, was the one that presented the greatest abundance of seed-eating birds and its seeds were found in the eared doves hunted more frequently than those of sorghum and soybeans. The crop of sorghum was the least widespread in the territory but its seeds presented the highest concentration of imidacloprid in the field. In conclusion, imidacloprid may be present in unburied treated seeds of sorghum and maize in dangerous quantities, constituting an acute risk to seed-eating birds.

INTRODUCCIÓN GENERAL



Los neonicotinoides son actualmente una clase de insecticidas de amplio uso a nivel global. Introducidos desde la década de 1990, son la clase de insecticida de más rápido crecimiento en el mercado mundial en los últimos años (Jeschke et al., 2011; Tomizawa y Casida, 2011), particularmente como tratamiento de semillas previo a la siembra (Douglas y Tooker, 2015). Su amplia adopción se explica por su relativa mayor toxicidad para invertebrados que vertebrados, su diversidad de modos de aplicación, su persistencia y su actividad sistémica. Además de aplicarse sobre el suelo o las plantas, los neonicotinoides se utilizan ampliamente como tratamiento de semillas previo a la siembra (“curasemillas”) para controlar el daño por insectos chupadores y masticadores en diversos cultivos (Elbert et al., 2008). Con este modo de uso, la aplicación del ingrediente activo es virtualmente independiente del clima, se aplica directamente en el sitio de acción y reduce la exposición del operador a la sustancia activa (Jeschke et al., 2011).

Como consecuencia de su uso a gran escala y sus características físico-químicas, los neonicotinoides han mostrado ser contaminantes ambientales y presentan impactos potenciales sobre las funciones y los servicios ecosistémicos provistos por los ecosistemas acuáticos y terrestres (Chagnon et al., 2014). Los neonicotinoides son encontrados en el aire, como partículas de polvo durante la siembra de cultivos con semillas tratadas y como aerosoles durante las pulverizaciones (Bonmatin et al., 2014; Greatti et al., 2003). Son frecuentemente detectados en suelos agrícolas (Bonmatin et al., 2019; Jones et al., 2014) – incluso de producciones orgánicas (Humann-Guillemint et al., 2019a) –, humedales (Main et al., 2016, 2014), aguas superficiales (Hladik et al., 2014; Morrissey et al., 2015; Naumann et al., 2022; Tišler et al., 2009) y en plantas no-blanco de los bordes dado que, por ser relativamente solubles en agua, son absorbidos fácilmente vía raíces u hojas (Bonmatin et al., 2014; Hladik et al., 2014), llegando a estar presente en el polen y néctar (Bonmatin et al., 2005; Pohorecka et al., 2012). Su presencia se ha extendido a los animales y humanos, encontrándose residuos de neonicotinoides en abejas (Codling et al., 2018), plumaje de aves paseriformes (Hao et al., 2018; Humann-Guillemint et al., 2019b), nidos de gorriones (Chaudhry, 2019), fluídos cloacales de colibríes (Bishop et al., 2020), plumaje de aves marinas (Distefano et al., 2022), plumas y sangre de rapaces (Byholm et al., 2018; Humann-Guillemint et al., 2021; Taliansky-Chamudis et al., 2017), hígado de codornices silvestres (Ertl et al., 2018; Turaga et al., 2016), buchec, mollejas e hígado de perdices y palomas (Berny et al., 1999), huevos de perdices (Bro et al., 2016), plasma e hígado de aves de tierras de cultivo (Lennon et al., 2020, 2020a), gránulos fecales e hígado de gallos de las praderas (Roy y Chen, 2022), leche (Seccia et al., 2008), músculo e hígado de bovinos (Xiao et al., 2011), agua de grifo (Zhang et al., 2021), alimentos (Craddock et

al., 2019) y orina humana (Pan et al., 2022; Zhang y Lu, 2022), entre otras posibles muestras biológicas.

Varias investigaciones alertan sobre impactos directos e indirectos de los neonicotinoides sobre un amplio rango de especies no blanco de invertebrados (Cavallaro et al., 2017; de Lima e Silva et al., 2021; Pisa et al., 2015; Ritchie et al., 2019; van Dijk et al., 2013; Vijver y Van Den Brink, 2014) y vertebrados (Gibbons et al., 2015; Mineau y Callaghan, 2018; Pisa et al., 2021). Los neonicotinoides también son considerados responsables, al menos en parte, del colapso general de la entomofauna europea (van Lexmond et al., 2014) y, como efecto en cadena, de declives poblacionales de aves insectívoras (Hallmann et al., 2014).

El efecto de los neonicotinoides sobre abejas y polinizadores ha sido uno de los principales temas de controversia con este grupo de químicos, con trabajos que los eximirían de ser los principales culpables del declive de colonias de abejas y otros polinizadores (Cutler y Scott-Dupree, 2014; Codling et al., 2018; Cresswell et al., 2012; Flores et al., 2021; Staveley et al., 2014) y trabajos que muestran los impactos negativos de los neonicotinoides sobre este importante grupo biológico, vital para el desarrollo sustentable y la seguridad alimentaria (Alburaki et al., 2015; Batista et al., 2022; Colgan et al., 2019; Di Prisco et al., 2013; Fischer et al., 2014; Larson et al., 2013; Main et al., 2021; Matsumoto, 2013; Pilling et al., 2013; Pistorius et al., 2015; Sanchez-Bayo y Goka, 2014; Sandrock et al., 2014; Scholer y Krischik, 2014; Tosi et al., 2017; Tsvetkov et al., 2017; Van der Sluijs et al., 2013; Whitehorn et al., 2012; Williamson et al., 2014; Woodcock et al., 2021; Wu et al., 2017, entre otros). Considerando estos efectos sobre las abejas y polinizadores, la Unión Europea (UE) restringió el uso de imidacloprid, tiametoxam y clotianidin (Fig. 11) a cultivos atractivos para las abejas (incluidos el maíz, la colza y el girasol) con la excepción de los usos en invernaderos, de tratamiento de algunos cultivos después de la floración y de cereales de invierno. También se modificaron las condiciones de aprobación de las sustancias activas imidacloprid, clotianidin y tiametoxam mediante tres reglamentos publicados en el Diario Oficial de la Unión Europea el 30 de mayo de 2018. Tras las restricciones de los tres neonicotinoides en 2013, varios Estados miembros han concedido autorizaciones de emergencia para algunos de los usos restringidos (sitio de la Comisión Europea sobre neonicotinoides: <https://tinyurl.com/mryj88dv>).

El principal modo de acción de los neonicotinoides consiste en unirse a los receptores de acetilcolina nicotínicos del sistema nervioso central de los invertebrados (Casida y Durkin, 2013; Matsuda et al., 2001). En concentraciones bajas causan estimulación nerviosa, y en concentraciones altas bloquean los receptores, produciendo parálisis y muerte en los insectos (Tomizawa y Casida, 2004). Los vertebrados son menos

susceptibles que los artrópodos a los insecticidas neonicotinoides porque sus receptores nicotínicos presentan menor afinidad a estos químicos (Tomizawa y Casida, 2004). Pero los estudios de toxicidad aguda con neonicotinoides en aves (Tabla I1) muestran que la toxicidad relativa varía tanto entre productos como entre especies (Gibbons et al., 2014). Según las dosis letales medias (DL50), los neonicotinoides pasan de altamente tóxicos (ej, imidacloprid en *Perdix perdix*) a prácticamente no tóxicos (ej, clotianidin en *Colinus virginianus*) para aves. Dadas estas diferencias, una de las críticas al sistema de evaluación de riesgos de plaguicidas en aves es que, aunque se aplican factores de seguridad, se subestimaría el riesgo para las especies más sensibles (Luttik et al., 2011). Por tal motivo, es importante contar con datos de DL50 de aves de diferentes familias y lugares para lograr evaluaciones realistas, considerando que la intoxicación aguda puede ser factible ya que existen reportes de envenenamiento agudo de aves por neonicotinoides (Botha et al., 2018; Millot et al., 2017; Rogers et al., 2019).

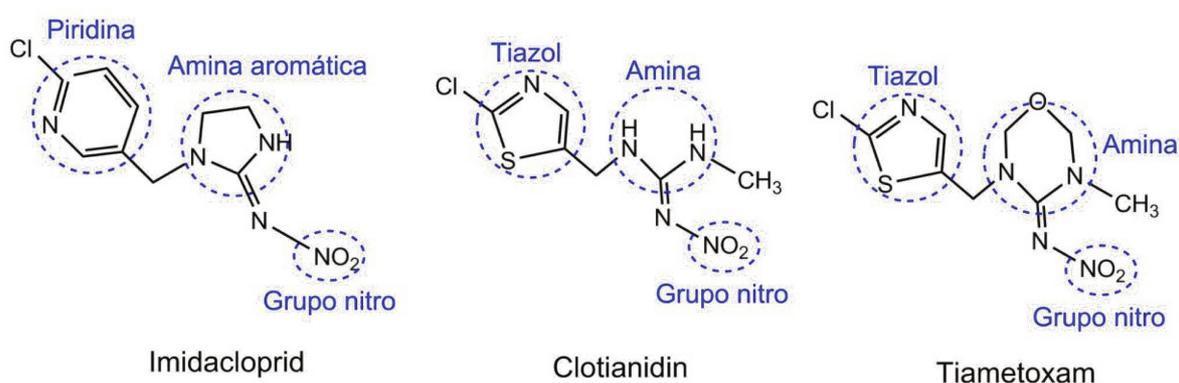


Fig. I.1. Estructura química de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.

Tabla I.1. Dosis letales medias (DL50) de tres neonicotinoides de uso frecuente en distintas especies de aves.

Especie de ave	Neonicotinoide (mg i.a./kg PC)		
	imidacloprid	clotianidin	tiametoxam
Ánade azulón (<i>Anas platyrhynchos</i>)	283 ^d	>752 ^d	
Canario (<i>Serinus canaria</i>)	25-50 ^d		
Codorniz japonesa (<i>Coturnix japonica</i>)	31 ^a	423 ^b	576 ^c
Colín de Virginia (<i>Colinus virginianus</i>)	152 ^a	>2000 ^b	1552 ^c
Gorrión común (<i>Passer domesticus</i>)	41 ^d		
Paloma doméstica (<i>Columba livia</i>)	25-50 ^d		
Perdiz pardilla (<i>Perdix perdix</i>)	14 ^d		

Fuentes: ^aTomlin CDS, 2004; ^bRexrode et al., 2003; ^cMineau y Palmer, 2013; ^dGibbons et al., 2014.

En cuanto a efectos subletales, los estudios realizados en aves muestran que el imidacloprid presenta los valores más bajos de efectos adversos no observables (NOAEL) respecto al resto de los neonicotinoides estudiados (Mineau y Palmer, 2013). Además de poder causar la muerte, distintas formulaciones de imidacloprid producen disminución de la condición corporal y de la respuesta inmune celular, estrés oxidativo, hepatotoxicidad y cambios en parámetros bioquímicos y hematológicos y alteraciones reproductivas (Abu Zeid et al., 2019; Balani et al., 2011; Ivanova et al., 2013; Kammon et al., 2010; Lopez-Antia et al., 2015; Lopez-Antia et al., 2013; Pandey y Mohanty, 2015; Rawi et al., 2019). Para el resto de los neonicotinoides, los estudios son más escasos. Un estudio de exposición subcrónica de aves a tiametoxam informó sobre cambios hematológicos significativos (Ivanova et al., 2013), en tanto que estudios similares con clotianidin informan sobre efectos en la fertilidad y el desarrollo embrionario de codornices japonesas (Tokumoto et al., 2013), así como adelgazamiento de la cáscara del huevo (Rexrode et al., 2003). Un efecto subletal poco evaluado es la posible alteración que podrían causar los neonicotinoides sobre comportamientos complejos de las aves, como por ejemplo el comportamiento de defensa contra depredadores, teniendo en cuenta que existe evidencia considerable que demuestra que los contaminantes químicos pueden afectar el comportamiento de la vida silvestre (Clotfelter et al., 2004; Ford et al., 2021; Saaristo et al., 2018; Zala y Penn, 2004), incluyendo los plaguicidas en las aves (de Souza et al., 2018; Eng et al., 2019, 2017; Grue et al., 1997; Ottinger et al., 2005; Peakall, 1985; Walker, 2003).

Dado que el consumo de semillas tratadas con neonicotinoides por parte de aves es una ruta potencial de intoxicación (Goulson, 2013; Mason et al., 2013; Mineau y Palmer, 2013; van Lexmond et al., 2014), otro comportamiento conveniente de estudiar es la evitación de comida tratada con neonicotinoides, ya que la evitación de alimento es un comportamiento que resulta en una reducción de la cantidad ingerida (M'Kay et al., 1999). La evitación de un alimento puede originarse por neofobia o por la presencia de un compuesto químico que produce un rechazo (Reidinger Jr y Mason, 1983). Ese rechazo puede ser inmediato, por reflejo (causado por olor o sabor desagradable y/o por irritación mediada por los receptores del nervio trigeminal de la cavidad oral-nasal), o puede requerir un aprendizaje mediante aversión condicionada. La aversión condicionada implica que el ave se alimenta del material tratado, siente un malestar post-ingestional y asocia ese malestar a alguna característica del alimento como color, olor o sabor y decide evitarlo (Sayre y Clark, 2001). Se presume que la respuesta a varios plaguicidas sería mediante este último mecanismo de rechazo, entre ellos algunos neonicotinoides como es el caso del imidacloprid (Lopez-Antia et al., 2014). Por otro lado, el grado de evitación a un compuesto depende de varios factores: la especie, el sexo, la edad, el tamaño del grupo,

las interacciones sociales, la experiencia previa, el tipo de comida, la privación previa de comida, las limitaciones del tiempo de alimentación durante el período de exposición, el color de la comida tratada, el tipo de comida alternativa disponible, el número de elecciones disponibles, la temperatura ambiente, el riesgo de predación percibido, el método de presentación del material tratado, la regurgitación, y el pelado o no de la cáscara (Avery, 1994; Avery et al., 1995; Bennett, 1989b, 1989a; Espailat y Mason, 1990b, 1990a; Fryday et al., 2001, 1999, 1998; Greig-Smith, 1987; Greig-Smith y Rowney, 1987; Kononen et al., 1987, 1986; Mason y Bonwell, 1993; Mason y Reidinger, 1982; Pascual et al., 1999a, 1999b; Reidinger Jr y Mason, 1983; Schafer Jr. et al., 1983; Werner et al., 2009). Potencialmente, el comportamiento de evitación limita la exposición y el riesgo de las aves a los plaguicidas aversivos. Estudios realizados con aves en cautiverio presentan al imidacloprid como un repelente efectivo y de mínimo peligro para las aves (Avery et al., 1993, 1997, 1994). En cuanto a clotianidin, Barfknecht (1998 a, b y 2000, citados en Mineau y Palmer, 2013) informan sobre una evitación completa a semillas tratadas por parte de codornices y palomas domésticas cuando cuentan con alimento alternativo, y una evitación parcial en palomas cuando sólo se les ofrece semillas tratadas. Sin embargo, para Mineau y Palmer (2013) y Goulson (2013), la evitación de semillas tratadas no ha sido suficientemente bien demostrada en un contexto realista para creer que mitigará un riesgo toxicológico alto. Es importante, entonces, profundizar en el estudio del comportamiento de evitación en contextos realistas, tanto en condiciones controladas (asegurando el estado de hambre) como en campo, para decidir considerarlo en las evaluaciones de riesgo de plaguicidas para aves porque, aunque la evitación pueda ser parcial, variable y dependiente del contexto, es necesario determinarla (OECD, 2011).

Además de conocer el papel de la evitación en la exposición de las aves a los neonicotinoides, conocer la cantidad de semillas tratadas disponibles para las aves y la proporción que ingieren de las mismas es importante para caracterizar adecuadamente la exposición y el riesgo de las aves a estos químicos. En los últimos años, varios estudios llevados a cabo en Europa y América del Norte han contribuido con valiosa información de campo respecto al número de semillas tratadas sin enterrar que quedan disponibles para las aves después de la siembra de los cereales de invierno en España (Lopez-Antia et al., 2016) y Reino Unido (de Montaigu y Goulson, 2022; Lennon et al., 2020), y de cereales y oleaginosas de verano en EE.UU. (Roy et al., 2019a) y Canadá (McGee et al., 2018), mostrando considerables diferencias en la densidad de semillas sin enterrar en entre cultivos y entre países. Factores como tipo de sembradora, experiencia del operador, condición del suelo, rastros, lluvia, tamaño de la semilla, profundidad de perforación, velocidad de trabajo durante la siembra, cultivo y sitio del lote (cabecera o interior) incidirían

en que haya más o menos semillas sin enterrar (De Snoo y Luttik, 2004; Mineau y Palmer, 2013; Pascual et al., 1999c). En cuanto a la ingestión de esas semillas por parte de las aves, López-Antia et al (2016) y Lennon et al (2020) informan haber observado 30 y 11 especies de aves, respectivamente, consumiendo semillas de cereales de invierno en los campos recién sembrados, alcanzando estas semillas más del 50% de la dieta en el caso de la perdiz roja (Lopez-Antia et al., 2016). Un número intermedio de especies de aves (16) se observó consumiendo semillas tratadas con neonicotinoides en derrames simulados de cultivos estivales (maíz y soja) en EE.UU. (Roy y Coy, 2020). En cambio, se informa la presencia de sólo 8 especies de aves en campos de Canadá, de las cuales sólo dos individuos consumieron una semilla cada uno de maíz tratado con clotianidin (McGee et al., 2018). Estas diferencias llevan a preguntarse acerca de cuál es la situación de los cultivos del hemisferio Sur y hasta qué punto estos datos de semillas tratadas y aves expuestas son extrapolables a escenarios sudamericanos, en los cuales también el uso de neonicotinoides está extendido. En Argentina, todas las semillas de maíz y gran parte de las semillas de sorgo se venden ya tratadas con principalmente clotianidin y tiametoxam. Las semillas de sorgo que se venden sin tratar son tratadas por el productor, generalmente con imidacloprid. En los cultivos de soja de Entre Ríos, en cambio, un porcentaje variable de productores (entre 0% y 50%, según la localidad) tratan las semillas con neonicotinoides (com. pers. con extensionistas de las Agencias de Extensión Rural de INTA Crespo, Diamante, Victoria y Nogoyá y asesores técnicos de la Cooperativa “La Agrícola Regional” de Crespo, provincia de Entre Ríos).

El riesgo se define como la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos como resultado de la exposición a una sustancia, entendiendo como efectos adversos a los cambios que alteran atributos funcionales o estructurales de la entidad estudiada (Norton et al., 2003). La evaluación de riesgo es un proceso secuencial que implica, por un lado, la evaluación de los efectos y, por otro lado, la evaluación de la exposición y, finalmente, la caracterización del riesgo. La evaluación de los efectos implica la identificación de los efectos adversos que causa la sustancia y la estimación de la relación entre la dosis o nivel de exposición a la sustancia y la incidencia y severidad de un efecto. La evaluación de la exposición consiste en estimar la dosis o concentración a la cual la población estudiada está o puede estar expuesta. Finalmente, la caracterización del riesgo es la estimación de la incidencia y severidad de los efectos adversos que probablemente ocurran en la población estudiada debido a la exposición actual o predicha a la sustancia (European Commission, 2003). La cantidad y calidad de la información de soporte en cada etapa del proceso es fundamental para evitar sub- o sobre-estimaciones del riesgo. Con la idea de contribuir con información de soporte para las evaluaciones de riesgo, los dos primeros

capítulos de esta tesis están abocados a responder preguntas más vinculadas al peligro de los neonicotinoides para las aves y los tres últimos a responder preguntas vinculadas a la exposición de aves a neonicotinoides a través de las variables descritas en la Tabla I2.

Por lo tanto, en función del amplio uso de los neonicotinoides tanto a nivel global como local, y de los antecedentes sobre sus impactos sobre aves en escenarios europeos y norteamericanos, aquí presentamos estudios que amplían el entendimiento sobre los efectos letales, no letales (comportamiento antipredador) y de evitación que producen los neonicotinoides, así como el grado de exposición de las aves a través de semillas tratadas en un escenario sudamericano, determinando la densidad de semillas disponibles después de la siembra de maíz, sorgo y soja, la proporción de estas semillas ingerida por una especie focal y su tasa de exposición tóxica. La torcaza (*Zenaida auriculata*) fue la especie elegida como modelo experimental de ave silvestre granívora sudamericana para los estudios de toxicidad aguda y evitación, y como especie focal en el campo, dado su tipo de dieta, su abundancia en la región, su facilidad de captura, su relativa fácil visualización en el campo y su ecología y biología más conocida que la de otras aves locales (Bucher, 1982; Bucher y Nores, 1976; Bucher y Ranvaud, 2006; Calvo-Silvera, 2006; Cândido Jr et al., 2008; Dardanelli et al., 2012; Murton et al., 1974; Ranvaud et al., 2001a).

Tabla I.2. Variables medidas para contestar las preguntas de cada capítulo de la tesis, vinculadas al peligro (efectos), a la exposición (concentración química) y al riesgo.

	 Peligro	∩	 Exposición	=	Riesgo
Cap. 1	¿Cómo es la toxicidad aguda de distintos NNI en la torcaza?				
	<ul style="list-style-type: none"> • Muerte (DL50, LT50) • Aparición e intensidad de signos de intoxicación y tiempo de recuperación • Variación PC • Consumo alimento (anorexia) 		<ul style="list-style-type: none"> • Formulaciones de imidacloprid, clotianidin o tiametoxam administradas por gavage a torcazas 		<ul style="list-style-type: none"> • Consumo diario promedio de sorgo • Semillas (masa y nº) de maíz, sorgo y soja que alcanzan las DL50
Cap. 2	Imidacloprid a dosis subletales ¿afecta el comportamiento antidepredador en perdices?				
	<ul style="list-style-type: none"> • Variación del comportamiento antidepredador 		<ul style="list-style-type: none"> • Imidacloprid por gavage a perdices rojas 		
Cap. 3	Semillas y cotiledones tratados con NNI ¿producen evitación “protectora” en torcazas cautivas?				
	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo alimento de prueba (evitación de alimento tratado) • Consumo alimento mantenimiento (anorexia) • Muerte • Signos de intoxicación • Variación SMI y PC • Estrés oxidativo y Hto 		<ul style="list-style-type: none"> • Residuos de neonicotinoide en alimentos de prueba (sorgo, soja o cotiledones de soja) ofrecidos a torcazas y tratados con formulaciones de neonicotinoides o en origen 		
Cap. 4	En el campo, las aves ¿evitan semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid?				
	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de semillas sin enterrar/m² después de la siembra (evitación de semillas tratadas) • Cantidad de cotiledones faltantes/m (evitación de cotiledones tratados) 		<ul style="list-style-type: none"> • Residuos de neonicotinoides en semillas de soja tratadas sin enterrar/m² • Residuos de neonicotinoides en cotiledones de soja tratados • Abundancia y riqueza de aves en campo experimental del INTA Paraná 		<ul style="list-style-type: none"> • TER agudo refinado • Área de forrajeo problema • Tiempo de forrajeo problema
Cap. 5	De las semillas tratadas en campo, ¿cuál es su concentración de NNI, cuántas quedan disponibles para las aves y en qué proporción son ingeridas por torcazas?				
			<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de semillas sin enterrar/m² (maíz, sorgo y soja) después de la siembra y variables que influyen en su nº. • Residuos neonicotinoides en semillas no enterradas • Abundancia y riqueza de aves en campos comerciales de maíz, sorgo y soja de Paraná y Diamante • Contenido de semillas de cultivos y de residuos de neonicotinoides en en t.g.i de torcazas cazadas en Paraná y Diamante 		<ul style="list-style-type: none"> • TER agudo nivel 1 • TER agudo refinado

NNI: insecticidas neonicotinoides. DL50: dosis letal media. LT50: Tiempo de muerte medio. PC: peso corporal. SMI: Índice de masa escalonada. TER: Índice de exposición tóxica. INTA: Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria. Hto: hematocrito.

Hipótesis



Hipótesis generales

- 1) El peligro de los “curasemillas” neonicotinoides para las aves granívoras aumenta en la medida que aumenta la toxicidad de la formulación
- 2) La exposición de las aves granívoras a “curasemillas” neonicotinoides aumenta en la medida que aumenta la cantidad de químico ingerido

Hipótesis de trabajo y predicciones derivadas

Hipótesis de trabajo 1: La toxicidad oral aguda de los “curasemillas” neonicotinoides evaluada en torcazas difiere entre principios activos.

Predicción 1: La DL50 del “curasemilla” neonicotinoide en torcazas, los signos de intoxicación, los efectos sobre el PC y el consumo de alimento difieren según el principio activo ingerido.

Hipótesis de trabajo 2: La exposición de perdices rojas a imidacloprid afecta el comportamiento antipredador de las mismas.

Predicción 2: Las respuestas activas y pasivas a estímulos de riesgo de depredación varían entre perdices rojas dosificadas o no con dosis subletales de imidacloprid.

Hipótesis de trabajo 3: Los cultivos tratados con “curasemillas” neonicotinoides producen comportamiento de evitación en torcazas cautivas

Predicción 3: El consumo de semillas y cotiledones tratados con neonicotinoides es menor que el de semillas y cotiledones sin tratar.

Hipótesis de trabajo 4: Imidacloprid agregado como curasemilla en soja a campo produce en las aves un comportamiento de rechazo a semillas y cotiledones tratados

Predicción 4: El número de semillas sin enterrar y de cotiledones sin daño por aves es mayor en parcelas tratadas que en las no tratadas con imidacloprid.

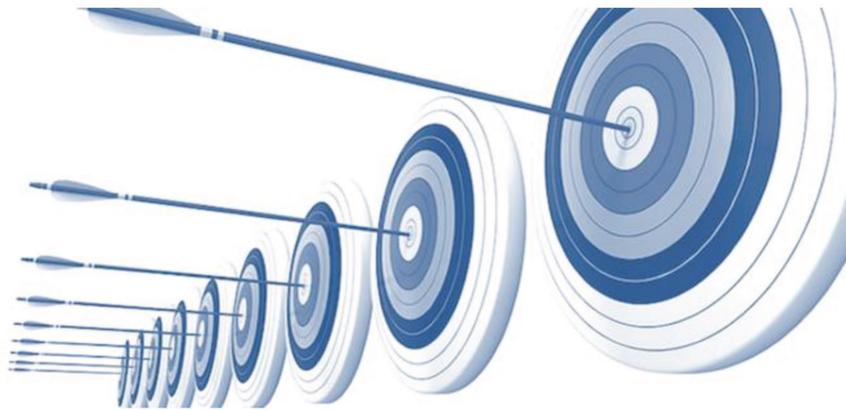
Hipótesis de trabajo 5: La exposición de las aves granívoras a “curasemillas” neonicotinoides aumenta en la medida en que aumenta la cantidad de semillas tratadas expuestas en el suelo luego de la siembra de un cultivo y la cantidad de residuos de neonicotinoides ingeridos.

Predicción 5a: Las semillas tratadas no debidamente enterradas luego de la siembra de maíz, sorgo y soja constituyen una ruta de exposición a neonicotinoides para las aves granívoras.

Predicción 5b: Amplio número de especies e individuos de aves comedoras de semillas están presentes dentro de los campos recién sembrados

Predicción 5c: Las torcazas cazadas contienen semillas de cultivos y neonicotinoides en sus tractos gastrointestinales.

Objetivos del trabajo



Objetivo general

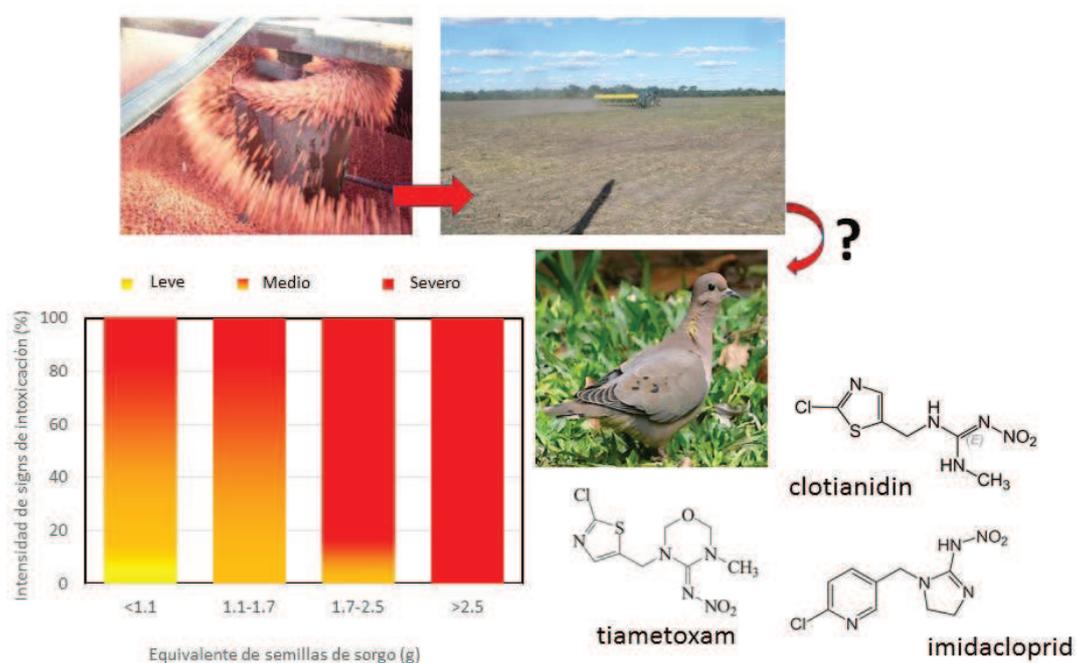
Evaluar la exposición y el peligro para aves granívoras por la ingesta de semillas tratadas con neonicotinoides.

Objetivos específicos (ordenados según los capítulos)

1. Evaluar la toxicidad oral aguda de formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam en torcazas.
2. Evaluar el comportamiento de perdices rojas tratadas con imidacloprid ante estímulos de amenaza predatoria.
3. Evaluar el comportamiento de evitación en aviario de torcazas expuestas a cotiledones y semillas de soja tratadas con imidacloprid y a semillas de sorgo tratadas con imidacloprid, clotianidin y/o tiametoxam
4. Evaluar el comportamiento de evitación en campo de las aves a cotiledones provenientes de semillas de soja tratadas con imidacloprid
5. Estimar la cantidad de semillas que quedan en el suelo disponibles para las aves luego de una siembra de maíz, soja y sorgo en lotes comerciales. Evaluar la presencia de neonicotinoides y de semillas de cultivos en bucheros de torcazas medianas cazadas cerca de los lotes evaluados.

CAPÍTULO 1

Toxicidad oral aguda de imidacloprid, tiametoxam y clotianidin en torcazas



Publicación derivada:

Addy-Orduna, L.M., Brodeur, J.C., Mateo, R., 2019. Oral acute toxicity of imidacloprid, thiamethoxam y clothianidin in eared doves: A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds. *Science of The Total Environment* 650, 1216–1223.

Resumen

Recientemente se ha demostrado que los neonicotinoides causan impactos negativos directos en las aves de América del Norte y Europa. Para comprender mejor el impacto de estos compuestos en las especies de aves y mejorar las capacidades de evaluación de riesgos, el estudio actual determinó las toxicidades agudas de las formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam en torcazas de América del Sur (*Zenaida auriculata*). Los insecticidas se administraron por sonda intragástrica a torcazas adultas para determinar las dosis letales medias (DL50) de acuerdo con un procedimiento secuencial estandarizado. La toxicidad aguda de la formulación de imidacloprid (DL50=59 mg i.a./kg PC) fue mucho mayor que la de las formulaciones probadas de clotianidin (DL50=4248 mg i.a./kg PC) y tiametoxam (DL50=4366 mg i.a./kg PC). El imidacloprid también difirió de los otros dos neonicotinoides en términos de la aparición e intensidad de los signos de intoxicación y los tiempos de muerte y recuperación. Los tres insecticidas indujeron una reducción en el consumo de alimentos que condujo a la pérdida de peso corporal. Una torcaza de peso medio de 127 g obtendría una dosis equivalente a la DL50 de imidacloprid consumiendo 1,7 g de semillas de sorgo tratadas. Como a las torcazas se les ofreció semillas de sorgo no tratadas durante 5 h por día consumiendo en promedio $6,4 \pm 1,8$ g (media \pm DE), se concluye que estas torcazas podrían estar expuestas a dosis letales en el campo. Este trabajo es el primero en describir los signos de intoxicación e informar la DL50 de neonicotinoides en una especie de ave silvestre de América del Sur.

Introducción

Los neonicotinoides son la clase comercialmente más importante de insecticidas introducidos en el mercado global después de los piretroides (Jeschke et al., 2011). En Argentina, como en otros países, los neonicotinoides imidacloprid, clotianidin y tiametoxam están registrados para su uso en muchos cultivos y se emplean con frecuencia como tratamientos de semillas (Simon-Delso et al., 2015). Las formulaciones de imidacloprid (60% p/v) se registran como tratamiento de semillas (entre otros usos) para soja (0,3-0,4 mg i.a./g semilla), sorgo (4,5 mg i.a./g semilla) y maíz (3,0-4,5 mg i.a./g semilla). Por su parte, clotianidin (60% p/v) se utiliza como tratamiento de semillas para sorgo (1,8-3,0 mg i.a./g semilla) y maíz (0,9-1,5 mg i.a./g semilla), y tiametoxam (60% p/v) para soja (0,4-0,7 mg i.a./g semilla), sorgo (1,5-1,8 mg i.a./g semilla) y maíz (1,2-2,1 mg i.a./g semilla) (CASAFE, 2013). Además, imidacloprid se usa a veces como "repelente" para palomas en semillas de soja (1,2 mg i.a./g semilla, comunicación personal de los

agrónomos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Teniendo en cuenta que 101 incidentes de mortalidad de la vida silvestre, incluidas tres especies de palomas, se han relacionado recientemente con el tratamiento de semillas con neonicotinoides (Millot et al., 2017), esta práctica puede necesitar ser reconsiderada como "control letal" en lugar de "repelencia".

Los neonicotinoides son neuroactivos y actúan como agonistas en múltiples subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (Casida y Durkin, 2013; Matsuda et al., 2001). Poseen una alta afinidad por los receptores nicotínicos de los insectos y una pobre penetración de la barrera hematoencefálica en los mamíferos (Sheets et al., 2016; Tomizawa y Casida, 2005). Son insecticidas sistémicos y generalmente tienen una larga persistencia en el suelo (50 a 545 días), una solubilidad en agua relativamente alta y un considerable potencial de escorrentía y lixiviación (Lewis et al., 2016). En muchos países se ha confirmado una extensa contaminación neonicotinoide del suelo y el agua, especialmente en Estados Unidos y Canadá (Hladik y Kolpin, 2016; Limay-Rios Victor et al., 2015).

Debido a su amplio uso y alto potencial de distribución en el ambiente, los neonicotinoides pueden causar impactos directos e indirectos en varias especies no objetivo, incluidas las aves (Chagnon et al., 2015; Eng et al., 2017; Gibbons et al., 2015; Goulson, 2014; Hladik y Kolpin, 2016; Mason et al., 2013; Mineau y Palmer, 2013; Sanchez-Bayo y Goka, 2014; van der Sluijs et al., 2015). En las aves, se ha demostrado que los neonicotinoides causan efectos directos o indirectos. El colapso de las poblaciones de invertebrados de las que se alimentan las aves, representan un efecto indirecto de los neonicotinoides (Hallmann et al., 2014; van Lexmond et al., 2014). Por otro lado, pueden ocurrir efectos directos a través de la ingestión de invertebrados contaminados, semillas tratadas (Elbert et al., 2008; Goulson, 2013), o a través de otras vías de exposición (como la vía dérmica) que normalmente no se tienen en cuenta en la evaluación del riesgo (Mineau, 2011).

La toxicidad aguda de los insecticidas neonicotinoides, medida como la dosis letal media (DL50), varía entre los productos y las especies de aves (Gibbons et al., 2015). Los valores de DL50 notificados para las aves oscilan entre 14 y 450 mg/kg PC para el imidacloprid, de 423 a >2000 mg/kg PC para clotianidin y de 576 a 1552 mg/kg PC para el tiametoxam (Gibbons et al., 2015; Mineau y Palmer, 2013; Rexrode et al., 2003; Tomlin CDS, 2004). Sin embargo, como pocas especies de aves se prueban típicamente, es difícil derivar de la literatura la verdadera variación de las respuestas de la amplia gama de especies de aves (Gibbons et al., 2015). Además, la toxicidad de los productos formulados

puede diferir de la del ingrediente activo, porque los aditivos suelen facilitar la absorción del ingrediente activo por los organismos.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad oral aguda en torcazas (*Zenaida auriculata*) de tres neonicotinoides ampliamente utilizados (imidacloprid, clotianidin y tiametoxam) en su forma formulada. También se estimó la cantidad de semillas de soja, sorgo y maíz que podrían producir intoxicación aguda, y se calculó el consumo diario de semillas de sorgo no tratadas para evaluar el riesgo de intoxicación. Finalmente, también compilamos datos sobre la aparición y evolución de los signos de intoxicación subletal, ya que Mineau y Palmer (2013) sugirieron que el debilitamiento severo podría ocurrir a exposiciones a neonicotinoides mucho más bajas que las dosis letales reportadas. La torcaza es una abundante ave granívora sudamericana que es fácil de capturar y se adapta bien al cautiverio. Estudios sobre el contenido estomacal de las torcazas demostraron previamente que esta especie consume semillas de cultivos que pueden ser tratados con neonicotinoides como sorgo, girasol, trigo y maíz (Bucher y Nores, 1976; Calvo-Silvera, 2006; Murton et al., 1974). Las semillas de soja y los cotiledones de las plantas de soja recientemente emergidas también son consumidos por estas torcazas (Ranvaud et al., 2001a).

Materiales y métodos

Químicos

Las formulaciones de insecticidas probadas utilizadas fueron IMIDA NOVA® 60 (600 mg/ml de imidacloprid, NOVA®, lote nº 130), PONCHO 60 FS® (600 mg/ml de clotianidin, Bayer®) y CRUISER 60FS (600 mg/ml de tiametoxam, Syngenta®). Clotianidin y tiametoxam normalmente no se venden libremente y sólo se ponen a disposición de las empresas productoras de semillas. Por esta razón, en el estudio actual se utilizaron muestras de clotianidin y tiametoxam donadas por las compañías Bayer® y Syngenta®.

La concentración del principio activo en todas las formulaciones fue corroborada por un servicio contratado de análisis cromatográfico, Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría del Departamento de Ciencias Biológicas y Bioquímica de la Universidad Nacional del Litoral. El imidacloprid fue determinado por HPLC-DAD (Agilent 1100) equipado con una columna Varian-C18 de 150 × 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm a 35 °C, una fase móvil de agua:metanol (65:35) y un volumen de inyección de 5 µl. Las formulaciones de clotianidin y tiametoxam se determinaron mediante HPLC-DAD (Agilent 1100) equipado con una columna Eclipse XDB-C18 de 75 × 4,6 mm y un tamaño de

partícula de 5 µm a 35 ° C, una fase móvil de agua: metanol (70:30) y un volumen de inyección de 10 µl. La identificación y calibración se realizaron con estándares analíticos de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam (Pestanal, Sigma-Aldrich®). Las concentraciones medidas fueron de 613 ± 3 mg/ml (media ± SE) para imidacloprid, 443 ± 7 mg/ml para clotianidin y 464 ± 2 mg/ml para tiametoxam. Las dosis orales administradas se calcularon en base a estas concentraciones medidas.

Aves experimentales y condiciones de alojamiento

Las torcazas silvestres fueron capturadas con trampas de cebo en campos dentro de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná del INTA, bajo permisos de las autoridades provinciales (Resolución 1721 de la Dirección General de Recursos Naturales del Gobierno de la Provincia de Entre Ríos). Las torcazas capturadas fueron alojadas en recintos grupales (2 m de ancho × 9 m de largo × 2,5 m de altura), con hasta 70 aves por recinto, en un aviario ubicado dentro de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná. Las aves fueron pesadas e identificadas con un anillo de metal a su llegada, antes de ser puestas en cuarentena por un período de al menos un mes. El alojamiento de aves y el cuidado general se realizaron de acuerdo con las pautas publicadas con respecto al uso de aves silvestres en la investigación (Fair et al., 2010).

Dos semanas antes de la prueba, las aves fueron asignadas al azar a jaulas individuales (50 × 50 × 50 cm) y aclimatadas a las condiciones experimentales. A las aves se les ofreció mezcla comercial de semillas de paloma (una mezcla de trigo, maíz, sorgo, mijo y semilla de colza adquirida en "Forrajería Laurita" de Paraná), agua y arenilla *ad libitum*. La ventilación se controló para mantener las condiciones interiores de temperatura y humedad dentro de los rangos ambientales exteriores. El fotoperíodo, la temperatura y la humedad de la sala de pruebas se registraron diariamente. Todos los experimentos se realizaron bajo un permiso del Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (protocolo 232).

Diseño experimental

La toxicidad aguda oral de las formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam se determinó en torcazas de acuerdo con la Guía de prueba 223 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, 2009). Esta prueba es un procedimiento secuencial diseñado para minimizar el número de aves utilizadas. Un programa informático está disponible en la página web de la OECD para ayudar con la selección de dosis y estimar los límites de DL50, pendiente y confianza (Calculadora de

diseño secuencial, SEDEC versión 1.3, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/44050199.pdf>). En la Fig. 1.1 se muestra un diagrama que representa los diferentes pasos involucrados en el procedimiento (prueba límite y prueba completa). Para el imidacloprid, las etapas 1, 2 y 3b se realizaron previamente utilizando como referencia la DL50 en *Colinus virginianus* (152 mg/kg; Tomlin, 2004). La prueba límite y las etapas 2, 3a y 4 se realizaron para clotianidin, mientras que la prueba límite y las etapas 1, 2 y 3a se llevaron a cabo para tiametoxam. Para clotianidin, la prueba límite fue seguida por la etapa 2 porque sólo un individuo murió y se observaron signos de toxicidad en los sobrevivientes. Para tiametoxam, la prueba límite fue seguida por la etapa 1 porque todos los individuos dosificados murieron (Fig. 1.1A). Se utilizaron un total de 15 aves como controles: 5 para las etapas de la prueba de imidacloprid, 5 para las pruebas límite de tiametoxam y clotianidin, y 5 para las etapas restantes de las pruebas de clotianidin y tiametoxam. El número de individuos tratados fue de 24, 35 y 29 para imidacloprid, clotianidin y tiametoxam, respectivamente.

En cada etapa, las dosis de tratamiento se calcularon utilizando el software SEDEC y se administraron por sonda (gavage). Los volúmenes de dosis se calcularon en función de los pesos corporales individuales medidos 24 horas antes de la dosificación. Para prevenir la regurgitación, los volúmenes de dosis fueron los más pequeños posibles y nunca excedieron los 10 ml de formulación/kg PC (media \pm SE=6,7 \pm 0,3 ml/kg PC). Las aves tuvieron un ayuno de 12-15 horas durante la noche inmediatamente antes de la dosificación. Se utilizó agua como vehículo. Las aves control fueron dosificadas sólo con agua. Las aves se observaron continuamente durante las primeras dos horas después de la dosificación y tres veces más (12:00, 13:30 y 15:30 h) durante las primeras 24 horas. Luego se observaron tres veces al día (7:30, 11:30, 15:30 h) durante los dos días siguientes, y una vez al día durante el período restante de 14 días (7:30 h).

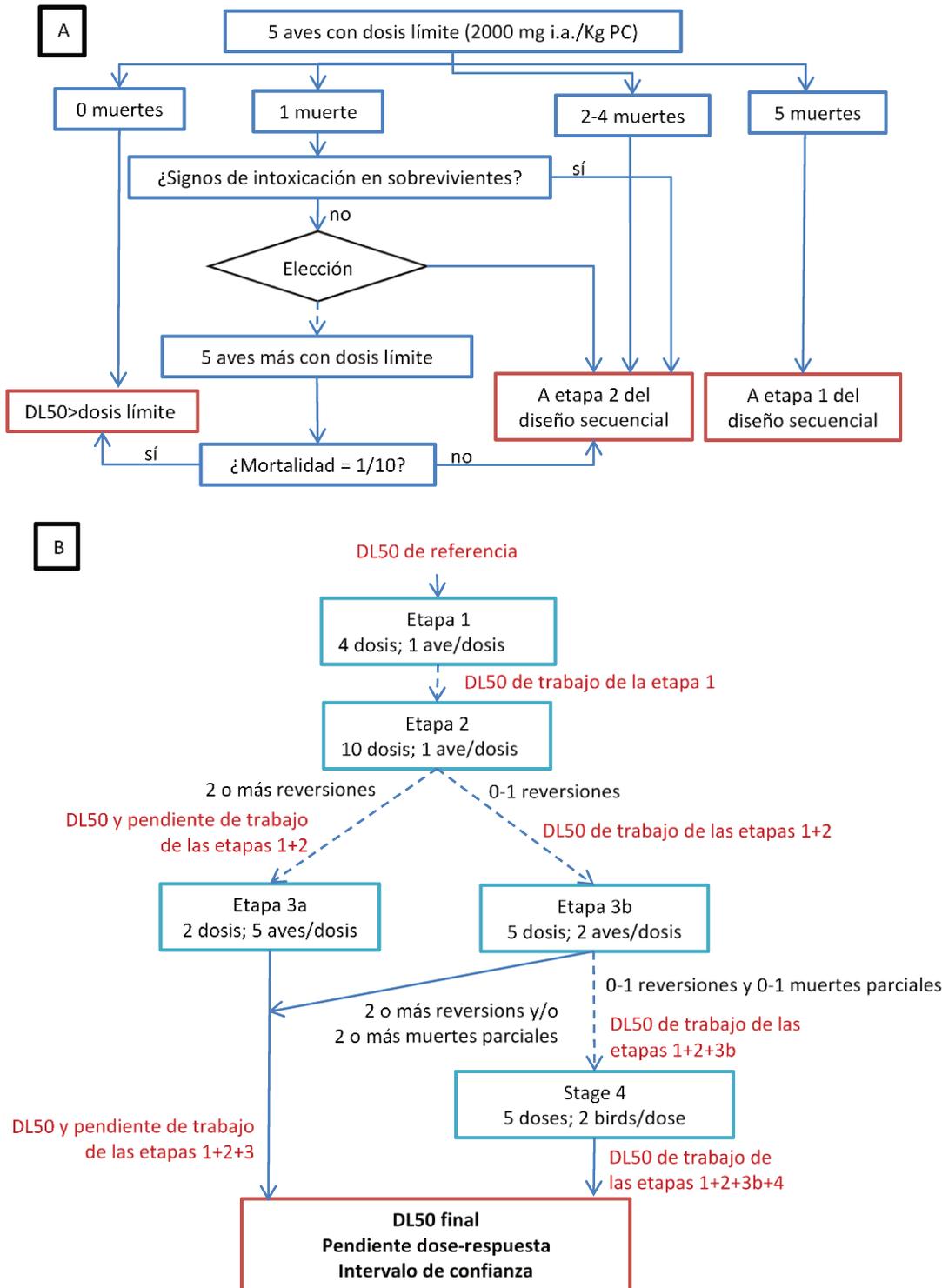


Fig. 1.1. Procedimiento de la prueba de dosis límite, dependiendo del número de muertes por dosis límite (A), y del diseño secuencial para la prueba de pendiente y DL50, dependiendo de las reversiones y las muertes parciales (B). Aves control no incluidas en estos diagramas. Adaptado de la Guía de Pruebas 223 de la OCDE (2009).

La mortalidad (número de muertes y tiempo de muerte), el inicio y la intensidad de los signos de intoxicación, el tiempo de recuperación, la regurgitación de la formulación, el consumo de alimentos y el peso corporal se registraron en todas las etapas. La mortalidad se registró durante los tres primeros días después del gavage y estos datos se utilizaron para calcular la DL50 y la pendiente de la curva dosis-respuesta. El tiempo hasta la muerte se expresó como el período de tiempo que dura desde el momento en que se dosificó un ave hasta el momento en que se observó su muerte. Los signos de intoxicación observados incluyeron falta de voluntad para moverse, apatía, plumas "esponjosas", alas caídas y ataxia. El inicio de los signos de intoxicación se registró como el período desde la dosificación hasta el primer signo de intoxicación observado. A medida que se siguió un procedimiento de subida y bajada, en muchos casos con un solo ave por dosis, se establecieron rangos de dosis arbitrariamente para comparar las variables medidas, manteniendo el número de individuos lo más equilibrado posible en cada rango. Para el imidacloprid, los rangos fijos fueron <40 mg/kg, 40-59 mg/kg, 60-90 mg/kg, y >de 90 mg/kg. A su vez, los rangos de dosis para clotianidin y tiametoxam consistieron en <1000 mg/kg, 1000-2000 mg/kg y >2000 mg/kg.

La intensidad de los signos de intoxicación se clasificó en tres niveles para cada neonicotinoide, de menor a mayor intensidad. El tiempo de recuperación correspondió al período que duró desde la dosificación hasta la ausencia de signos de intoxicación. Para detectar regurgitaciones de la formulación, se colocó un papel blanco en el fondo de las jaulas. El consumo de alimentos se registró en los días 1, 2, 3, 7, 10 y 14 después de la dosificación calculando la diferencia entre los alimentos ofrecidos y los restantes. Finalmente, el peso corporal de cada ave se midió con balanza analítica ($\pm 0,01$) antes de la dosificación y en los días 3, 7 y 14 después de la dosificación.

Número de semillas tratadas necesarias para alcanzar los DL50

La masa de semillas tratadas que necesitarían ser consumidas por las aves para alcanzar la DL50 se calculó como $(DL50 \cdot PC) / CT$, donde PC corresponde al peso corporal medio de las torcazas adultas y CT a la concentración teórica de neonicotinoides en semillas tratadas (mg i.a./g de semillas) según las dosis máximas recomendadas para su uso como insecticida o 'repelente'. Sobre la base de este valor, el número de semillas requeridas para alcanzar la DL50 se calculó utilizando la masa promedio de semillas de soja, sorgo y maíz. El PC se obtuvo de 853 torcazas adultas capturadas para los diversos experimentos realizados en el aviario de la Estación Experimental Paraná de agosto a febrero desde 2009 hasta 2016. La CT se calculó como la concentración nominal de la

formulación multiplicada por la tasa de uso máximo registrada. La concentración de la formulación se consideró de 600 mg i.a./ml (60% p/v, concentración nominal) ya que esta concentración es más común para las formulaciones de neonicotinoides (CASAFE, 2013). Las CT calculadas para imidacloprid fueron 4,5 mg i.a./g para sorgo y maíz, y 0,4 y 1,2 mg i.a./g de semilla en soja para uso insecticida y repelente, respectivamente. La CT de clotianidin en el sorgo fue de 3,0 mg i.a./g, mientras que para maíz fue de 1,5 mg i.a./g. Finalmente, la CT de tiametoxam fue de 0,7 mg i.a./g en soja, 1,8 mg i.a./g en sorgo y 2,1 mg i.a./g en maíz. El peso medio de la semilla se basó en el peso promedio de 100 semillas de soja (Super Soja NIDERA®), 100 semillas de sorgo blanco (JOWAR FOOD ©) y 250 semillas de maíz (DK73-10VT3P de Monsanto®). Para evaluar las posibles diferencias entre la cantidad teórica y la cantidad real de sustancias químicas presentes en las semillas después de un tratamiento convencional de semillas, 30 g de semillas de soja tratadas con 70 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 (60 % p/v imidacloprid) fueron analizadas por HPLC-DAD como se describió anteriormente para las formulaciones de plaguicidas.

Además, la cantidad calculada de semillas equivalente a los rangos fijos de dosis probadas se calculó como $(\text{dosis} \cdot \text{PC}) / \text{CT}$. La intensidad de los signos de intoxicación observados se expresó en términos de la ingestión de estas cantidades calculadas de semillas.

Consumo de semillas de sorgo no tratadas

Para determinar cuántas semillas de sorgo pueden comer normalmente las torcazas, el consumo de semillas se cuantificó en 25 torcazas mantenidas en jaulas individuales (diferentes de las utilizadas en la prueba de toxicidad aguda). Las aves se aclimataron a las jaulas individuales durante cuatro días antes de que comenzaran las mediciones. Considerando un escenario realista donde las aves vuelan a diferentes sitios para buscar alimento, se ofrecieron a las torcazas comederos con 15 g de semillas de sorgo (JOWAR FOOD ©) entre las 9:00 h y las 14:00 h, y 20 g de alimento de mantenimiento (mezcla comercial de semillas para palomas) desde las 14:00 h hasta las 7:30 h del día siguiente durante cinco días. El consumo diario de sorgo y alimentos de mantenimiento se midió durante tres días consecutivos calculando la diferencia entre los alimentos ofrecidos y los restantes, incluido el factor de humedad ($\text{alimentos consumidos} = \text{alimentos ofrecidos} + \text{factor de humedad} - \text{alimentos restantes}$). El factor de humedad se midió pesando tazas de comida no ofrecidas a las torcazas al final del período de exposición al alimento. Los pesos corporales de las aves se midieron al final del período de observación. También se consideró el peor de los casos en el que las aves sólo se alimentaban de semillas de sorgo.

Esta cantidad se calculó en base a la aparente energía metabolizable corregida para la retención de nitrógeno (AMEn) del sorgo (Sales y Janssens, 2003) y la tasa metabólica de campo (FMR) de las aves de bosque templado (Nagy et al., 1999).

Análisis de datos

Las pendientes de las curvas dosis-respuesta, las DL50 y sus límites de confianza del 95% se calcularon a través del software SEDEC. TL50 (tiempo requerido para producir el 50% de la mortalidad) se calculó utilizando el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Las diferencias en el tiempo hasta la muerte, el inicio de los signos de intoxicación, la intensidad de los signos de intoxicación y el tiempo hasta la recuperación se compararon entre las dosis para cada neonicotinoide utilizando una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando esta prueba indicó diferencias significativas, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para realizar comparaciones pareadas entre los rangos de dosis. Para probar la presencia de diferencias en la cantidad de alimentos consumidos entre los controles y los rangos de dosis fija de cada neonicotinoide, la normalidad de los datos de consumo se probó a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Luego, se realizó un modelo mixto lineal generalizado (MMLG) con medidas repetidas, fijando el consumo de alimentos como la variable dependiente, los rangos de dosis, los rangos de día y dosis * día como predictores, y la etapa y la jaula como efectos aleatorios.

Con respecto a los pesos corporales, la homogeneidad de la varianza y la normalidad se evaluaron mediante las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Para evaluar la presencia de diferencias significativas en los pesos corporales entre los rangos de dosis, se realizó un modelo mixto lineal generalizado (distribución normal, función de enlace de identidad) con mediciones repetidas (días 1, 3, 7 y 14 de cada etapa). El rango de dosis, días después de la dosificación, y la interacción de ambas variables se incluyeron como factores fijos, y la etapa y la jaula como factores aleatorios. La significación de todas las pruebas se estableció como $p < 0,05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con IBM SPSS Statistics 24.0.

Resultados

Mortalidad

La DL50 de la formulación de imidacloprid fue aproximadamente 70 veces menor que la de las formulaciones de clotianidin y tiametoxam (Tabla 1.1), lo que indica una mayor toxicidad aguda del imidacloprid que los otros dos neonicotinoides. El tiempo hasta la

muerte varió entre 1,75 a 8,00 horas para el imidacloprid, entre 0,92 a 1,95 días para el tiametoxam y entre 1,92 y 3,96 días para el clotianidin (Tabla 1.2). TL50 (\pm SE) de imidacloprid fue de $4,5 \pm 2,4$ horas a dosis entre 66-84 mg/kg y $7,0 \pm 1,6$ horas a dosis entre 95-1075 mg/kg. TL50 de tiametoxam fue de $22,5 \pm 17,4$ horas a dosis entre 1014-2000 mg/kg (Fig.1.2).

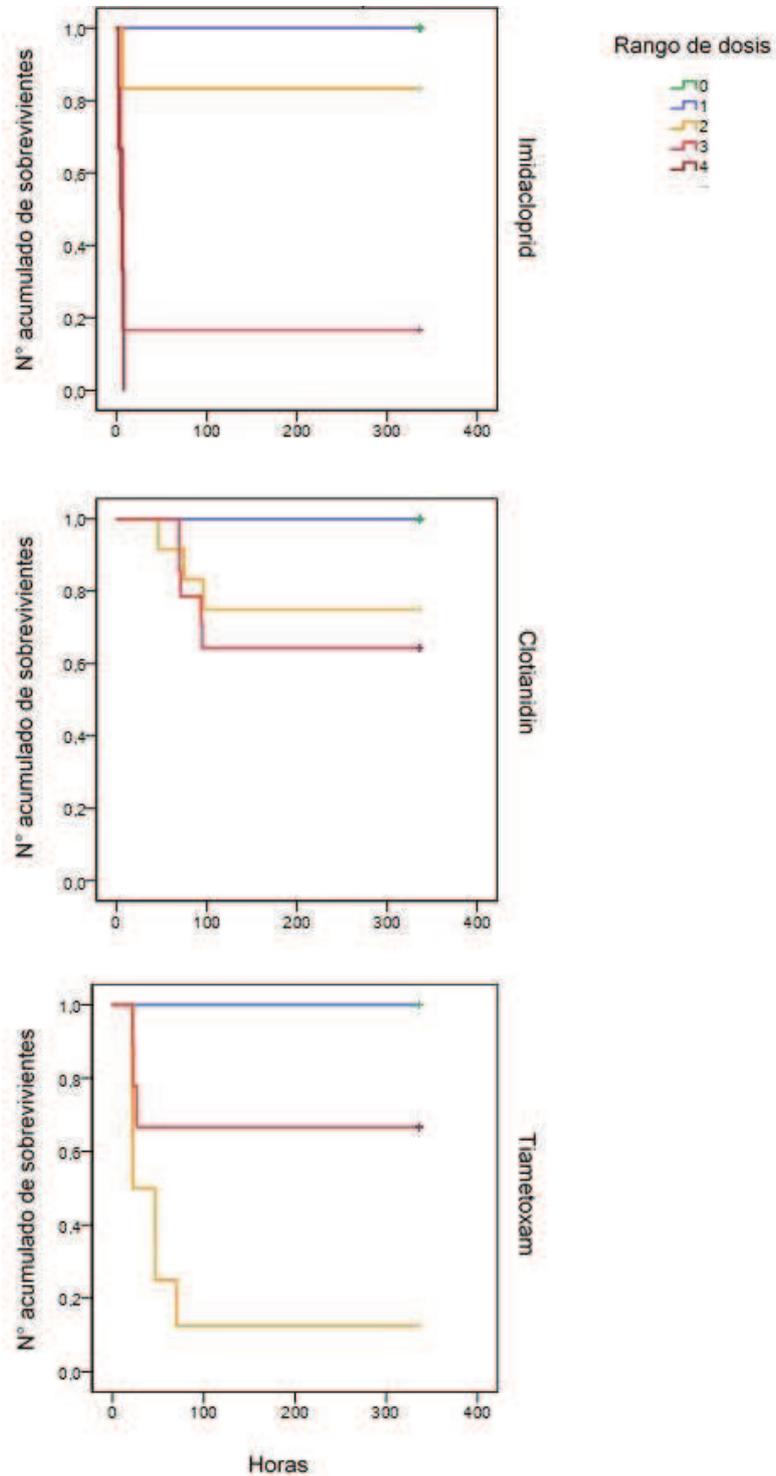


Fig. 1.2. Supervivencia acumulada de torcasas a lo largo del tiempo para cada rango de neonicotinoides.

Tabla 1.1. Dosis letal 50 (DL50) expresada en mg i.a./kg PC, y pendiente de las curvas dosis-respuesta calculadas en torcazas (*Zenaida auriculata*) expuestas mediante sonda a formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.

Formulación	imidacloprid	clotianidin	tiametoxam
DL50 (límites de confianza 95%)	59 (38 a 82)	4248 (2311 a +∞)	4366 (1623 a +∞)
Slope (límites de confianza 95%)	6,80 (1.58 a 12.03)	1,93 (-0.16 a 4.02)	1,49 (-0.16 a 3.15)

Signos de intoxicación: inicio, intensidad y tiempo de recuperación

Todas las torcazas dosificadas con las formulaciones de imidacloprid y tiametoxam mostraron signos de intoxicación. Por el contrario, dos torcazas dosificadas con la formulación de clotianidin (259 y 2000 mg/kg de peso corporal) no mostraron ningún signo de toxicidad. Las torcazas control nunca mostraron signos similares a los observados en las torcazas expuestas a pesticidas. Los signos de intoxicación aparecieron significativamente más rápido a dosis de 40 mg/kg PC de imidacloprid o más en comparación con dosis inferiores a 40 mg/kg ($p=0,01$). Aunque ninguna de las torcazas expuestas a menos de 40 mg/kg PC murió, todas ellas mostraron signos neurológicos de toxicidad (Tabla 1.3) que podrían perjudicar su supervivencia en la naturaleza. Con clotianidin y tiametoxam, el inicio de los signos de intoxicación fue significativamente diferente entre los rangos de dosis ($p=0,008$ y $p=0,043$ para clotianidin y tiametoxam, respectivamente), los signos de toxicidad aparecieron antes en los rangos de dosis más altos (Tabla 1.2). No se encontró mortalidad en torcazas expuestas a menos de 1000 mg/kg PC, pero la mayoría de ellas mostraron signos neurológicos de toxicidad (Tablas 1.2 y 1.3).

En todos los casos, los signos de toxicidad aparecieron durante la primera hora después de la exposición a los neonicotinoides. La intensidad de los signos de intoxicación se clasificó en tres niveles diferentes según los síntomas observados. En el nivel 1, se observó que el ave descansaba a menos que alguien se acercara, caminaba lento y un poco descoordinada, con alas caídas, movimientos descoordinados y disminución de la respuesta para huir. En el nivel 2, el ave estaba "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, el cuello contraído, los ojos abiertos o medio abiertos, el pico cerrado o abierto y la respuesta para huir muy disminuida. Finalmente, en el nivel 3 el ave estaba "tendida", es decir, acostada en el suelo, inmóvil, inclinada hacia adelante, con las alas entreabiertas, las patas abiertas, los ojos abiertos o medio abiertos, y sin ningún impulso de huir, solo movimientos espasmódicos. La intensidad de los signos de intoxicación fue significativamente diferente entre los rangos de dosis para los tres neonicotinoides

probados ($p=0,004$ para imidacloprid, $p=0,003$ para clotianidin y $p<0,001$ para tiametoxam). La Fig. 1.3 muestra el aumento en el porcentaje de aves con signos severos de toxicidad según el aumento de las dosis de neonicotinoides. Cabe destacar que incluso en las dosis de rango más bajas, porcentajes significativos de aves mostraron signos medios a severos con imidacloprid (83%), clotianidin (44%) y tiametoxam (8,3%) (Fig. 1.3). En cuanto al tiempo de recuperación, fue muy variable y no se detectaron diferencias entre los rangos de dosis fijas en el caso de imidacloprid. Por el contrario, el tiempo de recuperación fue significativamente mayor en el rango de dosis más alto para clotianidin y tiametoxam, ($p=0,007$ y $0,034$, respectivamente) (Tabla 1.2).

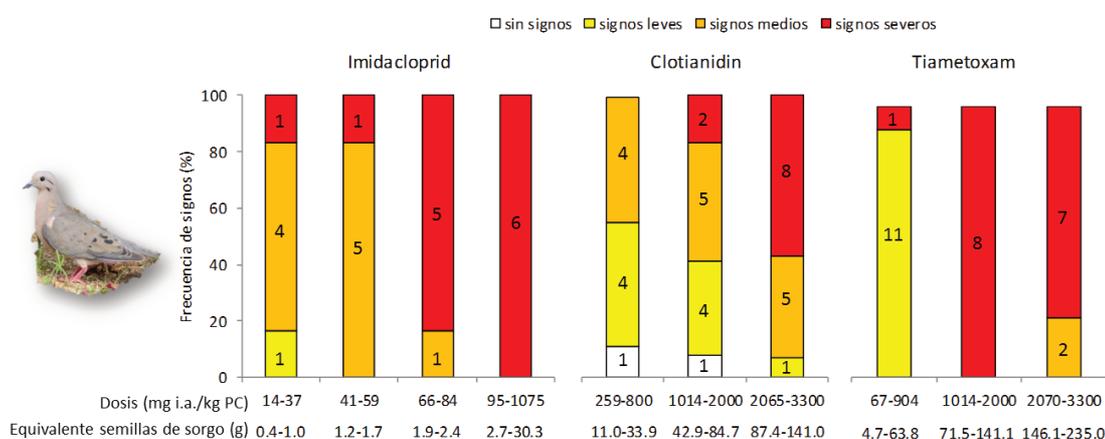


Fig. 1.3. Niveles de intensidad de los signos de intoxicación observados en torcazas expuestas mediante sonda intra-gástrica a formulaciones de neonicotinoides. Los números dentro de las barras indican la cantidad de individuos con los diferentes niveles de signos de intoxicación en cada rango de dosis. El nivel 1 (leve) incluye descansar a menos que alguien se acerque, caminar lento y un poco descoordinado, caminar con las alas caídas, movimientos descoordinados y respuesta disminuida para huir; el nivel 2 (medio) incluye torcaza "sentada" y "esponjada", quieta, con abdomen en el suelo, cuello contraído, ojos abiertos o medio abiertos, pico cerrado o abierto y respuesta muy disminuida para huir; y el nivel 3 (severo) incluye torcaza "tendida", inmóvil, en el suelo, inclinada hacia adelante, alas medio abiertas, piernas abiertas, ojos abiertos o medio abiertos y respuesta nula para huir, sólo movimientos espasmódicos. Los valores de la semilla de sorgo se calcularon utilizando el peso corporal promedio obtenido para las torcazas y la tasa de aplicación registrada más alta. Ninguna de las aves control mostró signos de intoxicación.

Tabla 1.2. Tiempo de muerte, inicio e intensidad de signos de intoxicación y tiempo de recuperación en torcazas (*Zenaida auriculata*) expuestas mediante gavage a formulaciones de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.

Formulación	n	Rango dosis (mg i,a./kg PC)	Tiempo de muerte (horas)			Inicio signos de intoxicación (horas)			Intensidad signos de intoxicación (1 a 3)			Tiempo de recuperación (horas)					
			N° muertas	Mediana	Mín	Máx	% con signos	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx	% Rec	Mediana	Mín	Máx
imidacloprid	6	<40	0	—	—	—	100	1,7 ^a	1,1	2,8	2 ^a	1	3	100	9,4	7,0	20,0
	6	40 to 59	1	7,0	—	—	100	0,5 ^b	0,1	1,5	2 ^{ab}	2	3	83	27,6	4,5	51,0
	6	60 to 90	5	7,0	1,8	8,0	100	0,7 ^b	0,5	1,0	3 ^b	2	3	17	27,0	—	—
	6	>90	6	5,0	1,8	8,0	100	0,6 ^b	0,3	1,5	3 ^b	3	3	0	—	—	—
clotianidin	9	<1000	0	—	—	—	89	1,5 ^a	0,8	3,0	1 ^a	0	2	89	15,1 ^a	1,8	26,8
	12	1000 to 2000	3	74,5	46,0	96,0	92	1,0 ^a	0,3	23,0	2 ^a	0	3	67	24,3 ^a	21,5	119,5
	14	>2000	5	71,0	69,1	95,0	100	0,3 ^b	0,1	3,5	3 ^b	1	3	64	70,8 ^b	21,3	189,0
tiametoxam	12	<1000	0	—	—	—	100	1,7 ^a	0,1	7,0	1 ^a	1	3	100	23,0 ^a	3,50	31,0
	8	1000 to 2000	5	22,5	22,0	70,0	100	1,2 ^{ab}	0,1	3,0	3 ^b	3	3	12	26,5	—	—
	9	>2000	3	23,2	22,0	27,0	100	1,00 ^b	0,3	1,9	3 ^b	2	3	67	46,5 ^b	22,00	144,0

^{a,b}Medianas con diferentes letras fueron significativamente diferentes entre dosis dentro de cada tratamiento neonicotinoide. Muertas: torcazas muertas por intoxicación con el neonicotinoide. Con signos: torcazas con signos de intoxicación. Min: mínimo. Max: máximo. Rec: torcazas recuperadas. Las aves control no se muestran aquí porque ninguna murió ni mostró signos de intoxicación.

Tabla 1.3. Número estimado de semillas tratadas de sorgo, soja y maíz equivalentes a la dosis administrada por gavaje y signos de intoxicación observados en las torcazas expuestas a los neonicotinoides (una fila por ave).

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
imidacloprid	14,1	2	99,0	3,3	0,3	0,3	1,3	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, cuello contraído, ojos cerrados, inmóvil	20,0
	17,9	2	124,0	5,3	0,5	0,5	1,1	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, el cuello contraído, camina si alguien se acerca	20,0
	21,5	1	123,0	6,3	0,6	0,6	2,8	1	Camina con alas caídas	7,0
	22,8	2	104,0	5,6	0,5	0,5	2,6	2	Torcaza "esponjada" pero sobre la percha, cuello contraído, no se mueve si alguien se acerca	9,0
	28,9	2	121,0	8,3	0,8	0,8	1,8	2	Torcaza "sentada" (abdomen en el suelo, cuello contraído), respuesta de huida disminuida	9,8

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	36,6	2	114,0	9,9	0,9	0,9	1,7	2	Torcaza "sentada" (abdomen sobre el suelo, cuello contraído), camina con las alas caídas cuando alguien se aproxima	7,0
	41,0	3	118,1	11,5	1,1	1,1	0,4	3	Palomja "tendida, i.e, tendida sobre el suelo, inmóvil, inclinada hacia adelante, alas y pico entreabiertos	muere
	41,0	3	112,9	11,0	1,0	1,0	0,3	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, el cuello contraído, camina si alguien se acerca	4,5
	46,5	2	123,0	13,6	1,3	1,3	1,5	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, el cuello contraído, respuesta de huida muy disminuida	51,0
	52,1	3	115,2	14,3	1,3	1,3	0,8	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, el cuello contraído, respuesta de huida muy	31,0

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
									disminuida, con alas caídas	
	52,1	3	116,7	14,5	1,4	1,4	0,1	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo	27,6
	59,0	2	117,0	16,4	1,5	1,5	0,7	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, cuello contraído, respuesta de huída disminuida	8,7
	66,1	3	124,5	19,6	1,8	1,8	1,0	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, camina sólo si alguien se acerca	muere
	66,1	3	121,7	19,2	1,8	1,8	0,6	3	Torcaza "tendida", acostada en el suelo, inmóvil, inclinada hacia adelante, con las alas abiertas	muere
	74,8	2	119,0	21,2	2,0	2,0	0,6	3	Torcaza "tendida ", acostada en el suelo, inmóvil, solo movimientos espasmódicos, inclinada	muere

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	79,2	1	120,0	22,6	2,1	2,1	0,5	3	hacia adelante, con las alas entreabiertas, cabeza hacia un lado en el suelo Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas entreabiertas, patas abiertas, ojos cerrados	muere
	83,9	3	112,7	22,5	2,1	2,1	0,8	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", con el abdomen en el suelo, sin ningún impulso para huir, alas caídas	27,0
	83,9	3	136,0	27,2	2,5	2,5	0,8	3	Torcaza "tendida", acostada en el suelo hacia adelante, inmóvil, alas y patas abiertas alas abiertas, open legs, half open eyes	muere
	94,9	2	104,0	23,5	2,2	2,2	0,3	3	Torcaza "tendida", sobre el suelo, hacia adelante, cabeza a un lado sobre el suelo, inmóvil, sólo movimientos espasmódicos	muere

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	106,0	3	106,9	27,0	2,5	2,5	0,8	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas entreabiertas, patas abiertas, ojos entreabiertos	muere
	106,0	3	118,2	29,8	2,8	2,8	0,7	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas entreabiertas, ojos cerrados	muere
	120,0	2	129,0	36,9	3,4	3,4	0,3	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas entreabiertas, ojos cerrados, sólo movimientos espasmódicos, dificultad para respirar	muere
	292,0	1	121,0	84,1	7,9	7,9	1,5	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas y patas abiertas, ojos entreabiertos	muere

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	1075,0	1	120,0	307,1	28,7	28,7	0,5	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas y ojos entreabiertos, patas abiertas	muere
clotianidin	259,0	3	128,4	uso no registrado	11,1	22,2	2,0	1	Torcaza en reposo a menos q alguien se acerque	2,4
	259,0	3	112,7	uso no registrado	9,7	19,5	sin signos	sin signos		sin signos
	259,0	3	133,1	uso no registrado	11,5	23,0	1,3	1	Torcaza en reposo a menos q alguien se acerque	1,8
	259,0	3	124,8	uso no registrado	10,8	21,5	1,3	1	Quieta, sobre la percha	3,5
	259,0	3	102,0	uso no registrado	8,8	17,6	1,3	1	Quieta, sobre la percha	3,5
	392,0	2	118,0	uso no registrado	15,4	30,8	1,9	2	Torcaza "sentada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, en reposo a menos que alguien se aproxime, alas caídas cuando camina	53,8

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	497,0	2	109,0	uso no registrado	18,1	36,1	0,8	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, en reposo a menos que alguien se aproxime	26,8
	630,0	2	111,2	uso no registrado	23,4	46,7	3,0	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, alas caídas cuando camina	26,8
	800,0	2	118,7	uso no registrado	31,7	63,3	1,8	2	Torcaza "sentada" y "esponjada" sobre la percha, quieta	47,0
	1014,0	2	119,5	uso no registrado	40,4	80,8	1,9	2	En reposo a menos que alguien se aproxime, camina lento y algo descoordinado, alas caídas, se bambolea	22,0
	1281,0	4	110,3	uso no registrado	47,1	94,2	0,8	3	Incapaz de caminar, inmóvil, spasmodic movements	muere
	1281,0	4	112,7	uso no registrado	48,1	96,2	0,8	1	Quieta, sobre la percha, pierde el equilibrio	21,5

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	1286,0	2	102,8	uso no registrado	44,1	88,1	0,3	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo	muere
	1626,0	4	108,0	uso no registrado	58,5	117,1	2,3	1	En reposo a menos que alguien se aproxime, aleteo torpe	21,5
	1626,0	4	142,6	uso no registrado	77,3	154,6	0,8	1	Quieta, en reposo a menos que alguien se aproxime, camina lento	21,5
	1632,0	2	128,0	uso no registrado	69,6	139,3	1,0	2	Torcaza "sentada", casi "tendida", inmóvil	26,5
	2000,0	límite	109,8	uso no registrado	73,2	146,4	3,6	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, respuesta de huida muy disminuida	muere
	2000,0	límite	139,6	uso no registrado	93,1	186,1	Sin signos	Sin signos		Sin signos
	2000,0	límite	110,3	uso no registrado	73,5	147,1	1,0	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, respuesta de huida disminuida	119,5

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	2000,0	límite	134,4	uso no registrado	89,6	179,2	23,0	1	En reposo a menos que alguien se aproxime, camina lento	27,5
	2000,0	límite	117,6	uso no registrado	78,4	156,8	4,0	2	Torcaza "sentada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído	55,0
	2065,0	4	114,7	uso no registrado	79,0	157,9	2,2	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", abdomen sobre el suelo, respuesta de huída muy disminuida y torpe	93,3
	2065,0	4	111,9	uso no registrado	77,0	154,0	3,5	1	En reposo a menos que alguien se aproxime, camina lento	45,3
	2070,0	2	117,4	uso no registrado	81,0	162,0	0,3	2	Torcaza "sentada" sobre la percha, quieta	26,7
	2622,0	4	112,9	uso no registrado	98,7	197,3	0,7	2	Camina con las alas caídas, respuesta de huída disminuida	21,3
	2622,0	4	119,3	uso no registrado	104,3	208,5	0,3	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", inmóvil	muere
	2625,0	2	115,8	uso no registrado	101,3	202,7	0,2	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas	muere

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
									abiertas, sólo movimientos espasmódicos	
	3330,0	2	139,7	uso no registrado	155,1	310,1	1,6	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, en reposo a menos que alguien se aproxime	54,6
	3330,0	3	122,4	uso no registrado	135,9	271,7	0,3	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, un ala abierta, ojos cerrados, y sin ningún impulso para huir, sólo movimientos espasmódicos	muere
	3330,0	3	125,8	uso no registrado	139,6	279,3	1,9	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil	muere
	3330,0	3	110,0	uso no registrado	122,1	244,2	0,2	2	Torcaza "sentada", sobre la percha	70,8
	3330,0	3	123,1	uso no registrado	136,6	273,3	0,1	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", inmóvil, sin ningún impulso para huir	142,7

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapas del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	3330,0	3	113,8	uso no registrado	126,3	252,6	0,1	2	Camina lento y descoordinado, respuesta de huida muy disminuida	94,7
	3330,0	4	109,4	uso no registrado	121,4	242,9	0,2	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas y ojos abiertos, y sin ningún impulso para huir	muere
	3330,0	4	115,0	uso no registrado	127,7	255,3	0,1	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", inmóvil	189,0
tiametoxam	66,6	1	127,0	11,7	4,7	4,0	5,3	1	Camina con alas caídas	31,0
	115,0	3	83,8	13,4	5,4	4,6	1,0	1	Quieta, torpe al revolotear	3,6
	115,0	3	113,6	18,1	7,3	6,2	0,9	1	Torpe al revolotear	5,0
	115,0	3	109,9	17,6	7,0	6,0	1,4	1	Quieta, sobre la percha	3,5
	115,0	3	110,8	17,7	7,1	6,1	0,1	1	Quieta, en reposo a menos que alguien se aproxime	27,5
	115,0	3	106,9	17,1	6,8	5,9	1,3	1	Torcaza "sentada" y "esponjada",	5,1

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
									movimientos descoordinados	
	245,0	1	110,8	37,7	15,1	12,9	5,0	1	En reposo a menos que alguien se aproxime	23,0
	392,0	2	99,1	54,0	21,6	18,5	2,1	1	Torcaza "sentada" (abdomen sobre el suelo) y "esponjada", en reposo a menos que alguien se aproxime	6,5
	497,0	2	114,0	78,7	31,5	27,0	2,0	1	En reposo a menos que alguien se aproxime, camina algo descoordinada	30,3
	630,0	2	119,3	104,4	41,8	35,8	2,5	1	Torcaza "sentada" (abdomen sobre el suelo), quieta	26,7
	800,0	2	114,9	127,7	51,1	43,8	1,4	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, hacia adelante, y respuesta de huida muy disminuida	26,6
	904,0	1	116,7	146,5	58,6	50,2	7,0	1	En reposo a menos que alguien se aproxime, camina lento y un poco descoordinada	23,0

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	1014,0	2	94,2	132,7	53,1	45,5	0,08	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, sin ningún impulso para huir, sólo movimientos espasmódicos	muere
	1286,0	2	99,5	177,7	71,1	60,9	1,83	3	Torcaza "sentada" sobre el suelo, hacia adelante, alas abiertas, y respuesta de huída muy disminuida	1,1
	1632,0	2	109,3	247,7	99,1	84,9	1,17	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, hacia adelante, alas abiertas, respuesta de huída muy disminuida	muere
	2000,0	límite	98,8	274,4	109,8	94,1	1,42	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, sin ningún impulso para huir, inmóvil	muere

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	2000,0	límite	110,1	305,8	122,3	104,9	0,50	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, sin ningún impulso para huir, inmóvil	muere
	2000,0	límite	100,8	280,0	112,0	96,0	1,25	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, sin ningún impulso para huir, inmóvil	muere
	2000,0	límite	107,2	297,8	119,1	102,1	1,17	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas abiertas, y sin ningún impulso para huir	muere
	2000,0	límite	129,6	360,0	144,0	123,4	3,00	3	Torcaza "tendida", acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas abiertas, y sin ningún impulso para huir	muere
	2070,0	2	116,0	333,5	133,4	114,3	1,92	2	Torcaza "sentada" y "esponjada", movimientos descoordinados	0,9

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	2625,0	2	86,0	313,5	125,4	107,5	1,00	3	Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas abiertas, sin ningún impulso para huir	muere
	3330,0	1	99,6	460,7	184,3	157,9	0,97	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, cuello contraído, ojos cerrados, inmóvil	2,0
	3330,0	2	118,9	549,9	220,0	188,5	1,00	3	Torcaza "sentada" y "esponjada", quieta con el abdomen sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas abiertas, sin ningún impulso para huir	1,9
	3330,0	3	107,9	499,0	199,6	171,1	0,67	3	Torcaza "tendida", hacia adelante, inmóvil, sin ningún impulso para huir, sólo movimientos espasmódicos	muere
	3330,0	3	106,0	490,3	196,1	168,1	0,33	2	Quieta, respuesta de huida disminuida, movimiento algo	1,3

Formulación	Dosis (mg i.a./kg PC)	Etapa del test	PC inicial (g)	Equivalente de semillas de soja (g)	Equivalente de semillas de sorgo (g)	Equivalente de semillas de maíz (g)	Inicio signos de intoxicación (horas)	Intensidad máxima de signos de intoxicación (1 a 3)	Descripción de los signos de intoxicación	Tiempo de recuperación (horas)
	3330,0	3	117,1	541,6	216,6	185,7	0,50	3	descoordinado, alas caídas Torcaza "tendida", sentada o acostada sobre el suelo, inmóvil, hacia adelante, alas entreabiertas	muere
	3330,0	3	123,4	570,7	228,3	195,7	1,33	3	Quieta, respuesta de huida muy disminuida, alas caídas	2,1
	3330,0	3	82,0	379,3	151,7	130,0	0,42	3	Quieta, torcaza "sentada" y "esponjada", movimientos descoordinados, respuesta de huida muy disminuida, alas caídas	6,0

El equivalente de semilla se calculó como [(dosis de neonicotinoide administrada x peso corporal inicial) / (concentración teórica de neonicotinoide)].

Consumo de alimentos y peso corporal

Todas las aves que murieron por los tratamientos neonicotinoides comieron pequeñas cantidades de alimentos antes de morir. El imidacloprid prácticamente suprimió el consumo de alimentos en las aves que finalmente murieron (mediana=0,00 g, solo uno pudo comer hasta 0,27 g). En el caso de clotianidin, todas las muertes ocurrieron de tres a cinco días después de la dosificación, y el consumo diario de alimentos fue muy bajo (mediana=0,02 g, mín.=0,00 g, máx.=2,48 g). Finalmente, en el caso de tiametoxam, el consumo diario de alimentos antes de la muerte fue más variable pero también generalmente bajo (mediana=0,25 g, mín.=0,00 g, máx.=3,52 g). El consumo medio diario de alimentos de todos los controles fue de 10,9 g \pm 0,2 g (media \pm SE).

Con respecto a las aves supervivientes, tanto los factores fijos (rango de dosis, día y rango de dosis*día) como los factores aleatorios (etapa, jaula) del MMLG afectaron significativamente ($p < 0,05$) el consumo de alimentos. Estos efectos en el consumo de alimentos de los sobrevivientes fueron más fuertes durante los primeros días después de la dosificación. En el caso de imidacloprid, las diferencias significativas entre pares de rangos de dosis se observaron en los días 1, 2 y 3. Para clotianidin, hubo diferencias significativas entre todos los días probados. Finalmente, se observaron diferencias significativas en los días 1, 2, 3 y 7 para tiametoxam (Fig. 1.4). El peso corporal de las torcazas se redujo significativamente después de la dosificación con los tratamientos con clotianidin ($p < 0,001$) y tiametoxam ($p < 0,001$), pero este efecto fue reversible como lo demuestra la interacción significativa entre los tratamientos y los días (ambos $p < 0,001$; Fig.1.5). El peso corporal no se vio afectado significativamente por la exposición a imidacloprid. Algunas aves control también perdieron peso durante los experimentos, lo que podría explicarse por el estrés individual en cautiverio, aunque en menor medida que las aves tratadas con clotianidin y tiametoxam.

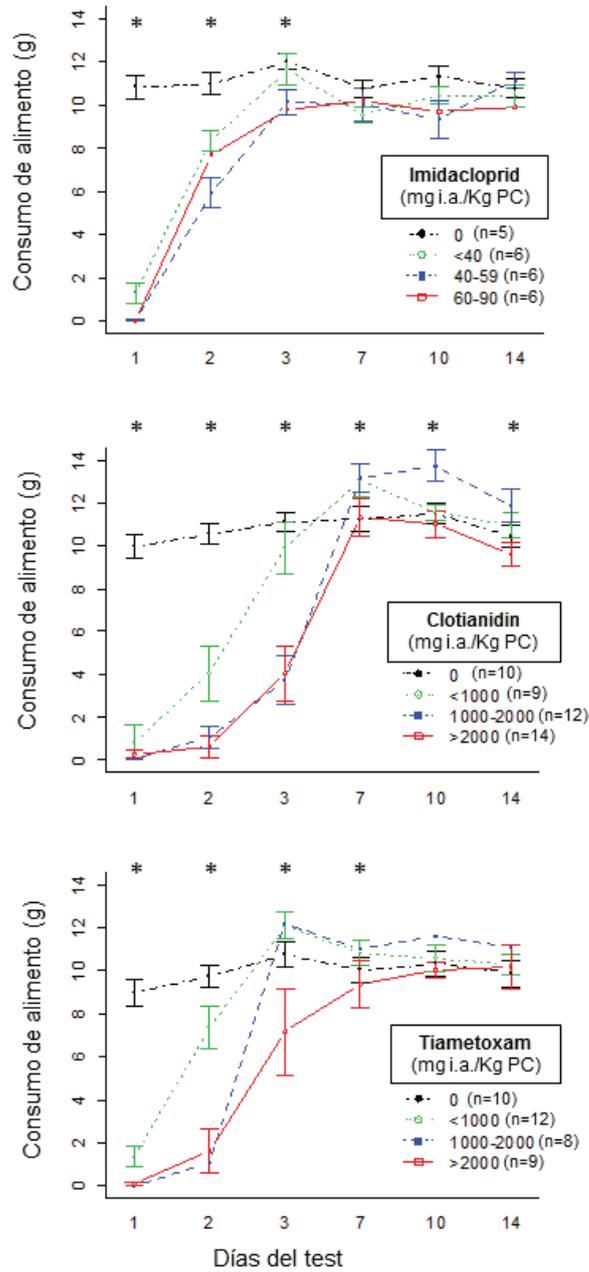


Fig. 1.4. Consumo medio de alimentos de las torcazas durante los días de prueba después de su única dosis de neonicotinoide. El día 1 es el día del gavage. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre los controles y los rangos de dosis. Los tamaños de muestra (n) para cada rango de dosis son los iniciales, antes de que ocurran las muertes.

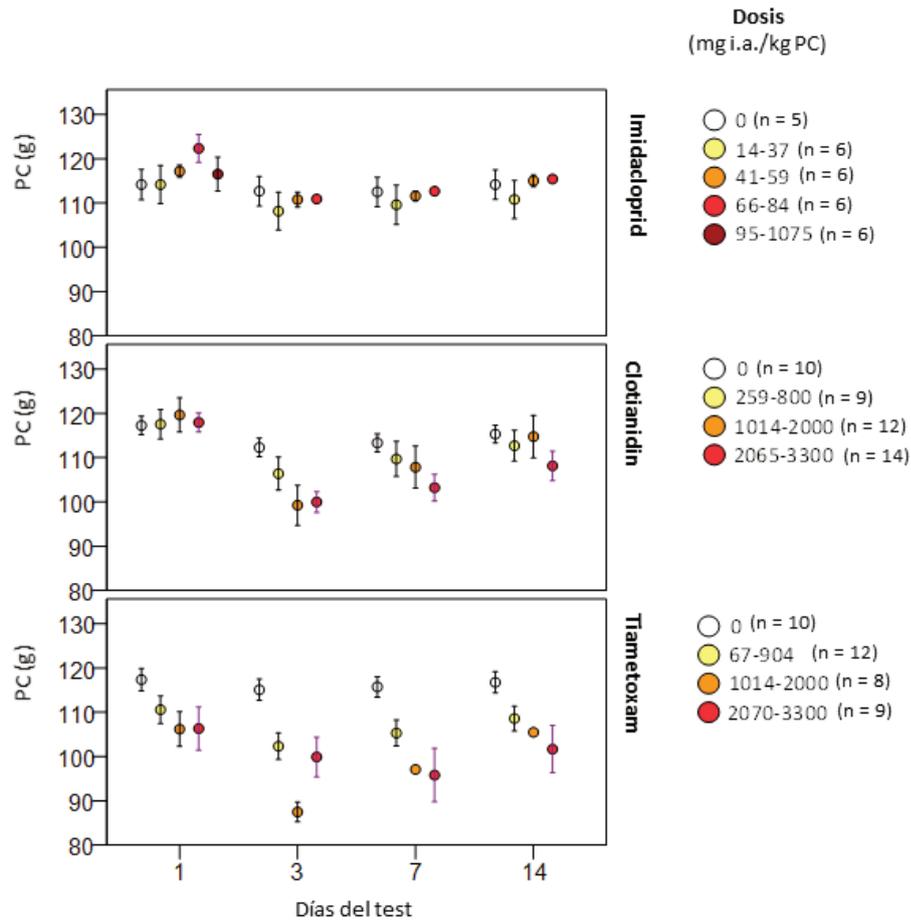


Fig. 1.5. Medias del peso corporal de torcazas tratadas vía gavage con formulaciones de neonicotinoides. Los pesos corresponden a los días 1, 3, 7 y 14 de la prueba, considerando los diferentes rangos de dosis y todas las aves (muertas y supervivientes).

Estimación de la masa y el número de semillas tratadas necesarias para alcanzar las DL50

El peso corporal medio de las torcazas adultas fue de 0,127 kg (DE=0,014 kg). Por lo tanto, considerando la mayor tasa de aplicación (4,5 mg i.a./g de semillas de sorgo o maíz) y la masa de las semillas (sorgo: media \pm DE, 0,029 \pm 0,004 g/semilla; maíz: 0,30 \pm 0,05 g/semilla), una torcaza de peso medio podría alcanzar la DL50 de imidacloprid consumiendo solo 1,7 g de semillas (56 semillas de sorgo o 6 semillas de maíz) (Tabla 1.4). Los signos de toxicidad por exposición a imidacloprid pueden ocurrir con tan solo 0,4 g de semillas (13 semillas de sorgo o 1 semilla de maíz) (Fig. 1.3). En contraste, se necesitarían más de 100 semillas de soja (0,15 \pm 0,02 g / semilla) para alcanzar la DL50 de imidacloprid, debido a la menor tasa de aplicación utilizada en este cultivo (0,4 mg i.a./g semilla). Como se puede observar en la Tabla 1.4 y la Fig. 1.3,

puede ser necesario un mayor número de semillas tratadas con clotianidin y tiametoxam para producir signos de toxicidad o letalidad en torcazas. La concentración de imidacloprid medida en soja recolectada antes de la siembra fue aproximadamente un 10% menor ($n=3$, media \pm DE, $380 \pm 30 \mu\text{g/g}$) que la concentración teórica a la tasa máxima de aplicación como insecticida ($420 \mu\text{g/g}$), por lo que los valores de riesgo indicados anteriormente pueden considerarse realistas.

Tabla 1.4. Masa y número de semillas de soja, sorgo y maíz tratadas con neonicotinoídes, necesarias para alcanzar las DL50 en torcazas para los diferentes tratamientos de semillas de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam.

Neonicotinoide	DL50 (mg i.a./Kg PC)	Semilla	Uso	CT (mg i.a./g semilla)	Semillas que alcanzan la DL50	
					Masa (g)	Número
Imidacloprid	59	Soja	I	0,42	17,8	119
		Soja	R	1,20	6,2	42
		Sorgo	I	4,50	1,7	56
		Maíz	I	4,50	1,7	6
Clotianidin	4248	Sorgo	I	3,00	179,8	5994
		Maíz	I	1,50	359,7	1199
Tiametoxam	4366	Soja	I	0,72	770,1	5134
		Sorgo	I	1,80	308,0	10268
		Maíz	I	2,10	264,0	880

I=insecticida, R=repelente de aves, CT=concentración teórica de neonicotinoide. El número de semillas para alcanzar las DL50 se calculó de acuerdo con la media de masa de semillas.

Consumo de semillas de sorgo no tratadas por torcazas cautivas

El consumo medio diario de semillas de sorgo fue de 6,4 g (SD=1,8 g) por torcaza. El consumo máximo fue de 11,5 g registrado en el último día de prueba (día 5) en una torcaza cuyo peso corporal fue de 110 g. A su vez, el consumo mínimo fue de 2,1 g registrado en el día 3 en una torcaza cuyo peso corporal era de 108 g. Las torcazas pesaron entre 100 g y 121 g al inicio de la prueba. Teniendo en cuenta un consumo diario de semillas de sorgo de 6,4 g, las torcazas que toman solo el 27% (1,7 g) de esta cantidad podrían estar expuestas a dosis letales del insecticida. De acuerdo con la

demanda energética estimada de torcazas, en el peor de los casos esta especie puede comer hasta 16 g de sorgo por día.

Discusión

Las DL50 obtenidas en torcazas destacan una amplia diferencia en la toxicidad aguda entre el imidacloprid (59 mg/kg) por un lado, y el clotianidin y el tiametoxam por el otro (más de 4000 mg/kg en ambos casos), coincidiendo con lo observado en los datos resumidos por Gibbons et al. (2015) para otras especies. Siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020; WHO, 2009) para clasificar los plaguicidas por el peligro que presentan, imidacloprid se clasifica como moderadamente tóxico para las torcazas, ya que su DL50 se encuentra entre 50 y 2000 mg/kg PC. Clotianidin y el tiametoxam, en cambio, pueden clasificarse como poco peligrosos, ya que sus DL50 se encuentran entre 2000 y 5000 mg/kg PC. En comparación con las DL50 ya disponibles para las aves, la DL50 de imidacloprid de las torcazas (59 mg / kg) es más alta que el valor más bajo reportado (DL50=14 mg/kg para la perdiz gris *Perdix perdix*; Gibbons et al., 2015), pero comparable a la mayoría de las DL50 previamente registradas en aves: codornices japonesas *Coturnix japonica* (31 mg/kg), gorriones domésticos *Passer domesticus* (41 mg/kg) y palomas domésticas *Columba livia* y canarios *Serinus canaria* (25-50 mg/kg) (Gibbons et al., 2015). Por el contrario, las DL50 de clotianidin (4248 mg/kg) y tiametoxam (4366 mg/kg) fueron más altas en torcazas que en otras especies como las codornices japonesas (423 mg/kg para el clotianidin y 576 mg/kg para el tiametoxam; Mineau y Palmer, 2013; Rexrode et al., 2003), y las codornices blancas del norte (DL50=1552 mg/kg para el tiametoxam; Mineau y Palmer, 2013). Por lo tanto, nuestros datos destacan la baja toxicidad aguda del clotianidin y el tiametoxam en esta especie de paloma en comparación con otras aves.

El tiempo que tarda una sustancia tóxica en producir la muerte o la incapacidad proporciona información importante sobre su peligro y también es muy relevante para fines de evaluación de riesgos. En el caso del imidacloprid, el tiempo hasta la muerte de las torcazas siempre fue dentro del primer día después de la dosificación. Sin embargo, el tiempo de muerte de las perdices de patas rojas (*Alectoris rufa*) alimentadas con trigo que contenía 0,7 mg de imidacloprid/g durante 25 días fue más prolongado, ocurriendo casi 7 días para las hembras y 13 días para los machos (Lopez-Antia et al., 2015). Esto sugiere que la dosis y la forma de ingestión (dieta o sonda) afectan el tiempo de la muerte debido a la evitación de los alimentos tratados o la anorexia causada en las primeras etapas de la intoxicación. Por otro lado, en este estudio, el tiempo hasta la

muerte del clotianidin y el tiametoxam resultó ser más largo (hasta casi cuatro y dos días, respectivamente) que para el imidacloprid.

Conocer los signos clínicos típicos puede ser útil cuando se intenta identificar la intoxicación de las aves, pero hay poca información claramente detallada sobre el tema de los neonicotinoides en la literatura científica. Por esta razón, la primera caracterización detallada de los trastornos nerviosos (características, tiempo de aparición e intensidad de los signos de intoxicación, y recuperación) asociados a los neonicotinoides se realizó en torcazas. Se demostró claramente que se requerían dosis mucho más altas de clotianidin y tiametoxam para obtener tiempos similares de inicio de los signos de intoxicación que con el imidacloprid. Pero a pesar de las diferencias de dosis en los rangos de dosis más bajos entre imidacloprid (>40 mg i.a./kg PC) y los otros dos neonicotinoides (>1000 mg i.a./kg PC), la media de la aparición de signos de intoxicación fue similar (1,7 h para imidacloprid y tiametoxam, y 1,5 h para clotianidin) entre los compuestos y siempre inferior a dos horas. El tiempo de recuperación de las torcazas afectadas por las dosis más altas de clotianidin y tiametoxam fue generalmente largo, con un máximo de casi 8 días después de la dosificación en el caso del clotianidin. Estas diferencias entre neonicotinoides en la intensidad y duración de los signos de neurotoxicidad observados en aves pueden estar determinadas por su selectividad para los receptores nicotínicos de acetilcolina de vertebrados (nAChR) (Tomizawa y Casida, 2005), la irreversibilidad de su unión a nAChR (Tennekes y Sánchez-Bayo, 2011), su capacidad para alterar las corrientes inducidas por ACh (Cartereau Alison et al., 2017) y las diferencias metabólicas existentes entre las sustancias (Manjon et al., 2018).

En general, para los tres neonicotinoides examinados, los signos de intoxicación consistieron en una pérdida progresiva de vitalidad y movimiento, con aumento de la dificultad respiratoria y la inmovilidad, pero sin temblores o convulsiones comúnmente observados con insecticidas piretroides. Curiosamente, los síntomas neurotóxicos causados por los neonicotinoides fueron considerablemente diferentes de los signos de intoxicación causados por los piretroides en la misma especie (Addy Orduna et al., 2011). Con los neonicotinoides, las torcazas morían en una posición típica que consistía en que el ave se apoyaba hacia adelante en el suelo, inmóvil, con las alas entreabiertas y las patas abiertas. Dentro del rango de dosis más bajas para cada neonicotinoide, ninguna de las torcazas murió, pero casi todas presentaron signos de intoxicación, siendo más intensas para el imidacloprid. Por lo tanto, como sugieren Millot et al. (2017), los efectos agudos de los neonicotinoides podrían causar mortalidad indirecta al hacer que las aves sean más vulnerables a los depredadores o a la colisión con automóviles.

En general, el consumo de alimentos y el peso corporal disminuyeron particularmente durante el primer día después de la dosificación de neonicotinoides. Esto concuerda con los resultados observados por (Lopez-Antia et al., 2014, 2013), quienes mostraron una condición corporal reducida en perdices de patas rojas alimentadas con trigo tratado con imidacloprid. En oposición a esto, Tokumoto et al. (2013) mostraron que 50 mg de clotianidín / kg PC en codornices causaron un aumento en el peso corporal que los autores atribuyeron a la función hepática deteriorada. En cuanto al consumo de semillas de sorgo no tratadas, el menor consumo en cautividad en comparación con la estimación en vida libre puede explicarse por la menor demanda energética de las torcazas en condiciones de cautiverio.

Finalmente, de los tres neonicotinoides probados, el imidacloprid presentaría alto riesgo de intoxicación aguda por semillas de sorgo tratadas para torcazas. Si la concentración en las semillas es igual a la dosis máxima registrada (750 ml de formulación de imidacloprid/100 kg de semillas), sólo 56 semillas de sorgo (aproximadamente 1,7 g) serían suficientes para alcanzar la DL50 de una torcaza con un peso corporal de 127 g. Estos cálculos se han realizado utilizando concentraciones teóricas en semillas de sorgo tratadas, pero la cantidad real de pesticida presente en las semillas puede disminuir con el tiempo después de la siembra debido al lavado por lluvia o agua de riego. Teniendo en cuenta que la mayor parte de la dieta de la torcaza en Argentina se compone de semillas de cultivo, que el sorgo es un alimento preferido (Bucher y Nores, 1976; Murton et al., 1974) y que el rango de consumo de sorgo por ave por día (tanto la estimación como la experimentada) fue en gran medida superior a 1,7 g, las intoxicaciones agudas debidas a la ingestión de semillas de sorgo tratadas con imidacloprid son altamente probables en el campo. Esto también fue sugerido por Avery et al. (1997), quienes consideraron que las palomas estaban en alto riesgo de intoxicación con sorgo tratado con imidacloprid. Sin embargo, algunos estudios muestran que las semillas tratadas con imidacloprid (particularmente trigo y arroz) son evitadas por especies de aves como los mirlos de alas rojas y los vaqueros de cabeza marrón (Avery et al., 1993, 1994), pero esta evitación es de hecho una consecuencia de la toxicidad después de la ingestión de pequeñas cantidades de semillas tratadas (Lopez-Antia et al., 2014). Por lo tanto, evitar el imidacloprid podría ser insuficiente para prevenir las intoxicaciones de aves en el campo (Millot et al., 2017), y se necesitan más estudios sobre el sorgo y la soja para evaluar el riesgo específico (repelencia e intoxicación) de las dosis registradas de imidacloprid en estos cultivos. Además, como la densidad de semillas tratadas en la superficie del suelo puede influir en la respuesta de evitación de las aves al modificar su tasa de consumo de semillas (Millot et al., 2017),

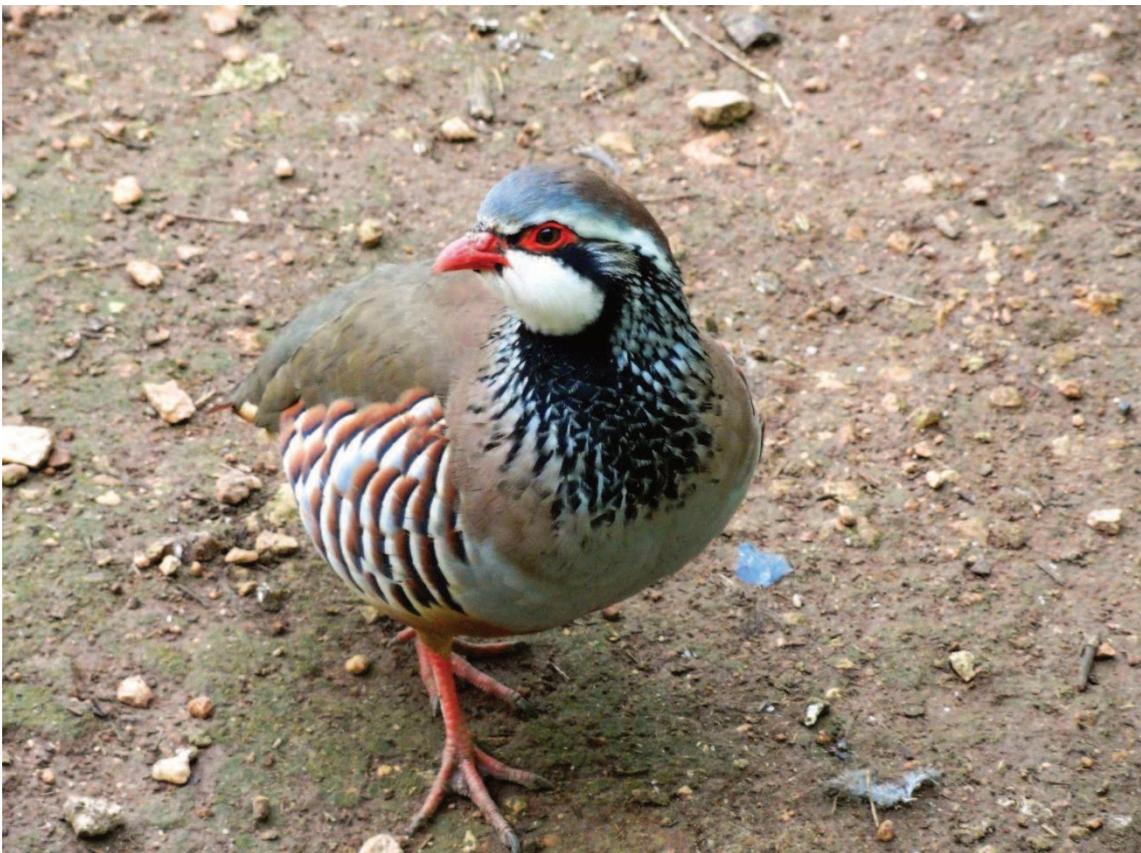
se necesitan estudios de campo para saber cuántas semillas de sorgo permanecen disponibles después de la siembra.

Conclusiones

Se encontró una amplia diferencia en la toxicidad aguda oral entre el imidacloprid y otros dos neonicotinoides, clotianidin y tiametoxam, en la paloma sudamericana, *Zenaida auriculata*. Como afirman (Moffat et al., 2016) para los artrópodos, el riesgo del uso de neonicotinoides también debe estudiarse para cada compuesto y especie de ave. El imidacloprid produce signos de intoxicación más intensos a dosis mucho más bajas y las aves mueren más rápidamente que con los otros dos neonicotinoides. El clotianidin y el tiametoxam causaron letalidad a dosis muy altas (>1000 mg i,a./kg PC), y los tiempos de recuperación de las aves fueron en general muy largos. Esto sugiere posibles diferencias toxicodinámicas entre estos dos neonicotinoides y el imidacloprid. La principal característica de la intoxicación con neonicotinoides es una pérdida progresiva de vitalidad y movimiento, como un "apagón", sin temblores y movimientos bruscos. En vista de estos resultados, el número directo de muertes de aves en el campo es mucho más probable que se produzca por el uso de imidacloprid que por clotianidin y tiametoxam. Se llevarán a cabo investigaciones futuras sobre los efectos de estos productos químicos administrados por la dieta a concentraciones ambientalmente relevantes en torcazas para refinar la evaluación del riesgo en condiciones de campo.

CAPÍTULO 2

Comportamiento antidepredador de la perdiz roja dosificada con imidacloprid ante simulación de depredadores



Resumen

Los neonicotinoides tienen el potencial de producir alteraciones en el sistema nervioso de las aves, lo cual podría afectar comportamientos complejos vinculados a la supervivencia como los comportamientos antidepredadores. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dosis subletales de imidacloprid (0, 1 y 6 mg/kg PC) sobre las respuestas comportamentales de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) a posibles depredadores. Para ello, 66 perdices, machos y hembras en igual proporción, se expusieron, en grupo o individualmente, a la reproducción de llamadas de alarma intra e interespecíficas (estímulos auditivos), a una silueta de rapaz como simulación de predador aéreo y a una maqueta de zorro como simulación de predador terrestre (estímulos visuales). Las respuestas comportamentales se dividieron en respuestas antipredador activas (escape y vigilancia con desplazamiento) y respuestas antipredador pasivas (vigilancia sin desplazamiento, inmovilización y agachado). También se midió la latencia (tiempo que el ave demora en responder al estímulo), la velocidad de las respuestas activas y, sólo en el experimento individual, las vocalizaciones y estado neurológico. Se encontró un efecto del tratamiento sobre la duración de los comportamientos de agachamiento ante los estímulos visuales en el experimento grupal ($p=0,040$) y sobre la vigilancia sin desplazamiento ante el estímulo auditivo de alarma intraespecífica ($p=0,007$). Por lo tanto, el imidacloprid causó una sobreexcitación en las aves, ya que las aves a las que se les administró 6 mg i.a./kg PC mostraron un agachamiento más corto y una vigilancia sin desplazamiento más prolongada que las aves controles. Próximos estudios con formulación de imidacloprid serían convenientes para continuar dilucidando el efecto en campo de este neonicotinoide sobre los comportamientos antidepredador de las aves.

Introducción

Los contaminantes químicos pueden interferir con comportamientos complejos de la vida silvestre que tienen implicaciones directas en la aptitud y en la dinámica de las poblaciones (Saaristo et al., 2018). Gran parte de los contaminantes químicos vertidos en el ambiente son plaguicidas, entre ellos insecticidas neonicotinoides. La intoxicación aguda con neonicotinoides provoca una pérdida progresiva de vitalidad y movimiento en las aves (Addy-Orduna et al., 2019; Franzen-Klein et al., 2020; Sheets et al., 2016), así como pérdida de orientación en el comportamiento migratorio (Eng et al., 2017). A su vez, la intoxicación por neonicotinoides puede causar excitación del sistema nervioso (Addy-Orduna et al., 2022; Burke, 2016; Hirano et al., 2015; Rodrigues et al., 2010). Ya

sea por excitación o pérdida de vitalidad, las aves que ingieren neonicotinoides podrían presentar alteraciones en comportamientos vinculados a su supervivencia como son los comportamientos para evitar a los predadores. Como consecuencia, las interacciones depredador-presa podrían alterarse, lo que a su vez puede resultar en cambios en la población del depredador, la presa o ambos (Weis et al., 2001).

Las perdices rojas (*Alectoris rufa*) son aves de tierras de cultivos del suroeste de Europa (Farfán et al., 2022) que pueden estar directamente expuestas a plaguicidas como los neonicotinoides a través de semillas, plantas e insectos tratados (Mateo et al., 2022). El imidacloprid ingerido por perdices rojas cautivas a través de trigo tratado ha demostrado causar la muerte, alterar parámetros bioquímicos, disminuir el peso corporal, causar estrés oxidativo, disminuir la respuesta inmune celular, producir alteraciones reproductivas (Lopez-Antia et al., 2013; Lopez-Antia et al., 2015), y posiblemente pueda afectar a los comportamientos antidepredador de las perdices rojas. Estas aves discriminan entre predadores aéreos y terrestres, predominando comportamiento de inmovilización ante los primeros, y de vigilancia y escape ante los segundos (Binazzi et al., 2011; Dávila et al., 2019). Es decir, las perdices, como otras especies animales, pueden usar estrategias pasivas o activas ante situaciones de riesgo cuando se aproxima un predador terrestre (Forkman et al., 2007). Estos comportamientos podrían alterarse ante la ingestión de plaguicidas neurotóxicos, afectándose por ejemplo el reconocimiento de predadores o la locomoción (Bhardwaj et al., 2010; de Faria et al., 2018; de Souza et al., 2018). Dado que el comportamiento es un indicador sensible del impacto de una exposición (Peterson et al., 2017) y una herramienta de alerta temprana (Hellou, 2011), el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dosis bajas de imidacloprid sobre las respuestas comportamentales de la perdiz roja a posibles depredadores.

Materiales y métodos

Aves experimentales y condiciones de alojamiento

Los experimentos se llevaron a cabo con 66 perdices rojas adultas del parque de mantenimiento (18 m de largo x 18 m de ancho x 2,5 m de altura) del Centro de Investigación Agroambiental "El Chaparrillo" (Ciudad Real, España), donde las aves se mantienen con pienso comercial de perdiz (Forraje de mantenimiento de perdiz, Nanta-Nutreco, Tres Cantos, España), y son provistas de agua del grifo *ad libitum*.

Treinta y seis perdices (18 hembras y 18 machos) fueron usadas para un experimento grupal, y otras 30 perdices (15 hembras y 15 machos) para un experimento individual. Previo a los experimentos, estas aves fueron pesadas, marcadas (anillas de color con combinaciones únicas) y enjauladas individualmente (95 cm de largo × 40 cm de ancho × 42 cm de altura) con agua y alimentos *ad libitum*. Los protocolos de los experimentos fueron aprobados previamente por el "Comité de Ética y Experimentación Animal" de la Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Tratamientos

Los tratamientos para ambos experimentos (grupal e individual) consistieron en 0, 1 o 6 mg de imidacloprid / kg de peso corporal (llamados C, T1 y T2, respectivamente), administrados a través de sonda gástrica (gavage). Se utilizó imidacloprid grado analítico ($\geq 98.0\%$, Pestanal, Sigma®) disuelto en aceite de maíz comestible. Considerando la DL50 de una especie similar, la codorniz japonesa (DL50 = 31 mg/kg p.v.), los tratamientos equivalen al 3 y 20 % de esta DL50. Todos los volúmenes se administraron de acuerdo con el peso corporal de cada individuo, incluidos los controles, en los cuáles sólo se administró el aceite. El volumen de dosificación siempre fue 1 ml/kg PC.

Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en un recinto de 3 m de largo x 2 m de ancho x 2 m de altura, con el suelo marcado con cuadrados de 0,5 m de lado, diferenciando una zona de alta exposición y otra de baja exposición al estímulo de depredación (Fig.2.1). El experimento grupal consistió en exponer secuencialmente 3 grupos de 12 aves cada uno (4 aves de cada tratamiento/grupo, mitad hembras y mitad machos) a un estímulo auditivo intraespecífico de peligro (alarma de perdices, denominada A1), a un estímulo de depredador aéreo simulando una rapaz (ida y vuelta, llamados R1 y R2 respectivamente), y a un estímulo visual de depredador terrestre simulando un zorro (llamado FX) después de 2 h de haber recibido el imidacloprid (Fig. 2.2). Los 15 minutos totales del experimento grupal fueron registrados mediante cámara de video externa, frente a la puerta del recinto. El estímulo A1 consistió en una grabación de llamadas de alarma de perdices transmitida a través de un dispositivo de audio por un operador oculto ubicado en uno de los ángulos del recinto. R1 y R2 consistieron en una silueta de rapaz (simulando un aguilucho cenizo *Circus pygargus*) de madera contrachapada de 45 cm de evergadura que pasaba sobre el techo del recinto a una velocidad aproximada

de 0.5 m/s, 3 m por encima del piso. La silueta fue movida por un operador oculto que la movió a lo largo de una tirolesa utilizando un carretel de pesca de alta velocidad con línea de monofilamento. El estímulo FX fue una piel de zorro real sobre un esqueleto de alambre que simulaba el cuerpo del animal. La maqueta del zorro se fijó en un carro que se movía a lo largo de una línea recta paralela al recinto, a unos 30 cm del mismo, y fue tirado por un operador oculto mediante hilo transparente a una velocidad aproximada de 0.2 m/s.

El experimento individual consistió en exponer por única vez a un individuo (10 individuos/tratamiento) por 10 minutos después de las 2 h de recibir el tratamiento a dos estímulos auditivos, uno intraespecífico (alarma de perdiz - A1) y otro interespecífico (alarma de urracas - A2) y a los dos estímulos visuales de depredadores simulados (R1 y FX, como en el experimento grupal). La secuencia y duración de los estímulos se detalla en la Fig. 2.2. Los 10 minutos totales del experimento individual fueron registrados tanto por la cámara de video externa, frente a la puerta del recinto, como por una cámara interna, ubicada en uno de los ángulos del recinto (Fig. 2.1). La alarma de urraca (A2) se transmitió con el mismo dispositivo y operario que el estímulo A1. Después de la exposición a los estímulos amenazantes del experimento individual, se realizó un análisis neurológico en cada ave del experimento individual. Se midieron el reflejo de amenaza, el reflejo pupilar directo, el reflejo palpebral, la expresión de la cara, la capacidad de cerrar la mandíbula, el reflejo nauseoso, el tono de la lengua, el tono muscular, la propiocepción consciente de las piernas y las alas, el reflejo del aleteo y el aterrizaje, y el reflejo espinal de la retirada de la pierna.

Se distinguieron 6 categorías de comportamiento de respuesta ante los estímulos amenazantes: 1) escape (E: el ave salta, corre o vuela), 2) vigilancia con desplazamiento (Vd: el ave está vigilante, es decir erguida, con el cuello estirado y moviendo la cabeza para escanear visualmente, y camina, generalmente en sentido contrario al estímulo amenazante), 3) vigilancia sin desplazamiento (V: el ave se mantiene vigilante en el lugar), 4) inmovilización (F: el ave queda inmóvil), 5) agachamiento (Fc: el ave se agacha, queda en cuclillas, inmóvil), y 6) sin comportamiento antidepredador (CNAD: cualquier comportamiento diferente a los comportamientos antidepredador, como por ejemplo caminar no vigilante, picoteo del suelo, baño de arena, sacudida del plumaje, aleteo, acicalamiento, beber). Para facilitar la comparación entre aves controles y tratadas respecto a un efecto neurosupresor o neuroexitador del insecticida, las categorías de comportamiento E y Vd se combinaron (E+Vd) formando una medida compuesta denominada "comportamiento antidepredador activo" (CAPA). Por otra

parte, las categorías V, F y Fc se combinaron (V+F+Fc) formando una medida compuesta denominada “comportamiento antidepredador pasivo” (CAPP).

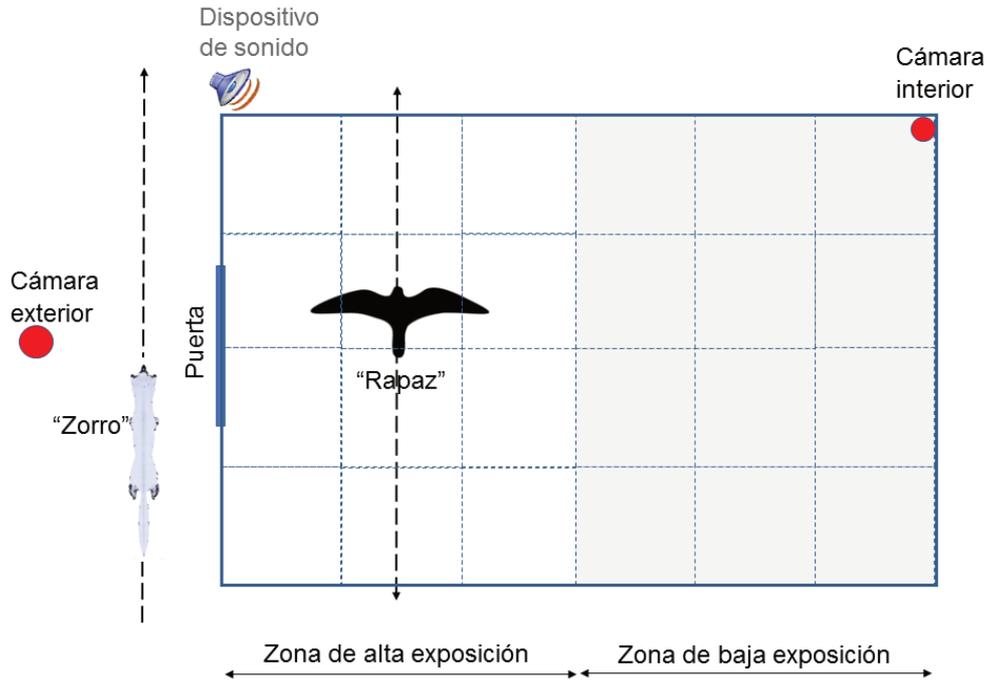


Fig. 2.1. Diagrama de la clausura donde se llevaron a cabo los ensayos de comportamiento de perdices rojas dosificadas con dosis subletales de imidacloprid.

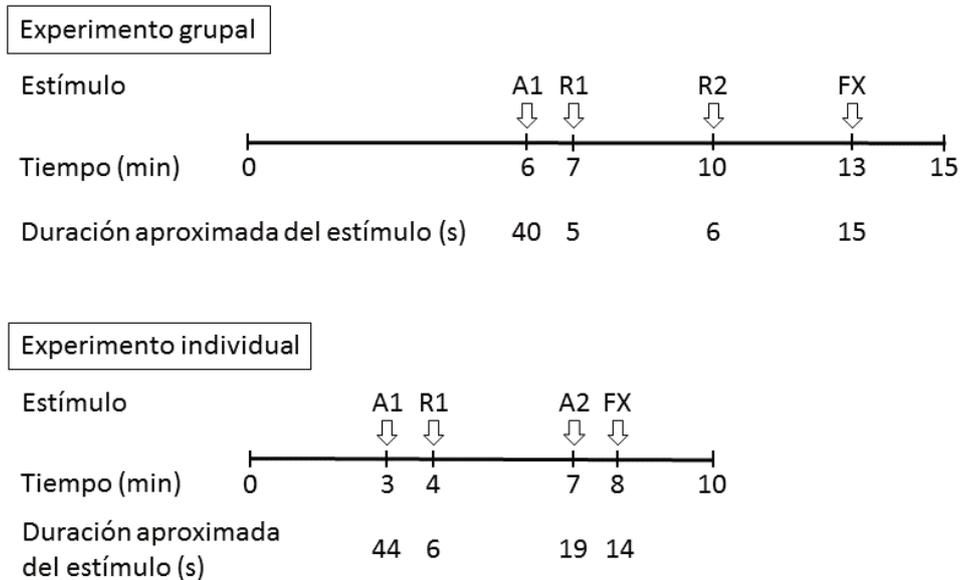


Fig. 2.2. Secuencia y duración de la exposición de perdices rojas a los estímulos amenazantes en el experimento grupal e individual. A1: alarma intraespecífica, A2: alarma interespecífica, R1: simulación de rapaz yendo, R2: simulación de rapaz volviendo, FX: simulación de zorro.

De cada categoría de comportamiento se contó el número de individuos que lo realizaron y su duración (segundos dedicados al comportamiento de respuesta antidepredador), mediante muestreo focal continuo (Martin y Bateson, 1993) durante el tiempo que duraba el estímulo. En las categorías que implicaron movimiento (E y Vd) se determinó la velocidad de las mismas en metros/segundos. También se midió la latencia (tiempo desde el inicio del estímulo hasta el inicio del comportamiento respuesta, medido en segundos). Las vocalizaciones se consideraron sólo en el experimento individual, registrándose como vocalizó/no vocalizó ante los estímulos amenazantes.

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron usando GLMM con el programa R (R Core Team, 2021; versión 4.1.1) y el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2017), considerando los experimentos grupal e individual por separado. La proporción de individuos que mostraron comportamientos antidepredador se analizó determinando presencia/ausencia de cada comportamiento en los individuos usando una distribución Binomial. La latencia y el tiempo gastado en los comportamientos se midió en segundos enteros, ajustándose los datos así generalmente a distribuciones Poisson o Binomial Negativa, y en algún caso a la distribución Conway-Maxwell-Poisson (Conway y Maxwell, 1962; Shmueli et al., 2005). Cuando correspondió, el logaritmo del tiempo total del estímulo se agregó al modelo a través de un término offset y se modelaron los ceros (ziformula= ~ 1). Para analizar la velocidad de los comportamientos activos se utilizó la distribución gaussiana o la Tweedie (Tweedie, 1984), y para las vocalizaciones se usó una distribución binomial. Los factores fijos fueron estímulo, tratamiento, sexo y zona donde se encontraba el ave en el momento del estímulo (AE, zona de alta exposición; o BE, zona de baja exposición). El peso corporal anidado al individuo se agregó como factor aleatorio en cada modelo. Los ajustes a los modelos se realizaron usando el paquete DHARMA (Hartig, 2021). Las comparaciones múltiples se realizaron con el test de Tukey usando los paquetes lsmeans (Lenth, 2016) y multcompView (Graves et al., 2019). Los resultados de las pruebas neurológicas se analizaron mediante un test de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre los tratamientos.

Resultados

Tanto en el experimento grupal como en el individual, la proporción de aves que respondieron a los estímulos no varió entre tratamientos (Tablas 2.1 y 2.2). Sin embargo, cabe destacar que sólo las aves control (aves C) escaparon ante el estímulo zorro en el experimento individual (Tabla 2.2). Tampoco la latencia y la duración de los comportamientos variaron entre aves tratadas y controles (Tablas 2.3 y 2.4.), excepto en el comportamiento de agachamiento frente a los estímulos visuales en el experimento grupal (Fig. 2.3) y en el de vigilancia sin desplazamiento ante el estímulo auditivo intraespecífico en el experimento individual (Fig. 2.4). En cuanto a las velocidades de las respuestas activas, cabe notar una velocidad promedio de escape y de la vigilancia con desplazamiento mayor en las aves control que en las tratadas ante la vuelta de la rapaz y el cruce del zorro en el experimento grupal, aunque la diferencia no haya resultado significativa (Tabla 2.3). En el experimento individual, las vocalizaciones no difirieron entre tratamientos (Tabla 2.2). Las aves vocalizaron sólo ante los estímulos visuales, y principalmente si se encontraban en la zona de alta exposición AE ($p=0.027$).

Los casos (número de individuos que respondieron con comportamientos antidepredatorios) y la duración de los comportamientos generalmente variaron entre los estímulos, tanto en el experimento grupal como en el individual (Tabla 2.5). En el experimento grupal, por ejemplo, hubo más casos de aves con latencia ante el estímulo zorro que ante el resto de los estímulos. En cambio, en el experimento individual, hubo más casos de latencia ante la alarma intraespecífica que ante el resto de los estímulos (Tabla 2.5). El estímulo del paso de la rapaz fue el que produjo el mayor número y duración de respuestas de escape (letras b y c en "Escapa" de Tabla 2.5). En ambos experimentos, la duración de la latencia fue menor ante el estímulo zorro (indicado con letra a en Tabla 2.5) y las aves escaparon más rápido ante la rapaz (indicado con letra b en Tabla 2.5). En el experimento grupal, el comportamiento de inmovilidad estuvo ausente y ningún ave escapó ni se agachó ante el estímulo auditivo intraespecífico (espacios vacíos en Tabla 2.5). Ante los estímulos auditivos predominaron los comportamientos de vigilancia (con y sin desplazamiento), particularmente al inicio del estímulo, y luego las aves continuaban con comportamientos no antidepredador hasta el final del estímulo. Sólo ante los estímulos auditivos hubo aves que nunca respondieron con comportamientos antidepredador. En cambio, todas las aves respondieron con algún comportamiento antidepredador ante los estímulos visuales. Las respuestas de escape, inmovilidad y vocalización fueron mayores cuando el ave se encontraba en la zona de alta exposición que en la de baja exposición (indicado con letra b en la zona AE de Tabla 2.5). En cuanto a los análisis neurológicos, sólo el reflejo

pupilar mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0,04$), con respuesta disminuida en las aves T1. El peso corporal promedio de las hembras fue 423,5 g ($SE=\pm 6,6$ g) y el de los machos fue 464,1 g ($SE=\pm 6,1$ g). En ningún ave se observaron signos neurológicos evidentes de intoxicación, como falta de coordinación, ataxia o convulsiones durante los experimentos. La cantidad de imidacloprid promedio incorporada por las aves a través del T1 fue 0,423 mg en hembras y 0,464 mg en machos, y la incorporada a través del T2 fue 2,541 mg en hembras y 2,785 en machos.

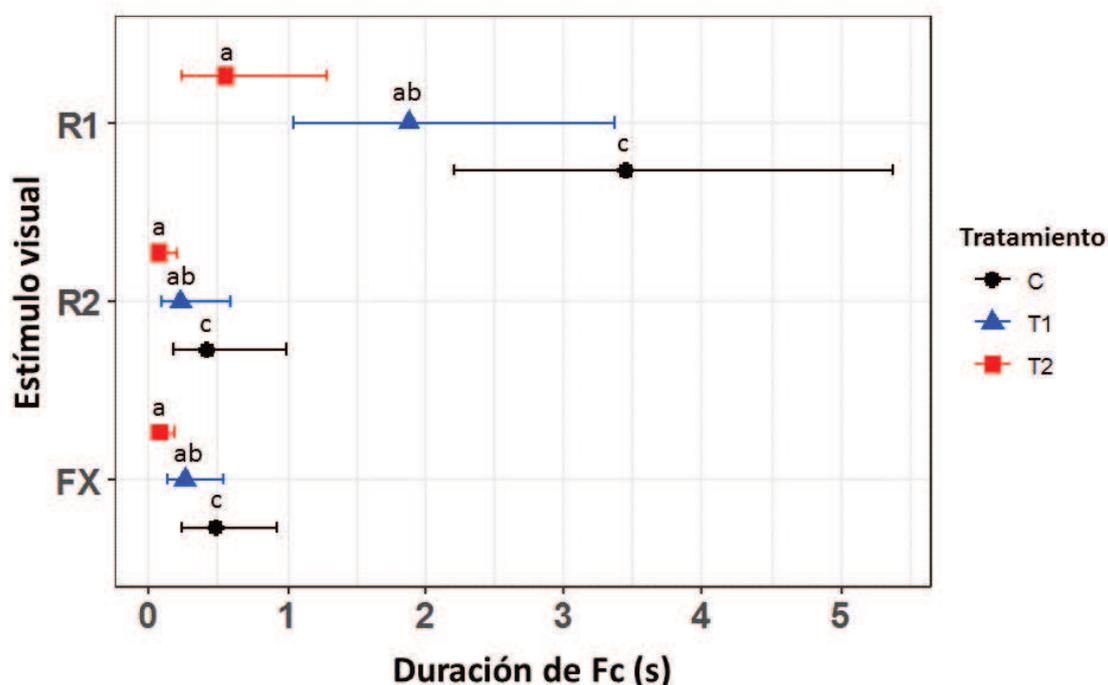


Fig. 2.3. Duración (media \pm IC 95%) del comportamiento de agachamiento (Fc) de las perdiscas rojas en cada tratamiento ante los estímulos visuales R1 (“rapaz” yendo), R2 (“rapaz” volviendo) y FX (“zorro”) en el experimento grupal. C: control, T1: 0 mg i.a./kg PC, T1: 1 mg i.a./kg PC, T2: 6 mg i.a./kg PC. Las letras indican diferencia significativa entre C y T2.

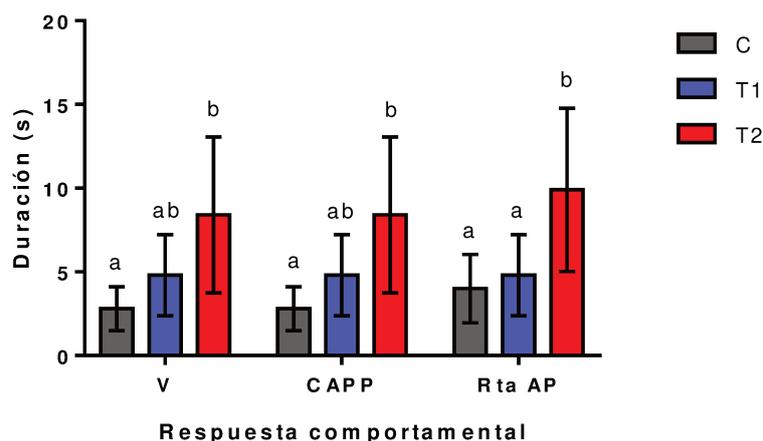


Fig. 2.4. Duración (media \pm SE) del comportamiento de vigilancia sin desplazamiento (V), de los comportamientos antidepredador pasivos (CAPP) y de las respuestas anti-depredador (Rtas AP) en cada tratamiento (C=0 mg i.a./kg PC, T1=1 mg i.a./kg PC, T2=6 mg i.a./kg PC) ante el estímulo alarma intraespecífica (A1) en el experimento individual. Letras distintas indican diferencia significativa.

Tabla 2.1. Número y porcentaje (entre paréntesis) de individuos tratados con imidacloprid (n=12 por tratamiento) que mostraron comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos amenazantes en el experimento grupal.

Estímulo	Comportamiento	Número de individuos (%)		
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)
Alerta auditiva intraespecífica	Latencia	6 (50)	9 (75)	6 (50)
	A: Escapa	0	0	0
	B: Vigila y camina	2 (17)	1 (8)	4 (33)
	C: Vigila	10 (83)	8 (67)	9 (75)
	D: Inmóvil	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	E: Agachada	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	A+B: CAPA	2 (17)	1 (8)	4 (33)
	C+D+E: CAPP	10 (83)	8 (67)	9 (75)
	A+B+C+D+E: Con respuesta	10 (83)	8 (67)	9 (75)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	2 (17)	4 (33)	3 (25)
Rapaz en vuelo (ida)	Latencia	9 (75)	7 (64)*	5 (45)*
	A: Escapa	6 (50)	8(73)*	6 (54)*
	B: Vigila y camina	5 (42)	4 (36)*	4 (36)*
	C: Vigila	8 (67)	6 (54)*	7 (64)*

	D: Inmóvil	0 (0)	0 (0)*	0 (0)*
	E: Agachada	3 (25)	2 (18)*	1 (9)*
	A+B: CAPA	9 (75)	10 (91)*	8 (73)*
	C+D+E: CAPP	11 (92)	7 (64)*	8 (73)*
	A+B+C+D+E: Con respuesta	12 (100)	11 (100)	11 (100)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rapaz en vuelo (vuelta)	Latencia	4 (33)	4 (33)	3 (27)*
	A: Escapa	7 (58)	7 (58)	6 (54)*
	B: Vigila y camina	8 (67)	6 (50)	5 (45)*
	C: Vigila	6 (50)	7 (58)	8 (73)*
	D: Inmóvil	0 (0)	0 (0)	0 (0)*
	E: Agachada	1 (8)	0 (0)	1 (9)*
	A+B: CAPA	10 (83)	10 (83)	9 (82)*
	C+D+E: CAPP	6 (50)	7 (58)	8 (73)*
	A+B+C+D+E: Con respuesta	12 (100)	12 (100)	11 (100)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Zorro cruzando	Latencia	9 (75)	10 (83)	10 (83)
	A: Escapa	2 (18)*	2 (17)	1 (8)
	B: Vigila y camina	8 (73)*	10 (83)	9 (75)
	C: Vigila	10 (90)*	11 (92)	8 (67)
	D: Inmóvil	0 (0)*	0 (0)	0 (0)
	E: Agachada	2 (18)*	2 (17)	1 (8)
	A+B: CAPA	9 (82)*	10 (83)	9 (75)
	C+D+E: CAPP	10 (91)*	11 (92)	8 (67)
	A+B+C+D+E: Con respuesta	11 (100)	12 (100)	12 (100)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*n=11. CNAD: comportamiento no antidepredador. El número y porcentaje de individuos con comportamientos antipredador no difirió significativamente entre los tratamientos ($p>0.05$ en todos los casos).

Tabla 2.2. Número y porcentaje (entre paréntesis) de individuos tratados con imidacloprid (n=10 por tratamiento) que mostraron comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos amenazantes en el experimento individual.

Estímulo	Comportamiento	Número de individuos y (%)		
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)
Alerta auditiva intraespecífica	Latencia	8 (80)	6 (60)	9 (90)
	A: Escapa	0 (0)	0 (0)	2 (20)
	B: Vigila y camina	2 (20)	0 (0)	2 (20)
	C: Vigila	4 (40)	4 (40)	4 (40)
	D: Inmóvil	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	E: Agachada	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	A+B: CAPA	2 (20)	0 (0)	3 (30)
	C+D+E: CAPP	4 (40)	4 (40)	4 (40)
	A+B+C+D+E: Con respuesta	4 (40)	4 (40)	4 (40)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	6 (60)	6 (60)	6 (60)
	Vocalizó	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Alerta auditiva interespecífica	Latencia	5 (56)*	5 (50)	5 (50)
	A: Escapa	1 (11)*	0 (0)	0 (0)
	B: Vigila y camina	0 (0)*	0 (0)	2 (20)
	C: Vigila	5 (56)*	5 (50)	6 (60)
	D: Inmóvil	0 (0)*	0 (0)	0 (0)
	E: Agachada	0 (0)*	0 (0)	0 (0)
	A+B: CAPA	1 (11)*	0 (0)	2 (20)
	C+D+E: CAPP	5 (56)*	5 (50)	6 (60)
	A+B+C+D+E: Con respuesta	5 (56)*	5 (50)	6 (60)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	4 (44)*	5 (50)	4 (40)
	Vocalizó	0 (0)*	0 (0)	0 (0)
Rapaz en vuelo (ida)	Latencia	0 (0)	1 (10)	3 (30)
	A: Escapa	5 (50)	6 (60)	3 (30)
	B: Vigila y camina	6 (60)	6 (60)	5 (50)
	C: Vigila	3 (30)	3 (30)	2 (20)
	D: Inmóvil	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	E: Agachada	5 (50)	4 (40)	3 (30)
	A+B: CAPA	7 (70)	8 (80)	6 (60)
	C+D+E: CAPP	8 (80)	7 (70)	7 (70)

Zorro cruzando	A+B+C+D+E: Con respuesta	10 (100)	10 (100)	10 (100)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Vocalizó	2 (20)	5 (50)	2 (20)
	Latencia	4 (40)	7 (70)	7 (70)
	A: Escapa	2 (20)	0 (0)	0 (0)
	B: Vigila y camina	8 (80)	8 (80)	6 (60)
	C: Vigila	4 (40)	6 (60)	4 (40)
	D: Inmóvil	2 (20)	4 (40)	5(50)
	E: Agachada	1 (10)	1 (10)	0 (0)
	A+B: CAPA	9 (90)	8 (80)	6 (60)
	C+D+E: CAPP	6 (60)	10 (100)	9 (90)
	A+B+C+D+E: Con respuesta	10 (100)	10 (100)	10 (100)
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Vocalizó	5 (50)	0 (0)	2 (20)

*n=9. CAPA: respuesta activa, CAPP: respuesta pasiva, CNAD: comportamiento no antidepredador. El número y porcentaje de individuos con comportamientos antipredador no difirió significativamente entre los tratamientos ($p>0.05$ en todos los casos).

Tabla 2.3. Latencia y tiempo (s, media \pm SE) invertido por las perdices expuestas a imidacloprid (n=12 por tratamiento) en los comportamientos antidepredador ante diferentes estímulos en los ensayos grupales.

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y Velocidad (m/s)			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
Alerta auditiva intraespecífica (alarma de perdices)	Latencia	7,75 \pm 4,38	13,2 \pm 5,52	13,50 \pm 5,55	a, a, a
	A: Escapa	0	0	0	
		0	0	0	
	B: Vigila y camina	1,17 \pm 0,93	0,58 \pm 0,58	1,58 \pm 0,73	a, a, a
		0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	a, a, a
	C: Vigila	8,16 \pm 1,69	8,58 \pm 3,11	10,00 \pm 2,79	a, a, a

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y Velocidad (m/s)			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
Rapaz en vuelo (ida)	D: Inmóvil	0	0	0	
	E: Agachada	0	0	0	
	A+B: CAPA	1,17 ± 0,93 0,01 ± 0,01	0,58 ± 0,58 0,01 ± 0,01	1,58 ± 0,73 0,04 ± 0,02	a, a, a a, a, a
	C+D+E: CAPP	8,17 ± 1,69	8,58 ± 3,11	10,00 ± 2,79	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	9,33 ± 1,68	9,17 ± 3,12	11,58 ± 0,43	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	40,00 ± 2,00	39,75 ± 1,03	39,00 ± 1,00	a, a, a
	Latencia	1,08 ± 0,29	0,91 ± 0,28	0,91 ± 0,41	a, a, a
	A: Escapa	1,08 ± 0,34 0,31 ± 0,10	1,54 ± 0,43 0,57 ± 0,15	1,73 ± 0,57 0,31 ± 0,09	a, a, a a, a, a
	B: Vigila y camina	1,17 ± 0,44 0,12 ± 0,05	0,73 ± 0,38 0,06 ± 0,03	1,36 ± 0,68 0,12 ± 0,06	a, a, a a, a, a
	C: Vigila	1,17 ± 0,30	1,54 ± 0,59	1,27 ± 0,54	a, a, a
Rapaz en vuelo (vuelta)	D: Inmóvil	0	0	0	
	E: Agachada	0,83 ± 0,46	0,45 ± 0,36	0,09 ± 0,09	a, ab, b
	A+B: CAPA	2,25 ± 0,52 0,43 ± 0,12	2,27 ± 0,38 0,63 ± 0,16	3,09 ± 0,72 0,43 ± 0,11	a, a, a a, a, a
	C+D+E: CAPP	2,00 ± 0,35	2,00 ± 0,60	1,36 ± 0,53	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	4,25 ± 0,49	4,27 ± 0,45	4,45 ± 0,54	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0	0	0	
	Latencia	0,67 ± 0,31	0,75 ± 0,33	0,64 ± 0,39	a, a, a
A: Escapa	1,50 ± 0,47 0,46 ± 0,14	1,42 ± 0,53 0,43 ± 0,13	1,45 ± 0,43 0,32 ± 0,10	a, a, a a, a, a	
B: Vigila y camina	2,33 ± 0,74 0,20 ± 0,05	1,50 ± 0,56 0,15 ± 0,06	1,27 ± 0,54 0,08 ± 0,04	a, a, a a, a, a	

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y Velocidad (m/s)			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
Zorro cruzando	C: Vigila	1,42 ± 0,51	2,33 ± 0,69	2,64 ± 0,72	a, a, a
	D: Inmóvil	0	0	0	
	E: Agachada	0,08 ± 0,08	0	0,09 ± 0,09	a, ab, b
	A+B: CAPA	3,83 ± 0,75	2,92 ± 0,58	2,72 ± 0,60	a, a, a
		<i>0,66 ± 0,15</i>	<i>0,57 ± 0,15</i>	<i>0,41 ± 0,09</i>	<i>a, a, a</i>
	C+D+E: CAPP	1,50 ± 0,51	2,33 ± 0,69	2,73 ± 0,75	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	5,33 ± 0,51	5,25 ± 0,58	5,45 ± 0,62	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0	0	0	
	Latencia	1,91 ± 0,41	2,00 ± 0,41	2,42 ± 0,47	a, a, a
	A: Escapa	0,27 ± 0,19	0,17 ± 0,11	0,50 ± 0,50	a, a, a
		<i>0,14 ± 0,10</i>	<i>0,08 ± 0,06</i>	<i>0,04 ± 0,04</i>	<i>a, a, a</i>
	B: Vigila y camina	6,36 ± 1,43	8,58 ± 1,29	7,25 ± 1,52	a, a, a
		0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,03	<i>a, a, a</i>
C: Vigila	6,64 ± 1,38	4,42 ± 1,20	5,08 ± 1,45	a, a, a	
D: Inmóvil	0	0	0		
E: Agachada	0,18 ± 0,12	0,17 ± 0,11	0,08 ± 0,08	a, ab, b	
A+B: CAPA	6,64 ± 1,38	8,75 ± 1,32	7,75 ± 1,50	a, a, a	
	<i>0,25 ± 0,09</i>	<i>0,18 ± 0,06</i>	<i>0,16 ± 0,05</i>	<i>a, a, a</i>	
C+D+E: CAPP	6,82 ± 1,39	4,58 ± 1,18	5,17 ± 1,49	a, a, a	
A+B+C+D+E: Con respuesta	13,45 ± 0,43	13,33 ± 0,39	12,92 ± 0,42	a, a, a	
Sin respuesta (sólo CNAD)	0	0	0		

En las respuestas activas se muestra también (en cursiva) la velocidad en los desplazamientos (media ± SE). CAPA: respuesta activa, CAPP: respuesta pasiva, CNAD: comportamiento no anti-depredador. Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2.4. Latencia y tiempo (s, media \pm SE) invertido por las perdices tratadas con imidacloprid (n=10 por tratamiento) en los comportamientos antidepredador ante los diferentes estímulos en el experimento individual.

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y Velocidad (m/s)			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
Alerta auditiva intraespecífica (alarma de perdices)	Latencia	26,70 \pm 6,87	26,30 \pm 7,16	28,00 \pm 6,71	a, a, a
	A: Escapa	0 0	0 0	0,60 \pm 0,4 0,11 \pm 0,08	a, a, a a, a, a
	B: Vigila y camina	1,20 \pm 0,80 0,06 \pm 0,04	0 0	0,90 \pm 0,60 0,03 \pm 0,02	a, a, a a, a, a
	C: Vigila	2,80 \pm 1,31	4,80 \pm 2,42	8,40 \pm 4,66	a, ab, b
	D: Inmóvil	0	0	0	
	E: Agachada	0	0	0	
	A+B: CAPA	1,20 \pm 0,80 0,06 \pm 0,04	0 0	1,50 \pm 0,78 0,14 \pm 0,10	a, a, a a, a, a
	C+D+E: CAPP	2,80 \pm 1,31	4,80 \pm 2,42	8,40 \pm 4,66	a, a, b
	A+B+C+D+E: Con respuesta	4,00 \pm 2,04	4,80 \pm 2,42	9,90 \pm 4,88	a, a, b
	Sin respuesta (sólo CNAD)	43,50 \pm 0,22	43,83 \pm 0,17	44,33 \pm 0,21	a, a, a
Alerta auditiva interespecífica (alarma de urracas)	Latencia	9,00 \pm 3,41	9,70 \pm 3,23	7,80 \pm 3,05	a, a, a
	A: Escapa	0,22 \pm 0,22 0,05 \pm 0,05	0 0	0 0	a, a, a a, a, a
	B: Vigila y camina	0 0	0 0	2,10 \pm 1,45 0,02 \pm 0,02	a, a, a a, a, a
	C: Vigila	7,89 \pm 2,80	8,10 \pm 2,07	6,60 \pm 1,31	a, a, a
	D: Inmóvil	0	0	0	
	E: Agachada	0	0	0	
	A+B: CAPA	0,22 \pm 0,22 0,05 \pm 0,05	0 0	2,10 \pm 1,45 0,02 \pm 0,02	a, a, a a, a, a

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y Velocidad (m/s)			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
Rapaz en vuelo (ida)	C+D+E: CAPP	7,89 ± 2,80	8,10 ± 2,85	6,60 ± 2,07	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	8,11 ± 2,84	8,10 ± 2,85	8,70 ± 2,70	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	19,75 ± 0,25	19,40 ± 0,24	19,00 ± 0,00	a, a, a
	Latencia	0	0,20 ± 0,20	1,00 ± 0,52	a, a, a
	A: Escapa	1,50 ± 0,64 <i>0,55 ± 0,22</i>	1,25 ± 0,52 <i>0,75 ± 0,25</i>	0,98 ± 0,63 <i>0,34 ± 0,18</i>	a, a, a
	B: Vigila y camina	2,00 ± 0,67 <i>0,17 ± 0,06</i>	2,35 ± 0,74 <i>0,12 ± 0,04</i>	1,72 ± 0,67 <i>0,17 ± 0,07</i>	a, a, a
	C: Vigila	1,00 ± 0,63	0,75 ± 0,40	0,30 ± 0,21	a, a, a
	D: Inmóvil	1,00 ± 0,70	0	0,90 ± 0,52	a, a, a
	E: Agachada	0,90 ± 0,31	1,45 ± 0,88	1,50 ± 0,78	a, a, a
	A+B: CAPA	3,50 ± 0,86 <i>0,72 ± 0,26</i>	3,60 ± 0,71 <i>0,87 ± 0,25</i>	2,70 ± 0,81 <i>0,51 ± 0,20</i>	a, a, a a, a, a
	C+D+E: CAPP	2,90 ± 0,75	2,20 ± 0,83	2,70 ± 0,76	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	6,40 ± 0,30	5,80 ± 0,42	5,40 ± 0,58	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0	0	0	
	Zorro cruzando	Latencia	0,80 ± 0,42	1,50 ± 0,48	1,40 ± 0,34
A: Escapa		0,90 ± 0,71 <i>0,23 ± 0,18</i>	0 0	0 0	a, a, a a, a, a
B: Vigila y camina		7,20 ± 1,53 <i>0,21 ± 0,04</i>	4,70 ± 1,01 <i>0,11 ± 0,03</i>	5,80 ± 2,05 <i>0,09 ± 0,03</i>	a, a, a a, a, a
C: Vigila		2,80 ± 1,31	2,30 ± 0,75	2,10 ± 1,17	a, a, a
D: Inmóvil		1,40 ± 1,29	3,10 ± 1,40	6,10 ± 2,05	a, a, a
E: Agachada		0,10 ± 0,10	1,30 ± 1,30	0	a, a, a
A+B: CAPA		8,10 ± 1,40	4,70 ± 1,01	5,80 ± 2,05	a, a, a

Estímulo	Comportamiento	Duración (s) y <i>Velocidad (m/s)</i>			Diferencia significativa
		C (0 mg/kg)	T1 (1 mg/kg)	T2 (6 mg/kg)	
		<i>0,44 ± 0,16</i>	<i>0,11 ± 0,03</i>	<i>0,09 ± 0,03</i>	a, a, a
	C+D+E: CAPP	4,30 ± 1,57	6,70 ± 1,12	8,20 ± 1,64	a, a, a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	12,40 ± 0,83	11,40 ± 0,65	14,00 ± 1,20	a, a, a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	0	0	0	

En las respuestas activas se muestra también (en cursiva) la velocidad en los desplazamientos (m/s, media ± SE). CAPA: respuesta activa, CAPP: respuesta pasiva, CNAD: comportamiento no antidepredador. Letras diferentes en la última columna indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2.5. Diferencias estadísticas (letras diferentes) en el número de individuos con comportamientos antidepredador (casos) y la duración del comportamiento entre los diferentes estímulos amenazantes (A1, A2, R1, R2, FX) y ubicación de las aves en la jaula en el momento del estímulo (zona).

Experimento	Comportamiento	Estímulos								Zonas			
		Grupal				Individual				Grupal		Individual	
		A1	R1	R2	FX	A1	A2	R1	FX	BE	AE	BE	AE
Casos	Latencia	ab	ab	a	b	b	ab	a	ab	a	a	a	b
	A: Escapa		b	b	a	a	a	b	a	a	b	a	b
	B: Vigila y camina	a	ab	bc	c	a	a	b	b	a	a	a	a
	C: Vigila	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	D: Inmóvil					a	a	a	a			a	b
	E: Agachada		a	a	a			a	a	a	a	a	a
	A+B: CAPA	a	b	b	b	a	a	a	a	a	b	a	a
	C+D+E: CAPP	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	A+B+C+D+E: Con respuesta	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	Sin respuesta (sólo CNAD)	a				b	a			a	a	a	a
	Vocalizó						a	a			a	b	
Duración	Latencia	b	ab	ab	a	b	b	ab	a	b	a	a	a
	A: Escapa		b	b	a	ab	a	c	b	a	b	a	a
	B: Vigila y camina	a	b	bc	c	b	a	a	a	a	b	a	a

Experimento Comportamiento	Estímulos								Zonas			
	Grupal				Individual				Grupal		Individual	
	A1	R1	R2	FX	A1	A2	R1	FX	BE	AE	BE	AE
C: Vigila	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a
D: Inmóvil					a	a	a	a			a	a
E: Agachada			b	ab	a			b	a	a	a	a
A+B: CAPA	a	b	b	b	a	b	c	bc	a	a	a	a
C+D+E: CAPP	a	a	a	a	a	c	bc	b	a	a	a	a
A+B+C+D+E: Con respuesta	b	a	a	b	b	b	a	b	a	a	a	a
Sin respuesta (sólo CNAD)	a	a	a	a	b	a			a	a	a	a
Velocidad E*	a	b	b	a	ab	ab	b	a	a	b	a	a
Velocidad Vd	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Velocidad CAPA*	a	b	b	a	ab	a	b	a	a	b	a	a

*Diferencia significativa entre sexos ($p < 0.05$): hembra escapa más rápido que macho en el experimento grupal. El orden alfabético es proporcional a los valores de las variables comportamentales ($a < b < c$). E: escape; Vd: vigila y camina. CAPA: Comportamiento antidepredador activo (E+Vd). CNAD: comportamiento no antidepredador. BE: zona de baja exposición, AE: zona de alta exposición. A1. Alarma intraespecífica, A2: alarma interespecífica, R1: simulación de rapaz yendo, R2: simulación de rapaz volviendo, FX: simulación de zorro.

Discusión

En general, los tratamientos con imidacloprid no produjeron efectos significativos en las respuestas de comportamiento antidepredador en los experimentos grupal e individual. Los comportamientos aparentemente afectados por el tratamiento fueron parte de los identificados como pasivos: el agachamiento ante los estímulos visuales (rapaz y zorro) en el experimento grupal y la vigilancia ante la alarma intraespecífica en el experimento individual. Ambos hechos podrían sugerir un efecto excitante, dado que a las aves tratadas podría costarle más esfuerzo permanecer en la posición de agachado si están excitadas, y extender el tiempo de vigilancia por igual motivo. Otra contribución a esta idea es que las aves dosificadas con la dosis más baja de imidacloprid escaparon en promedio más rápido que el resto ante la primera exposición al estímulo rapaz, tanto en el experimento grupal como en el individual (Tabla 2.3 y 2.4). Sin embargo, ante el segundo estímulo rapaz y el estímulo zorro, ocurrió lo contrario: las aves controles escaparon en promedio más rápido, e incluso las aves tratadas en el experimento individual ni siquiera lo hicieron, sólo caminaron (Tablas 2.3 y 2.4). Por lo

tanto, un efecto excitante del imidacloprid a dosis bajas no puede generalizarse aquí a estímulos visuales sucesivos, sino que este efecto se limitaría al primer estímulo visual amenazante que percibe, pudiendo existir cierta habituación más rápida ante los estímulos siguientes.

Los escasos efectos sobre el comportamiento antidepredatorio observados en las aves tratadas respecto a las controles posiblemente se deban a las bajas dosis administradas y/o al uso de ingrediente activo en vez de formulación plaguicida, ya que las formulaciones suelen ser más tóxicas que los ingredientes activos solos (Nagy et al., 2020). Ninguna perdiz roja evidenció alteraciones neurológicas tales como ataxia, a diferencia de gorriones alimentados con 6 mg/kg de imidacloprid (T2 en este estudio) granulado de los que Cox (2001) describe síntomas de incoordinación, falta de respuesta e inhabilidad para volar. Por otra parte, codornices comunes (*Coturnix coturnix*), pertenecientes a la misma familia de las perdices rojas (Phasianidae), dosificadas con imidacloprid solo (4,5 mg/kg PC) o mezclado con polietilenglicol (PEG-600) como adyuvante (3,995 mg/kg PC de imidacloprid y 10 ml/kg PC de PEG) exhibieron debilidad general, salivación, a veces excitación y varios síntomas motores como patadas y temblores (Rawi et al., 2019). Estos diferentes resultados ante una misma dosis o dosis similares del químico podrían explicarse por diferencias interespecíficas de sensibilidad al plaguicida y/o por el efecto potenciador de los aditivos en las formulaciones comerciales del imidacloprid. Por otro lado, es necesario mencionar que todas las mediciones en este estudio se realizaron sólo a las 2 horas posteriores a la dosificación, sin la posibilidad de registrar síntomas neurológicos o alteraciones en el comportamiento que pudieran aparecer más tarde.

Considerando el peso corporal promedio de hembras y machos, las dosis de imidacloprid usadas equivaldrían a menos de un tercio de una semilla de maíz de 0,325 g tratada con una tasa de aplicación usual de 4,5 mg i.a./g de semillas (1,462 mg i.a / semilla de maíz tratada) en el caso de la dosis más baja (T1) y a menos de dos semillas de maíz en el caso de la dosis más alta (T2). Sin embargo, teniendo en cuenta que en análisis de residuos de imidacloprid en semillas de maíz no enterradas en el campo luego de la siembra se halló sólo un 8% de la tasa de aplicación nominal en las semillas (0,375 mg imidacloprid / g semilla de maíz, capítulo 5; es decir 0,122 mg i.a / semilla), las dosis utilizadas aquí podrían ser equivalentes al consumo de menos de 4 semillas de maíz tratadas para la dosis baja y al consumo de aproximadamente 20 semillas de maíz tratadas para la dosis más alta. Por lo tanto, considerando la tasa de aplicación nominal, las dosis usadas aquí equivaldrían a un consumo de semillas de maíz menor al mínimo consumo encontrado en esta especie, i.e 2 semillas (Prosser y Hart, 2005).

En cambio, considerando concentraciones menores más cercanas a las halladas en campo, las dosis usadas podrían asemejarse al rango de semillas de maíz (2 a 12 semillas de maíz/ave) que ingiere la perdiz roja (Prosser y Hart, 2005).

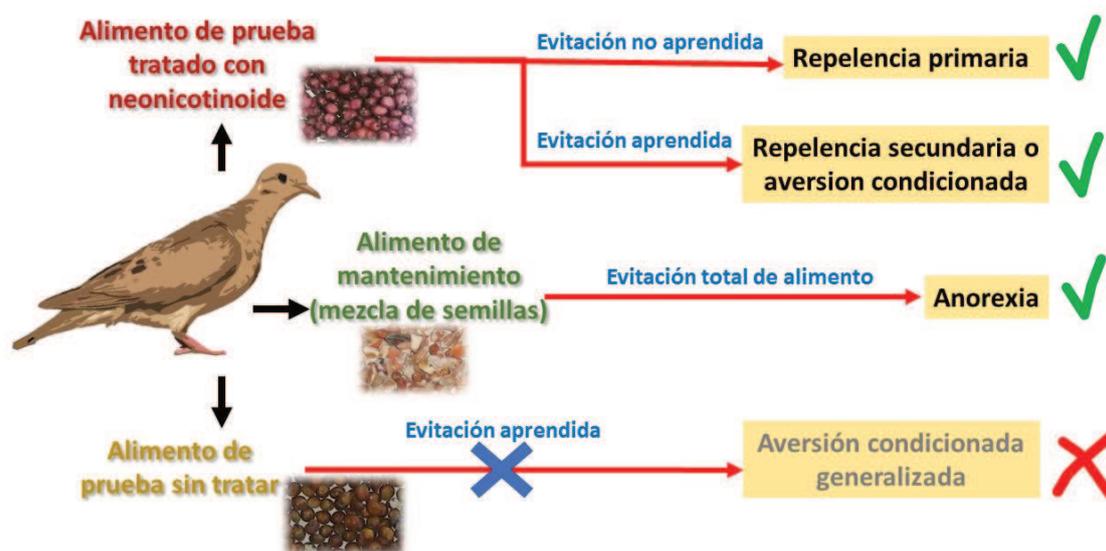
Los estímulos amenazantes visuales (R1, R2, FX) produjeron más comportamientos antidepredador y menor latencia que los estímulos auditivos (A1, A2), tanto en aves controles como en tratadas. Pero este aparente mayor efecto de los estímulos visuales respecto a los auditivos no se observó, en cambio, en polluelos de *Charadrius melodus* criados en cautiverio, los cuales parecieron responder relativamente por igual a estímulos auditivos y visuales (Saunders et al., 2013). Los comportamientos de huida (E y Vd) no parecieron ser notoriamente más frecuentes, duraderos o veloces ante el estímulo de depredador terrestre (FX) respecto al aéreo (R1 y R2) en las aves control en ninguno de los experimentos. Binazzi et al. (2011), en cambio, observaron mayor frecuencia de comportamientos de vigilancia y escape en perdices rojas ante un depredador terrestre simulado que ante un depredador aéreo, y mayor frecuencia de comportamiento de inmovilidad ante el depredador aéreo simulado. Esta diferencia en los resultados podría explicarse por la menor reproducibilidad de las evaluaciones de comportamiento en comparación con las medidas fisiológicas, y porque los comportamientos pueden ser altamente variables debido a su propia flexibilidad (Peterson et al., 2017; Zala y Penn, 2004). Por otro lado, existe evidencia de que las respuestas de miedo, al menos hasta cierto punto, están determinadas genéticamente. Así, en líneas divergentemente seleccionadas de *Coturnix japonica*, por ejemplo, muestran marcadas diferencias en sus respuestas al miedo (Mills et al., 1997).

Conclusión

Los resultados de este estudio sugieren un efecto del imidacloprid a dosis subletales sobre parte de los comportamientos antidepredador asociados a una estrategia pasiva de defensa en las perdices rojas. Al igual que en insectos, bajas dosis de imidacloprid causarían una estimulación nerviosa en las perdices que se vio traducida aquí en una reducción del tiempo en que el ave vigila sin desplazarse y en que el ave permanece agachada. Por lo tanto, es posible concluir que dosis subletales de imidacloprid influyen sobre parte de los comportamientos antidepredador de las perdices rojas tendientes a mimetizarse con el ambiente, reducir su perfil y visibilidad para pasar desapercibidas.

CAPÍTULO 3

Evitación de semillas y cotiledones tratados con neonicotinoides por torcazas cautivas



Publicación derivada:

Addy-Orduna, L.; Cazenave, J.; Mateo, R. 2022. Avoidance of Neonicotinoid-Treated Seeds y Cotyledons by Captive Eared Doves (*Zenaida Auriculata*, Columbidae). *Environmental Pollution*, 304, 119237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119237>.

Resumen

Las aves de las tierras de cultivo pueden estar expuestas a neonicotinoides a través de la ingestión de semillas no enterradas y cotiledones tratados. El objetivo de este estudio fue evaluar la evitación del sorgo tratado con imidacloprid, clotianidin o tiametoxam, de soja con imidacloprid y de cotiledones de soja con imidacloprid o tiametoxam en torcazas (*Zenaida auriculata*). Las torcazas fueron alimentadas con alimentos de prueba (sorgo, soja o cotiledones de soja tratados) y alimento de mantenimiento (mezcla de semillas) durante 3-5 días para estudiar la posible repelencia (repelencia primaria y aversión condicionada) y la anorexia causadas por los alimentos tratados con neonicotinoides, seguido de un período de 7 días con sólo alimento de mantenimiento para estudiar la persistencia del efecto anoréxico después de la exposición a neonicotinoides. Inmediatamente después, las mismas torcazas fueron expuestas a alimentos de prueba tratados durante un segundo período de 3-5 días para estudiar el posible refuerzo de la evitación de alimentos. Finalmente, las torcazas fueron alimentadas con alimentos de prueba no tratados para probar la capacidad del pesticida para inducir aversión condicionada contra los alimentos no tratados en encuentros posteriores. Se determinaron los signos de intoxicación aguda y las diferencias de peso corporal. Con el sorgo, los tres neonicotinoides produjeron una disminución en el consumo de semillas tratadas en >97% en comparación con las aves control. Sin embargo, esto no fue suficiente para evitar la muerte de 3/8 y 1/8 de las torcazas expuestas a imidacloprid y clotianidin, respectivamente. La anorexia se observó claramente con el sorgo tratado con neonicotinoides. Las aves no evitaron el sorgo no tratado después de la exposición al sorgo tratado, lo que indica que la evitación no se generaliza al tipo de alimento sin una señal sensorial asociada. Los resultados obtenidos con semillas de soja y cotiledones fueron menos concluyentes porque las torcazas cautivas apenas consumieron estos alimentos, incluso sin tratamiento neonicotinoide. La evitación de las semillas de sorgo tratadas con neonicotinoides fue insuficiente para prevenir el envenenamiento y la muerte de las torcazas.

Introducción

Dado el uso generalizado de neonicotinoides como tratamiento de semillas, el consumo por parte de las aves de semillas tratadas es una ruta potencial de intoxicación (Goulson, 2014; Lennon et al., 2019; Lopez-Antia et al., 2016, 2013; Roy et al., 2019b; Sánchez-Bayo, 2014; van der Sluijs et al., 2015). Los cotiledones (primera hoja del

embrión de la planta) de las semillas tratadas también podrían ser una vía de exposición, dada la absorción de neonicotinoides por las plantas (Alford y Krupke, 2017; Balfour et al., 2016). Sin embargo, la evitación de alimentos contaminados es un comportamiento que resulta en una reducción en la cantidad de sustancia tóxica ingerida (McKay et al., 1999). Es necesario conocer con precisión los efectos repelentes, anoréxicos y/o aversivos que los neonicotinoides producen en las aves para afinar y valorar adecuadamente su riesgo toxicológico. A pesar de la incertidumbre que aún persiste en cuanto a la medida en que la evitación es efectiva en la naturaleza, y las dificultades de extrapolación de los experimentos con aves cautivas, la evitación debe considerarse en la evaluación del riesgo aviar para mitigar las sobreestimaciones de riesgo. La evitación puede ser parcial, variable y dependiente del contexto, y estos factores deben tenerse en cuenta al evaluar su efecto sobre el riesgo de intoxicación (OECD, 2011).

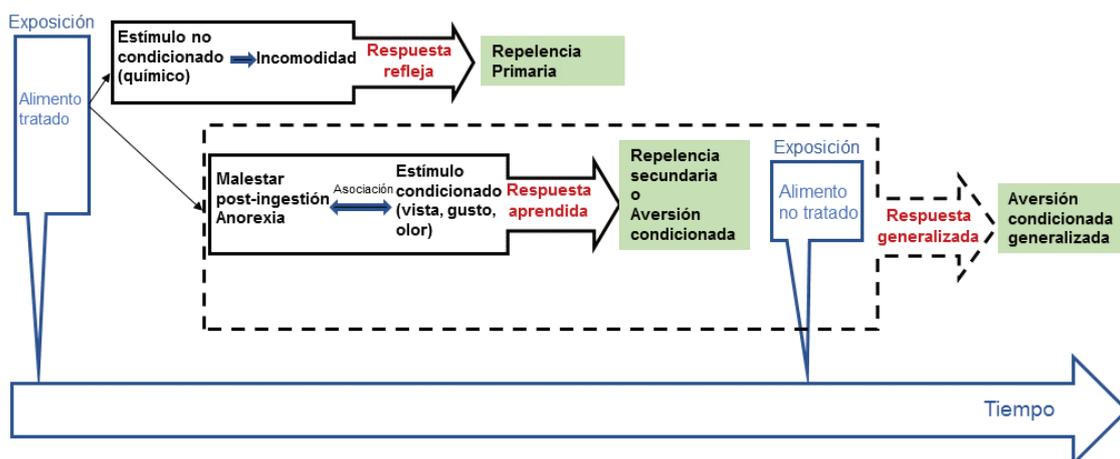


Fig. 3.1. Modelo conceptual de evitación de aves a químicos con propiedades repelentes. La exposición de un ave a un alimento tratado con un repelente primario produce evitación refleja inmediata. En cambio, ante un repelente secundario, un ave lo evita al asociar un estímulo condicionado (sonido, vista, gusto) a una experiencia aversiva (por ejemplo, enfermedad, dolor) resultante de la ingesta del alimento tratado. Si posteriormente se ofrece el mismo alimento pero sin el repelente secundario, el ave podría evitarlo sólo por el tipo de alimento como señal para rechazarlo, originándose una aversión condicionada generalizada.

Diferentes tipos de evitación pueden ser conceptualizados con un modelo (Fig. 3.1) que implica un efecto reflejo de rechazo (repelencia primaria) o una evitación aprendida (repelencia secundaria o aversión condicionada). Por lo tanto, la repelencia primaria se define aquí como un comportamiento de rechazo reflejo inmediato a un tóxico disuasorio que causa una incomodidad inmediata, mientras que la aversión condicionada es un comportamiento que resulta de la asociación entre una señal

sensorial (característica física como forma, sabor, color) de los alimentos y la incomodidad o malestar resultante de la ingesta (Lopez-Antia et al., 2014; Pascual et al., 1999^a). La aversión condicionada puede ocurrir contra el alimento que contiene el tóxico (también conocido como repelencia secundaria), o incluso contra el alimento sin el tóxico, con solo el tipo de alimento como la clave para negarse a comerlo (también conocido como aversión condicionada generalizada). Un efecto adicional involucrado en la evitación es la anorexia, que aquí es la falta de apetito causada por el tóxico (Eng et al., 2019; Grue et al., 1997).

Todavía no hay acuerdo sobre si la evitación reduce efectivamente la exposición de las aves a los neonicotinoides utilizados como tratamiento de semillas. Según López-Antia et al. (2014), las perdices (*Alectoris rufa*) evitan las semillas tratadas con pesticidas por aversión condicionada cuando se dispone de alimentos alternativos. Con respecto al clotianidín, Barfknecht (1998, 1998b y 2000, estudios de la industria no publicados citados por Mineau y Palmer, 2013) informa una evitación completa de las semillas tratadas por codornices (*Coturnix japonica*) y palomas domésticas (*Columba livia*) cuando tienen alimentos alternativos, y una evitación parcial en las palomas cuando solo se ofrecen semillas tratadas. Los estudios realizados con mirlos de alas rojas en cautiverio (*Agelaius phoeniceus*) y tordos cabeza café (*Molothrus ater*) presentan al imidacloprid como un repelente secundario efectivo y de mínimo peligro para las aves (Avery et al., 1993, 1997, 1994). Sin embargo, tanto Mineau y Palmer (2013) como Goulson (2013) sugirieron que la evitación de las semillas tratadas no se ha demostrado lo suficientemente bien en un contexto realista (es decir, abordar adecuadamente el estrés por hambre y la motivación para comer semillas nuevas) para creer que mitigará un alto riesgo toxicológico. Recientemente, Roy y Coy (2020) demostraron que en derrames simulados no todas las aves comen semillas tratadas con neonicotinoides, pero algunas comen lo suficiente como para producir efectos adversos.

Para aclarar la evitación causada por los neonicotinoides, se llevaron a cabo tres experimentos consecutivos con formulaciones de imidacloprid, clotianidín y tiametoxam en una especie de ave granívora sudamericana (torcazas, *Zenaidura macroura*, Columbidae) en jaulas individuales. Los objetivos fueron evaluar la repelencia primaria, la anorexia y la aversión condicionada a las semillas de sorgo y soja, y a los cotiledones de soja tratados con dosis de campo de neonicotinoides, y determinar algunos de sus efectos adversos. Particularmente con respecto a la evitación aprendida, nuestro interés fue determinar si cualquier aversión condicionada después de la exposición a neonicotinoides es en respuesta al recubrimiento del tratamiento de semillas (repelencia secundaria) o esto puede convertirse en una aversión condicionada generalizada al tipo

de alimento independientemente del tratamiento. Planteamos la hipótesis de que la evitación de semillas tratadas puede ser causada por una contribución de uno o varios de estos diferentes procesos de comportamiento, y esto puede diferir según la secuencia de las exposiciones, el tipo de alimento y el neonicotinoide específico utilizado. La torcaza silvestre fue elegida como modelo experimental para evaluar la evitación de neonicotinoides debido a sus rasgos ecológicos, dado que es una especie nativa granívora común que puede aclimatarse al cautiverio, y puede consumir tanto sorgo (Bucher y Nores, 1976) como semillas y cotiledones de soja (Ranvaud et al., 2001). El sorgo es un cultivo muy deseado por varias especies de aves (Casuso et al., 2016; de Melo y Cheschini, 2012), la soja ocupó alrededor del 40% del área sembrada con cereales y oleaginosas en 2020/2021 en Argentina (calculado a partir de datos publicados en <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/>), y ambos cultivos pueden ser tratados con neonicotinoides antes de la siembra (CASAFE, 2013).

Materiales y métodos

Aves experimentales y condiciones de alojamiento

Las torcazas fueron capturadas en el campo de la Estación Experimental Agropecuaria de Paraná (Paraná, Argentina) con la autorización del Gobierno de Entre Ríos (Resolución 1721). Las torcazas fueron alojadas en recintos grupales (2 m de ancho x 9 m de largo x 2,5 m de altura) en el aviario de la Estación Experimental Agropecuaria de Paraná siguiendo los lineamientos para el uso de aves silvestres en la investigación (Fair et al., 2010). Las utilizadas en los ensayos habían estado entre 6 y 20 meses en jaulas grupales antes del estudio.

Antes de los experimentos, las torcazas fueron asignadas aleatoriamente a jaulas individuales (50 x 50 x 50 cm). Se les ofrecieron alimentos de mantenimiento *ad libitum* (una mezcla de trigo, maíz, sorgo, mijo y semilla de colza adquirida en "Forrajería Laurita", Paraná), agua y arenilla. La ventilación se controló para mantener las condiciones interiores de fotoperiodo, temperatura y humedad dentro de los rangos ambientales exteriores. Se registraron las temperaturas y humedad máximas y mínimas, y la amplitud térmica (Tabla 3.1). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE para experimentos con animales, y bajo permisos del Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional del Litoral (protocolo 376/17).

Tabla 3.1. Registros de temperatura y humedad máxima y mínima y amplitud térmica media diaria en cada período de cada experimento de exposición de torcazas a sorgo, semillas o cotiledones de soja tratados con neonicotinoides.

Experimento	Período	Temperatura (°C)		Humedad (%)		Amplitud térmica media diaria (°C)
		Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	
Sorgo	Pre-Exposición 1	30,9	12,1	78	17	13,5
	Exposición 1	30,2	9,2	77	18	11,6
	Post-Exposición 1	31,9	12,0	99	18	12,8
	Exposición 2	33,6	13,0	79	18	15,1
	Aversión	34,4	13,0	75	13	16,5
Soja	Pre-Exposición 1	36,3	15,2	49	13	15,7
	Exposición 1	39,5	14,1	58	13	20,0
	Post-Exposición 1	33,7	12,6	75	13	17,3
	Exposición 2	37,3	11,6	53	17	26,1
	Aversión	37,3	11,6	53	15	19,1
Cotiledones	Pre-Exposición 1	37,8	20,7	77	12	15,9
	Exposición 1	38,8	20,5	55	10	16,7
	Post-Exposición 1	32,5	12,4	74	16	18,3
	Exposición 2	37,3	18,7	58	13	13,9
	Aversión	36,6	15,7	91	15	14,2

Las medidas se tomaron con termómetro ambiental digital ubicado dentro del aviario.

Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos para evaluar la evitación de las torcazas (1) a semillas de sorgo tratadas, (2) a semillas de soja tratadas y (3) a cotiledones de soja tratados. Se consideró la guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos sobre las pruebas de evitación de aves (OCDE, 2011) para diseñar los experimentos. Los esfuerzos para hacer este estudio realista y conservador consistieron en usar cultivos que puedan tratarse con neonicotinoides, usar dosis habituales a campo y garantizar el estrés por hambre.

Se utilizaron un total de 112 torcazas para todos los ensayos, utilizando generalmente 8 individuos por tratamiento. Todos los experimentos realizados consistieron en (1) una etapa de aclimatación a la jaula individual, con alimentos de mantenimiento (mezcla de semillas descrita anteriormente) *ad libitum*; (2) un período de Pre-exposición de 5 a 7 días o más (Fryday et al., 2001), necesario para identificar la

cantidad de alimentos que deben proporcionarse en el período de tratamiento, para aclimatar a las aves a la comida de prueba y para proporcionar una medida de consumo previa al tratamiento; (3) un primer período de exposición de 3 a 5 días a las semillas o cotiledones tratados con neonicotinoides (Exposición 1) para estudiar la evitación y la anorexia en torcazas, (4) un período de descanso de 7 a 8 días (Post-exposición 1) en el que solo se ofrecieron alimentos de mantenimiento *ad libitum*, para estudiar la persistencia de la anorexia, (5) un segundo período de exposición de 3 a 5 días a los tratamientos (Exposición 2) para reforzar la evitación y anorexia, y estudiar el desarrollo de una aversión condicionada contra los alimentos tratados (Rogers, 1978; Sayre y Clark, 2001); y (6) un período de exposición de 3 a 5 días a alimentos de prueba no tratados (post-exposición 2) para determinar si la evitación se extendió al tipo de alimento de prueba independientemente de la presencia de insecticidas (aversión generalizada a los alimentos condicionados) (Fig. 3.2 y 3.3).

El consumo diario de semillas de prueba y alimentos de mantenimiento se midió calculando la diferencia entre los alimentos ofrecidos y los sobrantes, incluido el factor de humedad, con la siguiente ecuación: alimentos consumidos=alimentos ofrecidos + factor de humedad - alimentos sobrantes. El factor de humedad se midió pesando tazas de comida colocadas en jaulas sin torcazas al principio y al final del tiempo de exposición diaria al tratamiento. El consumo de cotiledón se midió contando los cotiledones faltantes en las plántulas ofrecidas. Las muestras del alimento de prueba (15 g de sorgo, 9 g de soja y 36 a 80 cotiledones por muestra) de cada tratamiento se tomaron diariamente durante los períodos de exposición 1 y 2 para determinar los residuos químicos promedio por tratamiento.

El peso corporal (PC), la longitud del tarso y la longitud del ala de cada ave se registraron al principio y al final de cada período. Además, el índice de masa escalado (SMI) se calculó como una estimación de la condición corporal según Peig y Green (2009):

$$SMI=PC_i , [L_0/L_i]^{b_{SMA}}$$

PC_i y L_i fueron las medidas del peso corporal y la longitud del tarso (más correlacionadas con PC que con la longitud del ala, coeficiente de Spearman=0,431, $p<0,001$) del individuo i . L_0 (2,6764 cm) fue la longitud tarsal media de las torcazas de todos los experimentos, y b_{SMA} (0,9196) fue la pendiente de la regresión del Eje Mayor Reducido (RMA) utilizando software en línea (Bohonak y van der Linde, 2004).

EXPERIMENTO EVITACIÓN SORGO

- 8 individuos/tratamiento de 115g < PC < 127g
- Registro de temperatura y humedad
- Necropsias en caso de muertes
- Análisis de residuos químicos en semillas y órganos de aves muertas

Tratamientos: 1) CON: Sorgo sin plaguicidas
 2) COM: híbrido comercial de sorgo AD75STA con fungicida no especificado
 3) IMI: híbrido comercial de sorgo AD75STA tratado con imidacloprid (750 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 FS®)
 4) CLO: híbrido comercial de sorgo "DeKalb" (DK) de Syngenta® tratado con clotianidin en origen
 5) THI: híbrido comercial de sorgo AD75STA tratado con tiametoxam (550 ml/100 kg de CRUISER 35FS®)

días																													
Más de 2 semanas	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aclimatación	Pre-Exposición							Exposición 1					Post-exposición 1							Exposición 2					Post-exposición 2				
<ul style="list-style-type: none"> • 40 palomas en jaulas individuales • PC y medidas morfométricas • Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de cantidad de alimento de prueba y de mantenimiento a ofrecer a las aves durante el próximo período • Medición de consumos • PC y medidas morfométricas 							<ul style="list-style-type: none"> • Exposición a tratamientos 1 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 2 h/día • Medición de consumos • 4 observaciones/día de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas • Necropsies and sampling of dead birds 					<ul style="list-style-type: none"> • Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i> • Medición de consumos en los primeros 4 días del periodo • 1 observación/día de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas 							<ul style="list-style-type: none"> • Exposición a tratamientos 1 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 2 h/día • Medición de consumos • 4 observaciones/día de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas • Necropsies and sampling of dead birds 					<ul style="list-style-type: none"> • Exposición a sorgo no tratado por 1 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 2 h/día • Medición de consumos • 2 observaciones/día de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas 				

Fig. 3.2. Diagrama de experimento de evitación de torcazas a semillas de sorgo tratadas con neonicotinoides.

A) EXPERIMENTO EVITACIÓN SEMILLAS DE SOJA

Tratamiento: IMI, semillas de soja con imidacloprid (70 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 FS®)

- 3 individuos/tratamiento de 95g < PC < 124g
- Registro de temperatura y humedad
- Análisis de residuos químicos en semillas

días																													
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	1	2	3
Aclimatación					Pre-Exposición								Exposición 1			Post-exposición 1								Exposición 2			Post-exposición 2		
• 40 palomas en jaulas individuales • PC y medidas morfométricas • Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i>					• Determinación de cantidad de alimento de prueba y de mantenimiento a ofrecer a las aves durante el próximo período • Medición de consumos • PC y medidas morfométricas								• Exposición a tratamientos 2 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 1/2 h • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas			• Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i> • Medición de consumos en los primeros 3 días de este período • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas								• Exposición a tratamientos 2 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 1/2 h • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas			• Exposición a soja no tratada 2 h/día • Exposición a alimento de mantenimiento 1/2 h • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas		

B) EXPERIMENTO EVITACIÓN COTILEDONES DE SOJA

Tratamientos: 1) CON: plántulas provenientes de semillas de soja sin neonicotinoide
 2) IMI 1: plántulas provenientes de semillas de soja con imidacloprid (70 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 FS®)
 3) IMI 2: plántulas provenientes de semillas de soja con imidacloprid (200 ml/100 kg of IMIDA NOVA 60 FS®)
 4) THI: plántulas provenientes de semillas de soja con tiametoxam (200 ml/100 kg of CRUISER 35FS®)

- 8 individuos/tratamiento de 99 g < PC < 145g
- 20 semillas sembradas/bandeja, 2 bandejas/ave
- Registro de temperatura y humedad
- Análisis de residuos químicos en semillas y cotiledones

días																																						
1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Aclimatación							Pre-Exposición										Exposición 1					Post-exposición 1							Exposición 2					Post-exposición 2				
• 32 palomas en jaulas individuales • PC y medidas morfométricas • Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i>							• Variaciones de las exposiciones a alimentos de mantenimiento y de prueba hasta decidir la mejor opción para el período "Exposición 1" • Asignación de las aves a los tratamientos de tal manera que en cada una haya un número equitativo de aves que consumen muchos, algunos, pocos y ningún cotiledón. • PC y medidas morfométricas										• Exposición a tratamientos (plántulas) por 24 h. • Exposición a alimento de mantenimiento después de la hora 13:00 • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas					• Alimento de mantenimiento <i>ad libitum</i> • Medidas de consumo de los primeros 4 días del período • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas							• Exposición a tratamientos (plántulas) por 24 h. • Exposición a alimento de mantenimiento después de la hora 13:00 • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas					• Exposición a solo plántulas no tratadas por 24 h • Exposición a alimento de mantenimiento después de la hora 13:00 h • Medición de consumos • Observación diaria de signos de intoxicación • PC y medidas morfométricas				

Fig. 3.3. Diagrama de experimento de evitación de torcazas a semillas (A) y cotiledones (B) de soja tratados con neonicotinoides.

El comportamiento durante los primeros 15 minutos de exposición al tratamiento (contado desde el momento en que la persona colocó la comida y se alejó) se grabó en video en algunas aves al azar. Se registró la frecuencia (número de ocurrencias/s durante los primeros 15 minutos de exposición) de picoteo en el comedero con alimentos no tratados (promedio entre los períodos Pre-exposición y Post-exposición) o alimentos tratados (promedio entre los períodos de Exposición 1 y Exposición 2). Además, todas las aves fueron observadas al menos una vez al día durante unos 20 segundos cada una mediante muestreo de exploración (Martin y Bateson, 1993), y se registraron las alteraciones neuroconductuales y los signos de intoxicación. Los signos de intoxicación registrados fueron letargo (ave en reposo o caminando lentamente, un poco descoordinada), frenesí (ave exaltada, sobreexcitada), "sentada", "esponjada" y "acurrucada" (ave quieta, con el abdomen en el suelo, cuello contraído, ojos abiertos / medio abiertos, pico cerrado / abierto) y "tendida" (ave acostada en el suelo, inmóvil, inclinada hacia adelante, alas medio abiertas, piernas abiertas, ojos abiertos / medio abiertos, sólo movimientos espasmódicos). A las torcazas muertas durante los tratamientos se le realizaron necropsias y se recogieron muestras de hígado para el análisis de residuos de neonicotinoides.

Experimento de evitación de semillas de sorgo tratadas con neonicotinoides

El experimento se llevó a cabo durante octubre y noviembre, meses en los que se suele sembrar sorgo en la región. Cuarenta torcazas fueron aleatoriamente asignadas y aclimatadas a jaulas individuales durante más de dos semanas. Cada uno de los siguientes 5 grupos de tratamientos contenía 8 aves: (1) semillas de sorgo control no tratado de un almacén de forraje (tratamiento llamado CON), (2) semillas de sorgo híbrido comercial AD75STA de "adSur, Agrosemillas del Sur SA" tratadas con fungicidas no especificados en origen (llamado COM), (3) semillas de híbrido AD75STA tratado con la dosis máxima insecticida de imidacloprid registrada para sorgo, es decir, 750 ml/100 kg semilla de IMIDA NOVA 60 FS® (concentración nominal: 4,5 g i,a/kg semilla; llamado IMI), (4) semillas de sorgo híbrido comercial "Dekalb" (DK) de Syngenta® tratado con clotianidin en origen a una concentración no especificada en la etiqueta de la bolsa (llamado CLO), y (5) semillas de sorgo híbrido comercial AD75STA tratado con la dosis máxima insecticida de tiametoxam registrada para sorgo, es decir, 550 ml/100 kg semilla de CRUISER 35 FS® (concentración nominal: 1,9 g de i,a/kg semilla; llamado THI). Para la preparación del tratamiento IMI (750 ml/100 kg de semillas), se preparó una solución mezclando 30 ml de IMIDA NOVA 60FS® con 18 ml de agua. Para el tratamiento THI (550 ml/100 kg de semillas), se preparó una solución mezclando 22 ml

de CRUISER 35FS® con 26 ml de agua. Las semillas de sorgo (500 g) se trataron agregando 6 ml de estas soluciones en diferentes recipientes mientras se agitaban vigorosamente durante 5 minutos. Los híbridos de sorgo generalmente difieren en su composición (Bullard et al., 1980). El color puede variar dependiendo de su composición y del tratamiento de plaguicidas que reciben. Aquí, el color final de las semillas no fue homogéneo en todos los tratamientos, pasando de marrón rojizo a rojos más vivos.

El primer día de cada período, las aves (una jaula / tratamiento) fueron grabadas en video durante los primeros 15 minutos de exposición a la comida. Durante los 3-7 días del período de Pre-exposición, a las torcazas se les ofrecieron 15 g de sorgo sin tratar durante una hora y 20 g de alimento de mantenimiento durante dos horas y se midió el consumo de ambos tipos de alimento. En 10 de las 40 torcazas, se midió el consumo diario de alimento de mantenimiento. Finalmente, durante el período Pre-exposición, se determinó que 15 g de sorgo (8:30 a 9:30 h) y 20 g de alimento de mantenimiento (12:00 a 14:00 h) eran adecuados para evaluar los tratamientos a ofrecer durante los períodos Exposición 1, Exposición 2 y Post-exposición 2, de 5 días cada uno. Durante la exposición a los tratamientos (períodos Exposición 1 y Exposición 2), las aves fueron observadas 4 veces al día (7:45, 9:00, 11:55, 14:00 h) para registrar la mortalidad o los signos de intoxicación. En el período Post-exposición 1, el consumo de alimentos de mantenimiento ofrecido *ad libitum* se midió los primeros 4 días, y las aves fueron observadas una vez al día (7:45) hasta el día 5 de este período. En el período Post-exposición 2, las aves estuvieron expuestas sólo al sorgo no tratado (equivalente a las semillas posteriores a la cosecha) en la misma cantidad y duración de la exposición por día que en los períodos Exposición 1 y Exposición 2, y las aves se observaron 2 veces al día (Fig. 3.2).

Experimento de evitación de semillas de soja tratadas con neonicotinoides

Durante noviembre y diciembre (meses en los que la soja se siembra comúnmente en la región), cuarenta torcazas fueron aleatoriamente asignadas y aclimatadas a jaulas individuales durante cinco días. En los primeros tres días del período de Pre-exposición, a las aves se les ofreció soja (aproximadamente 9 g, variedad Nidera Seeds® 5909) durante 1 h / día y luego 20 g de alimento de mantenimiento durante 2 h / día. Pero dado el bajo consumo de los alimentos de prueba, las condiciones se restringieron progresivamente. En los días 5 y 6 de este período, se ofrecieron semillas de soja durante 2 h / día y luego alimentos de mantenimiento durante 1 h / día. Finalmente, durante los dos últimos días del período de Pre-exposición (días 7 y 8), se ofrecieron las

semillas de soja por 2 h/día (de 8:30 a,m, a 10:30 a,m,) y el alimento de mantenimiento por solo 0,5 h/día (de 11:00 a,m, a 11:30), siendo estas las condiciones finales de exposición al alimento tratado ofrecido en el siguiente período. De esta manera, 12 de las 40 torcazas (30%) consumieron soja durante el período Pre-exposición (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Consumo de semillas de soja sin tratar por torcazas (12 de las 40) durante el período Pre-exposición,

Individuo nro.	Día de medición durante el período Pre-exposición	N° semillas consumidas/individuo
1	6	0,9
	8	1,0
2	5	1,7
	7	1,1
3	4	3,4
	5	8,1
	6	14,4
	7	17,7
4	8	18,4
	4	5,1
	5	8,3
	6	9,4
	7	7,5
5	8	4,7
	4	1,1
	5	1,1
	6	2,8
6	7	2,5
	5	1,6
	8	1,0
7	8	1,0
	4	9,7
	5	8,9
	6	15,1
	7	13,4
8	8	22,3
	8	1,3
	6	1,9
9	5	1,0
10	8	1,2
11		
12		

El consumo fue medido desde el cuarto día del período Pre-exposure. El n° de semillas consumido fue calculado a partir del peso diario promedio de las semillas usadas para medir el factor humedad

Dado que las aves deben consumir varias semillas para alcanzar niveles peligrosos de neonicotinoides en la soja (Addy-Orduna et al., 2019), solo se

seleccionaron las aves que consumieron más de tres granos de soja al día (3 individuos) para garantizar una respuesta de evitación medible. Debido a este pequeño número de aves, solo se llevó a cabo un tratamiento (llamado IMI). El tratamiento (IMI) consistió en semillas tratadas con la dosis insecticida de imidacloprid (70 ml de semillas formuladas/100 kg, es decir, 0,4 g i.a./kg de semilla, obtenidas diluyendo 2,8 ml de IMIDA NOVA 60FS® en 17,2 ml de agua, e incorporándolas en 200 g de semillas).

Las tres aves fueron expuestas al tratamiento en los períodos de Exposición 1 y Exposición 2 (soja tratada durante dos horas y alimentos de mantenimiento durante media hora), durante tres días en lugar de cinco cada uno, dadas las condiciones más restrictivas que en el experimento de sorgo. El período posterior a la exposición 1 (alimentos de mantenimiento de 24 horas) duró 8 días y el período posterior a la exposición 2 (soja no tratada durante dos horas y alimentos de mantenimiento durante media hora) duró tres días. El consumo se midió todos los días durante los períodos de Exposición 1, Exposición 2 y Post-exposición 2, y los primeros tres días del período Post-exposición 1 (Fig. 3.3). Las aves fueron observadas 4 veces durante el primer día de exposición al tratamiento, y luego una vez al día para detectar posibles signos de intoxicación, y su comportamiento fue grabado por video el primer día de todos los períodos durante los primeros 15 minutos después de que se les ofreció el alimento de prueba.

Experimento con cotiledones de soja tratados con neonicotinoides

El experimento se llevó a cabo durante los meses de enero y febrero, para asegurar las condiciones ambientales necesarias para la germinación y emergencia de las plántulas de soja en bandejas de plástico. Treinta y dos torcazas fueron asignadas aleatoriamente y aclimatadas a jaulas individuales durante una semana. Ocho aves fueron expuestas a uno de los siguientes cuatro tratamientos: (1) plántulas de semillas de soja no tratadas, llamadas CON; (2) plántulas de semillas de soja tratadas con 70 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 FS®, es decir, 0,4 g imidacloprid/kg semilla que se utiliza como insecticida (IMI-i); (3) plántulas de semillas de soja tratadas con 200 ml/100 kg de IMIDA NOVA 60 FS®, es decir, 1,2 g imidacloprid/kg semilla que se utiliza como repelente de aves (IMI-r); y (4) plántulas de semillas de soja tratadas con 200 ml/100 kg de CRUISER 35 FS®, es decir, 0,7 g de tiametoxam/kg semilla (THI). Los tratamientos de semillas consistieron en incorporar 3 ml de la solución neonicotinoide a 600 g de semillas CON y agitar vigorosamente durante 5 minutos. La solución para el tratamiento IMI-i se preparó diluyendo 1,96 ml de la formulación de imidacloprid en 12,04 ml de

agua, mientras que las soluciones de los tratamientos IMI-r y THI se prepararon diluyendo 5,6 ml de neonicotinoide (formulación de imidacloprid o tiametoxam) en 8,4 ml de agua. Las semillas utilizadas fueron la variedad 5909 de Nidera Seeds®.

Al comienzo del período Pre-exposición, se ofrecieron bandejas con plántulas (2 bandejas / ave con 20 semillas sembradas cada una) durante 2 h / día y luego 20 g de alimento de mantenimiento durante 0,5 h / día. La alimentación se restringió cada vez más a lo largo de los 10 días del período para maximizar el consumo de cotiledones. El aumento de las restricciones consistió en ofrecer las plántulas durante 3 h / día y 0,5 h diarias de 20 g de alimentos de mantenimiento, luego 4 h / día de plántulas y 6 g (días 5 a 8 del período) o 5 g (día 9 del período) de alimento de mantenimiento durante 0,5 h / día. Finalmente, se decidió exponer a las aves a las plántulas durante 24 h y agregar 8 g de alimento de mantenimiento después de la 1:00 p.m. durante los períodos de Exposición 1, Exposición 2 y Post-exposición 2 (Fig. 3.3 B). Las aves fueron asignadas a cada tratamiento en base al consumo promedio de cotiledones (nivel de consumo) de los últimos 3 días del período Pre-exposición, de modo que los individuos que presentaron consumo alto (más de 6 cotiledones), medio (entre 3 y 6), bajo (menos de 3) o nulo de cotiledones se representaron de la manera más equitativa posible en cada tratamiento. El consumo se midió todos los días de los períodos Exposición 1, Exposición 2 y Post-exposición 2, y hasta el día 4 en el período Post-exposición 1. Las torcazas se observaron 4 veces durante el primer día de exposición al tratamiento, y luego una vez al día en todos los períodos. Las torcazas de las jaulas 25 a 32 (una CON, dos IMI-i, dos IMI-r, tres THI) fueron filmadas durante los períodos de Preexposición y Exposición 1. Para los períodos de Exposición 2 y Post-exposición 2, una torcaza para los tratamientos IMI-i, IMI-r y THI, y dos torcazas CON también fueron filmadas para conocer el comportamiento de los primeros 15 minutos después de ofrecer las bandejas con cotiledones.

Hematocrito y estrés oxidativo en torcazas expuestas a cotiledones de semillas tratadas

La sangre se tomó del corazón de cada torcaza recientemente sacrificada y el hematocrito (volumen celular * 100 / volumen total) se determinó mediante el uso de 2 o 3 tubos capilares por ave, después de la centrifugación durante 5 minutos a 1400 rcf. El peso hepático fue registrado y dividido por el PC para obtener el índice hepatosomático. Las muestras de hígado y cerebro (n=8 por tratamiento) se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis de marcadores de estrés oxidativo.

Los tejidos fueron homogeneizados (1:10 p/v) en buffer fosfato 0.01 M (pH 7.4), el cual contenía 0,02 M EDTA y 1,15% KCl (Reglero et al., 2009). Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min (4 °C) y se utilizaron sobrenadantes para evaluar las actividades enzimáticas antioxidantes y la peroxidación lipídica. Los métodos para determinar glutatión S-transferasa (GST) (Habig et al., 1974), 1974) y catalasa (CAT) (Beutler, 1982) se adaptaron a un lector de microplacas (Biotek Synergy HTK). Cada ensayo enzimático se realizó por triplicado y la actividad se expresó como mU mg prot⁻¹ (GST) o U mg prot⁻¹ (CAT). La peroxidación lipídica se midió en el mismo sobrenadante a través de la reacción de malondialdehído (MDA) con ácido 2-tio-barbitúrico (TBA) (Yagi, 1976). Los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se expresaron como nanomoles de MDA formados por hora por miligramo de proteínas (nmol TBARS mg prot⁻¹). El contenido de proteína se determinó utilizando albúmina bovina sérica (Sigma) como estándar (Bradford, 1976).

Análisis de neonicotinoides en semillas, cotiledones e hígados de aves muertas

La determinación de la concentración de neonicotinoides se realizó en semillas y cotiledones no tratados y tratados (0,5 g) siguiendo a Lopez-Antia et al. (2013), y en hígado (1 g) siguiendo a Lopez-Antia et al. (2015). En ambos casos, se realizó un análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) con un cromatógrafo Agilent serie 1100® y Agilent 6110® cuadrupolo LC-MS con fuente multimodo. Las recuperaciones en semillas (es decir, grano de sorgo) con un pico de 1 µg/g (n=2) fueron (media ± RSD) 71,8 ± 4,8% para imidacloprid, 94,1 ± 2,6% para clotianidin y 49,0 ± 0,9% para tiametoxam. Las recuperaciones en muestras de hígado con un pico de 2 ng/g (n=4) fueron (media ± RSD) 82,8 ± 4,6% para imidacloprid, 73,1 ± 14,5% para clotianidin y 54,4 ± 9,5% para tiametoxam.

Análisis de datos

La media y el error estándar (µg/g) de la concentración de neonicotinoides en sorgo, soja y cotiledones se calcularon a partir de los resultados del análisis de residuos de muestras tomadas durante los períodos Exposición 1 y Exposición 2. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se evaluaron en los datos de consumo mediante gráficos Q-Q y mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene. Se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (IBM SPSS v, 25) para analizar la cantidad consumida, tanto de alimentos de prueba como de consumo total (es decir, alimentos de mantenimiento + alimentos de prueba). Los gramos consumidos (alimentos de

prueba o consumo total) se asignaron como la variable de respuesta, los tratamientos (en experimentos de sorgo y cotiledones) o los períodos (en el experimento de soja) como el factor inter-sujeto, la jaula como factor sujeto y el día de prueba como un factor intra-sujeto.

En los experimentos de sorgo y cotiledones, los consumos durante el período Pre-exposición se analizaron utilizando modelos mixtos lineales generalizados, con el tratamiento como factor inter-sujeto, y el día del experimento como factor intra-sujeto y la jaula como factor aleatorio. La repelencia primaria y la aversión condicionada se evaluaron comparando el consumo entre los grupos control y los grupos tratados durante los períodos Exposición 1 y Exposición 2. La anorexia se evaluó comparando el consumo total entre los grupos control y los grupos tratados durante los períodos Exposición 1 y Exposición 2. La persistencia de esta anorexia también se probó en el período Post-exposición 1 comparando el consumo de alimentos de mantenimiento entre los grupos control y tratados. Finalmente, la aversión condicionada generalizada se evaluó comparando el consumo de alimentos de prueba no tratado entre el grupo control y los grupos tratados durante el período posterior a la Exposición 2. En el experimento de cotiledones, el nivel de consumo obtenido durante el período Pre-exposición se consideró como una covariable.

En el experimento de semillas de soja, dado que se realizó sin un grupo de control separado, la evitación se evaluó comparando el consumo de soja en los períodos Exposición 1 y Exposición 2 con respecto al período Pre-exposición. La anorexia se evaluó a través de la diferencia de consumo total entre los períodos con (Exposición 1 y 2) y sin (Pre-exposición 1) exposición a neonicotinoides. La aversión condicionada generalizada se evaluó comparando los consumos de semillas durante los períodos Post-exposición 2 y Pre-exposición 1, y a través de la diferencia entre los períodos Exposición 2 y Post-exposición 2.

Los signos de intoxicación se analizaron en cada período de exposición (Exposición 1 y 2 por separado) con modelos lineales generalizados con una variable de respuesta binomial (presencia/ausencia de signo de intoxicación en el momento del registro), con el tratamiento y el día como factores fijos. Las frecuencias de picoteo sobre los alimentos no tratados y tratados de las aves filmadas se presentan como media \pm DE. Los valores de PC e SMI en el momento de la muerte de las torcazas muertas se compararon con los de los sobrevivientes en el período de exposición mediante una prueba t y una prueba de Mann Whitney, respectivamente, para descartar la muerte por inanición. La variación en PC de cada individuo se obtuvo calculando el PC final menos el PC inicial en cada período del experimento. Se analizaron las variaciones de PC

comparando las de los grupos control con las de los grupos tratados. En los casos de experimentos de sorgo y cotiledón, esto se realizó con modelos lineales generales cuando la distribución de datos era normal y homocedástica, y con modelos lineales generalizados cuando este no era el caso. En el experimento de soja, se comparó la variación de PC entre períodos para las mismas torcazas. Las actividades hepáticas y cerebrales de la enzima glutatión S-transferasa (GST) en las torcazas del experimento de cotiledón se compararon entre los grupos con las pruebas ANOVA unidireccionales. La actividad de la catalasa hepática (CAT) y la peroxidación lipídica hepática y cerebral (LPO) se compararon entre los grupos con las pruebas de Kruskal-Wallis porque no lograron los supuestos normales y / o de homocedasticidad. El SMI de los tratamientos al principio y al final de cada experimento se comparó mediante una prueba de Wilcoxon pareada.

Resultados

Contenido de neonicotinoides en semillas y cotiledones ofrecidos

Aunque no intencionalmente, se encontró que algunos tratamientos contenían más de un neonicotinoide (Tabla 3.3). En el experimento del sorgo, el híbrido de sorgo AD-75STA (tratamiento COM), considerado a priori sin neonicotinoides (la etiqueta en la bolsa de las semillas no especificaba los componentes químicos y se vendía como sin neonicotinoides) y utilizado para realizar los tratamientos de semillas con las formulaciones de imidacloprid y tiametoxam, resultó contener bajos niveles de imidacloprid ($<5 \mu\text{g/g}$). Esta concentración fue tres órdenes de magnitud menor que en el tratamiento IMI en sorgo. Por lo tanto, se utilizaron los grupos CON y COM como controles para ser comparados con el resto de los tratamientos en los que se agregaron los neonicotinoides al sorgo COM. Además, se detectó clotianidin en los cotiledones de soja a partir de semillas tratadas con CRUISER® (tiametoxam, 35% p/v).

Tabla 3.3. Concentración de neonicotinoides en el alimento de prueba de cada tratamiento y medidas de evitación en las torcazas.

Experimento (alimento de prueba)	Grupo	Neonicotinoide encontrado	Concentración ¹ (µg/g semilla)		Aversión condicionada (%) ²		Anorexia (%) ²		Aversión generalizada (%) ²
			Exposición 1	Exposición 2	Exposición 1	Exposición 2	Exposición 1	Exposición 2	Post-exposición 2
Semillas sorgo	COM	Imidacloprid	1,7 ± 0,8	4,1 ± 0,2	18,5	18,9	4,1	9,8	0,0
Semillas sorgo	IMI	Imidacloprid	2222,0 ± 137,0	2411,0 ± 69,0	98,7*	100,0*	29,2*	21,2*	0,0
Semillas sorgo	CLO	Clotianidin	247,0 ± 16,0	230,0 ± 5,0	99,4*	100,0*	14,9*	7,7	1,4
Semillas sorgo	THI	Tiametoxam	189,0 ± 10,0	142,0 ± 10,0	97,5*	99,9*	14,0*	5,7	0,0
Semillas sorgo	THI	Imidacloprid ³	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,4					
Semillas soja	IMI	Imidacloprid	479,0	699,0 ± 134,0	95,4*	97,7*	13,5	34,3*	18,9
Cotiledones soja ⁴	IMI-i	Imidacloprid	35,9 ± 4,9	33,2 ± 5,9	37,2	60,6	6,3	4,6	57,5
Cotiledones soja ⁴	IMI-r	Imidacloprid	157,0 ± 17,0	148,0 ± 43,0	57,1	58,0	7,5	10,3	62,0
Cotiledones soja ⁴	THI	Tiametoxam	11,4 ± 1,1	7,6 ± 1,6	34,1	38,3	8	7,1	50,6
Cotiledones soja ⁵	THI	Clotianidin ⁵	1,7 ± 0,4	1,12 ± 0,14					

¹Media (± SE) de concentración diaria de cada período. ²Porcentajes calculados como $100 - [(C1_{i,j} / C0_{i,j}) * 100]$, siendo C1 el consumo promedio del grupo tratado, C0 el consumo promedio del grupo control, i el tipo de comida, y j el período. ³Las semillas COM (sorgo control comercial) fueron usadas para preparar las semillas THI, por tanto las trazas de imidacloprid estuvieron presentes. ⁴La soja tratada para obtener las plántulas ofrecidas en la Exposición 1 contuvo 422,91 y 953,67 µg/g de imidacloprid (IMI-i y IMI-r, respectivamente) y 71,13 µg/g de tiametoxam (THI). En la soja tratada para obtener las plántulas ofrecidas en la Exposición 2, los valores de neonicotinoides fueron 408,22 y 1246,46 µg/g de imidacloprid (IMI-i y IMI-r, respectivamente) y 80,61 µg/g de tiametoxam (THI). ⁵Tiametoxam fue parcialmente metabolizado a clotianidin en los cotiledones. Todos los consumos de cotiledones tratados fueron menores que los de los controles pero no significativamente. Los asteriscos indican diferencia significativa con el control. Las concentraciones de neonicotinoides en semillas y cotiledones CON fueron "ND" (no detectado).

Evitación de las torcazas al sorgo tratado

El consumo de sorgo entre todos los tratamientos durante el período de Pre-exposición no difirió ($p=0,335$), lo que indica que fueron comparables. Aunque el tratamiento COM (control comercial) contenía bajos niveles de imidacloprid, la diferencia en el consumo total de sorgo y alimentos entre CON y COM no fue significativa en ningún período del experimento ($p>0,05$ en todos los casos, Fig. 3.4 y Tabla 3.3), lo que indica que las torcazas COM se comportaron como un grupo control.

El consumo de sorgo entre los controles (tanto CON como COM) y los tratamientos neonicotinoides (IMI, CLO y THI) fueron significativamente diferentes durante los períodos de Exposición 1 y Exposición 2 ($p<0,001$ en ambos casos, Fig. 3.4 y Tabla 3.2), lo que indica un fuerte efecto de rechazo de neonicotinoides. Teniendo en cuenta la masa media del grano de sorgo utilizado (Tabla 3.3 y 3.4), las torcazas consumieron menos de 4 semillas de sorgo/día durante los períodos de exposición, y este consumo se limitó al primer día de exposición. Hubo una reducción en el consumo total de alimentos durante el período Exposición 1 ($p<0,05$ entre los grupos control y los grupos tratados, Fig. 3.4), evidenciando un efecto anoréxico de los neonicotinoides. En el período Exposición 2, el efecto anoréxico se mantuvo significativamente sólo en el grupo IMI con respecto a ambos grupos control ($p<0,001$, Fig. 3.4). La reducción del consumo total de alimentos se observó en los primeros días de los períodos de Exposición 1 y 2. En los días siguientes, la evitación de los alimentos tratados se compensó con un mayor consumo de alimento de mantenimiento. Esto confirma el efecto anoréxico de los neonicotinoides durante el consumo de alimentos tratados (sólo relevante en los primeros días de los períodos de exposición). No hubo diferencias significativas ($p>0,05$) en el consumo de sorgo CON y COM frente al resto de tratamientos durante el período Post-exposición 2 (Fig. 3.4), lo que indica que las torcazas no desarrollaron una aversión condicionada generalizada, es decir, contra el alimento de prueba sin el plaguicida.

Todas las torcazas del grupo IMI mostraron alteraciones neuroconductuales (letargo o frenesí, caminar descoordinado, "sentarse" y "esponjarse" o "tenderse" en el suelo, inmóvil inclinada hacia adelante, alas medio abiertas, piernas extendidas y ningún impulso de huir). Tres de las ocho aves IMI murieron durante el período Exposición 1, dos antes de las 24 h posteriores a la dosis (jaulas 20 y 2) y una antes de las 48 h después de la dosis (jaula 21). El sorgo se observó en el buche de las torcazas de las jaulas 20 (8 granos) y 2 (27 granos), ambas con poca cantidad de grasa corporal. La torcaza en la jaula 21 era muy flaca, prácticamente sin grasa corporal. Sin embargo, el PC ($p=0,452$, Fig. 3.5) ni el IME de los muertos difirieron significativamente de los sobrevivientes (IME sobrevivientes (media \pm SE)=105,10 \pm 1,18; SMI muertas=99,35 \pm

4,01, $p=0,617$). La concentración promedio de imidacloprid encontrada en el hígado de las tres torcazas IMI muertas fue de 5,66 ($\pm DE=0,65$) $\mu\text{g/g}$. En el grupo CLO, cinco de las ocho torcazas mostraron alteraciones neuroconductuales (letargo o frenesí, "sentada" y "acurrucada") el primer día y una murió en el segundo día del período Exposición 1. Los granos de sorgo no se encontraron en el buche del ave muerta, pero esta ave mostró diarrea y signos de intoxicación ("sentada" y "esponjada"). Sin embargo, no se detectaron residuos de clotianidin en el hígado de esa ave muerta. En el grupo THI, cinco de las ocho torcazas mostraron alteraciones neuroconductuales (letargo o frenesí, caminar descoordinado, "sentada" y "esponjada"), y ningún ave murió. Los signos de intoxicación difirieron significativamente entre las aves IMI y las aves CON (control no tratado), COM (control comercial) y CLO tanto en la Exposición 1 ($p<0,001$ en los tres casos) como en la Exposición 2 ($p=0,003$ en los tres casos, Fig. 3.6). El grupo IMI alcanzó la mayor frecuencia y duración de los signos de intoxicación durante los días del período (Fig. 3.6), así como la mayor intensidad en los signos de intoxicación, ya que fue el único grupo donde se observaron torcazas "tendidas". Considerando las concentraciones de neonicotinoides encontradas (Tabla 3.3), el PC promedio de las aves de cada tratamiento, y el consumo de sorgo tratado durante la Exposición 1 (Tabla 3.4), la cantidad estimada de neonicotinoides ingeridos a través del sorgo tratado fue de 1,6, 0,09 y 0,20 mg i.a./kg de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam, respectivamente. Los signos de intoxicación fueron menos evidentes en el período Exposición 2 (Fig. 3.6) debido a la alta evitación de las semillas tratadas por las torcazas como se confirma en los videos grabados durante los primeros 15 minutos del primer día de cada período (Tabla 3.6). Las torcazas IMI, CLO y THI picotearon el comedero con sorgo no tratado un promedio de 0,264 veces / s ($\pm SD=0,165$) y el comedero con sorgo tratado 0,066 veces / s ($\pm SD=0,040$) durante los primeros 15 minutos de exposición. Cabe aclarar que el número de picoteos no implica necesariamente la ingesta de semillas en todos los casos. A veces las aves picoteaban para explorar la comida o para moverla.

Las torcazas IMI (59% más PC perdido) y THI (49% más PC perdido) en el período Exposición 1 y las torcazas IMI y CLO en el período Exposición 2 mostraron una pérdida significativa de PC en comparación con las torcazas CON (Fig. 3.7 A), posiblemente como consecuencia del efecto anoréxico de los productos químicos. Hubo una diferencia significativa entre el IME inicial y el final del experimento (Tabla 3.7).

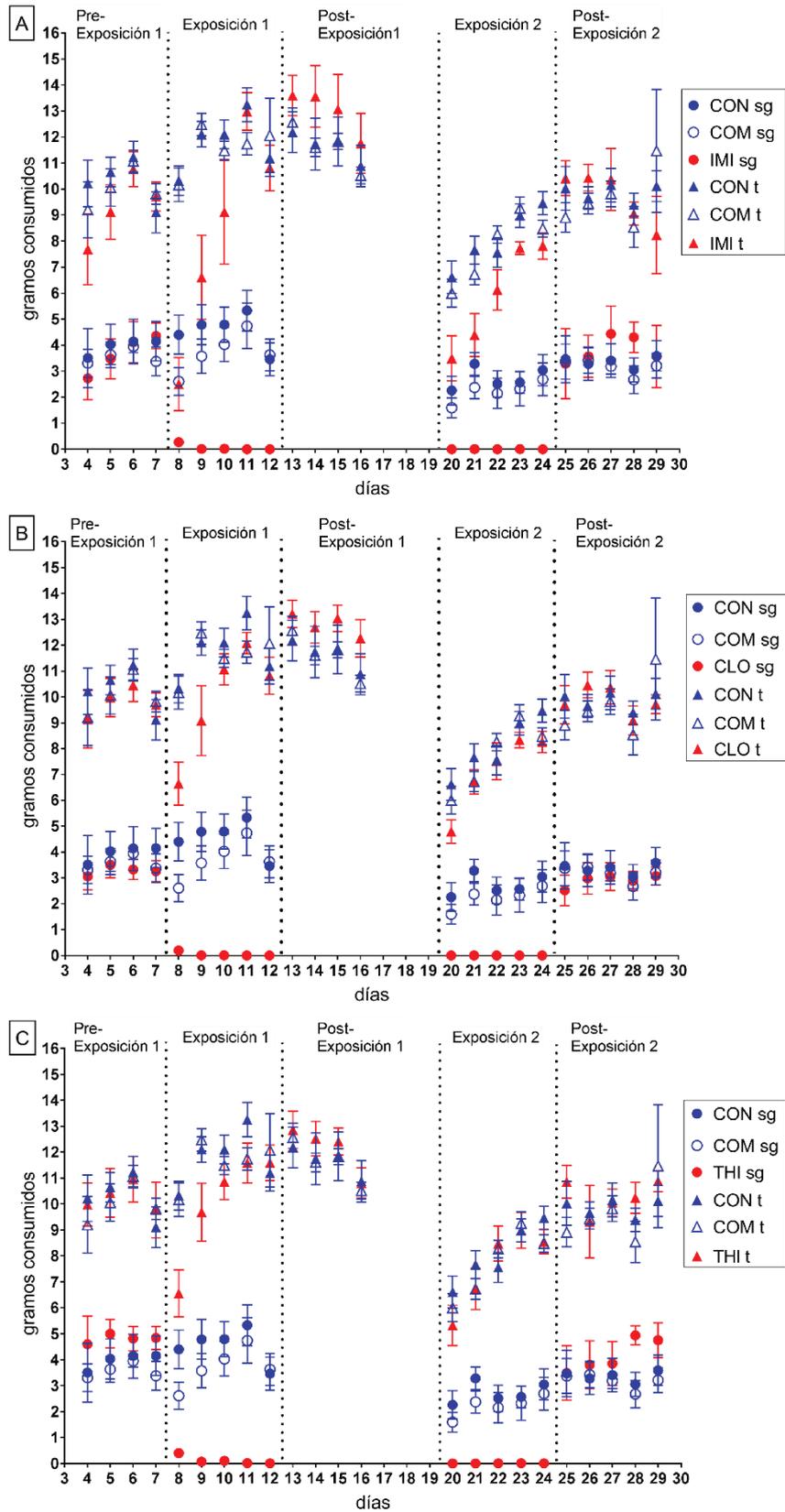


Fig. 3.4. Consumos de sorgo (subíndice "sg") y alimentos totales (subíndice "t"=sorgo + alimentos de mantenimiento) por parte de las torcazas (media \pm SE) a lo largo del experimento de evitación al sorgo tratado. CON: aves expuestas a sorgo sin tratar, COM: aves expuestas a sorgo comercial. IMI: aves expuestas a sorgo tratado con imidacloprid, CLO: aves expuestas a sorgo tratado con clotianidin, THI: aves expuestas a sorgo tratado con tiametoxam.

Tabla 3.4. Consumo medio en gramos (media \pm SE) de alimentos de prueba y consumo total (gramos de alimentos de prueba + gramos de alimento de mantenimiento) de torcazas durante los períodos de exposición a neonicotinoides.

Tratamiento	Consumo comida de prueba (g)		Consumo total (g)	
	Exposición 1	Exposición 2	Exposición 1	Exposición 2
Semillas sorgo				
CON	4,56 \pm 0,63	2,73 \pm 0,42	11,79 \pm 0,44	8,06 \pm 0,39
COM	3,72 \pm 0,59	2,22 \pm 0,46	11,59 \pm 0,37	7,75 \pm 0,25
IMI	0,08 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	7,78 \pm 0,91	5,28 \pm 0,57
CLO	0,04 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	9,82 \pm 0,58	6,9 \pm 0,36
THI	0,12 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	10,05 \pm 0,58	7,62 \pm 0,57
Semillas soja				
IMI	0,10 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02	7,82 \pm 0,30	5,81 \pm 0,40
Cotiledones				
CON	1,14 \pm 0,31	0,92 \pm 0,47	9,05 \pm 0,22	8,61 \pm 0,55
IMI-i	0,79 \pm 0,24	0,40 \pm 0,07	8,55 \pm 0,29	8,01 \pm 0,15
IMI-r	0,53 \pm 0,13	0,44 \pm 0,11	8,40 \pm 0,10	7,96 \pm 0,32
THI	0,83 \pm 0,14	0,65 \pm 0,10	8,40 \pm 0,20	7,64 \pm 0,24

CON: aves expuestas a sorgo o cotiledones sin tratar, COM: aves expuestas a sorgo comercial, IMI: aves expuestas a semillas de sorgo o de soja tratadas con imidacloprid, IMI-i: aves expuestas a cotiledones tratados con dosis insecticida de imidacloprid, IMI-r: aves expuestas a dosis repelente para aves de imidacloprid, CLO: aves expuestas a sorgo tratado con clotianidin, THI: aves expuestas a sorgo o cotiledones tratados con tiametoxam.

Tabla 3.5. Masa media en gramos de semillas y cotiledones.

Alimento de prueba	Masa en gramos (Media \pm SD)
Cotiledones de soja	0,206 \pm 0,043
Sorgo "Ad Sur" ¹	0,035 \pm 0,001
Sorgo "DK" ²	0,027 \pm 0,001

¹Sorgo híbrido comercial AD75STA de "adSur, Agrosemillas del Sur SA", utilizado en los tratamientos COM, IMI y THI del experimento de exposición a sorgo tratado.

²Sorgo híbrido comercial "Dekalb" de Syngenta®, utilizado en el tratamiento CLO de la prueba de sorgo.

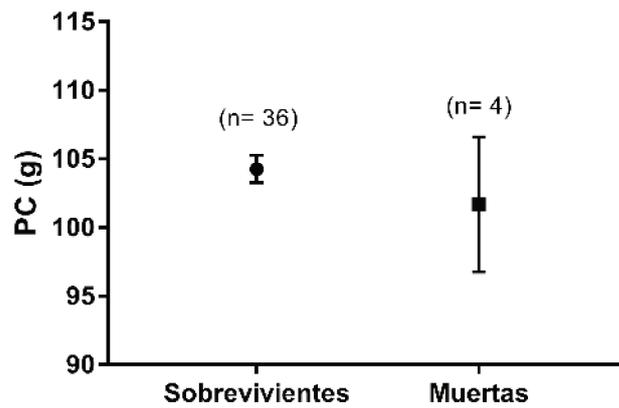


Fig. 3.5. Peso corporal de torcazas sobrevivientes y muertas del experimento de evitación a sorgo tratado con neonicotinoides. Las muertes solo ocurrieron durante el período Exposición 1, en aves tratadas con imidacloprid (3 muertas) y clotianidín (1 muerta). En las muertas, los PC fueron medidos en el momento de la muerte. En las sobrevivientes, el PC fue medido al final del período Exposición 1.

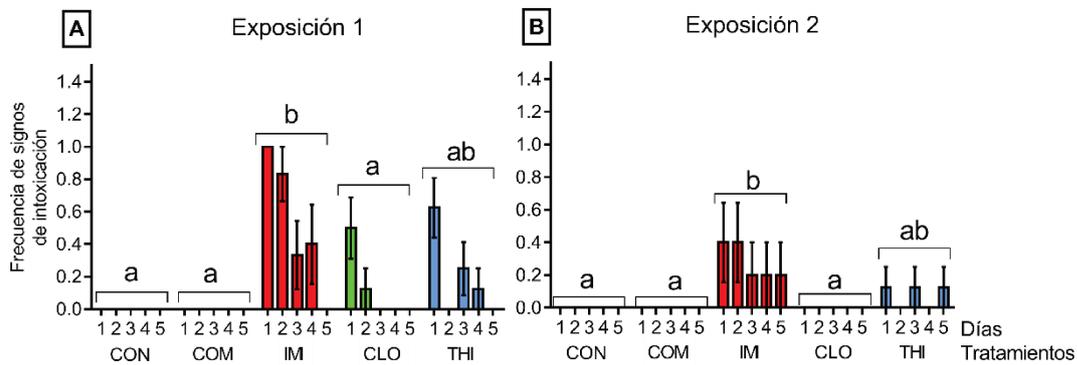


Fig. 3.6. Frecuencia de los signos de intoxicación observados en torcazas a lo largo de los días en cada tratamiento durante los períodos de Exposición 1 (A) y Exposición 2 (B) del experimento de sorgo. Los signos de intoxicación se midieron como presentes o ausentes en cada momento de observación, consistiendo desde letargo hasta inmóvil. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos, IMI: barras rojas, CLO: barras verdes, THI: barras azules.

Tabla 3.6. Registros de grabaciones en vídeo del comportamiento de algunas torcazas durante los primeros 15 minutos de exposición a los alimentos en los diferentes tratamientos y periodos.

Jaula	Experi- mento	Trata- miento	Período	Alimento	Día del período	1°pico- teo (s)	n picoteo comida	n picoteo arenilla	n tra- gos	n acica- lamiento	n sacu- didas	En per- cha
29	Sorgo	IMI	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	7	93	416	0	2	7	1	0
29	Sorgo	IMI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	58	178	17	1	7	1	0
29	Sorgo	IMI	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	43	232*	0	1	3	0	0
29	Sorgo	IMI	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	1	3	2	1
29	Sorgo	IMI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	98	401	0	1	6	2	0
30	Sorgo	THI	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	7	26	100	0	1	3	1	0
30	Sorgo	THI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	10	138	0	0	4	2	0
30	Sorgo	THI	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	3	391*	0	3	0	1	0
30	Sorgo	THI	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	1	5	1	0
30	Sorgo	THI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	2	168	0	2	0	0	0
31	Sorgo	CLO	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	7	434	129	0	2	1	3	0
31	Sorgo	CLO	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	49	39	0	3	7	7	0

Jaula	Experi- mento	Trata- miento	Período	Alimento	Día del período	1ºpico- teo (s)	n picoteo comida	n picoteo arenilla	n tra- gos	n acica- lamiento	n sacu- didas	En per- cha
31	Sorgo	CLO	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	16	389	0	3	3	3	0
31	Sorgo	CLO	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	15	1	8	4	0
31	Sorgo	CLO	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	509	214	22	1	4	2	4
32	Sorgo	COM	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	7	36	173	13	0	3	0	2
32	Sorgo	COM	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	48	141	35	1	5	0	2
32	Sorgo	COM	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	22	166	0	1	4	1	1
32	Sorgo	COM	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	25	87	4	1	6	1	3
32	Sorgo	COM	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	33	78	21	1	4	2	2
10	Soja	IMI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	129	1	0	0	0	0	0
10	Soja	IMI	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	3	590	0	1	0	0	0
10	Soja	IMI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	17	52	4	3	0	0	0
11	Soja	IMI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	246	6	0	0	3	1	0
11	Soja	IMI	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	3	640	0	1	0	1	0

Jaula	Experi- mento	Trata- miento	Período	Alimento	Día del período	1°pico- teo (s)	n picoteo comida	n picoteo arenilla	n tra- gos	n acica- lamiento	n sacu- didas	En per- cha
11	Soja	IMI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	69	20	0	2	1	0	0
21	Soja	IMI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	41	184	45	2	1	1	1
21	Soja	IMI	Post-exposición 1	Alimento de man- tenimiento	1	16	340	0	3	5	0	0
21	Soja	IMI	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	600	3	0	0	4	0	0
21	Soja	IMI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	10	79	0	3	4	0	0
31	Cotiledón	CON	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	0	292	0	2	1	0	0
31	Cotiledón	CON	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	36	346	0	1	2	0	0
39	Cotiledón	CON	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	0	6	0	0
39	Cotiledón	CON	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	200	2	0	2	7	0	0
40	Cotiledón	CON	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	120	8	0	1	0	0	0
40	Cotiledón	CON	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	NO**	0	0	1	0	0	1
30	Cotiledón	IMI 1	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	2	71	0	2	2	2	0
30	Cotiledón	IMI 1	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	0	436	0	5	2	0	0

Jaula	Experi- mento	Trata- miento	Período	Alimento	Día del período	1°pico- teo (s)	n picoteo comida	n picoteo arenilla	n tra- gos	n acica- lamiento	n sacu- didas	En per- cha
32	Cotiledón	IMI 1	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	12	38	0	0	1	0	0
32	Cotiledón	IMI 1	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	0	5	1	0
37	Cotiledón	IMI 1	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	2	1	0	0
37	Cotiledón	IMI 1	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	26	65	0	1	4	0	0
24	Cotiledón	IMI 2	Post-exposure1	Alimento de man- tenimiento	1	1	306	0	0	3	2	1
24	Cotiledón	IMI 2	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	57	5	0	0	0	0	0
24	Cotiledón	IMI 2	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	152	289	0	1	2	0	0
27	Cotiledón	IMI 2	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	NO**	0	0	0	0	0	0
27	Cotiledón	IMI 2	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	15	1	0	0	1	0	0
28	Cotiledón	IMI 2	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	87	52	0	0	4	1	0
28	Cotiledón	IMI 2	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	140	26	0	0	6	0	0
25	Cotiledón	THI	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	NO**	0	0	1	0	0	1
25	Cotiledón	THI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	NO**	0	0	0	0	0	0

Jaula	Experi- mento	Trata- miento	Período	Alimento	Día del período	1°pico- teo (s)	n picoteo comida	n picoteo arenilla	n tra- gos	n acica- lamiento	n sacu- didas	En per- cha
26	Cotiledón	THI	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	NO**	0	0	0	3	0	0
26	Cotiledón	THI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	NO**	25	0	0	2	2	0
29	Cotiledón	THI	Pre-exposición 1	Alimento de prueba no tratado	10	0	517	0	4	1	0	0
29	Cotiledón	THI	Exposición 1	Alimento de prueba tratado	1	7	298	0	5	0	2	0
38	Cotiledón	THI	Exposición 2	Alimento de prueba tratado	1	8	20	0	3	2	2	1
38	Cotiledón	THI	Post-exposición 2	Alimento de prueba no tratado	1	724	16	0	3	5	0	1

*Video terminado a los 8,5 minutos. **NO indica que esto no ocurrió durante los primeros 15 minutos de exposición de comida. 1° picoteo: tiempo en segundos en que el ave picoteó por primera vez la comida dentro del comedero después de que se le ofreció; n picoteo comida: número de veces que el ave picoteó el alimento del comedero durante los primeros 15 minutos de su exposición al alimento, n picoteo arenilla: número de veces que el ave picoteó la arenilla; n tragos: número de veces que el ave bebió agua de la fuente de agua potable; n acicalamientos: número de veces que el ave se acicaló; n sacudidas: número de veces que el ave se sacudió; "en percha": número de veces que el ave subió a la percha. En el experimento del sorgo, CON es el control de sorgo sin tratar y COM es el control de sorgo comercial.

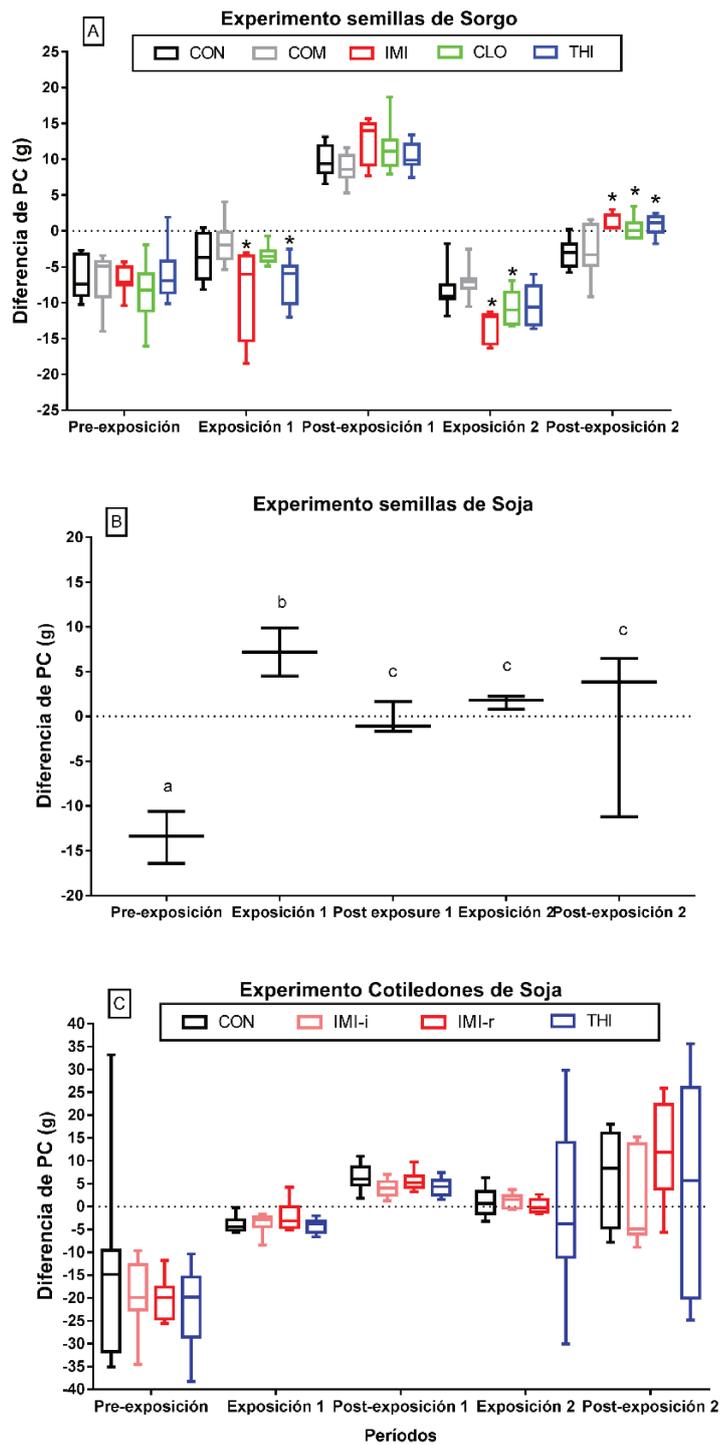


Fig. 3.7. Diferencia de peso corporal (PC al final del período - PC al comienzo del período) en las torcasas dentro de cada tratamiento de los experimentos de sorgo (A), soja (B) y cotiledón (C). Los bigotes muestran valores mínimos y máximos. Los asteriscos muestran el grupo con diferencias significativas con respecto al grupo control en cada período. En A, CON es el sorgo control no tratado, COM es el sorgo control comercial, e IMI, CLO y THI son los tratamientos de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam, respectivamente. En B, el tratamiento fue imidacloprid y las letras a, b y c indican las diferencias entre los períodos. En C, CON es el control no tratado, IMI-i es la dosis de insecticida de imidacloprid, IMI-r es la dosis repelente de imidacloprid y THI es el tratamiento con tiametoxam.

Tabla 3.7. Índice de masa escalado (SMI) de las torcazas al inicio y al final de cada tratamiento en los tres experimentos.

Experimento	Tratamiento	SMI inicial (g) (media \pm SD)	SMI final (g) (media \pm SD)	p-valor ($\alpha = 0,05$)
Sorgo	CON	117,06 \pm 2,79	106,81 \pm 6,22	0,017
	COM	117,16 \pm 4,55	107,24 \pm 4,17	0,012
	IMI	117,59 \pm 5,01	100,80 \pm 8,88	0,012
	CLO	118,59 \pm 2,27	106,88 \pm 5,89	0,012
	THI	118,21 \pm 4,76	103,12 \pm 7,65	0,017
Soja	IMI	118,02 \pm 3,12	117,01 \pm 15,18	1,000
Cotiledones de soja	CON	134,20 \pm 25,26	112,02 \pm 16,08	0,036
	IMI-i	123,39 \pm 5,18	101,93 \pm 25,13	0,093
	IMI-r	117,13 \pm 5,68	116,79 \pm 15,93	0,779
	THI	113,41 \pm 8,16	94,37 \pm 13,05	0,028

CON: aves expuestas a sorgo o cotiledones sin tratar, COM: aves expuestas a sorgo comercial, IMI: aves expuestas a semillas de sorgo o de soja tratadas con imidacloprid, IMI-i: aves expuestas a cotiledones tratados con dosis insecticida de imidacloprid, IMI-r: aves expuestas a dosis repelente para aves de imidacloprid, CLO: aves expuestas a sorgo tratado con clotianidin, THI: aves expuestas a sorgo o cotiledones tratados con tiametoxam.

Evitación de torcazas a semillas de soja tratadas

El consumo de semillas de soja fue significativamente menor en los períodos Exposición 1 y 2 que en el período Pre-Exposición ($p < 0,001$ en ambos casos; Tabla 3.8), sugiriendo que el tratamiento IMI en soja (alrededor de 590 mg/kg de semilla en promedio) produjo un fuerte efecto repelente sobre las torcazas (Tabla 3.3). Hubo alguna evidencia de anorexia, debido a que el alimento total consumido fue significativamente menor durante la Exposición 2 que en el período de Pre-exposición ($p < 0,01$, Tablas 3.3 y 3.8). El consumo de soja en el período posterior a la Exposición 2 frente al período anterior a la Exposición 1 no difirió significativamente (Tabla 3.8), lo que indica que no hay evidencia de aversión condicionada generalizada. No se observaron alteraciones neuroconductuales.

La cantidad estimada de imidacloprid ingerido a través de la soja tratada fue de 0,46 mg i.a./kg PC. Las torcazas picotearon en promedio el comedero con soja no tratada 0,056 veces/s ($SD = 0,033$) y el comedero con soja tratada 0,037 veces/s ($SD = 0,058$) durante los primeros 15 minutos de exposición. Hubo variaciones en el peso corporal entre períodos (Fig. 3.7 B), con una ganancia de PC particularmente durante el primer período de exposición a la sustancia química. No hubo diferencias significativas entre el SMI inicial y el final del experimento (Tabla 3.7).

Tabla 3.8. Consumo de soja tratada con imidacloprid y consumo total (soja + alimento de mantenimiento) por parte de las tres torcazas evaluadas (media \pm SE).

Período	Pre-exposición 1	Exposición 1	Post-exposición 1	Exposición 2	Post-exposición 2
Soja consumida (g)	1.77 \pm 0.27	0.10 \pm 0.02*		0.06 \pm 0.02*	1.77 \pm 0.55
N° semillas consumidas	10.93 \pm 1.73	0.56 \pm 0.24*		0.11 \pm 0.09*	12.22 \pm 3.86
Consumo total (g)	8.18 \pm 0.41	7.65 \pm 0.17	12.07 \pm 0.17	5.81 \pm 0.40	7.82 \pm 0.30

*Diferencia significativa ($p < 0.05$) con el período Pre-exposición 1.

Evitación de torcazas a los cotiledones de soja tratados

El consumo total entre los tratamientos durante el período previo a la exposición no difirió ($p=0,154$), lo que indica que los tratamientos fueron comparables. El consumo de cotiledón de torcazas CON no difirió con respecto a IMI-i, IMI-r y THI durante los períodos de exposición ($p=0,191$ en la exposición 1 y $p=0,170$ en la exposición 2; Fig. 3.8). El consumo total de alimentos no fue significativamente diferente entre los controles y los cotiledones de soja tratada, por lo que no se observó el efecto anoréxico ($p=0,065$ en la exposición 1, $p=0,470$ en el período de exposición 2). Sin embargo, hubo una ingesta significativamente menor en el consumo de alimentos de mantenimiento en los tratamientos que en el grupo control ($p=0,034$) durante el período Post-exposición 1, que desapareció el último día de ese período, sugiriendo un efecto anoréxico después de la exposición a los cotiledones tratados (Fig. 3.8). En el período post-exposición 2, el consumo de cotiledones no tratados no fue significativamente menor en el grupo tratado que en el control (Tabla 3.3, $p=0,348$). La Tabla 3.3 muestra altos valores medios de aversión, pero la alta variabilidad del consumo de cotiledón en torcazas CON impide la significación del efecto (Fig. 3.8). El consumo medio de cotiledones y el consumo total durante la Exposición 1 y 2 pueden observarse en la Tabla 3.4. No se observaron alteraciones neuroconductuales ni variaciones en el PC en períodos (Fig. 3.7 C).

La cantidad estimada de neonicotinoides ingeridos a través de los cotiledones tratados fue de 0,29, 0,85 y 0,10 mg i.a./kg PC de las dosis insecticidas y repelentes de imidacloprid y tiametoxam, respectivamente. Las torcazas IMI-i, IMI-r y THI picotearon en promedio el comedero con cotiledones no tratados 0,116 veces / s (SD=0,187) y el comedero con cotiledones tratados 0,090 veces / s (SD=0,172) durante los primeros 15 minutos de exposición. Hubo una diferencia significativa entre el IME inicial y el final del experimento (Tabla 3.7). Sin embargo, ni el hematocrito ni las actividades tanto de GST en el hígado como en el cerebro o la catalasa hepática mostraron diferencias significativas entre el grupo CON y el resto de los tratamientos (Fig. 3.8). Los niveles de TBARS, un indicador de oxidación lipídica, tampoco difirieron entre los tratamientos.

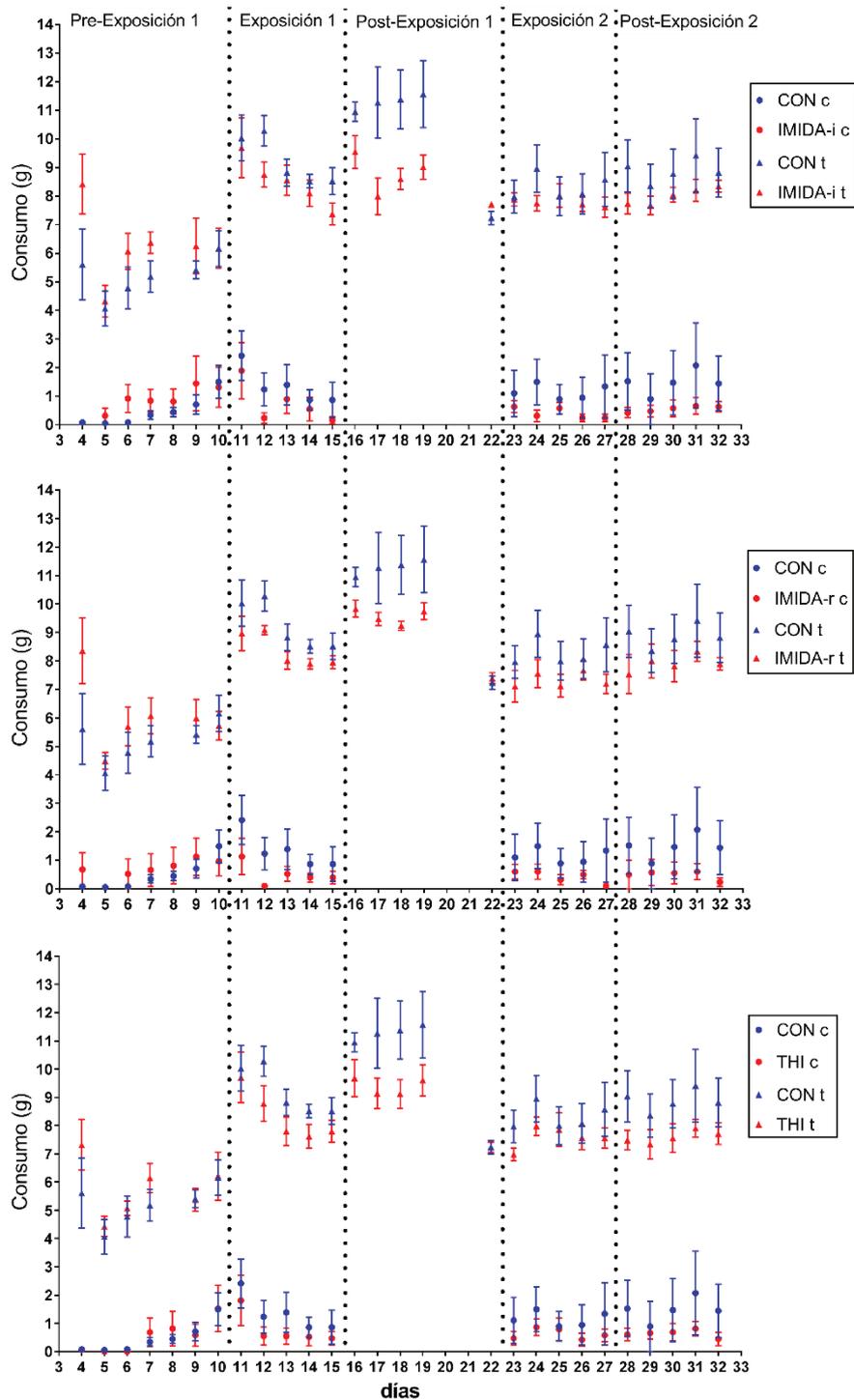


Fig. 3.8. Consumo (media \pm SE) de cotiledones de soja (subíndice "c") y de alimento total (subíndice "t"=cotiledones más alimentos de mantenimiento) por parte de torcazas a lo largo de los días del experimento de exposición a cotiledones provenientes de semillas tratadas con neonicotinoides. A: dosis de insecticida de la formulación de imidacloprid (IMI-i), B: dosis repelente de la formulación de imidacloprid (IMI-r), C: formulación de tiametoxam (THI). En la post-exposición 1, sólo se dio comida de mantenimiento a las aves. Aunque los consumos totales difieren entre algunos tratamientos ($p=0,046$) en algunos días del periodo de preexposición del experimento del cotiledón, se puede observar que esta diferencia disminuye hasta desaparecer en los últimos días de este periodo, superponiéndose todas las líneas de error.

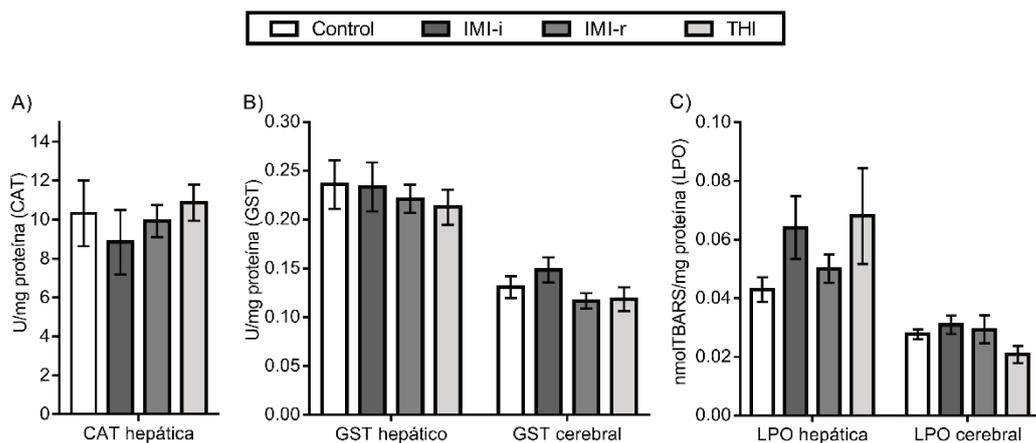


Fig. 3.9. Estrés oxidativo en muestras de hígado y cerebro de torcazas expuestas a cotiledones de soja tratados con neonicotinoides. A: Actividad de Catalasa hepática (A). B: Glutación S-transferasa (GST) en hígado y cerebro. C: peroxidación lipídica (LPO) en hígado y cerebro. Control: aves expuestas a cotiledones sin tratar, IMI-i: aves expuestas a cotiledones de soja tratada con dosis insecticida de imidacloprid. IMI-r: aves expuestas a cotiledones de soja tratada con dosis de imidacloprid para repeler aves. Las líneas en las barras indican el error estándar.

Discusión

Los neonicotinoides evaluados (imidacloprid, clotianidín y tiametoxam) produjeron una fuerte evitación de los alimentos tratados en las torcazas, particularmente contra las semillas tratadas. La soja no fue muy apetecible. Los signos de intoxicación y la fuerte evitación con el consumo nulo después del primer día de exposición al sorgo tratado pueden indicar el desarrollo de una aversión condicionada (o repelencia secundaria) contra las semillas de sorgo tratadas en lugar de una repelencia primaria (Sayre y Clark, 2001). Sin embargo, la repelencia primaria no debe descartarse totalmente porque los diferentes neonicotinoides produjeron una evitación de semillas similar, mientras que su toxicidad (y por lo tanto su capacidad esperada para inducir aversión) es bastante diferente entre ellos (Addy-Orduna et al. 2019). La aversión condicionada es un proceso neuroconductual inducido por la enfermedad o angustia causada por la sustancia aversiva (Tobajas et al., 2019a). Por el contrario, la repelencia primaria es inducida por el efecto disuasorio causado por el repelente (Clapperton et al., 2012). La aversión condicionada suele producir una fuerte evitación alimentaria a largo plazo (Tobajas et al., 2019b), mientras que la repelencia primaria desaparece a corto plazo y los animales pueden acostumbrarse a la presencia del repelente si no tiene consecuencias relevantes en su salud (Elmeros et al., 2011). Además de estos dos procesos, los experimentos descritos aquí han mostrado la evidencia de anorexia inducida por los tres tipos de alimentos prueba, que es otro signo de toxicidad neonicotinoide y posiblemente asociado con el proceso de aversión condicionada. Sin embargo, los experimentos han demostrado que los

neonicotinoides no lograron inducir una aversión condicionada generalizada hacia la semilla de prueba sin el tratamiento (es decir, equivalente a las semillas posteriores a la cosecha).

Con el sorgo, la mayor evitación se observó en el tratamiento CLO, consumiendo menos del 1% del consumido por el grupo control no tratado. Esta aversión condicionada al clotianidin en torcazas fue más fuerte que en palomas domésticas evaluadas en un estudio de una opción de la industria (Barfknecht, 1998; citado por Mineau y Palmer, 2013), en el que las palomas domésticas fueron expuestas al maíz tratado con casi el doble de concentración (500 mg/kg) que el utilizado aquí y consumieron alrededor del 45% de maíz en comparación con el grupo control. La codorniz también pareció evitar fuertemente el clotianidin según un estudio de dos opciones de la industria, en el que las aves sólo comieron semillas no tratadas, dejando intactas las semillas tratadas (Barfknecht, 2000; citado por Mineau y Palmer, 2013).

El imidacloprid en las semillas de sorgo (alrededor de 2300 mg/kg semilla) también causó una mayor evitación en las torcazas que en los mirlos de alas rojas expuestos a semillas de arroz tratadas con 2500 mg/kg semilla (Avery et al., 1994), donde los mirlos de alas rojas alimentados con arroz tratado con imidacloprid consumieron el 21% del arroz consumido por el grupo control. Las torcazas son posiblemente tan repelidas por semillas tratadas con imidacloprid como las perdices rojas, que se ha demostrado que reducen significativamente la ingesta de trigo tratado con 700 mg/kg semilla de imidacloprid (Lopez-Antia et al., 2013). También se han observado efectos anoréxicos en gorriones de corona blanca tratados con dosis de campo realistas de imidacloprid (Eng et al., 2019).

El tiametoxam agregado en el sorgo también tuvo un fuerte efecto aversivo o repelente (Tabla 3.7, Fig. 3.4), incluso con una concentración ligeramente menor que el resto de los neonicotinoides (Tabla 3.3). En función de la bibliografía revisada, estos resultados son el primer registro del efecto aversivo o repelente del tiametoxam en alimento tratado ofrecido a aves.

A pesar del pequeño número de aves utilizadas en el experimento de soja, se pudo detectar la evitación de la semilla tratada. Sin embargo, dada la ausencia de un grupo control separado y el bajo número de animales utilizados, estos resultados son menos robustos que el experimento de sorgo y deben tomarse con precaución (Allgoewer y Mayer, 2017).

En cuanto a los cotiledones de soja, sólo el 11,7% (SD=3,6) de los neonicotinoides aplicados a las semillas fueron a la planta en esta primera etapa de crecimiento, lo que puede limitar la capacidad del tratamiento para inducir la evitación en comparación con las semillas. Además, parte del tiametoxam se habría metabolizado a clotianidin, ya que se detectó en los cotiledones THI. Esto podría esperarse teniendo en cuenta que el tiametoxam puede transformarse en clotianidin dentro de los tejidos de plantas e insectos (Jeschke et al., 2011; Nauen et al., 2003) al escindir parcialmente el anillo de seis miembros de la estructura química del tiametoxam. La ausencia de evitación de cotiledones con imidacloprid coincide con la falta de repelencia del imidacloprid encontrada en

concentraciones de 70-205 mg/kg de semilla en arroz o 55 mg/kg de semilla en trigo (rango de concentración similar al determinado en los cotiledones, Tabla 3.3) ofrecida a mirlos de alas rojas cautivos en pruebas de dos opciones (Avery et al., 1993), siendo posiblemente concentraciones insuficientes para producir efecto repelente.

Las aves no evitaron los alimentos de prueba no tratados después de haber sido expuestos a los alimentos de prueba tratados. Por lo tanto, no se corroboró la hipótesis que planteamos de que la exposición al alimento tratado induciría una aversión generalizada. La evitación observada puede deberse a un atributo de la sustancia química que las aves logran detectar en las semillas tratadas (es decir color, olor o sabor). El color en las semillas tratadas puede tener algún papel en la diferenciación entre alimentos tratados y no tratados, aunque no exclusivo, dados los resultados obtenidos en mirlos de alas rojas expuestos al arroz tratado con imidacloprid incoloro (Avery et al., 1994). En ese estudio, los mirlos de alas rojas también evitaron el arroz con imidacloprid incoloro en las dosis más altas probadas (833 y 2500 mg/kg). Allí, los mirlos y los tordos consumieron suficientes semillas que exhibieron ataxia y enfermedad, y la evitación puede haberse debido al malestar posterior a la ingestión, particularmente en las concentraciones más altas. Posiblemente, el color de las semillas tratadas ha jugado un papel importante en la evitación en las torcazas, porque existen diferencias sustanciales entre las especies en la percepción visual (Fernández-Juricic et al., 2019), y el color generalmente ha demostrado ser la dimensión visual más destacada en el comportamiento de búsqueda de alimentos en palomas (Abs, 1983). En resumen, la aversión condicionada puede existir contra el alimento tratado como respuesta a los efectos adversos tóxicos de los neonicotinoides (repelencia secundaria) en vista de la mayor evitación observada en la Exposición 2 en comparación con la Exposición 1, pero no contra el alimento no tratado con exposición previa a tratados (aversión condicionada generalizada). Este hallazgo es relevante, porque una aversión condicionada generalizada a las semillas similares en forma y tamaño a las semillas tratadas podría tener consecuencias importantes en el comportamiento de forrajeo de las aves de las tierras de cultivo, teniendo en cuenta que los cambios de comportamiento pueden afectar la supervivencia o condición de las aves (Araújo et al., 2020; Saaristo et al., 2018).

Aunque el efecto repelente/aversivo de los neonicotinoides en las semillas fue fuerte, no fue suficiente para prevenir la ingestión de sorgo tratado, como se observó en los videos grabados, ni para prevenir la muerte de algunas aves. Todas las aves expuestas al sorgo IMI mostraron signos de intoxicación por consumir menos del 5% (0,08 g, Tabla 3.4) de la cantidad de sorgo tratado con imidacloprid para alcanzar la DL50 (1,7 g de sorgo tratado; Addy-Orduna et al., 2019). En el campo, el imidacloprid sería el neonicotinoide más frecuentemente involucrado en eventos de envenenamiento de aves silvestres (Botha et al., 2018; Millot et al., 2017; Rogers et al., 2019), posiblemente debido a su amplio uso, las dosis de campo empleadas y su DL50 más baja que el resto de los neonicotinoides (Addy-Orduna et al., 2019; Goulson, 2013; Mineau y Palmer, 2013). Aquí, el mayor número de aves envenenadas y las muertes se observaron con el tratamiento IMI

en sorgo, posiblemente porque estas son semillas preferidas por las torcazas y debido a la mayor concentración de imidacloprid presente en ellas. Sin embargo, el porcentaje de torcazas de los tratamientos CLO y THI que mostraron signos de intoxicación, así como la muerte de una torcaza en el grupo CLO sugeriría la posibilidad de efectos adversos de tiametoxam y clotianidin en aves que comen semillas tratadas con estos neonicotinoides en el campo, y no sólo con imidacloprid.

En comparación con el sorgo, la soja (semillas y cotiledones) tuvo una aceptación no homogénea por parte de las torcazas. Algunas torcazas nunca consumieron semillas de soja (28 de 40). La no detección de alteraciones neuroconductuales se debió posiblemente a la menor concentración de neonicotinoide y a la correspondiente dosis de exposición. La masa consumida de semillas de soja tratadas en el experimento fue inferior al 0,6% (0,10 g, Tabla 3.4) de la cantidad de semillas para alcanzar la DL50 (17,8 g; Addy-Orduna et al., 2019). Con respecto a los cotiledones, las tasas de aplicación de neonicotinoides utilizados en el campo no serían suficientes para causar signos de intoxicación. Considerando una concentración de 157 µg/g de imidacloprid en cotiledones (Tabla 3.3), un ave de 120 g tendría que ingerir unos 45 g de cotiledones para alcanzar la DL50 de imidacloprid. Dado que la cantidad media máxima de cotiledones ingeridos tratados con imidacloprid fue de 0,79 g, sería poco probable la intoxicación en el campo por el consumo de cotiledones tratados. Por lo tanto, tanto la preferencia por el cultivo como la concentración del producto químico influirían en el grado de intoxicación.

La reducción del PC fue significativa en los grupos IMI y THI en los dos períodos de exposición del experimento del sorgo (Fig. 3.7) en comparación con los controles. En los tres experimentos (sorgo, soja y cotiledón), la pérdida de PC dentro de todos los grupos de tratamiento observados en el período Pre-exposición se explica porque las aves pasaron de consumir alimentos de mantenimiento *ad libitum* durante la aclimatación a tener progresivamente condiciones más restrictivas. Particularmente esto se notó en el experimento de soja, por la mayor duración de ese período en comparación con los siguientes. El aumento de peso durante el período Exposición 1 en el experimento de soja puede indicar que las aves se acostumbraron a las condiciones experimentales y que la mayor parte de lo que se ingirió en ese período fue alimento de mantenimiento, posiblemente más nutritivo que la combinación con la ingesta de soja. Durante el período posterior a la Exposición 1, todos los grupos generalmente recuperaron peso corporal, ya que se alimentaron *ad libitum* con alimentos de mantenimiento. En resumen, la pérdida de PC se observó claramente durante la exposición a los tratamientos en el experimento del sorgo, no en el experimento de soja o cotiledón. En otro estudio en el que a las torcazas se les administró imidacloprid, clotianidin o tiametoxam a través de sonda, también redujeron su peso corporal, principalmente durante los primeros días después de la exposición (Addy-Orduna et al., 2019). Los resultados de otros estudios sobre el efecto del imidacloprid (el neonicotinoide más probado) sobre el peso corporal de otras especies de aves es variable. Por ejemplo, todas las perdices rojas expuestas al trigo tratado con 0,7 mg de imidacloprid/g de semilla perdieron peso corporal durante

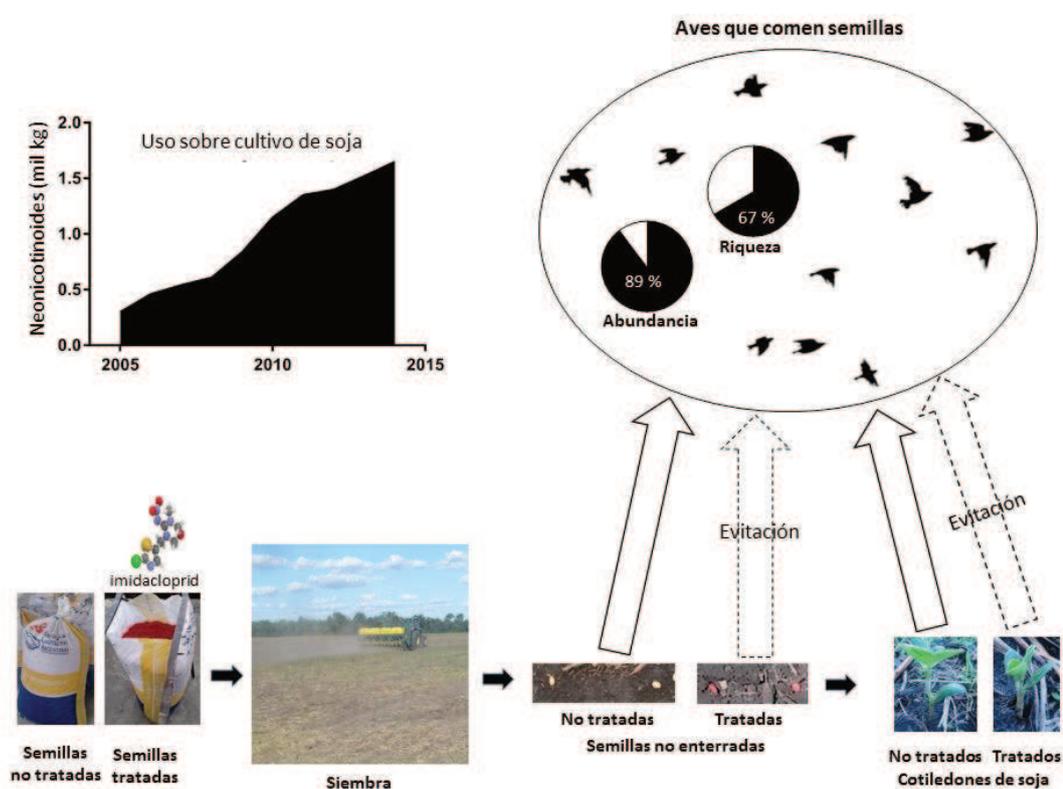
los experimentos, pero las diferencias no fueron significativas (Lopez-Antia et al., 2014). Lo mismo se describe en un estudio realizado en dos especies de mirlos expuestos al arroz y al trigo tratados con diferentes dosis de imidacloprid. Aunque los mirlos mostraron una ligera reducción en su PC, estos cambios no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (Avery et al., 1993). En comparación, los gorriones de corona blanca expuestos a 3,9 mg / kg de imidacloprid redujeron significativamente su peso corporal (Eng et al., 2019). Cabe destacar que en los estudios de perdiz y mirlo la exposición fue por semillas tratadas. Por lo tanto, la exposición real en cada grupo de tratamiento no fue controlada como en el estudio de gorriones de corona blanca, que fueron expuestos a la sustancia química por sonda. De esta manera, la pérdida de masa corporal a corto plazo en aves como resultado de la ingestión de neonicotinoides se observa recurrentemente en varios estudios. Este hecho podría afectar el ciclo de peso diario de las aves en el campo (el máximo alcanzado al final de la tarde y el mínimo justo antes del inicio de la alimentación por la mañana; (Pinowski y Kendeigh, 2012) y, por lo tanto, su salud y rendimiento. Por otro lado, los cotiledones tratados con los neonicotinoides parecieron no producir estrés oxidativo en las torcazas. En contraste, Sasidhar et al. (2014) describieron una reducción significativa en la concentración de GSH en el hígado y un aumento en los niveles hepáticos de TBARS en aves tratadas con 200 mg / kg de imidacloprid en los alimentos. También las palomas domésticas dosificadas con 2, 3 y 6 mg de imidacloprid/kg de peso corporal (Abu Zeid et al., 2019) y las perdices rojas expuestas al trigo tratadas con 0,7 y 1,4 mg/g de semilla (López-Antia et al., 2015, 2013) mostraron efectos sobre el estrés oxidativo. En cuanto al hematocrito, los datos bibliográficos son variables. Por ejemplo, el volumen del paquete celular (PCV) de pollos tratados con 1,25, 1,67 y 2,5 mg de imidacloprid/kg de peso corporal no se vio afectado (Balani et al., 2011). Finalmente, los índices de condición corporal (SMI) inferiores al final de los experimentos en comparación con el principio (incluso en torcazas control) evidenciaron las restricciones dietéticas en cantidad (alimentos no *ad libitum*) y/o calidad (alimentos tratados) durante los experimentos de sorgo y cotiledones, representando un escenario probable para las aves en el campo.

Conclusiones

Con las dosis de neonicotinoides comúnmente utilizadas para el tratamiento de semillas, la evitación de semillas tratadas por parte de torcazas fue fuerte, pero no pudo prevenir la intoxicación y la muerte en el caso de exposición a sorgo tratado. En contraste, los cotiledones de soja tratados con neonicotinoides no lograron producir un efecto de evitación y las aves no mostraron signos de intoxicación. Estos resultados muestran la necesidad de evaluar el riesgo de cada neonicotinoide por separado, considerando las preferencias alimentarias del ave, las dosis y el tiempo de aplicación, y los cultivos en los que se aplican.

CAPÍTULO 4

Evitación y riesgo de semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid para aves que comen semillas



Publicación derivada:

Addy-Orduna L, Mateo R. 2023. Field availability and avoidance of imidacloprid-treated soybean seeds and cotyledons by birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 00:1-11. doi:10.1002/etc.5597.

Resumen

Los insecticidas aplicados a las semillas antes de la siembra y sus cotiledones pueden presentar un riesgo toxicológico para las aves que comen semillas. Para evaluar si el comportamiento de evitación (rechazo de alimentos tratados) limita la exposición y, en consecuencia, el riesgo para las aves, se sembraron con soja tres campos de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. La mitad de la superficie de cada campo se sembró con semillas tratadas con 70 ml / 100 kg de semillas del insecticida imidacloprid 60% p/v (parcela T) y la otra mitad con semillas sin imidacloprid (parcela C). Las semillas no enterradas/m² y el porcentaje de plántulas dañadas se midieron 2 y 12 días después de la siembra, respectivamente. Las aves se registraron utilizando recuentos de puntos desde el borde del campo. La densidad de semillas no enterradas fue un 29,4% menor en las parcelas C que en las parcelas T, y el daño en los cotiledones de las plántulas fue un 15,4% mayor en las parcelas C que en las parcelas T. La abundancia y riqueza de aves que comen semillas y cotiledones fueron menores después de la siembra. Estos resultados sugieren un efecto aversivo de la soja tratada con imidacloprid en las aves en el campo. La especie dominante fue la torcaza (*Zenaida auriculata*), cuyo riesgo agudo de intoxicación por imidacloprid en semillas de soja y cotiledones fue bajo, de acuerdo con su relación de exposición a la toxicidad (TER, según sus siglas en inglés), su área de forraje problema y su tiempo de forraje problema. Aunque el imidacloprid causó aversión en las aves y esto podría reducir el riesgo agudo en especies como la torcaza, serían relevantes estudios adicionales para evaluar el riesgo de imidacloprid en soja en aves pequeñas y / o más sensibles al imidacloprid que utilizan este cultivo.

Introducción

Los neonicotinoides son un grupo de insecticidas que han tenido un rápido crecimiento en el mercado mundial (Elbert et al., 2008; Jeschke et al., 2011). Se utilizan para controlar insectos chupadores del suelo (Elbert et al., 1990). Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) de la membrana postsináptica son el objetivo principal de los neonicotinoides (Matsuda et al., 2001; Shao et al., 2013), afectando el impulso nervioso y actuando como disruptores de la transmisión neuronal. Tienen menor afinidad con los receptores nicotínicos de los vertebrados que con los de los insectos y esto se consideró una ventaja frente a otros insecticidas utilizados antes (Tomizawa y Casida, 2005). Los insecticidas neonicotinoides son solubles en agua, no volátiles, generalmente persistentes en el suelo y tienen un alto potencial de escorrentía y lixiviación (Bonmatin et al., 2015; Radolinski et al., 2018). Debido a su naturaleza sistémica, los neonicotinoides pueden ser absorbidos y distribuidos a través del tejido a todas las partes de la planta (Simon-Delso et al., 2015; Alford y Krupke, 2017).. Aproximadamente el 60% de todas las aplicaciones de neonicotinoides son

tratamientos de semillas en una amplia variedad de cultivos (Jeschke et al., 2011; Radolinski et al., 2018).

El imidacloprid, el primer neonicotinoide comercializado, se usa comúnmente para el tratamiento de semillas, incluida la soja (Hladik et al., 2014). Se ha identificado como un riesgo para las aves que se alimentan de semillas cuando se aplica como tratamiento previo a la siembra (López-Antia et al., 2013; Goulson, 2013; Mineau y Palmer, 2013; Gibbons et al., 2015). La eficiencia de la siembra prácticamente nunca es completa, las semillas permanecen en la superficie del suelo a diferentes densidades y, por lo tanto, están disponibles para las aves que comen semillas (de Leeuw, 1995; M'Kay et al., 1999; De Snoo y Luttik, 2004; López-Antia et al., 2016). La mayoría de los estudios de campo se han centrado en el riesgo para las aves de semillas de cereales de invierno (principalmente trigo y cebada) tratadas con neonicotinoides (Botha et al., 2018; Ertl et al., 2018; Ing et al., 2019; Lennon et al., 2020a, 200b; Turaga et al., 2016). Estudios recientes en Canadá y Estados Unidos evaluaron el riesgo que representan las semillas de cereales y las semillas oleaginosas de primavera tratadas con neonicotinoides para las aves (McGee et al., 2018; Roy et al., 2019; Roy y Coy, 2020). Pero se sabe poco sobre el riesgo que representan las semillas (y sus cotiledones) tratadas con imidacloprid en los agroecosistemas sudamericanos.

A nivel mundial, la cosecha de soja representó el 13% de la producción de granos 2020-2021, alcanzando los 363 millones de toneladas producidas en 129 millones de hectáreas, y siendo Estados Unidos, Brasil y Argentina los principales productores y exportadores del mundo (FAO-AMIS, 2021) En Argentina, el cultivo de soja es el más extendido, abarcando 17 millones de hectáreas en las últimas temporadas (MAGyP, 2021) Dado el predominio del cultivo de soja en Argentina, las semillas tratadas que permanecen sin enterrar después de la siembra, así como los cotiledones que emergen de las semillas tratadas, podrían presentar un riesgo de intoxicación para las aves que las consumen. Sin embargo, este riesgo podría reducirse fuertemente debido al efecto aversivo del imidacloprid. Los estudios realizados por el Centro de Investigación de Vida Silvestre del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos sobre aves en cautiverio han demostrado que el imidacloprid es un aversivo efectivo y de bajo riesgo para las aves (Avery et al., 1993, 1997, 1994) En contraste, existen estudios que atribuyen a las semillas tratadas con imidacloprid las intoxicaciones y muertes de perdices en campos agrícolas (Berny et al., 1999; Millot et al., 2017).

Aquí, hemos estudiado el efecto que las semillas de soja y cotiledones tratados con imidacloprid pueden tener en el comportamiento de forrajeo de las aves de tierras de cultivo en Paraná (Argentina). Las aves expuestas a alimentos que contienen imidacloprid pueden cambiar su comportamiento de forrajeo por la aversión y la anorexia causadas por este neonicotinoide, lo que tiene consecuencias en el refinamiento de la evaluación del riesgo ambiental de este tipo de producto fitosanitario. Entonces, los objetivos de este estudio fueron (1) estimar la densidad de semillas de soja no enterradas y disponibles para las aves después de la siembra, ya que las aves

que comen semillas, en ausencia de aversión, podrían estar expuestas a cantidades tóxicas de imidacloprid al alimentarse en estos campos; (2) evaluar la aversión de las aves a la soja tratada con imidacloprid midiendo las diferencias en la densidad de semillas que quedan disponibles para las aves en parcelas tratadas y no tratadas en diferentes momentos después de la siembra, (3) evaluar el comportamiento de evitación de las aves a los cotiledones de la soja tratada con imidacloprid midiendo las diferencias en el daño a las plántulas en parcelas tratadas y no tratadas; (4) comprobar que los campos sembrados de semillas de soja tratadas con imidacloprid muestran una menor abundancia de aves y riqueza de especies después de la siembra que antes de la siembra debido a la aversión causada por las semillas de soja tratadas con imidacloprid en las aves que utilizan dichos campos; y (5) calcular índices para caracterizar el riesgo agudo de semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid para la especie de ave granívora dominante.

Materiales y método

Lugar de estudio

El estudio se realizó en la primavera del hemisferio sur (finales de noviembre y principios de diciembre), en el campo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria de Paraná (EEA Paraná, 31°50´S, 60°32´W) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). A diferencia de los campos comerciales privados, este campo experimental permitió controlar más variables vinculadas al diseño y la logística del estudio, incluida la presencia de aves porque estas no fueron perturbadas por la caza u otras actividades humanas en el área de estudio.

El área de estudio pertenece a la subregión Ñandubay de la ecorregión Espinal, que tiene un clima húmedo, relieve plano y suavemente ondulado, y fue históricamente ocupada por bosques bajos, sabanas y prados (Burkart et al., 1999). Los suelos corresponden al orden taxonómico de Mollisol, con drenaje moderado y humedad relativa anual del suelo del 71,4% (Geo Inta, 2014).

Diseño Experimental

Se sembraron tres campos (llamados 1, 2 y 3, Fig. 4.1) de 3,1, 3,0 y 3,7 ha con semillas de soja NIDERA A 6411 RG®. Los cultivos anteriores en estos campos fueron maíz (campo 1) y sorgo (campos 2 y 3). En el momento de este estudio, los tres campos estaban "en reposo", con rastrojos del cultivo anterior, pero ya sin rastros de semillas de los cultivos predecesores. Cada campo se dividió en dos parcelas de tamaño similar. Una de las parcelas fue sembrada con semillas tratadas (parcela T) con la dosis insecticida registrada (70 ml de formulación / 100 kg de semillas de soja) de una formulación de imidacloprid 60% p/v (IMIDA NOVA 60, lote 130). La concentración de la formulación fue confirmada analíticamente por el Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría

de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), siendo 613 ± 3 mg de imidacloprid/ml de formulación. La parcela control (parcela C) se sembró con semillas de soja sin tratamiento con imidacloprid. Todas las semillas de soja, en parcelas C y T, fueron tratadas rutinariamente con un producto fungicida e inoculante (EFECTHOR PLUS®, con 120 mg/ml de carbendaz-2 metoxicarbamoil-benzimidazol + 120 mg/ml de tiram + $1,10^{10}$ c.f.u./g de soporte de bacterias fijadoras de nitrógeno *Bradyrhizobium japonicum*). Se tomaron muestras de 30 g de ambas semillas, tratadas y no tratadas con el insecticida, para confirmar la concentración del neonicotinoide en soja, que fue de 380 ± 30 mg/kg (media \pm SD), es decir, el 90,5% de la concentración nominal esperada (420 mg/kg). Esto indica que el tratamiento de las semillas con el insecticida fue relativamente eficiente. La sembradora fue una Mega Agrometal® con placas mecánicas dispensadoras y 13 cuerpos de siembra. El tren de siembra consistió en discos de corte, discos de doble cepilladora, contactores y ruedas. La densidad de siembra fue de 19 semillas/m por surco y la distancia entre surcos fue de 0,52 m (38 semillas/m²). En el día de la siembra, las temperaturas mínimas y máximas fueron de 16,7 °C y 30,6 °C, la humedad relativa media fue del 59%, y el viento fue de 9,4 km/h.



Fig. 4.1. Dibujo de las superficies de campos 1, 2 y 3 utilizados para las mediciones de cantidad de semillas no enterradas post-siembra, cotiledones dañados y número y especies de aves que comen semillas. $31^{\circ}50'01.90''S$, $60^{\circ}32'35.98''O$, provincia de Entre Ríos. La línea negra indica el perímetro del campo. Las líneas blancas continuas indican los bordes considerados cabeceras, donde se fijaron dos transectos para evaluar la densidad de las semillas no enterradas después de la siembra. Las líneas blancas segmentadas indican, figurativamente, las tres transectas centrales en los que se inspeccionaron las semillas no enterradas. La línea violeta en el medio indica la división entre la parcela control (C) y la parcela tratada (T). Las líneas segmentadas de color celeste indican, figurativamente, las transectas en las que se evaluaron los cotiledones. Los círculos blancos indican los puntos desde donde se observaron las aves.

En los días siguientes, se estudiaron la densidad de semillas de soja no enterradas, la densidad de plántulas y el porcentaje de cotiledones dañados junto con los recuentos de aves que comen semillas, como se explica a continuación. Con el fin de saber si el daño a las semillas y plántulas de soja fue causado principalmente por aves y no por insectos u otros organismos, se ubicaron tres clausuras en un campo adicional de 1 ha a más de 2 km de distancia de los otros campos en estudio para evitar interferencias en el comportamiento de las aves. Después de la siembra (similar a los campos de siembra 1, 2 y 3, pero con semillas sin ningún tratamiento), se instalaron las clausuras (3,5 m de ancho x 4,1 m de largo x 3,0 m de alto cada uno, totalmente cerrados con un tamaño de malla de 1 mm²), abarcando cada una de ellas 7 surcos de 4 m lineales.

Relevamiento de las semillas no enterradas disponibles para las aves

La siembra de los campos terminó a las 7:30 p.m. La densidad de semillas expuestas en la superficie de cabeceras e interior del campo se determinó al día siguiente a las 7:30 a.m. (12 h después de la siembra) y 48 h después de la siembra por puntos en transectas (2 transectas en cabecera y tres transectas en el interior del campo, Fig. 4.1). En cada transecta de la cabecera, tomamos 20 puntos equidistantes, seleccionando el primer punto al azar entre cero y la longitud de la transecta/20, y por lo tanto evaluamos 40 puntos/cabecera/campo. En las transectas del interior, se fijaron 10, 20 y 10 puntos de muestra equidistantes/transecta respectivamente, obteniendo un total de 40 puntos de muestras de interior/campo. En cada punto, se colocó un anillo metálico de 0,25 m² y se contaron las semillas en la superficie del suelo dentro del anillo. En el sitio de carga de la sembradora, ubicado en un margen del campo 2, el número de semillas derramadas se determinó tomando fotos de la superficie del suelo donde se encontró el derrame de semillas. Usando el software de diapositivas, la foto se superpuso con una cuadrícula que dividió la imagen en celdas pequeñas para facilitar el conteo de todas las semillas visibles en la imagen.

Relevamiento de los daños causados en los cotiledones de las plántulas

El daño a las plántulas debido al consumo de sus cotiledones se evaluó 12 días después de la siembra mediante un muestreo sistemático con inicio aleatorio (adaptado de Canavelli et al., 2014), cuando la mayoría de las plántulas del campo emergidas se encontraron en el estado de crecimiento "VC" (vegetativo cotiledonar), en el que ya aparece el primer par de hojas unifoliadas (Fehr y Caviness, 1977). Para hacer esto, cada parcela del campo (C o T) se dividió en cuatro secciones iguales en la dirección de los surcos de siembra. En cada sección, se seleccionó aleatoriamente una fila y se definieron 20 puntos equidistantes a lo largo de la fila. En cada uno de los puntos, se contaron y evaluaron las plántulas presentes en 1 m lineal del surco, identificando 3 tipos de daño: cotiledones picados ($\leq 1/4$ cotiledones), 1 o 2 cotiledones faltantes por plántula. Se

evaluaron un total de 160 muestras en cada campo, 80 en la parcela T y 80 en la parcela C. Después del relevamiento, se tomó una muestra de aproximadamente 50 g de cotiledones (equivalente a cerca de 200 cotiledones) en cada parcela (C y T) de cada campo para determinar la concentración de imidacloprid. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL. Se realizaron cinco extracciones sucesivas de cada muestra con 10 ml de metanol, los extractos se agruparon, se llevaron a sequedad y se re-suspendieron en 5 ml de agua: metanol (50:50). Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) acoplada a un detector de matriz de diodos (DAD) (equipo Agilent 1100) con una columna C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 µm (Varian), una fase móvil de agua:metanol (65:35), a una temperatura de 35 °C y un volumen de inyección de 5 µl.

Relevamiento de las aves

La abundancia (número de individuos) y la riqueza (número de especies) de aves en los campos se contaron con binoculares desde tres puntos fijos por campo durante 5 minutos en cuatro períodos de tiempo: antes (mañana), durante (tarde) y 12 h después (mañana siguiente) de la siembra, y justo antes de evaluar el daño en las plántulas (12 días después de la siembra). Todas las aves presentes en el campo fueron contadas por un observador que se movió a cada punto consecutivamente (Canavelli, 2011) Los puntos estaban separados entre sí por al menos 100 m para tener una cobertura completa del campo (puntos blancos en la Fig. 1). En cada punto, se registraron las especies y el número de individuos dentro del campo y en los márgenes, excluyendo aquellos que pasaban volando sobre el campo. El número de aves observadas de cada punto se trató por separado como tres réplicas de cada campo y no se sumaron.

Evaluación determinística del riesgo

El índice de exposición tóxica (TER, por su sigla en inglés) puede utilizarse como primer paso para caracterizar el riesgo agudo de un plaguicida (EFSA, 2009; Shore et al., 2005). Si el TER agudo ≥ 10 , el riesgo se considera aceptable. Si el TER agudo < 10 , se debe realizar una evaluación de riesgos refinada. Un refinamiento para la evaluación del riesgo de las semillas tratadas con plaguicidas que considera las semillas no enterradas después de la siembra consiste en comparar el área de forrajeo problema con el rango del hogar de las especies evaluadas (USEPA, 2016). Si el área de forrajeo problema es más grande que el rango del hogar, entonces la probabilidad de que un animal consuma suficiente semilla tratada para dar lugar a un riesgo de preocupación se consideraría baja. Si el área de forrajeo problema es igual o menor que el rango del hogar, entonces el riesgo de consumir semillas tratadas no está excluido por este análisis, y se puede calcular el tiempo de forrajeo problema (período de tiempo que un animal individual necesitaría pasar

comiendo semillas tratadas para recibir una dosis aguda diaria de pesticida). El tiempo de forrajeo problema puede compararse con el tiempo total de luz dentro de un día para determinar si es factible consumir ese número de semillas dentro de un día. Se calculó el TER agudo, el área de forrajeo problema y el tiempo de forrajeo problema de las semillas de soja y los cotiledones tratados con imidacloprid para torcazas a partir de los datos obtenidos en este estudio y en estudios anteriores (Addy-Orduna et al., 2022, 2019) siguiendo las directrices de la EFSA y la USEPA (detalles en la Tabla 4.3).

Análisis de datos

El efecto del tratamiento con imidacloprid sobre la evitación de semillas de soja por parte de las aves se evaluó como la diferencia en la densidad de semillas que permanecen en la superficie de las parcelas T y C en diferentes momentos después de la siembra. En ausencia de otros factores de confusión, una mayor densidad de semillas en las parcelas T que en las parcelas C se explicaría por la aversión causada por el imidacloprid que impide el consumo de semillas por parte de las aves. Para ello, se utilizó un modelo mixto lineal generalizado (GLMM) con distribución de Poisson para evaluar el efecto del tratamiento sobre la densidad de semillas en la superficie del suelo disponible para las aves. Semilla/m² fue la variable de respuesta; el tratamiento (parcelas C y T), el tiempo (12 h y 48 h después de la siembra), el sector (promontorio, centro), el campo (1, 2, 3) y sus interacciones fueron los factores fijos.

La densidad de las plántulas 12 días después de la siembra se comparó entre las parcelas C y T para evaluar el efecto protector del imidacloprid durante el desarrollo temprano de la planta. Dicha protección puede ser impulsada por el efecto sobre los insectos, pero también puede responder a la aversión producida en las aves que pueden desenterrar las semillas de soja. Esto se probó con un GLMM con distribución de Poisson, en el que el campo, el tratamiento y sus interacciones se asignaron como factores fijos y la transecta fue el factor aleatorio.

La evitación de plántulas de soja causada por imidacloprid se evaluó como la diferencia en el porcentaje de plántulas con cotiledones dañados entre las parcelas T y C. Para ello, se realizó un GLMM con distribución gaussiana con el porcentaje de plántulas dañadas por metro lineal como variable de respuesta, tratamientos, campos y sus interacciones como factores fijos, y transecta como factor aleatorio.

En cuanto a las aves, se realizó una revisión bibliográfica de cada especie registrada respecto a sus hábitos alimenticios de tal manera que se clasificaron según su consumo de semillas. Se diferenciaron dos grupos: las aves que consumen semillas (S) y las que no consumen semillas (NS). A su vez, dentro de las aves que consumen semillas se diferenciaron 3 subgrupos: (1) especies con al menos un registro bibliográfico que indica que ingiere semillas de soja (Scs); (2) especies con

registros que ingieren semillas de algún cultivo (Sc); y (3) especies que pueden ingerir algún tipo de semilla (Sg). En cuanto al consumo de cotiledones, tres especies de Columbidae (*Zenaida auriculata*, *Patagionas maculosa* y *P. picazuro*; Dardanelli et al., 2011) pueden incluir estos elementos en su dieta, pero no hay información sobre la ingestión de cotiledón por otras especies de aves. Algunos agricultores afirman que, además de palomas, paseriformes como el cardenal común (*Paroaria coronata*) y el morajú (*Molothrus bonariensis*) se alimentan de cotiledones de soja (agente del INTA Sebastián Zuil, comunicación personal). La abundancia y riqueza de cada grupo se determinaron en cada uno de los cuatro relevamientos o períodos (pre-siembra, siembra, post-siembra, emergencia). La dominancia por especie también se determinó en los diferentes períodos. La abundancia de aves y la riqueza de especies por hectárea observada en cada campo se analizaron utilizando un GLM con distribución de Poisson. Se utilizó la abundancia o riqueza de los grupos de aves según su dieta como variable respuesta y el período fue el factor fijo.

Los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics v. 28.

Resultados

Disponibilidad de semillas

La densidad de semillas no enterradas fue significativamente mayor en las parcelas tratadas (media \pm SE, 3,4 \pm 0,5 semillas/m²) que en las controles (2,4 \pm 0,4 semillas/m², p<0,001; Fig. 4.2), lo que puede indicar que evitar el imidacloprid puede reducir el consumo de semillas tratadas en un 29,4%. La densidad de semillas no enterradas fue significativamente mayor en la cabecera (3,2 \pm 0,5 semillas/m²) que en el interior de los campos (2,6 \pm 0,4 semillas/m², p=0,009; Fig. 4.2), y la interacción entre tratamiento y sector también fue significativa (p<0,001). El efecto global del tiempo después de la siembra no fue significativo (p=0,114), pero hubo una interacción significativa entre el tiempo después de la siembra y el tratamiento (p=0,002), con diferencias en las tendencias entre los campos (Tabla 4.1). Las densidades de semillas difirieron significativamente entre los campos (p<0,001).

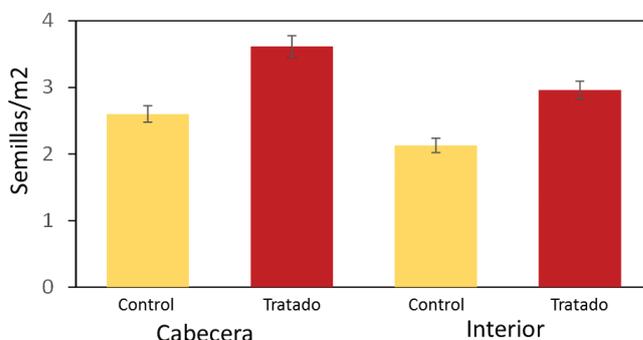


Fig. 4.2. Densidad media (\pm SE) de semillas de soja en la superficie de las parcelas sembradas con semillas sin imidacloprid (Control) y sembradas con semillas tratadas con imidacloprid (Tratado) en cada sector del campo (cabecera o interior).

Tabla 4.1. Número de semillas de soja/m² (media ± SD) en cada relevamiento.

Relevamiento	Campo			Sector		Tratamiento	
	1	2	3	Cabecera	Interior	Parcela C	Parcela T
12h Post-siembra	1.44±0.73	3.55±0.73	3.53±0.73	3.18±0.60	2.50±0.59	2.21±0.58	3.48±0.62
48h Post-siembra	2.77±0.79	2.22±0.79	4.06±0.79	3.27±0.64	2.76±0.64	2.70±0.63	3.33±0.66

En los lugares donde se cargó la sembradora, se observaron semillas derramadas en tres montones de aproximadamente 1 m² cada uno con 8865, 2417 y 4778 semillas, respectivamente.

Daño en las plántulas de soja

La concentración media de imidacloprid en cotiledones en el momento de la evaluación del daño (media ± DE) fue de 0,90 ± 0,10 mg/kg, 0,25 ± 0,07 mg/kg y 0,70 ± 0,1 mg/kg para los campos 1, 2 y 3, respectivamente, lo que corresponde al 0,24%, 0,06% y 0,18% de la concentración presente en las semillas tratadas en el momento de la siembra.

El número total de plántulas difirió significativamente entre las parcelas C y T ($p < 0,001$), con (media ± SE) 15,3±0,2 plántulas/m en las parcelas C y 18,1±0,2 plántulas/m en las parcelas T. El porcentaje de plántulas dañadas fue significativamente mayor en las parcelas C (28,3±1,1%) que en las parcelas T (12,9±0,6%, $p < 0,001$; Fig. 4.3). En contraste, el porcentaje de daño de plántulas dentro de las clausuras fue de sólo 1,8±0,5%. El daño más común de las plántulas fue la evidencia de cotiledones picoteados (11,8±0,6%), seguido de la ausencia de uno (7,5±0,5) o ambos cotiledones (1,4±0,2%) y estos porcentajes de daño fueron mayores en parcelas C que en parcelas T ($p < 0,001$; Fig. 4.3).

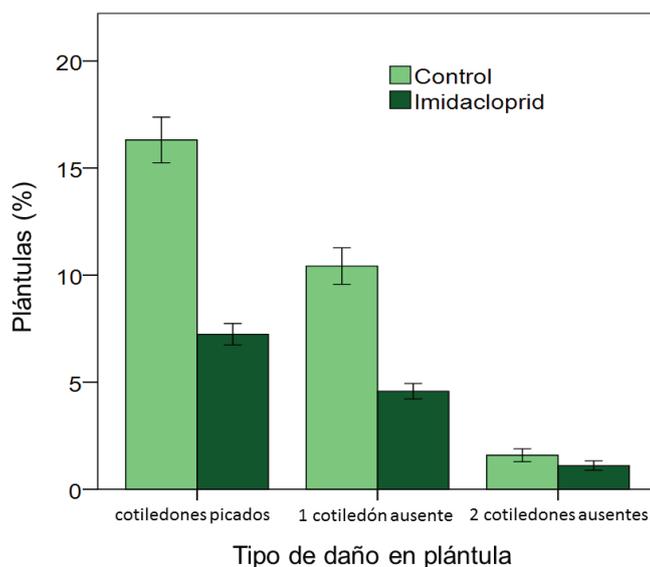


Fig. 4.3. Porcentaje de plántulas de soja con algún tipo de daño en sus cotiledones entre parcelas control y tratadas con imidacloprid.

Presencia de aves

Las aves registradas ($n=825$) pertenecieron a 45 especies y 23 familias (Tabla 4.2). La torcaza fue la especie dominante en los cuatro momentos estudiados, particularmente en el período de siembra (za en la Fig. 4.4). En cuanto a los hábitos de alimentación (Tabla 4.2), el 16% de las especies puede alimentarse de semillas de soja, el 38% puede alimentarse de semillas de cultivos, el 67% puede alimentarse de semillas en general y el 11% puede alimentarse de cotiledones de soja, independientemente de la proporción involucrada en su dieta. Por último, el 33% de las especies observadas no consumen semillas ni cotiledones. En cuanto a los individuos, las especies que se alimentan de cotiledones y semillas de soja fueron siempre las más abundantes (Fig. 4.4-4.6), debido en general al predominio de las torcazas.

La abundancia de aves y la riqueza de especies en los campos de estudio fueron generalmente menores durante los períodos de siembra y post-siembra que en los períodos de pre-siembra y emergencia (Fig. 4.7). Las diferencias en la abundancia fueron significativas para las aves que se alimentan de semillas ($p=0,003$) y semillas de soja ($p=0,016$). Las diferencias en la riqueza de las especies de aves fueron significativas para las aves que se alimentan de semillas ($p=0,003$) y semillas de soja ($p=0,004$) y cotiledones de soja ($p<0,001$).

Tabla 4.2. Grupos y subgrupos alimenticios y abundancia de las especies de aves observadas en el total de los campos evaluados sembrados con soja con y sin imidacloprid.

Especie	Código	Nombre común	Familia	Grupo	Sub grupo	Referencias de dieta	Abundancia (%)
<i>Zenaida auriculata</i> *	za	Torcaza	Columbidae	S	Scs	1-5, 7, 9-16, 18-20	37,7
<i>Myiopsitta monachus</i>	mm	Cotorra común	Psittacidae	S	Scs	1-4, 7, 11-13, 16, 24	6,9
<i>Patagioenas picazuro</i> *	pp	Paloma Picazuro	Columbidae	S	Scs	1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 20	4,2
<i>Zonotrichia capensis</i>	zc	Chingolo	Emberizidae	S	Scs	1-5, 7-11, 13, 14	3,5
<i>Paroaria coronata</i> **	pc	Cardenal común	Thraupidae	S	Scs	1-4, 9, 14	0,5
<i>Saltator aurantirostris</i>	sa	Pepitero de collar	Thraupidae	S	Scs	1-4, 6-9, 11-13	0,5
<i>Patagioenas maculosa</i> *	pm	Paloma manchada	Columbidae	S	Scs	1-4, 7, 9, 12-14, 20	0,1
<i>Sicalis flaveola</i>	sf	Jilguero dorado	Thraupidae	S	Sc	1-3, 5-7, 10, 11, 13, 14, 17	3,0
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	mr	Tordo pico corto	Icteridae	S	Sc	1, 2, 7, 10, 11, 13, 17	2,5
<i>Columbina picui</i>	cp	Torcacita	Columbidae	S	Sc	1, 2, 4, 5, 7-13	2,2
<i>Nothura maculosa</i>	nm	Inambú común	Tinamidae	S	Sc	1, 5, 9-11, 14, 23, 32	2,1
<i>Pitangus sulphuratus</i>	ps	Benteveo	Tyrannidae	S	Sc	1-3, 5, 9-13, 28	1,9
<i>Agelaioides badius</i>	ab	Tordo músico	Icteridae	S	Sc	1, 2, 7, 10, 11, 13	1,7
<i>Molothrus bonaeriensis</i> **	mb	Morajú	Icteridae	S	Sc	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 14, 17	1,5
<i>Sporophila caerulea</i>	sc	Corbatita	Thraupidae	S	Sc	1-3, 5, 10-13	1,1

<i>Passer domesticus</i>	pd	Gorrión	Passeridae	S	Sc	1, 3, 5, 14	0,4
<i>Embernagra platensis</i>	ep	Verdón	Thraupidae	S	Sc	1-3, 9, 11, 14, 25	0,2
<i>Vanellus chilensis</i>	vc	Tero	Charadriidae	S	Sg	1, 3, 5, 9, 29	9,0
<i>Furnarius rufus</i>	fr	Hornero	Furnariidae	S	Sg	1-5, 7, 8, 10, 11, 13, 14	3,0
<i>Pseudoleistes virescens</i>	pv	Pecho amarillo común	Icteridae	S	Sg	1, 2, 9, 12, 14, 17, 26	1,9
<i>Sicalis luteola</i>	sl	Misto	Thraupidae	S	Sg	1-3, 5, 9-11, 17	1,7
<i>Ammodramus humeralis</i>	ah	Cachilo ceja amarilla	Emberizidae	S	Sg	1-5, 9-11	0,7
<i>Turdus amaurochalinus</i>	ta	Zorzal chalchalero	Turdidae	S	Sg	1, 2, 4, 7-9	0,7
<i>Mimus saturninus</i>	ms	Calandria	Mimidae	S	Sg	1-3, 5, 10-14	0,6
<i>Sturnella superciliaris</i>	ss	Pecho colorado	Icteridae	S	Sg	1, 10, 11, 21	0,6
<i>Turdus rufiventris</i>	tr	Zorzal colorado	Turdidae	S	Sg	1, 2, 4, 9	0,4
<i>Spinus magellanicus</i>	sm	Cabecita negra	Fringillidae	S	Sg	1, 8, 13	0,2
<i>Anumbius annumbi</i>	aa	Leñatero	Furnariidae	S	Sg	1, 3, 5, 9, 10	0,1
<i>Saltator coerulescens</i>	sco	Pepitero gris	Thraupidae	S	Sg	1, 9	0,1
<i>Schoeniophylax phryganophilus</i>	sp	Chotoy	Furnariidae	S	Sg	1, 3, 5, 10-12, 31	0,1
<i>Tyrannus savana</i>	ts	Tijereta	Tyrannidae	NS		1-5, 8, 10-13	2,9
<i>Progne tapera</i>	pt	Golondrina parda	Hirundinidae	NS		1, 6, 10-12	2,4
<i>Chordeiles nacunda</i>	cn	Ñancundá	Caprimulgidae	NS		1, 12, 30	2,1

<i>Athene cunicularia</i>	ac	Lechucita vizcachera	Strigidae	NS	1-3, 10, 12, 14	0,8
<i>Colaptes melanochloros</i>	cm	Carpintero real	Picidae	NS	1-7, 11, 12	0,5
<i>Falco spaverius</i>	fs	Halconcito colorado	Falconidae	NS	1, 2, 9, 10, 12, 27	0,4
<i>Xolmis cinereus</i>	xc	Monjita gris	Tyrannidae	NS	1, 12	0,4
<i>Elaenia parvirostris</i>	epa	Fiofío pico corto	Tyrannidae	NS	1, 2, 4, 6, 7, 12, 13	0,2
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	ga	Arañero cara negra	Parulidae	NS	1-3, 5, 6, 12	0,2
<i>Hylocharis chrysura</i>	hc	Picaflor bronceado	Trochilidae	NS	1, 2, 12	0,1
<i>Melanerpes cactorum</i>	mc	Carpintero del cardón	Picidae	NS	1, 2, 6-8	0,1
<i>Polioptila dumicola</i>	pdu	Tacuarita azul	Poliptilidae	NS	1, 4, 6-8	0,1
<i>Synallaxis frontalis</i>	sfr	Pijuí frente gris	Furnariidae	NS	1, 4-6, 11, 12	0,1
<i>Syrigma sibilatrix</i>	ssi	Chiflón	Ardeidae	NS	1, 2, 22	0,1
<i>Tapera naevia</i>	tn	Crespín	Cuculidae	NS	1, 3, 5-7, 10	0,1

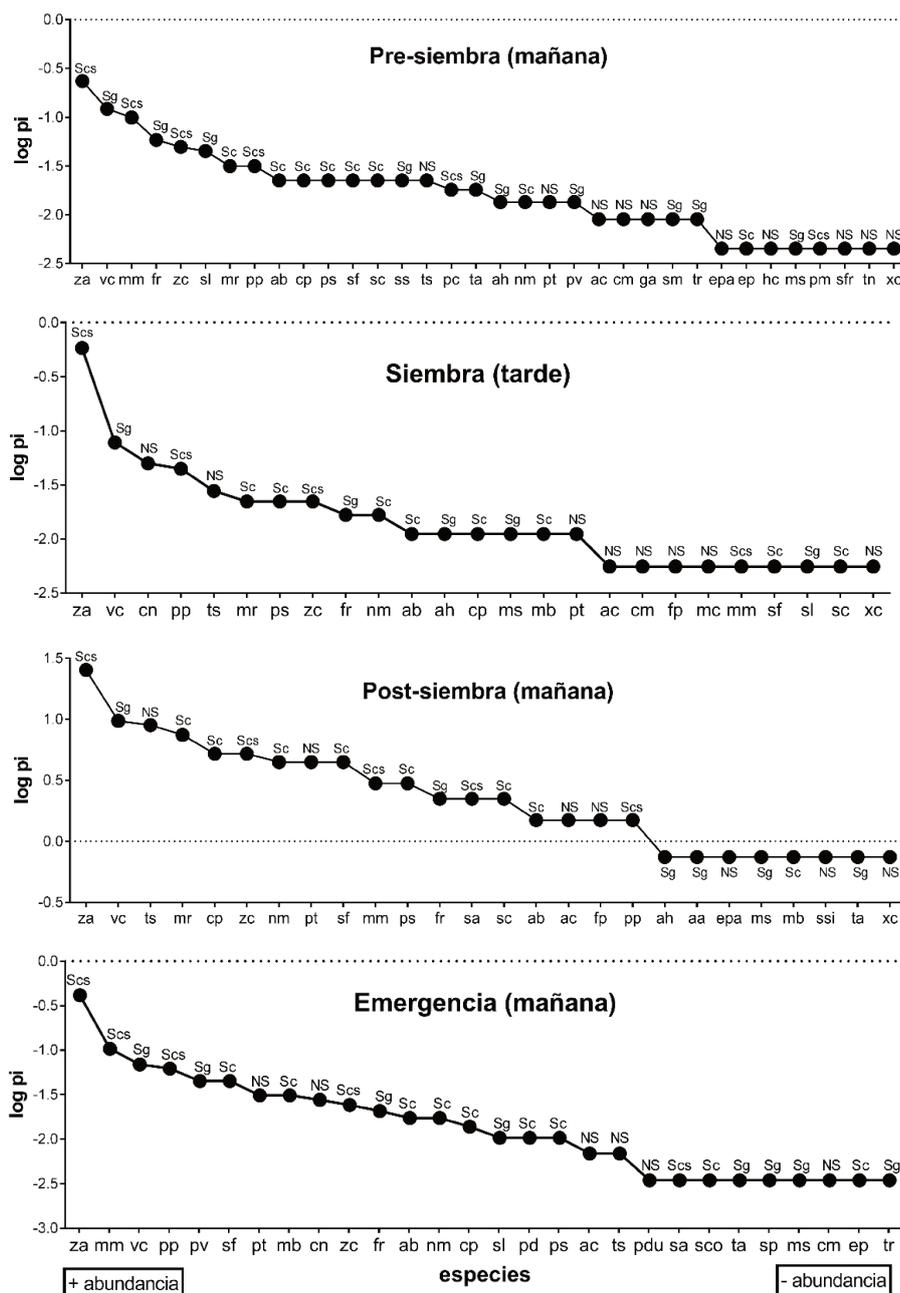
1: Raffo et al. (2014). 2: De la Peña (2011). 3: De la Peña y Pensiero (2017). 4: López de Casenave et al. (1998). 5: Di Giacomo y López de Casenave (2010). 6: Dardanelli et al. (2006). 7: Codesido et al. (2009). 8: Blendinger (2005). 9: Reales et al. (2009). 10: Solari y Zaccagnini (2009). 11: Goijman y Zaccagnini (2008). 12: Zaccagnini et al. (2010). 13: Sosa (2008). 14: Zotta (1940). 15: (Bucher y Nores (1976). 16: Bucher et al. (1991). 17: Bruggers et al. (1998). 18: Ranvaud et al. (2001). 19: Cândido Jr et al. (2008). 20: (Dardanelli et al. (2012). 21: Camperi et al. (1998). 22: Olguín et al. (2017). 23: Serié (1921). 24: Aramburú y Bucher, (1999). 25: Beltzer (1990a). 26: Darrieu et al. (1996). 27: Beltzer (1990b). 28: Latino y Beltzer (1999). 29: Caballero-Sadi et al. (2007). 30: Beltzer et al. (1988). 31: Salvador et al. (2017). 32: Bump y Bump, (1969).

*Consumo de cotiledones conocido y publicado (ej. Dardanelli et al. 2012).

**Consumo de cotiledones conocido pero no publicado en artículos académicos.

S: aves que incluyen semillas en su dieta, NS: aves que no incluyen semillas en su dieta, Scs: aves con registros publicados de consumos de semillas de cultivos, incluyendo semillas de soja; Sc: aves con registros publicados de consumos de semillas de cultivos; Sg: aves que consumen semillas en general.

La abundancia aquí es el porcentaje de individuos de la especie considerada con respecto al número total de individuos observados en todos los relevamientos.



1

2 Fig. 4.4. Rango-abundancia de especies de aves en pre-siembra, siembra, post-siembra y emer-
 3 gencia, considerando parcelas C y T y todos los campos. El número de puntos expresa la riqueza.
 4 En el eje x, las especies se ordenan de mayor a menor abundancia relativa (pi). La pendiente de la
 5 curva formada por los puntos indica el grado de equidad. En cada punto se indica la clasificación
 6 otorgada para la especie que representa ese punto en cuanto a su ingestión de semillas (NS: no
 7 semillas, Sg: semillas en general, Sc: semillas de cultivo, Scs: semillas de cultivo, incluyendo soja).
 8 aa: Anumbius annumbi, ab: Agelaioides badius, ac: Athene cunicularia, ah: Ammodramus humeralis, cn: Chordeiles na-
 9 cunda, cp: Columbina picui, cm: Colaptes melanochloros, epa: Elaenia parvirostris, ep: Embernagra platensis, fr: Furna-
 10 rius rufus, fs: Falco spaverius, ga: Geothlypis aequinoctialis, hc: Hylocharis chrysura, mb: Molothrus bonaerensis, mc:
 11 Melanerpes cactorum, mm: Myiopsitta monachus, mr: Molothrus rufoaxillaris, ms: Mimus saturninus, nm: Nothura mac-
 12 ulosa, pc: Paroaria coronata, pd: Passer domesticus, pdu: Polioptila dumicola, pm: Patagioenas maculosa, pp: Patagioenas
 13 picazuro, ps: Pitangus sulphuratus, pt: Progne tapera, pv: Pseudoleistes virescens, sa: Saltator aurantiifrons, sc: Spo-
 14 rophila caerulescens, sco: Saltator coerulescens, sf: Sicalis flaveola, sl: Sicalis luteola, sfr: Synallaxis frontalis, sm: Spinus
 15 magellanicus, sp: Schoeniophylax phryganophilus, ss: Sturnella superciliaris, ssi: Syrigma sibilatrix, ta: Turdus amauro-
 16 chalinus, tn: Tapera naevia, tr: Turdus rufiventris, ts: Tyrannus savana, vc: Vanellus chilensis, xc: Xolmis cinereus, za:
 17 Zenaidura macroura, zc: Zonotrichia capensis.

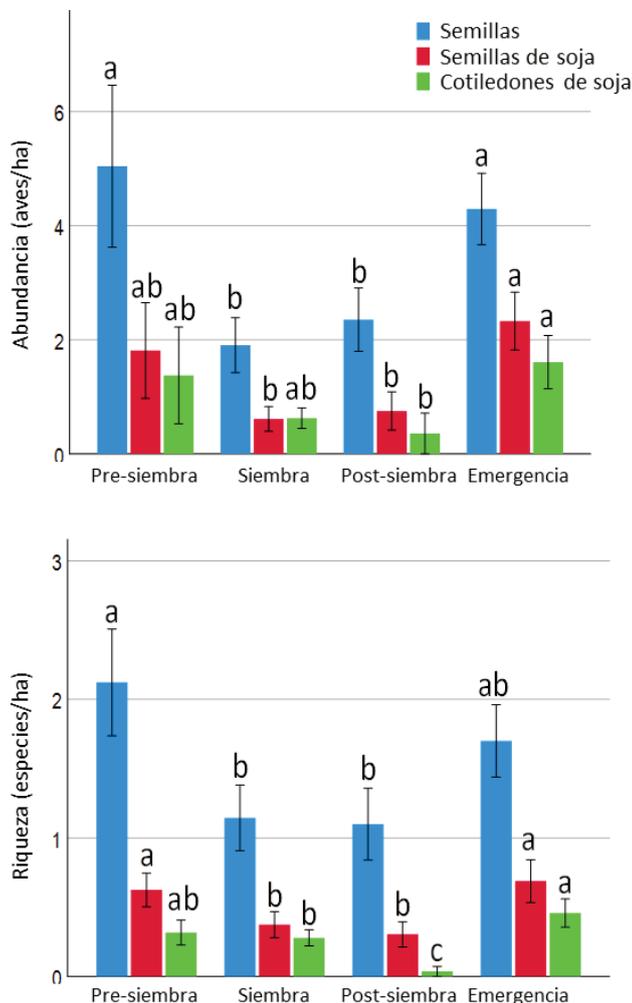


Fig. 4.7. Abundancia y riqueza de los diferentes grupos de aves según su tipo de alimento, presente en que campos con o sin tratamiento en los cuatro períodos estudiados.

Evaluación de riesgo agudo

Los TER agudos, tanto de las semillas tratadas con imidacloprid (TERs) como de sus cotiledones (TERc), fueron 18 y 1307, respectivamente, y por lo tanto no se consideraron como problema para la torcaza. El área de forrajeo problema para las semillas de soja fue más pequeña que el rango de hogar de la torcaza, pero el tiempo de forrajeo problema para las semillas de soja fue mayor que el promedio de horas diarias de luz durante la temporada de siembra de soja (13 h). En los sitios de carga,

aunque las semillas derramadas/m² fueron mucho más numerosas que las semillas de preocupación (131 semillas), no se lograría un riesgo agudo teniendo en cuenta la tasa de ingesta de semillas tratadas en cautiverio (estimada en 4 semillas por día). En el caso de los cotiledones, el área de forrajeo problema de la torcaza fue mayor que el rango de la torcaza y el tiempo de preocupación fue superior a 13 horas (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Ecuaciones, variables y resultados de la evaluación de riesgos de semillas y cotiledones de soja tratados con imidacloprid para la torcaza.

Variable	Ecuación/Fuente	Valor	Unidades
TER (índice de exposición tóxica a las semillas de soja tratadas) ^A	$= \text{DL50 (mg i.a./kg PC)} / [\text{ClS (mg i.a./kg semilla)}] * [\text{IMs (kg semilla)} / \text{PC (kg)}]$	18	sin unidad
DL50 de torcaza	Addy-Orduna et al., 2019	59	mg i.a./kg PC
ClS (concentración de imidacloprid en semillas de soja)	Concentración de campo obtenida en este estudio	380	mg i.a./kg semilla
IMs / PC	Masa de ingesta diaria de semillas de soja tratadas con imidacloprid / PC (Addy-Orduna et al., 2022)	0,0083	kg semilla/kg PC
PC promedio de torcaza	(Addy-Orduna et al., 2019)	127	g
TERc (índice de exposición tóxica a cotiledones de soja tratados) ^A	$= \text{DL50 (mg/kg PC)} / [\text{Clc (mg i.a./kg de cotiledón)}] * [\text{IMc (kg de cotiledón)} / \text{PC (kg)}]$	1307	sin unidad
Clc (concentración de imidacloprid en cotiledones)	Concentración de campo obtenida en este estudio	0,9	mg i.a./kg cotiledón
IMc / PC	Ingesta diaria de masa de cotiledones de soja tratados con imidacloprid / PC (Addy-Orduna et al., 2022)	0,0501	kg cotiledón/kg PC
Área de forrajeo problema para las semillas de soja ^B	$= \text{Semillas}_{\text{problema}} / [\text{SR} * (1 - \text{IR}) * \text{CE}]$	0,04	Hectáreas

Semillas _{problema} (semillas que alcanzan la DL50)	= $DL50 \text{ (mg/kg PC)} * PC \text{ promedio (kg) / (masa de i.a./semilla)}$	131	semillas
Masa de i.a./semilla	= $CI \text{ (mg i.a./kg semilla)} * \text{masa de 1 semilla de soja (kg/semilla)}$	0,057	mg i.a./semilla
Masa de 1 semilla de soja	(Addy-Orduna et al., 2022)	0,15	g
SR (Tasa de siembra)	densidad de siembra en este estudio	380000	semillas/ha
(1-IR) (Fracción de semillas no enterradas)	= $1 - (\text{Fracción incorporada o (semillas no enterradas tratadas/m}^2) / \text{SR (m}^2)$	0,09	sin unidad
CE (Eficiencia en el consumo)	(USEPA, 2016)	1	sin unidad
Área de forrajeo problema para los cotiledones^B de soja	= $Cotiledones_{problema} / (AC * CE)$	36,67	Hectáreas
Cotiledones _{problema} (cotiledones que alcanzan la DL50)	= $DL50 \text{ (mg/kg PC corporal)} * PC \text{ promedio (kg) / (masa de i.a./cotiledón)}$	40415	cotiledones
Masa de i.a./cotiledón	= $ICc \text{ (mg ai/kg cotiledón)} * \text{masa de 1 cotiledón (kg/cotiledón)}$	0,000185	mg i.a./cotiledón
Masa de 1 cotiledón	(Addy-Orduna et al., 2022)	0,206	g
AC (cotiledones disponibles)	= $2 * (\text{plántulas tratadas/ha})$	724000	cotiledones/ha
Rango de hogar de torcazas^B	= $a * PC^b$	11,36	Hectáreas
a (coeficiente alométrico para aves granívoras)	(Mace y Harvey, 1983)	0,05	ha/g PC
b (relación entre la tasa metabólica basal y el peso corporal)	(Mace y Harvey, 1983)	1,12	sin unidad
Tiempo de forrajero problema	= $Semillas_{problema} \text{ (semillas) / IR (semillas/h)}$	33	horas

para las semillas de soja ^B

IR (número de semillas tratadas con imidacloprid ingeridas/hora)	Inferido para 13 h de luz diaria, a partir de 0,56 semillas tratadas con imidacloprid consumidas en 2 h de exposición (Addy-Orduna et al., 2022)	4	semillas/h
Tiempo de forrajeo problema para cotiledones de soja ^B	$= \text{Cotiledones}_{\text{Problema}}(\text{cotiledones}) / \text{IRc}(\text{cotiledones/h})$	1616	horas
IRc (número de cotiledones tratados con imidacloprid ingeridos/hora)	Inferido para 13 h de luz diaria, a partir de 3,8 cotiledones tratados con imidacloprid consumidos en 2 h de exposición (Addy-Orduna et al., 2022)	25	cotiledones/h

^AAdaptado de EFSA (2009). ^BAdaptado de USEPA (2016).

Discusión

La evitación de alimentos en las aves de tierras de cultivo es un factor relevante en el refinamiento de la evaluación del riesgo ambiental de los plaguicidas utilizados para el tratamiento de semillas. El efecto aversivo de los neonicotinoides se ha observado en estudios experimentales con aves alimentadas con semillas y cotiledones tratados con neonicotinoides (varios citados aquí), pero la relevancia de dicho efecto en escenarios de campo no estaba clara. Aquí hemos estudiado el efecto aversivo del imidacloprid utilizado para el tratamiento de semillas en un escenario de campo en Argentina, donde el imidacloprid todavía está en uso. La mayor densidad de semillas no enterradas que quedan dos días después de la siembra y el menor daño en los cotiledones observado en las parcelas T respecto a las parcelas C pueden responder al efecto aversivo del imidacloprid en las aves. Además, la menor abundancia y riqueza de aves que comen semillas se observó durante los períodos de siembra y post-siembra, lo que puede producirse por una evitación generalizada de utilizar campos recién sembrados. Sin embargo, este tipo de estudios experimentales en condiciones de campo pueden verse afectados por muchas variables no controladas que se discutirán aquí.

Las semillas de soja utilizadas en el experimento se prepararon con la dosis de aplicación registrada de imidacloprid para soja, y las concentraciones confirmadas

obtenidas fueron cercanas a la nominal (90,5%). Esto indica que el tratamiento de las semillas con el insecticida fue relativamente eficiente. Sin embargo, M'Kay et al. (1999) reportan niveles de residuos de insecticidas en semillas de tolva por debajo del 30% de la concentración nominal. Probablemente las semillas de soja utilizadas aquí pueden haber perdido una cantidad significativa del insecticida debido a una fuerte lluvia que cayó 20 h después de la siembra, ya que el imidacloprid tiene una solubilidad relativamente alta en agua (610 mg / l a 20 ° C y pH 7; Bonmatin et al., 2015). Además, la densidad de semillas sin enterrar observada en este trabajo fue mayor que la encontrada por Roy et al. (2019) en campos de soja de EE.UU. (1,94 semillas de soja/m²). Esta diferencia puede deberse a factores tales como las prácticas agrícolas (técnica, velocidad, profundidad y densidad de siembra), el clima (lluvia) y las condiciones del suelo (de Leeuw et al., 1995).

La primera evidencia de evitación de semillas causada por imidacloprid en este estudio es la menor densidad de soja no enterrada observada en las parcelas C que en las parcelas T, tanto a las 12 como a las 48 h post-siembra. Esto puede sugerir un efecto aversivo de las semillas tratadas para las aves que impiden el consumo de semillas. pero no debemos descartar algún efecto de la heterogeneidad del hábitat, debido a la proximidad de algunas partes de los campos a parches de vegetación arbórea y arbustiva que las aves utilizan como refugio mientras se alimentan en campos adyacentes (Bou et al., 2016). El tiempo transcurrido desde la siembra y el tratamiento mostró una interacción significativa, pero contrariamente a nuestras expectativas, la densidad de semillas no enterradas no siempre fue menor después de 48 h en comparación con 12 h después de la siembra. Esto se debió probablemente a la lluvia ocurrida después de la siembra, que produjo el desenterramiento, arrastre y lavado de las semillas recién sembradas a áreas bajas dentro de los campos. La densidad de semillas no enterradas fue mayor en las cabeceras que en el interior del campo como se observó en otros estudios (de Leeuw et al., 1995; López-Antia et al., 2016).

Como se observó para las semillas no enterradas, hubo una menor densidad de plántulas en las parcelas C que en las parcelas T que pueden responder a la posible evitación de semillas o plántulas causada por el imidacloprid en las aves. El porcentaje de plántulas con algún daño en sus cotiledones fue claramente mayor en las parcelas C que en las parcelas T. Este último hallazgo debería haberse visto menos afectado por otros factores de confusión, como la densidad inicial de semillas o el efecto de la lluvia después de la siembra que probablemente desenterró semillas de soja en algunas partes de los campos. El porcentaje de imidacloprid en cotiledones en el momento de la evaluación del daño (0,06-0,24% de la cantidad total aplicada en la semilla) fue bajo en

comparación con la cantidad que se espera que sea absorbida y distribuida a la planta emergida de la semilla, estimada por otros autores en un 2-20% para toda la planta (Sánchez-Bayo, 2014; Wood y Goulson, 2017), y 0.65-1.18% para las plántulas (Alford y Krupke, 2017). Esto puede deberse, al menos en parte, al lavado de la semilla causado por la lluvia después de la siembra. Sin embargo, la concentración de imidacloprid en cotiledones medida aquí (0,9 mg/kg) fue mucho menor que la concentración de imidacloprid en cotiledones utilizados en exposiciones experimentales en torcazas (33 mg/kg), en las que se observó un promedio de 37% de aversión al cotiledón tratado con la dosis insecticida pero sin una diferencia significativa con respecto al control debido a la alta variabilidad en la ingesta de cotiledón (Addy-Orduna et al., 2022). Alguna parte del daño del cotiledón puede ser causado por el ataque de insectos, pero el porcentaje de plántulas dañadas en las clausuras (1,8%) fue mucho menor que los valores observados en las parcelas C de los campos evaluados (28,3%), por lo que la mayor parte del daño registrado probablemente fue causado por aves.

La abundancia de aves y la riqueza de especies no pudieron evaluarse por separado dentro de las parcelas C y T debido a la alta movilidad de las aves dentro del campo y la dificultad para diferenciar la frontera entre las parcelas C y T. Sin embargo, podemos observar que la abundancia y la riqueza fueron mucho menores durante los períodos de siembra y post-siembra que en los períodos previos a la siembra y las plántulas. Esto puede indicar que las aves se alejaron con la presencia de la maquinaria de siembra, pero también que no se sintieron particularmente atraídas por la disponibilidad de semillas de soja después de la siembra. Este puede ser otro efecto de la evitación de alimentos causada por el imidacloprid, porque las aves pueden evitar el uso de campos en los que las semillas contenían el imidacloprid aversivo. Los estudios experimentales en cautiverio han demostrado que las aves expuestas al imidacloprid tienen más dificultades para discernir las semillas tratadas y no tratadas cuando la presencia de tipos de semillas es impredecible, y esto puede aumentar el riesgo de envenenamiento (López-Antia et al., 2014). Además, la exposición a semillas tratadas con imidacloprid puede reducir la ingestión de otras fuentes de alimentos debido al efecto anoréxico de los neonicotinoides (Addy-Orduna et al., 2022; Eng et al., 2019; Lopez-Antia et al., 2015).

La riqueza de aves encontradas aquí fue algo diferente a la encontrada en campos de soja de otros estudios (Di Giacomo y López de Casenave, 2010; Goijman y Zaccagnini, 2008; Leveau y Leveau, 2004; Solari y Zaccagnini, 2009; Zufiaurre et al., 2016) evaluados en otras épocas del año y/o en diferentes ecorregiones. Esto demuestra la importancia de considerar no sólo los cultivos, sino el mes del año y la

ecorrección al evaluar la exposición de las aves a estos pesticidas, dado que factores como el tipo de cultivo, la heterogeneidad y la estructura leñosa influyen en la diversidad de aves en los paisajes agrícolas (Wilson et al., 2017).

Algunas de las especies de aves registradas en el estudio y clasificadas como aves que comen semillas pueden consumir semillas de soja y/o cotiledones, aunque esto puede no haber sido descrito en la literatura disponible. Por esta razón, el análisis de la abundancia y riqueza de todas las aves que consumen semillas y cotiledones como variable de respuesta puede ser una medida conservadora del riesgo de daño por parte de las aves. En cualquier caso, la abundancia y riqueza de los tres grupos de aves que comen semillas, semillas de soja o cotiledones muestran una tendencia similar, con los valores más bajos ocurriendo durante la siembra y en el período posterior a la siembra. Curiosamente, hubo un aumento en la abundancia de aves y la riqueza de especies durante el período de plántulas, y especialmente de especies que se alimentan de cotiledones.

La especie más abundante fue la torcaza, que ingiere semillas, incluidas las semillas de soja, pero también puede comer cotiledones de soja (Bucher y Nores, 1976; Dardanelli et al., 2012; Ranvaud et al., 2001). Ésta es probablemente una de las mejores especies focales para la evaluación de riesgos de productos fitosanitarios en Argentina, dado su tipo de dieta, abundancia en la región, facilidad de captura, visualización relativamente fácil en el campo y ecología y biología más conocidas que la de otras aves locales. De acuerdo con la evaluación determinista del riesgo realizada aquí con datos de concentración de imidacloprid de campo y datos de semillas y cotiledones tratados ingeridos por torcazas cautivas, su exposición al imidacloprid a través de semillas de soja y cotiledones sería insuficiente para alcanzar niveles de riesgo agudo. Además, un refinamiento de la evaluación del riesgo con la evitación de semillas causada por el imidacloprid (29,4% calculado por la diferencia en la densidad de semillas no enterradas en parcelas C y T) podría producir un menor riesgo en la torcaza. Sin embargo, cabe señalar que a veces la ingesta de alimentos por parte de los individuos en cautiverio puede ser menor que la de las aves en libertad (Addy-Orduna et al., 2019) y que tal vez la concentración de imidacloprid en cotiledones en este experimento fue menor de lo habitual debido al efecto de la lluvia después de la siembra, por lo que estos cálculos podrían subestimar el riesgo. Además, otras especies silvestres con tamaños corporales más pequeños y / o DL50 posiblemente más pequeños que los de las torcazas podrían verse más afectadas por la cantidad de imidacloprid contenida en las semillas de soja o cotiledones. Por ejemplo, la torcacita (*Columbina picui*) de 50 g de peso corporal (De la Peña y Salvador, 2016) y el chingolo (*Zonotrichia capensis*) de unos 20 g de peso

corporal (Rey, 1973) fueron pequeñas aves observadas dentro del campo después de sembrar, así como *Nothura maculosa*, especie con una DL50 de imidacloprid probablemente similar a *Perdix perdix* (14 mg i.a./kg de peso corporal; Gibbons et al., 2015) o *Coturnix japonica* (31 mg i.a./kg de peso corporal; Tomlin CDS, 2004) . Estudios toxicológicos específicos centrados en estas especies pueden ser necesarios para cubrir la amplia diversidad de aves que pueden consumir cotiledones tratados y semillas de cultivos sudamericanos. Finalmente, dado el alto porcentaje de aves que comen semillas que se encuentran en estos campos de soja, recomendamos más estudios con especies sudamericanas pequeñas o más sensibles químicamente que corroboren el bajo riesgo de imidacloprid como tratamiento de semillas para la soja.

Conclusiones

La mayor densidad de semillas de soja tratadas sin enterrar, el menor daño a las plántulas tratadas y la menor presencia de aves después de la siembra sugieren un comportamiento de evitación de imidacloprid por parte de las aves en el campo. Este comportamiento, junto con dosis más bajas del químico en la soja en comparación con otros cultivos, reduciría el riesgo de intoxicación aguda por imidacloprid a través de semillas de soja y cotiledones tratados a niveles bajos, al menos para la torcaza.

CAPÍTULO 5

Disponibilidad y riesgo para aves en el campo por el consumo de semillas de maíz, sorgo y soja tratadas con neonicotinoides



Resumen

En América del Sur, la investigación sobre el riesgo de envenenamiento por ingestión de semillas tratadas con neonicotinoides para las aves es incipiente. Para contribuir con información al respecto, el objetivo de este trabajo fue cuantificar la densidad de semillas que permanecen en el suelo disponible para las aves después de una siembra de maíz, sorgo y soja en campos comerciales. Cuarenta y tres campos recién sembrados (16 de maíz, 9 de sorgo y 18 de soja) fueron evaluados mediante transectas con puntos equidistantes, colocando un anillo metálico (0,25 m²) en cada punto y contando las semillas no enterradas. Además, se registraron más de 30 variables relacionadas con las características y condiciones del campo, del cultivo y de los aspectos técnicos de la siembra para evaluar su influencia sobre la densidad de semillas no enterradas. La riqueza y abundancia de aves se estimó en 25 de los 43 campos mediante una transecta de 250 m en las cabeceras y una dentro del campo. Se recolectaron muestras de semillas no enterradas en cada campo para determinar los residuos químicos. A 400 torcazas (*Zenaida auriculata*) donadas por cotos de caza entre septiembre y diciembre se les realizó necropsia para evaluar su dieta (200 aves) y determinar residuos de neonicotinoides (200 muestras). Se calculó la tasa de exposición tóxica (TER), como medida para caracterizar el riesgo. La densidad de semillas/m² sin enterrar difirió significativamente entre cultivos (soja>sorgo>maíz) y entre cabeceras e interior del campo. Variables como presencia de curvas de nivel, porcentaje de suelo cubierto con material vegetal, servicio de siembra contratado, dosificador de la sembradora y densidad de siembra produjeron un efecto significativo en la densidad de semillas sin enterrar. La riqueza de las aves que comen semillas fue mayor en las cabeceras y aumentó al aumentar la densidad de semillas sin enterrar. La abundancia de aves que comen semillas difirió entre los cultivos, siendo mayor en el maíz. Imidacloprid fue el neonicotinoide presente en las semillas de los tres cultivos y en mayor concentración. Los tractos gastrointestinales evaluados contuvieron semillas de maíz, sorgo y soja en diferentes proporciones, siendo combinaciones frecuentes maíz-semillas silvestres y soja-semillas silvestres. Considerando las combinaciones de semillas de los tractos gastrointestinales con mayor proporción de los cultivos evaluados y la concentración de campo de neonicotinoide en las semillas no enterradas, el riesgo agudo caracterizado a través del índice TER refinado resultó inaceptable (TER<10) para combinaciones de semillas que incluyeran maíz y/o sorgo.

Introducción

El desarrollo sostenible requiere conciliar las demandas de conservación de la biodiversidad y aumentar la producción agrícola (Butler et al., 2007). Las aves que viven en agroecosistemas forman parte de la biodiversidad agrícola y han sido ampliamente utilizadas como centinelas de la salud de los ecosistemas porque, entre otras cosas, reflejan la exposición y los efectos de los contaminantes (Smits y Fernie, 2013). Los efectos directos e indirectos de los plaguicidas han sido un factor importante en la disminución de la población de varias aves que viven en agroecosistemas en Europa y América del Norte (Boatman et al., 2004; Mineau y Whiteside, 2013; Stanton et al., 2018). Contrariamente, en América del Sur hay poca información sobre la exposición y los efectos de los plaguicidas en las aves silvestres, y la medida en que las están afectando.

Los tratamientos de semillas previos a la siembra se utilizan ampliamente a nivel mundial porque minimizan la necesidad de rociar, reducen la exposición del operador / productor al ingrediente activo y lo colocan donde sea necesario, reduciendo la tasa de aplicación de plaguicida en los cultivos (Prosser et al., 2006). Sin embargo, estos tratamientos se han asociado con una amplia exposición e impacto en las aves porque las semillas volcadas o no enterradas durante la siembra, con alta carga química por unidad, están disponibles *ad libitum* sobre el campo para las aves (Gibbons et al., 2015; Goulson, 2013; Mineau, 2003; Murton, 1963). La eficiencia de la siembra prácticamente nunca es completa y una parte de las semillas permanecen sin enterrar (McKay et al., 1999b). La cantidad de semillas en la superficie varía con la condición del suelo durante la siembra, el tipo y la regulación de la maquinaria, la experiencia del operador y las posibilidades y decisiones del productor (de Leeuw et al., 1995). Factores como el rastrojo, la lluvia, el tamaño de la semilla, la profundidad de perforación y la velocidad de trabajo durante la siembra también afectan el éxito de la siembra (de Leeuw et al., 1995; Mineau y Palmer, 2013). A su vez, el porcentaje de semillas que quedan en la superficie del suelo varía entre los cultivos y entre las cabeceras y el interior del campo (De Snoo y Luttik, 2004). Las cabeceras suelen tener una mayor densidad de semillas tratadas en la superficie del suelo que en el interior (Lopez-Antia et al., 2016; Pascual et al., 1999c) porque es donde se cargan y calibran las máquinas, siendo entonces los lugares de mayor exposición para las aves.

Los neonicotinoides son insecticidas sistémicos comúnmente utilizados como tratamiento de semillas para controlar insectos del suelo (Elbert et al., 1990). Su uso generalizado representa un riesgo para las aves que consumen semillas. Según Hart et

al. (1999), los factores que determinan que las aves sean envenenadas con semillas tratadas son el área sembrada, la toxicidad del plaguicida, la concentración en la semilla, la densidad de semillas expuestas, la disponibilidad de alimentos alternativos y la capacidad de las aves de evitar selectivamente las semillas tratadas. Teniendo en cuenta estos factores, varias investigaciones de campo en Europa (Bro et al., 2016, 2010; Humann-Guilleminot et al., 2019; Lennon et al., 2019, 2020a, 2020b; Lopez-Antia et al., 2016; Millot et al., 2017) y América del Norte (Ertl et al., 2018; Hao et al., 2018; McGee et al., 2018; Roy et al., 2019a; Charlotte L. Roy y Coy, 2020; Turaga et al., 2016) han contribuido a predecir el riesgo de intoxicación por ingestión de semillas tratadas con neonicotinoides para aves en el hemisferio norte. En América del Sur, en cambio, la investigación sobre el tema es incipiente. Recientemente, se han realizado algunos avances en cuanto al riesgo de neonicotinoides utilizados como tratamiento de semillas para especies de aves sudamericanas a través de estudios de aviario en condiciones controladas (Addy-Orduna et al., 2022, 2019; Poliserpi et al., 2020) y a escala de campo experimental para el cultivo de soja en sus primeros estados fenológicos (capítulo anterior). Bajo la hipótesis de que la exposición de aves a neonicotinoides varía entre cultivos de grano estivales en función de la cantidad de semillas que quedan sin enterrar, la abundancia y riqueza de aves que comen semillas y la cantidad de neonicotinoides y de granos ingeridos, los objetivos de este trabajo fueron (1) determinar la densidad de semillas tratadas que permanecen en el suelo disponible para las aves después de sembrar maíz, sorgo y soja en campos comerciales; (2) determinar la concentración de neonicotinoides de las semillas no enterradas de los cultivos recién sembrados; (3) determinar la abundancia y riqueza de aves que comen semillas en campos de maíz, sorgo y soja recién sembrados; (4) evaluar la proporción de semillas cultivadas y el contenido de neonicotinoides en el tracto gastrointestinal (t.g.i. a partir de ahora) de torcazas (*Zenaida auriculata*) proporcionadas por cotos de caza ubicados en el área de estudio; y, finalmente, (5) calcular un índice de riesgo agudo (acute toxicity-exposure-ratio, TER agudo) usado en las evaluaciones de riesgo europeas como insumo para caracterizar el riesgo de un plaguicida para aves. Por lo tanto, este trabajo aporta los primeros datos de campo de Sudamérica para evaluar riesgo agudo de neonicotinoides en aves.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El estudio se realizó en dos departamentos de la provincia de Entre Ríos, Paraná y Diamante (Fig. 5.1), durante la primavera del hemisferio sur. La mayor parte del departamento Paraná se encuentra en la ecorregión Espinal, cuyo paisaje predominante es plano a llanura suavemente ondulada, ocupada por bosque abierto con estrato arbóreo, arbustivo y herbáceo, bosques ribereños, pastizales y pastizales higrófilos, hoy en gran parte convertidos en agricultura (Matteucci, 2012a). El departamento Diamante corresponde a la ecorregión pampeana, que se caracteriza en esta parte por áreas onduladas con pastizales y prados, acompañados por matorrales y bosques ribereños, también hoy fuertemente transformados por actividades agrícolas (Matteucci, 2012b).

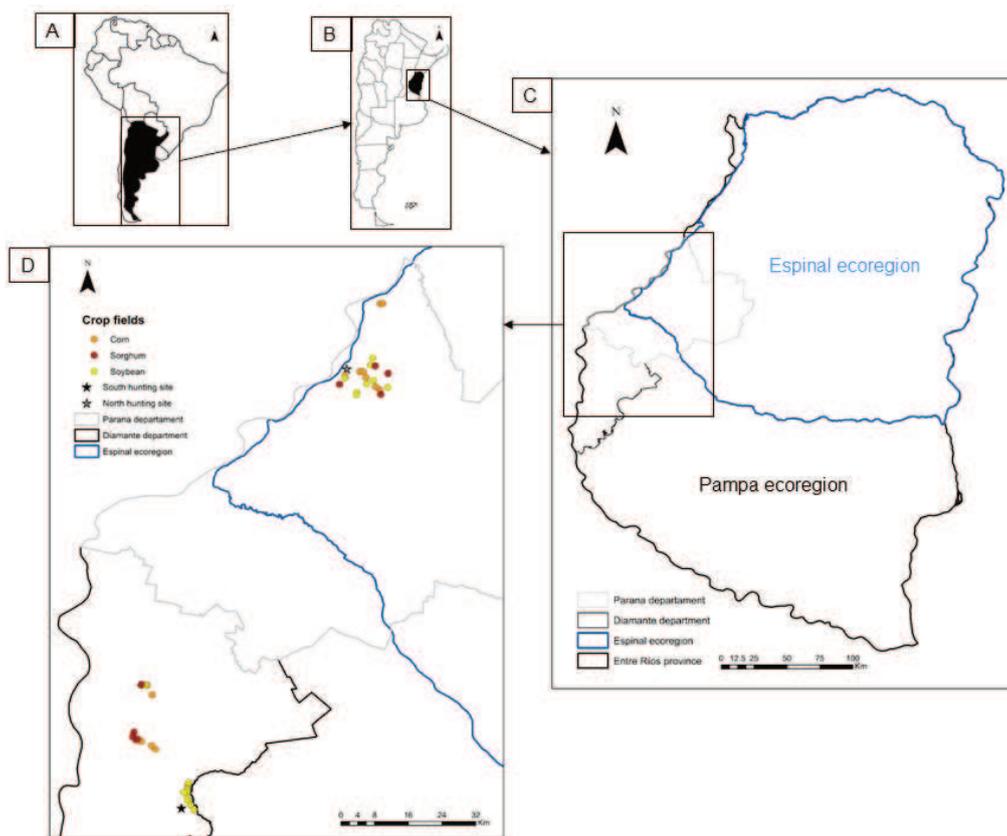


Fig. 5.1. Sitio de estudio. A: mapa de Sudamérica con Argentina marcada. B: Mapa de Argentina con la provincia de Entre Ríos marcada. C: Mapa de la provincia de Entre Ríos con los departamentos de Paraná y Diamante y ecorregiones marcadas. El resto de Entre Ríos corresponde a la ecorregión Pampeana. D: mapa de los campos estudiados y sitios de caza.

La primavera coincide con las fechas de siembra de maíz en septiembre (Maltese et al., 2019), de sorgo entre octubre y noviembre (Carcedo y Gambin, 2019), de soja en noviembre y soja tardía en diciembre (Divito et al., 2016; Peltzer, 2001). Generalmente la soja tardía se siembra sobre rastrojos de trigo (cultivo invernal), denominándose soja “de segunda”. En esa campaña de cultivo (2018/2019), se sembraron en Paraná 51.200 ha de maíz, 17.500 ha de sorgo y 148.800 ha de soja. En Diamante, en cambio, se sembraron 33.600 ha de maíz, 2.700 ha de sorgo y 57.500 ha de soja (MAGyP, 2021).

Relevamiento de semillas y variables de estudio

Para estimar el número de semillas en la superficie del suelo que permanecen disponibles para las aves después de sembrar maíz, sorgo y soja, se evaluaron 43 campos comerciales (Fig. 5.1 D). Veinte de ellos estaban ubicados en Paraná (8 campos de maíz, 4 de sorgo, 3 de soja temprana y 5 de soja tardía) y 23 en Diamante (8 campos de maíz, 5 de sorgo, 5 de soja temprana y 5 de soja tardía). Los agricultores o gestores de estos campos comunicaron previamente su intención de sembrar, proporcionaron información y permitieron el muestreo de sus campos.

El relevamiento de las semillas no enterradas fue sistemático con inicio aleatorio. Las cabeceras y el interior de cada campo se identificaron y midieron utilizando Google Earth Pro®. En el campo, el ancho de la cabecera se dividió en dos secciones iguales. En cada sección, un número al azar entre cero y el ancho de la de la sección en metros determinó el surco (transecta) a evaluar. Luego, el primer punto de muestra se estableció a una distancia aleatoria entre cero y la longitud de la cabecera / 30. Los siguientes 29 puntos de muestra se ubicaron equidistantemente en la transecta (total = 60 puntos de cabecera). En el interior del campo, se establecieron tres transectas con 15, 30 y 15 puntos de muestra equidistantes, respectivamente (total = 60 puntos interiores). Para establecerlos, la longitud del campo se dividió en 3 partes iguales, colocando la primera transecta en uno de los lados del interior en la dirección de los surcos y cubriendo las primeras 2/3 partes de la longitud de interior del campo. La segunda transecta interior comenzó al final de la primera y en diagonal, cubriendo gran parte de ancho del interior. La tercera transecta, iniciada al final de la diagonal, ocupó las últimas 2/3 partes del interior en dirección a los surcos (Fig.5.2).

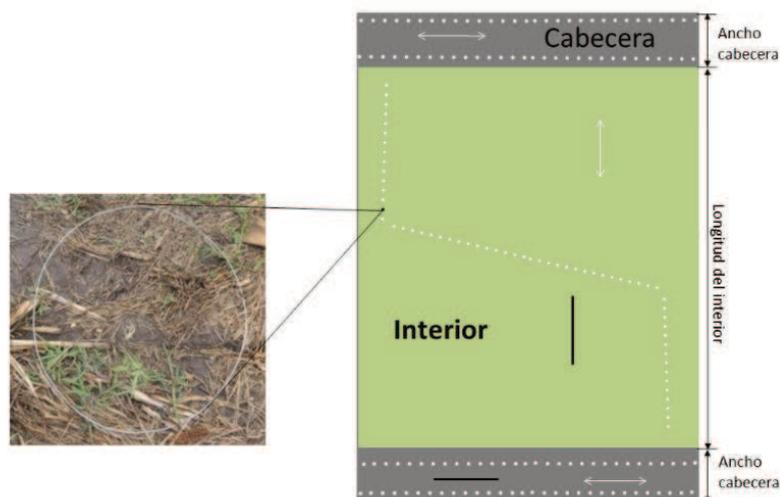


Fig. 5.2. Esquema del diseño de muestreo con transectas para evaluar el número de semillas no enterradas mediante un aro metálico (foto) y las aves en cada sector (cabecera o interior) del campo. Las líneas punteadas blancas representan las transectas para el relevamiento de las semillas y las líneas continuas negras representan las transectas para registrar las aves. Las flechas dobles blancas indican la dirección de los surcos.

En cada punto de muestreo, se colocó un anillo metálico de 0,25 m² y se contaron las semillas expuestas en el suelo del cultivo recién sembrado dentro del anillo. Se estimó el porcentaje de cobertura del suelo y se registraron artrópodos y semillas de plantas silvestres u otros cultivos dentro del anillo (estas últimas como posibles variables explicativas de presencia/ausencia de semillas y de aves). Por otro lado, se registraron variables relacionadas tanto con las características como con las condiciones del campo, el cultivo, la siembra y el relevamiento (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Variables registradas vinculadas al diseño del estudio, a las características y condiciones del lote, al proceso de la siembra o a aspectos del relevamiento de los 43 campos sembrados con maíz, sorgo o soja en los departamentos Paraná y Diamante de la provincia de Entre Ríos.

Variable	Escala de medición	Niveles o unidad de medida	Descripción de los niveles y/o detalles de la variable	Origen de la variable
Semillas no enterradas	Punto y sector del lote	n°/m ²	Sobre el suelo y disponibles para las aves	Medido en campo
Departamento	Lote	2	Paraná, Diamante	Imágenes satelitales

Variable	Escala de medición	Niveles o unidad de medida	Descripción de los niveles y/o detalles de la variable	Origen de la variable
Sector	Lote	2	Cabeceras, interior	Medido en campo
Sitios de carga	Punto y sector del lote	2	No, sí; sí en puntos de lotes de maíz y soja 1 ^a	Medido en campo
Propietario o gestor del campo	Lote	10	7 de Paraná, 3 de Diamante	Agentes de extensión de INTA
Cultivo sembrado	Lote	4	Maíz, sorgo, soja de primera (1 ^a), soja de segunda (2 ^a)	Productor y corroborado en campo
Suelo cubierto	Punto y sector del lote	%	Promedios: 57% en maíz, 44% en sorgo, 53% soja 1 ^a , 84% soja 2 ^a	Medido en campo
Superficie del lote	Lote	ha	Desde 4,6 a 98 ha	Imágenes satelitales y productor
Perímetro del lote	Lote	m	Desde 1055 m hasta 6041 m	Imágenes satelitales
Labranza	Lote	2	No, sí; sí en 44% lotes de maíz, 22% lotes de sorgo y 0% lotes de soja	Productor y corroborado en campo
Rastrojo	Lote	7	Sin; maíz; sorgo; soja; trigo; pastura; combinado (maíz/avena, soja/maíz, trigo/maíz, trigo/soja, trigo/avena/maíz, soja/maíz/trigo)	Corroborado en campo
Tipo de suelo	Lote	9	Argiudol ácuico, Argiudol cumúlico, Argiacuol páquico, Argiudol rendólico, Argiudol vértico, Hapludol rendólico, Hapludol vértico, Peluderte árgico crómico, Peluderte árgico	Web GeoINTA y edafólogo Dante Bedendo de INTA
Lluvia	Lote	mm	Medida desde día anterior a la siembra hasta 4 días post-siembra	Centro meteorológico de INTA Paraná
Curvas de nivel	Lote	2	No, sí; sí en 50% de lotes de maíz, 44% de lotes de sorgo, 100% de lotes de soja de 1 ^a y 70% de lotes soja de 2 ^a	Imágenes satelitales y corroborado en campo
Forma del lote	Lote	2	Con bordes sinuosos: 56% lotes maíz, 56% lotes sorgo,	Imágenes satelitales y

Variable	Escala de medición	Niveles o unidad de medida	Descripción de los niveles y/o detalles de la variable	Origen de la variable
			75% lotes soja 1ª y 57% lotes soja 2ª	corroborado en campo
Proporción de cabecera	Lote	%	Desde 1% hasta 41% del lote	Imágenes satelitales y corroborado en campo
Borde vegetado	Lote	%	Desde 0% a 100% de borde vegetado en los campos	Imágenes satelitales y corroborado en campo
Variedad o híbrido	Lote	21	Brevant™ DS 510 PWU, Dow 22-6 PW Next, Pioneer P38A57 HR, Pionner, Sursem 566, Tijereta 621, Advanta 422, DK61, Don Atilio Lacar Murphy, SALA Africano II, Tobin TOB 62 T, Credenz 4505, Don Mario 40R16, Don Mario 6.2, Nidera 5258, Don Mario 3810, Don Mario 4612, Don Mario 5.9, Nidera 5009, Nidera 5258, Nidera 5509, Syngenta SY 5x1 RR	Productor
Artrópodos	Punto y sector del lote	2	No, sí; presencia de artrópodos vivos: sorgo > maíz > soja 2ª > soja 1ª	Medido en campo
Rastros de vertebrados	Punto y sector del lote	2	No, sí; heces, huellas, cuevas. Soja 2ª > soja 1ª = maíz > sorgo	Medido en campo
Semillas de otros cultivos	Punto y sector del lote	2	No, sí; soja 2ª > soja 1ª > sorgo > maíz	Medido en campo
Semillas de malezas	Punto y sector del lote	2	No, sí; soja 1ª > sorgo > maíz > soja 2ª	Medido en campo
Marca sembradora	Lote	11	Tedeschi, Super Walter WG30, Agrometal TX Mega, PLA, Migra, Agrometal GF-C, Deutz Agroline DS 4300, Crucianelli Pionner 2123, John Deer, Pierobon Multimix, CELE ACTIVA II	Productor y corroborado en campo
Dosificador sembradora	Lote	3	Chorrillo (45% de los casos de sorgo), placa (100% de los casos en maíz y soja,	Web del fabricante y agentes de

Variable	Escala de medición	Niveles o unidad de medida	Descripción de los niveles y/o detalles de la variable	Origen de la variable
			10% de los casos de sorgo), extensión de mixto (45% de los casos de INTA sorgo)	
Siembra contratada	Lote	2	No, sí; sí en 50% de los lotes de maíz, 56% de los de sorgo, 62% de los de soja 1 ^a y 26% de los de soja 2 ^a	Productor
Profundidad de siembra	Lote	cm	Promedios: 4,5 cm maíz, 4,7 cm sorgo, 3,7 cm soja 1 ^a , 3,0 cm soja 2 ^a	Productor
Densidad de siembra	Lote	semillas/m ²	Promedios: 6,48 en maíz; 42,14 en sorgo; 46,56 en soja 1 ^a ; 47,39 en soja 2 ^a .	Productor
Velocidad de siembra	Lote	km/h	Promedios: 6,3 km/h maíz; 6,5 km/h sorgo; 6,5 km/h soja 1 ^a ; 6.4 km/h soja 2 ^a	Productor
Neonicotinoide en semillas	Lote	4	Ninguno, imidacloprid, clotianidin, tiametoxam	Análisis de residuos
Tratamiento neonicotinoide en origen	Lote	2	No, sí; sí en 100% del maíz, 67% del sorgo, 0%de la soja de 1 ^a y 21% de la soja de 2 ^a	Etiqueta y/o web del fabricante
Peso promedio semilla sembrada	Lote	g	Promedios: 0,325 g maíz; 0,027 g sorgo; 0,141 g soja 1 ^a ; 0,158 g soja 2 ^a	Medido en laboratorio a partir de las muestras para análisis de residuos.
Fungicidas encontrados en las semillas	Lote	2	No, sí; 100% correspondió a "sí" por la presencia de flutriafol, thiram, metalaxyl, triticonazole, tebuconazole, difenoconazol y/o pyraclostrobin en las semillas	Análisis de residuos
Herbicidas encontrados en las semillas	Lote	2	No, sí; Clortiamid (8% de los casos)	Análisis de residuos
Fecha de siembra juliana	Lote	n°	1 a 28	Productor
Hora inicio relevamiento de semillas	Lote.	3	Antes de las 10:00 h, entre 10:00-14:00 h, después de las 14:00 h	Medido en campo
Días entre la siembra y el relevamiento	Lote.	días	Promedios: 1,4 d maíz; 0,2 d sorgo; 1,2 d soja 1 ^a ; 1,1 d soja 2 ^a	Medido en campo

Relevamiento de aves en los campos y categorización trófica

Las aves fueron registradas en 25 de los 43 campos por medio de una transecta de faja en la cabecera y otra dentro del campo, ambas de 250 m recorridos en 8 minutos y cubriendo visualmente un ancho de 20 m a cada lado (Bibby et al., 2000; Ralph et al., 1996). Las especies se clasificaron en dos categorías según los antecedentes bibliográficos de su dieta. Las especies "S" fueron aquellas que consumen semillas y las especies "NS" las que no consumen semillas. Dentro de la especie "S", se pudieron diferenciar dos subgrupos: 1) especies con antecedentes bibliográficos que consumen semillas de cultivos (Sc) y 2) especies que consumen semillas en alguna proporción de su dieta, pero sin registros bibliográficos sobre ingestión de semillas de cultivos (Sg).

La riqueza se definió como el número de especies por transecta y la abundancia como el número de individuos de una especie determinada por transecta. Ambas variables se determinaron tanto para las especies "S" como "NS".

Análisis del contenido en el tracto gastrointestinal de torcazas cazadas

Dos empresas de caza, una ubicada en el departamento de Paraná y la otra en el departamento Diamante, proporcionaron las torcazas cazadas en dos fechas cada una para realizar análisis de contenido y residuos químicos en buches y mollejas. De esta manera, contamos con torcazas cazadas en cuatro fechas diferentes: 24 de septiembre, 18 de octubre, 14 de noviembre y 27 de diciembre de 2018. La compañía de caza de Diamante proporcionó las torcazas de septiembre y diciembre y la de Paraná proveyó las torcazas de octubre y noviembre.

La necropsia se realizó en 400 torcazas, 100 torcazas por fecha de caza, de las cuales 50 aves se utilizaron para evaluar el contenido digestivo (dieta) y las otras 50 para el análisis de residuos químicos. El muestreo para el análisis de la dieta consistió en arrastrar todo el contenido del buche y la molleja, por separado, de cada animal con agua y embolsarlo individualmente en bolsas de plástico etiquetadas, selladas herméticamente y almacenadas a -20 °C. Una vez descongeladas a temperatura ambiente, el contenido de las bolsas se transfirió a placas de Petri para su secado (48 h a 50°C). Se pesó la masa seca total del contenido en buche y molleja, así como la de cada componente ingerido identificado con una lupa. Se estimó la masa húmeda de semillas a partir de los porcentajes de humedad para cada tipo de semilla publicados en la Bolsa de Comercio de Rosario (BCR, 2018) y en Apéndice G de EFSA (2009).

Para el análisis de residuos químicos, el contenido del buche y la molleja de las torcazas cazadas fue extraído, se identificaron sus componentes a simple vista y fue envuelto en papel de aluminio con su correspondiente etiquetado. Los paquetes de papel de aluminio se colocaron en bolsas herméticas (una bolsa/ animal) y se conservaron a -20°C.

Residuos de plaguicidas

La determinación de la concentración de plaguicidas se realizó en las muestras (0,5 g) de semillas de cada campo evaluado y el contenido de buches y mollejas de las torcazas cazadas siguiendo el método descrito por Lopez-Antia et al. (2013). El análisis LC-MS se realizó con un cromatógrafo Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6110 Quadrupole LC/MS con fuente multimodo.

Evaluación de riesgo determinístico

El índice de exposición tóxica (toxicity-exposure ratio, TER por su sigla en inglés, Ec. 1 y 2) es una medida para caracterizar el riesgo agudo de un plaguicida (EFSA, 2009; Shore et al., 2005).

$$TER \text{ nivel } 1 = DL50 / (NAR \cdot FIR / PC) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

- DL50: dosis letal 50, en mg i.a./kg PC, para *Colinus virginianus*: 152 mg imidacloprid/kg PC (Tomlin CDS, 2004), 2000 mg clotianidin/kg PC (Rexrode et al., 2003) y 1552 tiametoxam mg/kg PC (Mineau y Palmer, 2013). Para las aves granívoras pequeñas, las DL50 se dividieron por un factor estándar de 10 (EFSA, 2009), dado que se espera mayor sensibilidad a los químicos en especies de tamaños corporales menores.
- NAR: tasa de aplicación nominal del plaguicida, en mg i.a./kg semilla, siendo 4,5 mg imidacloprid/g semilla, 1,5 mg clotianidin/g semilla y 2,1 mg tiametoxam/g semilla para maíz, 4,5 mg imidacloprid/g semilla, 3,0 mg clotianidin/g semilla y 1,8 mg tiametoxam/g semilla para sorgo y 0,4 mg imidacloprid/g semilla) y 0,7 mg i,a./g semilla (Addy-Orduna et al., 2019).
- FIR/PC: Tasa de ingesta diaria de campo/peso corporal, estimado en 0,3 y 0,1 para aves granívoras pequeñas y grandes, respectivamente según EFSA (2009).

En un primer nivel de evaluación, si el TER agudo ≥ 10 , el riesgo se considera aceptable. En cambio, si el TER agudo < 10 , se debe continuar refinando la evaluación. Aquí calculamos el TER agudo de primer nivel de imidacloprid, clotianidin y tiametoxam en maíz, sorgo y soja. La evaluación de riesgo de primer nivel para semillas tratadas supone un escenario de “peor de los casos”, es decir, supone especies focales genéricas (especies no reales pero representativas de las especies potencialmente en riesgo) que se alimentan únicamente de semillas tratadas recién sembradas con la tasa de aplicación nominal del plaguicida. Siguiendo la guía EFSA (2009), las especies focales genéricas se dividen en “ave granívora mediana o grande” que come semillas grandes como las de maíz y en “ave granívora pequeña” que come semillas más pequeñas que las de maíz. Sin embargo, aquí nosotros también calculamos el TER para “aves pequeñas” que comen maíz, dado que se observaron en los campos de maíz recién sembrados aves pequeñas como *Zonotrichia capensis* y *Columbina picui* (20 y 47 g, respectivamente; Dunning, 2007), entre otras, registradas como consumidoras de maíz (De la Peña, 2011).

El refinamiento del análisis de riesgo se puede llevar a cabo en base a diferentes variables obtenidas en el campo que aproximan la exposición estimada a los valores reales que pueden tener las aves en libertad. Una de estas variables es la proporción en la dieta de las aves que pueden representar las diferentes semillas de siembra. Aquí, para el cálculo de los TER agudos refinados se utilizó a la torcaza como especie focal, ya que está presente en los campos recién sembrados y es prevalente y representativa del gremio alimenticio. Se consideraron las combinaciones de semillas halladas en los t.g.i. de las torcazas cazadas en cada batida que incluyeron al menos uno de los tres cultivos evaluados y en mayor proporción (peor de los casos en una dieta mixta). Cada combinación de semillas se evaluó frente a imidacloprid, clotianidin, tiametoxam y sus combinaciones cuando hubo más de un componente que podía estar tratado con neonicotinoide. Interpretando la guía EFSA (2009), el TER agudo refinado puede calcularse como:

$$TER\ ag\ ref = \frac{DL50}{\{1/PC \cdot \sum_i [PDi \cdot (DEE / (\sum PDi \cdot FEi \cdot (1 - MC/100)) \cdot AE/100)] \cdot Ci\}} \quad Ec.2$$

Donde,

- *i*: componente de la dieta
- DL50: 59 mg imidacloprid/kg PC, 4248 mg clotianidin/kg PC o 4366 mg tiametoxam/kg PC (Addy-Orduna et al., 2019). Cuando se supuso tratamiento químico diferente entre cultivos, la DL50 de la mezcla se calculó como $\sum(\text{proporción de i.a.}/DL50)^{-1}$.

- PC: masa promedio de las 400 torcazas cazadas, en g.
- PDi: proporción del componente en la dieta (0 a 1).
- DEE: gasto energético diario de un ave no paseriforme, 175,32 kJ/día, calculado siguiendo el apéndice G de EFSA (2009).
- FEi: contenido energético del alimento, siendo 18,4 KJ/g secos en semillas de cereal y 21,7 KJ/g secos en semillas silvestres (EFSA, 2009).
- MC: contenido de humedad en el alimento, siendo 14,5% en maíz, 15% en sorgo, 13,5% en soja, 14% en trigo, avena, cebada y colza, y 9,9% en semillas silvestres (BCR, 2018; EFSA, 2009).
- AE: eficiencia de asimilación en palomas, tanto de semillas de cereal como silvestres, 76% (EFSA, 2009).
- C: concentración máxima hallada en las semillas sin enterrar, en mg i.a./kg semilla.

Análisis de datos

La exploración de datos se realizó siguiendo a Zuur et al. (2010), usando el software RStudio con la versión 4.1.1 del programa estadístico R (R Core Team, 2021). Para analizar la variabilidad de la densidad de semillas no enterradas se utilizaron GLMM con distribución de Poisson inflada en ceros (Tabla 5.2). Los factores fijos por diseño fueron departamento, sector y sitio de carga. El factor aleatorio por diseño fue la transecta anidada al lote anidado al propietario.

La abundancia y la riqueza de aves que comen semillas se analizaron mediante GLMM con distribución Binomial Negativa, incluyendo departamento, cultivo, sector, labranza, borde vegetado, semillas/m², presencia de semillas de otros cultivos, de semillas de malezas y de sitios de carga como factores fijos, y rastrojo como factor aleatorio.

Todos los análisis se realizaron con el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017). Las variables explicativas numéricas fueron estandarizadas y centradas. El ajuste de los modelos se verificó usando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2021). La colinealidad entre variables se analizó con el paquete “performance” (Lüdtke et al., 2021). Los gráficos fueron realizados con el paquete “ggplot2” (Wickham, 2016).

Tabla 5.2. Modelos estadísticos utilizados para evaluar la incidencia de los diferentes grupos de variables explicativas sobre la densidad de semillas no enterradas después de la siembra.

Grupo de variables explicativas	Modelo
Cultivo + variables de diseño	Semillas/m ² ~ Departamento + Cultivo + Sector + Sitio de carga + (1 Propietario/Lote/Transecta), ziformula=~1, family= "poisson"
VARIABLES relacionadas al lote + variables de diseño	Semillas/m ² ~ Departamento + Sector + Sitio de carga + Porcentaje suelo cubierto + Superficie lote + Curvas de nivel + Proporción de cabecera + Porcentaje borde vegetado + Forma del lote + Labranza + Lluvia + Artrópodos + (1 Variedad) + (1 Rastrojo) + (1 Tipo suelo) + (1 Propietario/Lote/Transecta), ziformula=~1, family= "poisson"
VARIABLES relacionadas a la siembra + variables de diseño	Semillas/m ² ~ Departamento + Sector + Sitio de carga + Siembra contratada + Dosificador sembradora + Profundidad de siembra + Densidad de siembra + Velocidad de siembra + Fechas de siembra julianas + (1 Propietario/Lote/Transecta), ziformula=~1, family= "poisson"
VARIABLES relacionadas al relevamiento + variables de diseño	Semillas/m ² ~ Departamento + Sector + Sitio de carga + Días a la siembra + Hora inicio relevamiento + (1 Propietario/Lote/Transecta), ziformula=~1, family= "poisson".

Resultados

Semillas disponibles para aves después de la siembra

La densidad de semillas no enterradas fue significativamente mayor en los campos de soja (soja temprana o 1^a y tardía o 2^a) que en los campos de maíz y sorgo ($p=0,0009$; Fig. 5.3A), así como en cabeceras respecto al interior de los lotes ($p<0,001$; Fig. 5.3B). Los promedios de densidades de semillas no enterradas, sin considerar los puntos de muestreo caídos en sitios de carga, fueron 0,64 (SE= $\pm 0,05$) semillas/m² en maíz, 1,35 ($\pm 0,14$) semillas/m² en sorgo, 3,47 ($\pm 0,36$) semillas/m² en soja 1^a y 3,40 ($\pm 0,78$) semillas/m² en soja 2^a. La variable sitio de carga produjeron un efecto significativo en la densidad de semillas no enterradas ($p<0,001$), encontrándose densidades de 480 semillas/m² en el único sitio de carga encontrado en maíz y desde 192 hasta 23440 semillas/m² en distintos sitios de carga encontrados en soja de primera.

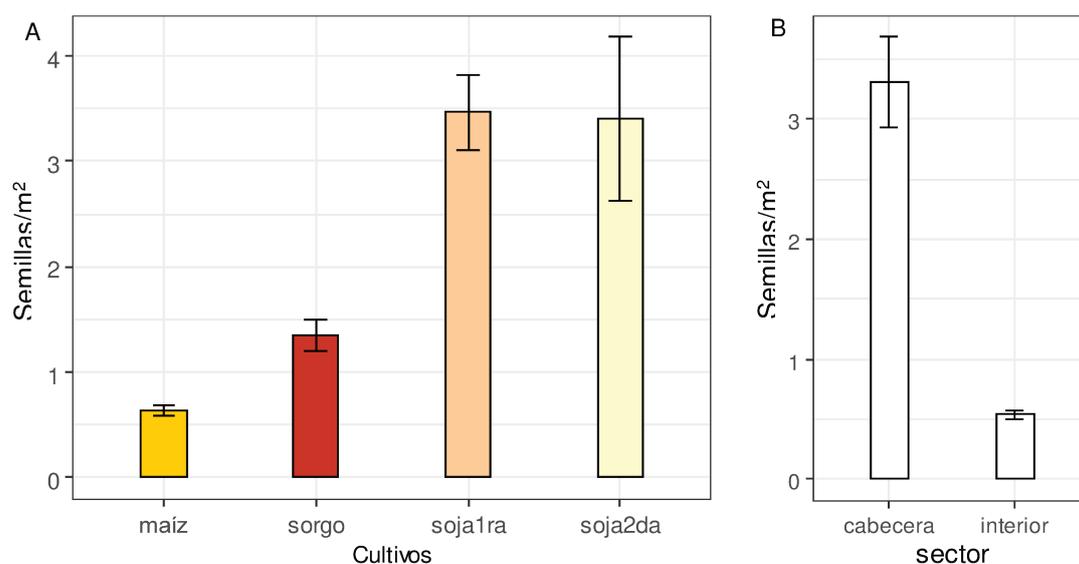


Fig. 5.3. Densidad de semillas no enterradas (media \pm SE) en cada cultivo (A) y en cabeceras e interior del lote (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga. Soja 1ra: soja temprana, sembrada sobre barbecho químico; soja2da: soja sembrada sobre rastrojo de trigo.

Las variables relacionadas a las características y condiciones del campo que produjeron un efecto significativo sobre la densidad de semillas no enterradas fueron la presencia de curvas de nivel en el lote ($p=0,025$; Fig. 5.4A) y el porcentaje de suelo cubierto ($p<0,001$; Fig. 5.4B). En cuanto a las variables relacionadas a la siembra, la densidad de semillas resultó menor cuando la siembra fue contratada ($p<0,001$; Fig. 5.5A), cuando fue realizada con un dosificador mixto ($p<0,001$; Fig. 5.5B) y cuando la densidad de siembra fue menor ($p=0.014$; Fig. 5.5C). Las variables relacionadas con el relevamiento (días desde la siembra hasta el relevamiento y hora de inicio del relevamiento) no produjeron un efecto significativo en la densidad de semillas no enterradas ($p= 0,7517$ y $0,208$, respectivamente).

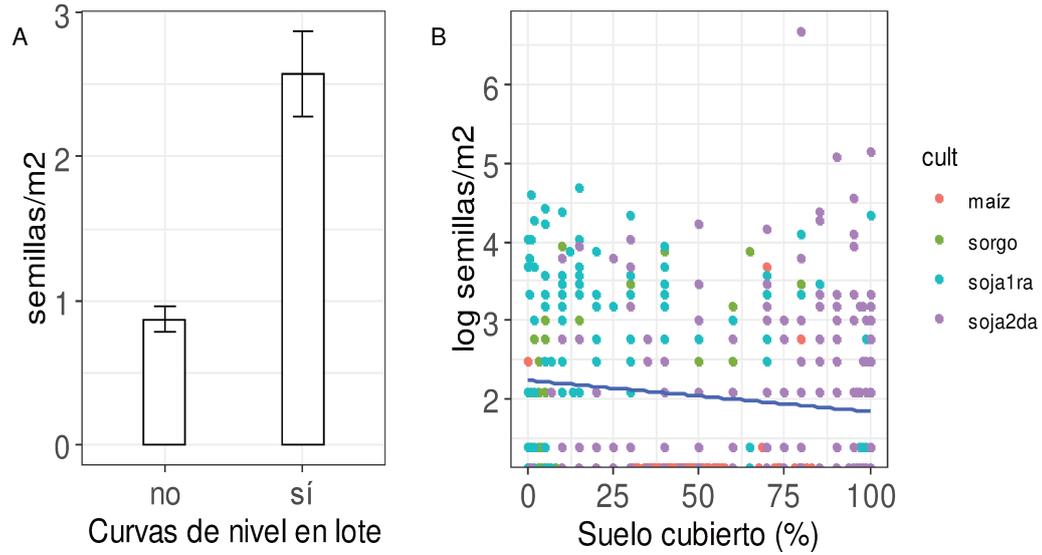


Fig. 5.4. Densidad de semillas no enterradas (media \pm error) en lotes sin y con curvas de nivel (A) y en función del porcentaje de suelo cubierto (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga.

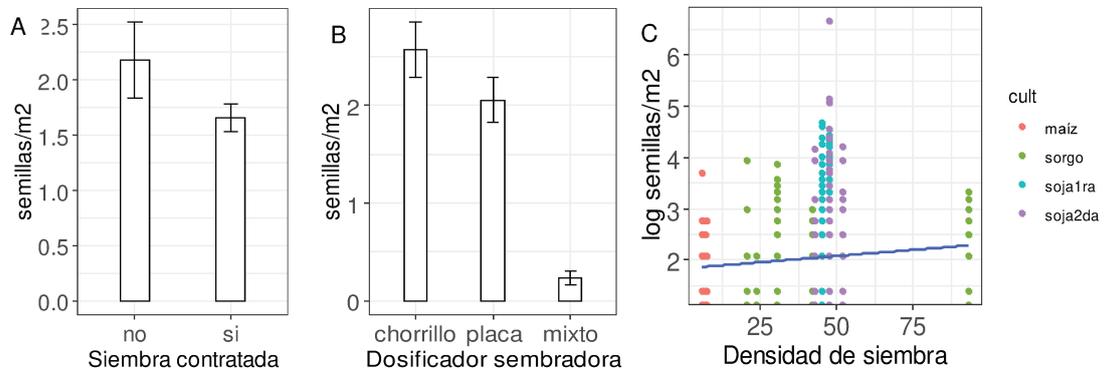


Fig. 5.5. Densidad de semillas no enterradas (media \pm error) sin y con siembra contratada (A) y en función del tipo de dosificador de la sembradora (B), sin incluir los puntos caídos en sitios de carga.

Neonicotinoides en semillas

La totalidad de las semillas de maíz y sorgo estuvieron tratadas con algún neonicotinoide. El neonicotinoide más frecuente y presente en los tres cultivos fue imidacloprid, seguido por la clotianidin y el tiametoxam (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Concentraciones (media \pm SE, *máxima*; mg i.a./kg semillas) de neonicotinoides en las semillas de los campos evaluados y porcentajes de muestras por cultivo que contuvieron imidacloprid (M_{imi}), clotianidin (M_{cloti}) y tiametoxam (M_{tia}).

Cultivo	Imidacloprid	M_{imi} (%)	Clotianidin	M_{clo} (%)	Tiametoxam	M_{tia} (%)
Maíz	181,5 \pm 65,8	54	56,1 \pm 4,0	46	39,4 \pm 5,4	23
	375,4		62,5		53,0	
Sorgo	599,0 \pm 197,8	75	159,4 \pm 0,2	25	16,6 (n=1)	12,5
	1166,3		159,6		16,9	
Soja	11,0 \pm 10,7	10	0	0	0	0
	21,8					

Aves registradas y su categorización trófica

En los 25 campos relevados mediante transecta de faja, se observó un total de 574 individuos, de los cuales el 96% se clasificó como especies “S”. En cuanto a la riqueza, se detectó un total de 32 especies de aves, el 75% de las cuales correspondió a aves “S”. Dentro del grupo de las aves “S” pudieron diferenciarse dos subgrupos: las especies con antecedentes publicados de consumo de semillas de algún cultivo de grano (Sc, 58% de las especies “S”) y las especies con antecedentes publicados de consumo de semillas en general (Sg, 42% de las especies “S”), sin registros encontrados sobre ingesta de cultivos (Tabla 5.4).

La abundancia de aves “S” difirió entre cultivos, siendo significativamente mayor en maíz que en sorgo y soja ($p=0.003$; Fig. 5.6A). También la riqueza de aves “S” fue mayor en los lotes de maíz que en sorgo y soja, aunque la diferencia no fue significativa ($p=0.059$; Fig. 5.6B).

Tanto la abundancia como la riqueza de aves “S” fue algo mayor en Diamante (11,8 \pm 2,9 individuos/transecta; 2,9 \pm 0.5 especies/transecta) que en Paraná (9,4 \pm 2,7 individuos/transecta; 2,7 \pm 0.5 especies/transecta). Al contrario de lo esperado, la presencia de semillas de otros cultivos no implicó mayor abundancia de aves “S” ($p=0,023$; Fig. 5.7A). La riqueza de aves “S” fue mayor en cabeceras que en el interior de los lotes ($p<0,001$; Fig. 5.7B) y aumentó en función del porcentaje de borde del campo con vegetación ($p=0,019$; Fig. 5.8A) y con la densidad de semillas/m² no enterradas del cultivo sembrado ($p=0,042$; Fig 5.8B).

Tabla 5.4. Aves registradas en los 25 campos evaluados, 12 del departamento Paraná y 13 del departamento Diamante.

Especie	Código	Nombre común	Familia	Grupo	Subgrupo	Referencias de dieta	Campo	Abundancia
<i>Zenaida auriculata</i>	za	Torcaza	Columbidae	S	Sc	1-5, 7, 9-16, 18-20	M, SG, SJ	343
<i>Zonotrichia capensis</i>	zc	Chingolo	Emberizidae	S	Sc	1-5, 7-11, 13, 14	M, SG, SJ	27
<i>Columbina picui</i>	cp	Torcacita	Columbidae	S	Sc	1, 2, 4, 5, 7-13	M, SG, SJ	22
<i>Saltator aurantirostris</i>	sa	Pepitero de collar	Thraupidae	S	Sc	1-4, 6-9, 11-13	M, SG, SJ	11
<i>Molothrus bonaeriensis</i>	mb	Morajú	Icteridae	S	Sc	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 14, 17	M, SG	9
<i>Paroaria coronata</i>	pc	Cardenal común	Thraupidae	S	Sc	1-4, 9, 14	M, SG, SJ	9
<i>Pitangus sulphuratus</i>	ps	Benteveo	Tyrannidae	S	Sc	1-3, 5, 9-13, 23	M, SG, SJ	7
<i>Leptotila verreauxi</i>	lv	Yerutí común	Columbidae	S	Sc	3, 31	M, SG, SJ	6
<i>Agelaioides badius</i>	ab	Tordo músico	Icteridae	S	Sc	1, 2, 7, 10, 11, 13	SG, SJ	3
<i>Sicalis flaveola</i>	sf	Jilguero dorado	Thraupidae	S	Sc	1-3, 5-7, 10, 11, 13, 14, 17	M	2
<i>Sporophila caerulescens</i>	sc	Corbatita	Thraupidae	S	Sc	1-3, 5, 10-13	SG	2
<i>Microspingus melanoleucus</i>	mm	Monterita cabecinegra	Thraupidae	S	Sc	3, 31	M	1
<i>Molothrus rufoaxillaris</i>	mr	Tordo pico corto	Icteridae	S	Sc	1, 2, 7, 10, 11, 13, 17	SG	1
<i>Patagioenas picazuro</i>	pp	Paloma Picazuro	Columbidae	S	Sc	1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 20	M	1
<i>Vanellus chilensis</i>	vc	Tero	Charadriidae	S	Sg	1, 3, 5, 9, 24	M, SG, SJ	33
<i>Turdus amaurochalinus</i>	ta	Zorzal chalchalero	Turdidae	S	Sg	1, 2, 4, 7-9	M, SG, SJ	20
<i>Furnarius rufus</i>	fr	Hornero	Furnariidae	S	Sg	1-5, 7, 8, 10, 11, 13, 14	M, SG, SJ	16
<i>Ammodramus humeralis</i>	ah	Cachilo ceja amarilla	Emberizidae	S	Sg	1-5, 9-11	M, SG, SJ	11

Especie	Código	Nombre común	Familia	Grupo	Subgrupo	Referencias de dieta	Campo	Abundancia
<i>Nothura maculosa</i>	nm	Inambú común	Tinamidae	S	Sg	1, 5, 9-11, 14, 22, 27	M, SJ	10
<i>Sicalis luteola</i>	sl	Misto	Thraupidae	S	Sg	1-3, 5, 9-11, 17	M, SG	7
<i>Spinus magellanicus</i>	sm	Cabecita negra	Fringillidae	S	Sg	1, 8, 13	M, SJ	5
<i>Schoeniophylax phryganophilus</i>	sp	Chotoy	Furnariidae	S	Sg	1, 3, 5, 10-12, 31	M	3
<i>Mimus saturninus</i>	ms	Calandria	Mimidae	S	Sg	1-3, 5, 10-14	M	2
<i>Turdus rufiventris</i>	tr	Zorzal colorado	Turdidae	S	Sg	1, 2, 4, 9	SJ	1
<i>Tyrannus savana</i>	ts	Tijereta	Tyrannidae	NS		1-5, 8, 10-13	SG, SJ	11
<i>Troglodytes aedon</i>	tra	Ratona común	Troglodytidae	NS		3, 31	SJ	3
<i>Athene cunicularia</i>	ac	Lechucita vizcachera	Strigidae	NS		1-3, 10, 12, 14	M	2
<i>Chordeiles nacunda</i>	cn	Ñancundá	Caprimulgidae	NS		1, 12, 25	SJ	2
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	cl	Esmeralda ventridorada	Trochilidae	NS		3, 26	SJ	1
<i>Myiophobus fasciatus</i>	mf	Mosqueta estriada	Tyrannidae	NS		2, 28	SJ	1
<i>Synallaxis albescens</i>	sya	Pijuí cola parda	Furnariidae	NS		28	SJ	1
<i>Taraba major</i>	tm	Chororó	Thamnophilidae	NS		3, 26	SJ	1

La abundancia se midió como individuos totales/especie. 1: (Raffo et al., 2014), 2: (De la Peña, 2011), 3: (De la Peña y Pensiero, 2017), 4: (López de Casenave et al., 1998), 5: (Di Giacomo y López de Casenave, 2010), 6: (Dardanelli et al., 2006), 7: (Codesido et al., 2009), 8: (Blendinger, 2005), 9: (Reales et al., 2009), 10: (Solari y Zaccagnini, 2009), 11: (Gojman y Zaccagnini, 2008), 12: (Zaccagnini et al., 2010), 13: (Sosa, 2008), 14: (Zotta, 1940), 15: (Bucher y Nores, 1976), 16: (Bucher et al., 1991), 17: (Bruggers et al., 1998), 18: (Ranvaud et al., 2001b), 19: (Cândido-jr et al., 2008), 20: (Dardanelli et al., 2012), 22: (Serié, 1921), 23: (Latino y Beltzer, 1999), 24: (Caballero-Sadi et al., 2007), 25: (Beltzer et al., 1988), 26: (Salvador et al., 2017), 27: (Bump y Bump, 1969); 28: (De la Peña y Salvador, 2016). M, SG, SJ son los campos recién sembrados de maíz, sorgo y soja, respectivamente, donde se observó la especie. S: come semillas; NS: no come semillas. Sc: consumo probado de semillas de cultivo. Sg: consume semillas en alguna proporción.

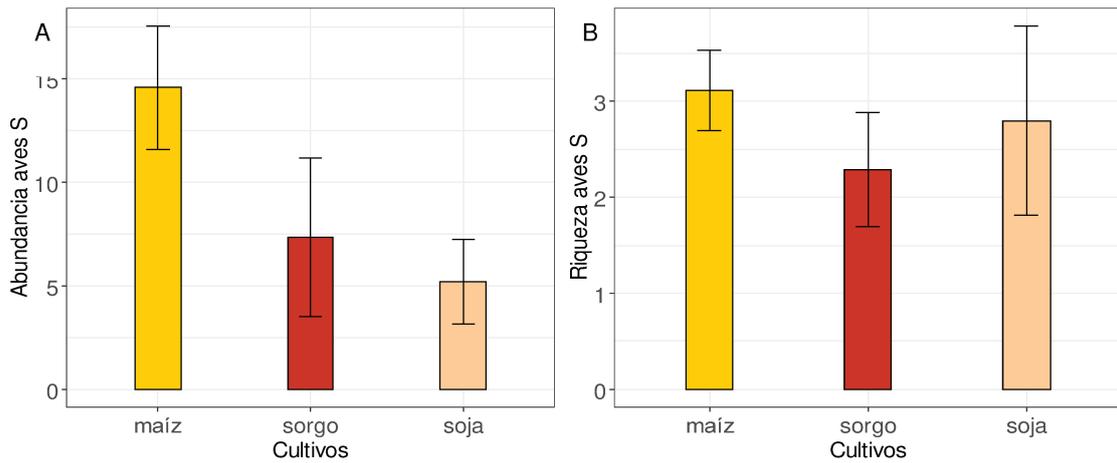


Fig. 5.6. Abundancia (número de individuos de una especie/transecta) y riqueza (número de especies/transecta) de las aves "S" que comen semillas en alguna proporción de su dieta.

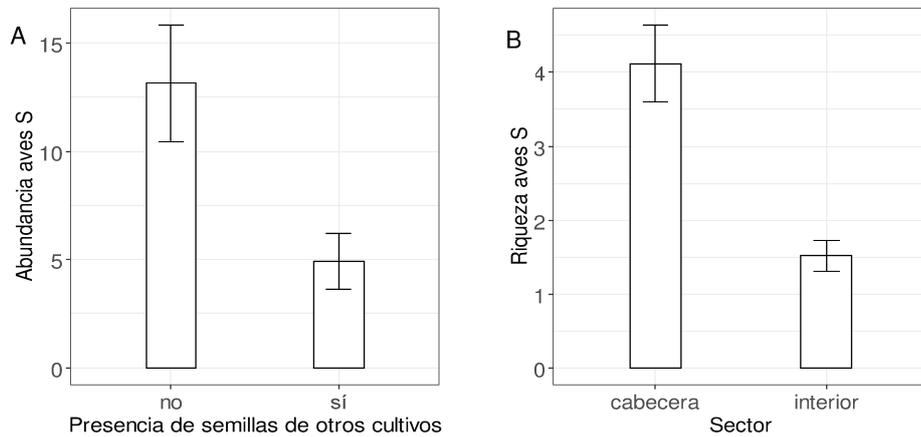


Fig. 5.7. Abundancia de especies "S" frente a la presencia de semillas de otros cultivos sobre el suelo del lote (A) y de la riqueza de especies "S" en cada sector del campo (B).

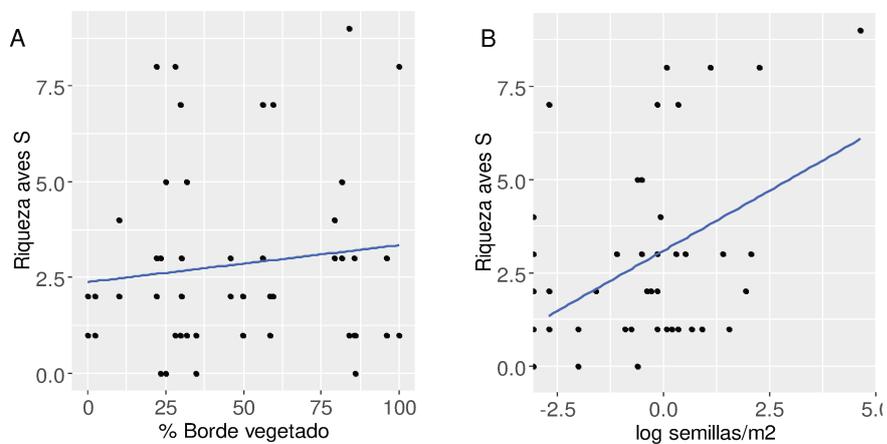


Fig 5.8. Tendencia observada entre la riqueza de especies "S" y el porcentaje de borde vegetado de los lotes (A) y la densidad de semillas/m² del cultivo sembrado (B).

Contenido alimenticio y químico en buches y mollejas de torcazas cazadas

La mayor parte de las aves cazadas fueron individuos adultos; sólo 9 individuos correspondientes a la batida (expedición de caza) de diciembre fueron juveniles. a variable sexo se distribuyó de forma relativamente equitativa entre las batidas (36 a 63% de hembras y 37 a 67% de machos), alcanzándose en total el 50% de cada sexo. La masa promedio de las torcazas cazadas fue 125,86 g (DE= \pm 11,56 g). Ningún individuo se observó caquéctico y el 95% de las aves mostró una musculatura pectoral de 3 a 5 de una escala de medición de 1 a 5.

La masa ingerida de semillas de los diferentes cultivos varió entre batidas (Tabla 5.5). Los valores máximos de peso fresco ingerido calculados fueron 15,36 g de maíz, 11,33 g de sorgo y 7,92 g de soja. El maíz estuvo presente en el t.g.i. del 58%, 40% y 4% de las torcazas batidas en septiembre, octubre y noviembre, respectivamente. El sorgo se encontró en todas las batidas pero nunca en más del 16% de las aves evaluadas. La soja sólo se encontró en las torcazas de las batidas de septiembre (36% de los individuos) y de octubre (6% de los individuos). Se encontró trigo en la totalidad de las torcazas de noviembre y en el 68% de las de diciembre (Tabla 5.5). Considerando todas las batidas, de los tres cultivos estivales estudiados, el cultivo presente en mayor porcentaje en el t.g.i. fue el maíz, seguido de la soja y del sorgo (Fig. 5.9).

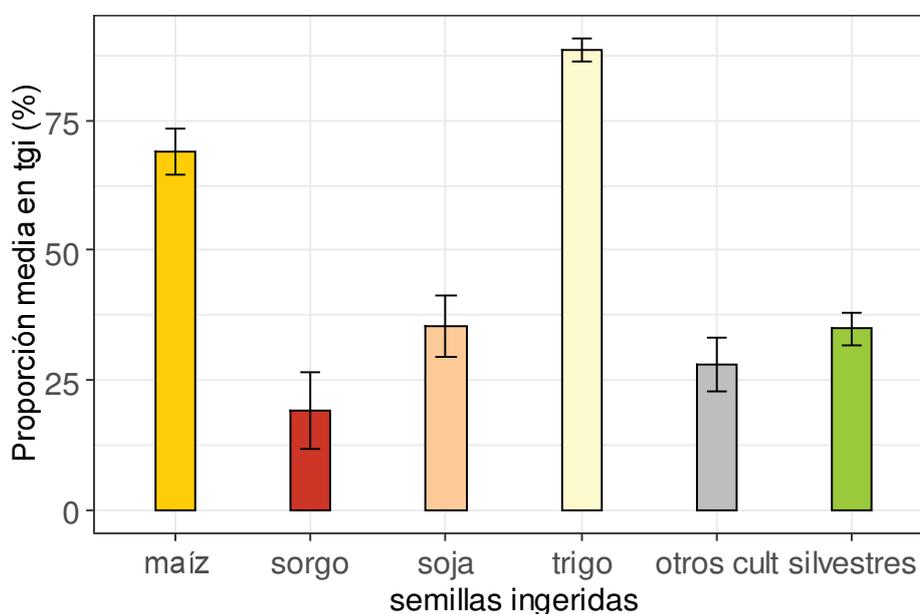


Fig. 5.9. Media y error estándar del porcentaje de cada componente considerando todos los t.g.i. de todas torcazas evaluadas (n=200).

La mayor parte de los t.g.i. presentó combinaciones de semillas (Tabla 5.6), pero ninguna de semillas de los tres cultivos estudiados juntos. Tampoco una misma

combinación de semillas se repitió en las 4 batidas (Tabla 5.6). Considerando las dosis registradas de neonicotinoides, la combinación más peligrosa debería incluir maíz y sorgo juntos, encontrada en la batida de septiembre, incluyendo semillas silvestres (Tabla 5.6). En las batidas de septiembre y octubre se encontraron t.g.i con sólo maíz. En cambio, el sorgo y la soja siempre se encontraron acompañados de otras semillas (Tabla 5.6). La figura 5.10 muestra un buche con combinación de semillas de maíz y silvestres, una de las combinaciones observadas más frecuentes.

Tabla 5.5. Masa seca promedio por torcaza cazada de cada componente en buche y molleja y la proporción media y máxima del componente respecto al contenido total por ave en las cuatro batidas de Paraná y Diamante

Componente	Batida	Dto	N° de individuos	Masa seca (g) por ave (media ± SE)	Proporción (%) por ave (media ± SE)	Proporción máxima (%) por ave
Maíz	Septiembre	D	29	4,12 ± 0,80	65 ± 6	100
	Octubre	P	20	0,40 ± 0,12	75 ± 6	90
	Noviembre	P	2	7,79 ± 2,69	66 ± 22	88
	Diciembre	D	0			
Sorgo	Septiembre	D	4	2,26 ± 1,36	24 ± 13	46
	Octubre	P	1	0,06	29	29
	Noviembre	P	8	0,87 ± 0,75	7 ± 5	41
	Diciembre	D	1	9,63	92	92
Soja	Septiembre	D	19	2,32 ± 0,54	37 ± 7	89
	Octubre	P	5	0,06 ± 0,01	27 ± 15	88
	Noviembre	P	0			
	Diciembre	D	0			
Trigo	Septiembre	D	0			
	Octubre	P	0			
	Noviembre	P	50	7,66 ± 0,48	91 ± 3	100
	Diciembre	D	38	1,65 ± 0,45	85 ± 5	100
Otros cultivos (colza, avena, cebada)	Septiembre	D	1	0,10	42	42
	Octubre	P	23	0,21 ± 0,06	38 ± 7	100
	Noviembre	P	6	0,48 ± 0,45	5 ± 4	26
	Diciembre	D	4	0,03 ± 0,009	5 ± 3	14
Semillas silvestres	Septiembre	D	48	1,18 ± 0,22	47 ± 6	100
	Octubre	P	38	0,09 ± 0,02	54 ± 7	100
	Noviembre	P	38	0,52 ± 0,19	6 ± 2	67
	Diciembre	D	31	0,28 ± 0,20	27 ± 6	100

Otros (piedras, material vegetal, trocitos de caracoles, plumas, invertebrados, indeterminado)	Septiembre	D	45	0,23 ± 0,03	21 ± 4	90
	Octubre	P	48	0,34 ± 0,04	61 ± 5	100
	Noviembre	P	50	0,66 ± 0,24	8 ± 2	58
	Diciembre	D	40	0,25 ± 0,03	34 ± 5	93

Dto.: departamento, D: Diamante; P: Paraná.

Tabla 5.6. Combinaciones de semillas halladas en los tractos gastrointestinales de las aves en orden decreciente de frecuencia de aparición.

Componentes	Proporción de Casos cada componente (%)	de Batidas (%)	
trigo	100	19,3	N, D
trigo - semillas silvestres	99-1	18,2	N, D
semillas silvestres	100	13,5	N, D
maíz - semillas silvestres	99-1	10,9	S, O
soja - semillas silvestres ^{1,2}	89-11	5,2	S, O
maíz - soja - semillas silvestres	83-13-4	4,7	S
otros cultivos - semillas silvestres	95-5	4,7	O
sorgo - trigo ^{3,4}	92-8	3,6	N, D
maíz - otros cultivos - semillas silvestres	94-3-3	3,1	O
trigo - otros cultivos - semillas silvestres	98-1-1	3,1	N, D
Maíz ^{1,2}	100	2,6	S, O
maíz - otros cultivos	97-3	2,1	S, O
Ninguna semilla		2,1	O
sorgo - maíz - semillas silvestres ¹	45-41-14	1,6	S
trigo - otros cultivos	99-1	1,0	D
maíz - trigo - semillas silvestres ³	89-9-3	1,0	N
soja - otros cultivos - semillas silvestres	15-80-5	1,0	O
maíz - soja- otros cultivos - semillas silvestres	78-12-5-6	0,5	O
sorgo - soja - otros cultivos - semillas silvestres ²	29-13-29-29	0,5	O
otros cultivos	100	0,5	O

¹Utilizada para la evaluación de riesgo de la batida de septiembre. ²Utilizada para la evaluación de riesgo de la batida de octubre. ³Utilizada para la evaluación de riesgo de la batida de noviembre. ⁴Utilizada para la evaluación de riesgo de la batida de diciembre. En las combinaciones que involucraron los cultivos estudiados, las proporciones mostradas corresponden a la combinación potencialmente más peligrosa, es decir, con mayor proporción del cultivo tratado. Las letras S, O, N, D indican las batidas en que apareció esa combinación de semillas, correspondientes a septiembre, octubre, noviembre y diciembre, respectivamente.



Fig. 5.10. Contenido del buche (papel aluminio izquierda) y de la molleja (papel aluminio derecho) de una torcaza cazada en la batida de septiembre.

El único neonicotinoide encontrado en el t.g.i. de 11 de las 200 torcazas en las que se determinó residuos fue el imidacloprid, presente en todas las batidas excepto en la de diciembre, alcanzando el 20% de las torcazas de septiembre, el 4% de las de octubre y el 2% de las de noviembre. La mayor concentración de imidacloprid en t.g.i. se observó en un ave de la batida de octubre (Tabla 5.6), correspondiente al departamento Paraná y cuyo componente principal en su buche fue soja. Cinco de las 11 torcazas con imidacloprid tenían el buche vacío, pero con maíz y/o sorgo presente en sus mollejas. La única ave de la batida de noviembre que presentó trazas de imidacloprid tenía 100% de trigo en su buche y trigo y piedras en su molleja.

Tabla 5.7. Residuos de imidacloprid en buches y mollejas de las torcazas cazadas en las cuatro batidas.

Batida	Concentración de imidacloprid (mg i.a./kg semilla)						
	n_B	B (media \pm SE)	n_M	M (media \pm SE)	N_{ind}	C_{ind} (media \pm SE)	C_{ind} máxima
Septiembre	1	3,01	8	0,33 \pm 0,13	8	0,71 \pm 0,37	3,18
Octubre	1	1,73	2	2,33 \pm 1,97	2	3,20 \pm 2,84	6,04
Noviembre	1	0,03	0	0	1	0,03	0,03
Diciembre	0	0	0	0	0	0	0

B: buches; n_B : número de buches en que se detectó el químico; M: mollejas; n_M : número de mollejas en las que se detectó el químico; N_{ind} : número de individuos en los que se detectó el químico; C_{ind} : concentración de imidacloprid en el ave.

Evaluación de riesgo

La mayoría de los TER de primer nivel obtenidos resultaron en impacto inaceptable (TER <10), excepto el clotianidin en maíz y el tiametoxam en soja para un ave granívora grande (Tabla 5.8), requiriéndose, por lo tanto, una evaluación más refinada.

Las combinaciones seleccionadas para calcular el TER refinado fueron maíz solo ("100M") en las batidas de septiembre y octubre, y maíz-trigo-semillas silvestres ("89M_9T_3SIL") en la batida de noviembre. En la batida de diciembre no se encontró maíz en los t.g.i. (Tabla 5.5). Para sorgo, las combinaciones evaluadas fueron sorgo-maíz-semillas silvestres ("45SG_41M_14SIL") hallada en septiembre, sorgo-soja-otros cultivos-semillas silvestres ("29SG_13SJ_29*OC_29SIL") hallada en octubre, y sorgo-trigo ("92SG_8T") hallada en noviembre y diciembre. Para soja, la combinación evaluada fue soja-semillas silvestres ("89SJ-11SIL") hallada sólo en septiembre y octubre, cuyo TER refinado fue 27,21 para la torcaza. Todas las combinaciones se evaluaron frente a los tres neonicotinoides, obteniéndose TER agudo refinado <10 en todas las combinaciones que involucraron maíz y/o sorgo (Fig. 5.11), y con imidacloprid al menos en uno de los componentes de la dieta mixta.

Tabla 5.8. Valores TER de cada neonicotinoide en los tres cultivos para las especies focales genéricas de la evaluación de primer nivel.

Especie focal genérica	Cultivo	Neonicotinoide	TER nivel 1
Ave granívora pequeña	Maíz	IMI	0,01
		CLO	0,44
		TMX	0,25
	Sorgo	IMI	0,01
		CLO	0,22
		TMX	0,29
	Soja	IMI	0,13
		TMX	0,74
	Ave granívora grande	Maíz	IMI
CLO			13,3
TMX			7,39
Sorgo		IMI	0,34
		CLO	6,67
		TMX	8,62
Soja		IMI	3,8
		TMX	22,17

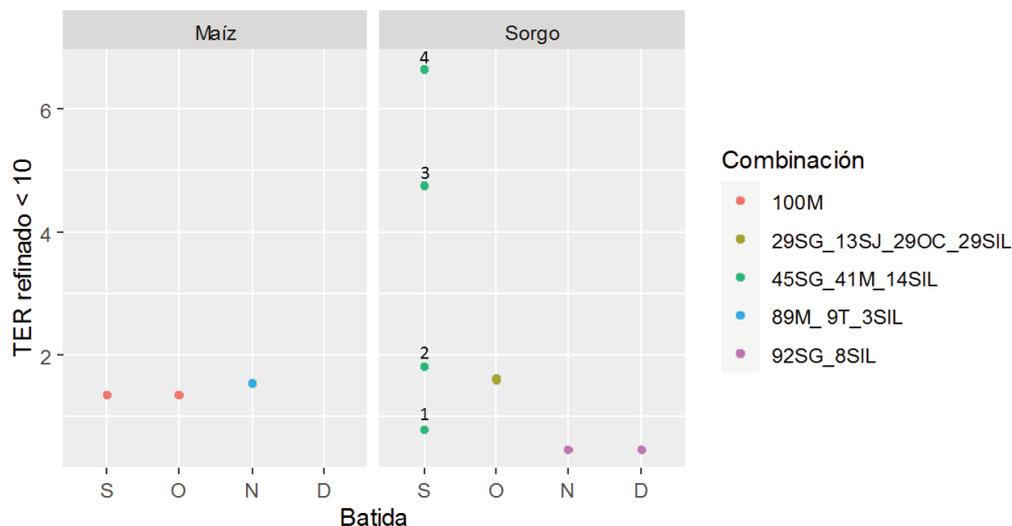


Fig. 5.11. Valores de TER agudo refinado de los neonicotinoides para las composiciones de dieta halladas en los t.g.i. de las torcazas de las distintas batidas (S: septiembre, O: octubre, N: noviembre, D: diciembre). 100M: 100% de maíz con la dosis máxima de imidacloprid encontrada en las semillas no enterradas (375,4 mg i.a./kg semilla). 89M_9T_3SIL: 89% de maíz, 9% de trigo y 3% de semillas silvestres ingeridas, considerando al maíz tratado con 375,4 mg imidacloprid/kg semilla hallada en el campo. 45SG_41M_14SIL: 45% de sorgo, 41% de maíz y 14% de semillas silvestres ingeridas; 1: sorgo y maíz tratados con imidacloprid en las dosis máximas halladas en las semillas no enterradas después de la siembra (1166 y 375,4 mg i.a./kg semilla, respectivamente); 2: sorgo tratado con imidacloprid (1166 mg i.a./kg semilla) y maíz tratado con clotianidin (62,5 mg i.a./kg semilla) o tiametoxam (53 mg i.a./kg semilla); 3: sorgo tratado con clotianidin (159,6 mg i.a./kg semilla) y maíz tratado con imidacloprid (375,4 mg i.a./kg semilla); 4: sorgo tratado con tiametoxam (16,9 mg i.a./kg semilla) y maíz tratado con imidacloprid (375,4 mg i.a./kg semilla). 29SG_13SJ_29OC_29SIL: 29% sorgo, 13% soja, 29% otros cultivos y 29% semillas silvestres; sorgo tratado con imidacloprid (1166 mg i.a./kg semilla) y soja tratada (21,8 mg i.a./kg semilla) o sin tratar con imidacloprid. 92SG_8SIL: 92% sorgo y 8% semillas silvestres; sorgo tratado con imidacloprid (1166 mg i.a./kg semilla).

Discusión

Todos los campos evaluados presentaron semillas sin enterrar después de la siembra. La mayor densidad de semillas no enterradas y disponibles para las aves se encontró en campos de soja, seguidos por campos de sorgo y, por último, de maíz, con más semillas en las cabeceras que en el interior de los campos, y explicados por la presencia de sitios de carga, por variables relacionadas a las características del suelo (grado de cobertura) y del relieve (curvas de nivel), así como de la propia siembra (contratada o no, tipo de dosificador, densidad de siembra). El imidacloprid fue detectado en mayor concentración que clotianidin y tiametoxam en las semillas no enterradas de los tres cultivos. En cuanto a las aves presentes dentro de los campos, la mayor parte se clasificó como comedora de semillas (aves “S”), siendo más abundantes en los campos sembrados con maíz que en los de sorgo y soja, y con un mayor número

de especies en cabeceras que en el interior de los campos. La riqueza de aves "S" se vio influenciada por el porcentaje de bordes con vegetación arbustiva y/o arbórea y por la cantidad de semillas del cultivo no enterradas luego de la siembra. Aunque ausente en los t.g.i. de las torcazas batidas en diciembre, el maíz estuvo presente en mayor proporción, seguido por la soja y por el sorgo. El único neonicotinoide hallado en los t.g.i. fue imidacloprid, cuya concentración máxima se obtuvo en una torcaza cazada en octubre y al que se atribuyen los valores de TER refinados <10 de las combinaciones de semillas ingeridas que incluyeron maíz y o sorgo.

También Roy et al. (2019) obtuvieron densidades de semillas sin enterrar más altas en soja que en maíz en campos de USA, aunque con valores medios menores a los aquí obtenidos, siendo en su caso 1,04 y 0,07 semillas/m² de soja y maíz, respectivamente. Por su parte, McGee et al. (2018) obtuvieron una densidad de semillas de maíz sin enterrar en campos de USA aún menor, llegando sólo a 0,02 semillas/m². La menor densidad de semillas de maíz sin enterrar respecto a las de sorgo y soja se podría explicar por su mayor costo económico respecto al sorgo y a la soja, lo cual implica que generalmente se tomen todos los recaudos posibles para evitar pérdidas y lograr una eficiencia de siembra alta. La mayor cantidad de semillas en cabeceras que en interior de los campos se ha observado en otros trabajos de campo trabajos (de Leeuw, 1995; Rosie J Lennon et al., 2020; Lopez-Antia et al., 2016; McKay et al., 1999b) y suele deberse a posibles pérdidas durante el giro de la maquinaria en las esquinas, a la superficie frecuentemente más irregular en los bordes y a que los sitios de carga y limpieza de la sembradora suelen realizarse allí, creándose así "puntos calientes" de especial atracción para las aves (EFSA, 2009). La mayor densidad de semillas sin enterrar en campos con curvas de nivel que sin ellas también evidencia la mayor dificultad de incorporación de las semillas al suelo en superficies con desniveles. El efecto inversamente proporcional del porcentaje de suelo cubierto respecto a la densidad de semillas sin enterrar se podría explicar por la menor visibilidad de las mismas cuando el suelo no está desnudo y, quizás también en esos campos con cobertura haya más animales que pueden retirar las semillas no enterradas. En cuanto a las variables propias de la siembra, los campos en los que se contrató la siembra mostraron menor cantidad de semillas sin enterrar, posiblemente debido a que generalmente quienes brindan servicios de siembra tienen mucha experiencia en la tarea y cuentan muchas veces con maquinaria actualizada. El tipo de dosificador de la sembradora también mostró un efecto en la densidad de semillas sin enterrar, siendo el dosificador tipo "chorrillo" asociado a una mayor densidad de semillas sin enterrar. Esto se explica porque el mecanismo de embrague para pasar la máquina de la posición de

siembra (vertido de semillas) a la posición de traslado (no vertido de semillas) al girar en las cabeceras es más lento en los sistemas a chorrillo, dejando la posibilidad de que caigan algunas semillas hasta que la posición de traslado se efectiviza (Ricardo De Carli, INTA Crespo, com. pers.). Por otra parte, se espera que la densidad y profundidad de siembra influya sobre la densidad de semillas sin enterrar. La densidad de siembra tuvo un efecto proporcional sobre la densidad de semillas sin enterrar (menor densidad de siembra, menor densidad de semillas sin enterrar), explicando el orden decreciente soja>sorgo>maíz de semillas sin enterrar de acuerdo a su densidad de siembra media (46,98 semillas/m², 42,14 semillas/m² y 6,48 semillas/m² de soja, sorgo y maíz, respectivamente, según Tabla 5.1) Aunque la profundidad de siembra aquí no produjo un efecto significativo sobre la densidad de semillas sin enterrar, la soja fue el cultivo con menor profundidad de siembra media (ver Tabla 5.1), sugiriendo la influencia de esta variable sobre la densidad de semillas sin enterrar, como mostraron Pascual et al. (1999).

De los tres neonicotinoides evaluados en las semillas no enterradas recolectadas en el campo, imidacloprid fue el único encontrado en los tres cultivos, mostrando mayores dosis respecto a clotianidin y tiametoxam (Tabla 5.3), sugiriendo un mayor uso de este compuesto respecto a los otros y/o debido a sus dosis de aplicación registradas (NAR) más altas que las de clotianidin y tiametoxam. En todos los casos, las concentraciones halladas fueron considerablemente menores a las nominales, indicando baja eficiencia en el tratamiento de semillas, lavado o, más probablemente, relativa rápida degradación inicial de estos químicos en el ambiente (Roy et al., 2019a).

La riqueza de aves resultó mayor en cabeceras que en el interior de campos, de forma similar a lo que observaron Di Giacomo y López de Casenave (2010) en campos de soja y alfalfa de Argentina. A pesar de ser la semilla más grande de los tres cultivos y con densidades menores de semillas no enterradas, los campos de maíz mostraron mayor abundancia de aves que comen semillas que los de sorgo y soja. Esto coincide con el trabajo de Roy y Coy (2020), en el cual la abundancia de aves en derrames simulados también fue mayor con maíz que con soja. Varias especies de aves aparecen como comedoras de maíz en la bibliografía consultada. Entre ellas aparecen, además de palomas como *Zenaida auriculata*, *Patagioenas maculosa*, *P. picazuro*, *Leptotila verreauxi* y *Columbina picuí*, paseriformes tales como *Agelaioides badius*, *Molothrus bonariensis*, *M. rufoaxillaris*, *Paroaria coronata*, *Saltator aurantirostris*, *Sicalis flaveola* y *Zonotrichia capensis*, entre otras (De la Peña y Pensiero, 2017). Esto indicaría que también aves de tamaño corporal pequeño pueden ingerir semillas de maíz, en contraposición con la idea comúnmente considerada que “aves grandes comen semillas

grandes” y “aves pequeñas comen semillas pequeñas” utilizadas en las evaluaciones de riesgo (EFSA, 2009).

Los contenidos de los t.g.i. evidenciaron que las torcazas consumen semillas de los tres cultivos estudiados durante la ventana de tiempo (septiembre a diciembre) coincidente a su siembra, junto con cereales de invierno recién cosechados cuyas semillas quedan en los rastrojos. Las torcazas donadas fueron cazadas generalmente a lo largo de una salida de caza, la cual podía iniciarse desde el amanecer, cuando las aves salen de sus dormideros. Por lo tanto, no nos fue posible dividir las aves según el momento del día en que fueron cazadas. Los buches que encontramos vacíos probablemente se debieron a que el ave fue cazada justo al salir del dormidero, antes de iniciar su primera ingesta del día. Pero cabe mencionar que 5 de las 11 aves que presentaron imidacloprid en su t.g.i., tenían el buche vacío y maíz y sorgo en sus mollejas, hecho que puede sugerir un efecto anoréxico del imidacloprid, el cual ha sido probado en torcazas cautivas expuestas a semillas tratadas con imidacloprid (Addy-Orduna et al., 2022). La torcaza con la máxima dosis de imidacloprid provino de la batida de octubre, mes óptimo para la siembra del sorgo. El promedio de imidacloprid en los t.g.i. de las torcazas fue 1,097 mg i.a./kg semilla, valor cercano a 0,082 mg i.a./kg encontrado en contenidos digestivos de perdices rojas (*Alectoris rufus*) cazadas en España, pero menor a los valores de imidacloprid encontrados en buches y mollejas de perdices grises (*Perdix perdix*, 15,0 mg i.a./kg) y palomas (*Columba palumbus*, *Columba livia* y *Columba oenas*, 34,7 mg/kg) muertas o moribundas por intoxicación con imidacloprid en Francia (Milot et al., 2017).

La cantidad máxima de maíz y sorgo encontrada en los t.g.i. (15,4 g de maíz y 11,3 g de sorgo) superó la masa de maíz y sorgo que alcanza la DL50 considerando las dosis máximas registradas para imidacloprid (1,7 g de semillas tratadas, tanto para maíz como para sorgo; Addy-Orduna et al., 2019). Por lo tanto, ante ausencia de aversión al químico, las torcazas podrían fácilmente ingerir una dosis letal consumiendo maíz o sorgo tratados. Esto explica los valores de TER pequeños, que implican riesgo agudo probable, hallados en combinaciones de semillas que involucraron maíz y/o sorgo tratados con imidacloprid. Clotianidin y tiametoxam, en cambio, requerirían mayor cantidad de semillas de maíz y sorgo que la hallada en los t.g.i. de las torcazas cazadas para alcanzar las DL50, explicándose así sus valores de TER > 10 (riesgo agudo improbable). En los casos de TER refinado < 10 obtenidos que involucraron al imidacloprid en semillas de maíz y/o sorgo es necesario aclarar que la posible evitación del químico en el campo no está incluida directamente en el análisis. Suponiendo que la tasa de ingesta en cautiverio de semillas de sorgo tratadas (0,04 g de sorgo/h; Addy-

Orduna et al., 2022) se puede extrapolar al campo, a un día con 13 h de luz solar (1,04 g/día), el TER calculado, considerando dicha ingesta y la concentración de imidacloprid en sorgo máxima hallada en el campo (1166,3 mg/kg), aumentaría a 6,18, pero seguiría siendo un $TER < 10$, indicando probabilidad de intoxicación aguda. Pero interpretar los datos de evitación de cautiverio y evaluar sus implicancias para el riesgo en el campo es difícil e incierto (EFSA, 2009). Lo más apropiado sería, dado que se cuenta con antecedentes de evitación de neonicotinoides en cautiverio, evaluar la evitación de las aves a semillas de sorgo y maíz en el campo para así caracterizar el riesgo con mayor certeza.

Conclusiones

Todos los campos presentaron semillas no enterradas después de la siembra (soja>sorgo>maíz), constituyendo una ruta de exposición a neonicotinoides para las aves que comen semillas. La mayor densidad de semillas no enterradas se vio en el cultivo de soja, el cual fue el menos tratado con neonicotinoides. Imidacloprid fue el neonicotinoide presente en las semillas de los tres cultivos y en mayor dosis. Por otra parte, la mayor parte de las aves observadas en los campos comen semillas, estando potencialmente expuestas a intoxicación por neonicotinoides, aumentado su riqueza en las cabeceras y siendo más abundantes en cultivos de maíz que en sorgo y soja. La torcaza resultó una buena especie focal para evaluar riesgo agudo, ya que sus t.g.i. contuvieron semillas de los tres cultivos, permitiendo estimar el riesgo agudo a través del índice TER refinado al considerar las proporciones ingeridas reales de cada tipo de semilla. Sin considerar la evitación de estos químicos por las aves, los valores de TER refinados obtenidos de combinaciones de semillas que incluyeron maíz o sorgo indicarían un riesgo agudo inaceptable para la torcaza.

Los resultados de las investigaciones apoyaron la hipótesis general respecto a que el peligro de los “curasemillas” neonicotinoides para las aves granívoras aumenta en la medida que aumenta su toxicidad, puesto que el insecticida neonicotinoide que presentó mayor toxicidad aguda (menor DL50 y más signos de intoxicación) de los tres evaluados, el imidacloprid, evidenció también mayor peligro agudo (capítulo 1). Pero, a su vez, ese peligro a dosis bajas de imidacloprid sin aditivos implicó efectos en el comportamiento antipredador en la estrategia pasiva del mismo, disminuyendo el tiempo del agachamiento y aumentando el tiempo de la vigilancia en las aves tratadas, sin aparentemente afectar las respuestas activas de huida en respuesta a estímulos amenazantes (capítulo 2). En cuanto a la hipótesis general respecto a que la exposición de las aves a “curasemillas” neonicotinoides aumenta en la medida que aumenta la cantidad de químico ingerido permaneció vigente, teniendo en cuenta que la cantidad ingerida disminuyó con el comportamiento de evitación de torcazas en cautiverio, aunque no fue suficiente para evitar la muerte de algunas de las expuestas a sorgo tratado (capítulo 3). En el caso de la soja a campo, el imidacloprid produjo rechazo en las aves que comen semillas y cotiledones de ese cultivo, disminuyendo así la exposición de las aves al químico (capítulo 4). Por otro lado, las semillas no enterradas después de la siembra de maíz, sorgo y soja, dado su relativo alto número, constituyeron una posible ruta de exposición a neonicotinoides para las aves que comen semillas, siendo el maíz y el sorgo los cultivos que presentaron mayor riesgo agudo, dado que fueron semillas ingeridas por aves como la torcaza y que son tratados con dosis relativamente altas de neonicotinoide (capítulo 5).

El imidacloprid resultó 70 veces más tóxico que clotianidin y tiametoxam en torcazas y la mortalidad ocurrió más rápido con imidacloprid que con clotianidin y tiametoxam. Esta diferencia de toxicidad aguda entre neonicotinoides fue mayor a la observada en la bibliografía para otras especies (Tabla I1), y podría explicarse por las diferencias en la estructura molecular, ya que el imidacloprid tiene un cloropiridilmetilo de 1° generación y clotianidin y tiametoxam tienen clorotiazolilmetilos de 2° generación (Wang et al., 2018). Probablemente, la amina del imidacloprid cause la diferencia en la toxicidad, puesto que las aminas aromáticas de 5 miembros (farmacóforo del imidacloprid) son más tóxicas y estables que otras aminas más reactivas (Fig. I1). A su vez, la similitud de toxicidad entre clotianidin y tiametoxam podría explicarse por su parecido en la estructura química, siendo el clotianidin resultante de la metabolización del tiametoxam (Ford y Casida, 2006). Esta diferencia de toxicidad entre neonicotinoides mostró una relativa alta sensibilidad de la torcaza al imidacloprid, con un valor de DL50

muy cercano al hallado por Poliserpi et al. (2020) en tordos músicos (*Agelaioides badius*), especie passeriforme de menor tamaño corporal que la torcaza.

Aunque los signos de intoxicación pudieron registrarse y analizarse luego del gavage (administración por sonda) en las torcazas, el diseño estandarizado de la OECD (2009) usado en el capítulo 1 para la determinación de la DL50 presentó limitaciones para una evaluación de signos de intoxicación para cada una de las dosis probadas debido a que algunas dosis implicaron sólo un individuo, teniendo que categorizarse las dosis en rangos para realizar los análisis sobre el inicio y la intensidad de los signos de intoxicación. De todos modos, pudo caracterizarse la alteración neurocomportamental (signos de intoxicación) causada por neonicotinoides y constatarse la aparición de los primeros signos siempre antes de las dos horas posteriores a la ingestión de la dosis en los tres insecticidas, indicando una relativa rápida absorción de los neonicotinoides en las torcazas. Esta rápida absorción de neonicotinoides también pudo ser observada en los tordos músicos, en los cuales se indica una absorción de imidacloprid antes de las 4 horas de ingerir la dosis, con aparición de signos de intoxicación dentro de los primeros 5 minutos posteriores al gavage (Poliserpi et al., 2021). En torcazas, todas las aves a las que se le administró imidacloprid por gavage (capítulo 1) o a través de semillas de sorgo tratadas (capítulo 3) mostraron alteraciones neuroconductuales. El tiametoxam también produjo alteraciones neurocomportamentales en todas las torcazas dosificadas por gavage y en la mayoría de las torcazas expuestas a semillas tratadas. El clotianidin, por su parte, produjo signos de intoxicación en el 94% de las torcazas dosificadas por gavage y en igual porcentaje que el tiametoxam en el caso de semillas de sorgo tratadas (62,5%). Por lo tanto, imidacloprid fue el neonicotinoide que produjo signos de intoxicación con mayor frecuencia e intensidad, pero los signos de intoxicación duraron más tiempo con clotianidin y tiametoxam que con imidacloprid luego del gavage. En cambio, la duración de los signos de intoxicación en torcazas expuestas a clotianidin y tiametoxam a través las semillas tratadas de sorgo fue menor a la de las torcazas expuestas a semillas de sorgo con imidacloprid (Fig. 3.6), a pesar que la administración vía sonda impide la absorción del químico a través de la mucosa oral, disminuyendo, por lo tanto, las superficies de absorción del tracto gastrointestinal (Vandenberg et al., 2014). Por el contrario, las semillas y cotiledones de soja tratados con neonicotinoide no produjeron alteraciones neurocomportamentales en las torcazas cautivas expuestas, mostrando la importancia de la dosis, la forma de administración del químico y de las preferencias alimenticias de las aves para la manifestación de las alteraciones neurocomportamentales.

El efecto anoréxico de los neonicotinoides se observó tanto vía gavaje dentro de los primeros tres días después de la dosificación como vía semillas (sorgo y soja) tratadas. Con cotiledones tratados, el efecto anoréxico se observó después del período de exposición a los mismos, es decir, como un efecto no inmediato. En general, los neonicotinoides redujeron el peso corporal de manera reversible pero este efecto varió a veces con la forma de administración y con el tipo de comida tratada. La exposición a clotianidín y a tiametoxam tanto vía sonda como a través de semillas de sorgo tratadas produjo disminución del peso corporal en las torcazas. En cambio, imidacloprid produjo reducción del PC sólo a través de las semillas de sorgo, no vía sonda. Este efecto variable del imidacloprid sobre el PC según la forma de administración también se puede ver también comparando otros trabajos, pero los resultados de la comparación resultan inversos a los obtenidos aquí. El PC de perdices rojas (Lopez-Antia et al., 2014) y mirlos (Avery et al., 1993) expuestos a semillas tratadas con imidacloprid no se redujo significativamente, pero sí el PC de gorriones de corona blanda dosificados con imidacloprid mediante sonda (Eng et al., 2019). Por lo tanto, a diferencia del clotianidín y el tiametoxam, el efecto sobre el PC del imidacloprid en las aves es variable.

El efecto del imidacloprid sobre el comportamiento antidepredador de las perdices fue la acción excitante del químico sobre los comportamientos pasivos y una falta de efecto perceptible sobre los comportamientos de huida (capítulo 2). Posiblemente, los nAChR de las aves estén involucrados en comportamientos similares a la ansiedad como ocurre en mamíferos (Picciotto et al., 2001) y esto explique el efecto excitante del imidacloprid a dosis bajas observado en las perdices al estimular los receptores nicotínicos sin llegar a bloquearlos por completo. Además, cabe destacar que ninguna perdiz mostró signos de intoxicación tales como ataxia o una posición característica de la intoxicación observada en torcazas (caminata descoordinada, ave “sentada” y “esponjada”, ave “tendida”). Dado que en el experimento con perdices realizado en esta tesis se utilizó imidacloprid grado técnico y no una formulación comercial y que fue administrado vía gavaje en vez de alimento tratado, más pruebas serían necesarias para profundizar sobre las consecuencias en el campo del efecto excitatorio de los neonicotinoides sobre las aves.

Las semillas (sorgo y soja) tratadas con neonicotinoides produjeron una fuerte evitación en las torcazas cautivas (capítulo 3), pero la evitación del sorgo tratado no previno la intoxicación y la muerte. Esto respaldaría la idea de Mineau y Palmer (2013) y Goulson (2013) sobre que la evitación de semillas tratadas no mitiga un riesgo toxicológico alto, como sería el caso de semillas de sorgo tratadas. Por otro lado, las semillas y cotiledones de soja no fueron apetecibles para muchas de las torcazas

cautivas. Por tanto, la concentración de neonicotinoides y las preferencias de las torcazas hacen que el sorgo sea más peligroso que la soja. El neonicotinoide (i.a. y formulación), la dosis y el tipo de alimento resultan, entonces, clave para la magnitud del riesgo toxicológico resultante.

A pesar de la cantidad de factores que inciden y las limitaciones metodológicas del trabajo de campo, la densidad de las semillas de soja y el daño en cotiledones pudieron mostrar la evitación de las aves al imidacloprid en el campo: las aves pueden evitar parcialmente las semillas de soja tratadas con imidacloprid en el campo y el daño por aves en las plántulas de semillas tratadas con imidacloprid es menor que en plántulas sin imidacloprid en el campo (capítulo 4). Por lo tanto, estos resultados difieren de lo obtenido en el experimento con torcazas cautivas (capítulo 3), las cuales no produjeron una diferencia significativa en el daño sobre los cotiledones tratados con neonicotinoide respecto a los controles. Estos hallazgos marcan la importancia de los trabajos de campo para corroborar o rebatir la información recabada en experimentos en jaulas con aves, ya que las mismas suelen presentar diferencias en cuanto a sus preferencias alimenticias y comportamientos a causa de los menores requerimientos energéticos del cautiverio y el posible estrés por el encierro. Por otro lado, dada la gran extensión del cultivo de soja en nuestro país, el bajo riesgo agudo de imidacloprid en semillas y cotiledones de soja para las torcazas es un resultado positivo en términos ambientales.

De todas formas, dada su cantidad, las semillas no enterradas después de la siembra de maíz, sorgo y soja constituyen una ruta de exposición a neonicotinoides para las aves en los campos entrerrianos, quedando más semillas sin enterrar después de la siembra de soja que de la de sorgo y maíz. Entre otras variables, las diferencias de nivel en el terreno y la densidad de siembra influyeron en la cantidad de semillas no enterradas. La mayor densidad de semillas sin enterrar con densidades de siembra mayores fue un resultado esperado y también presentado por Pascual et al. (1999d) al comparar la densidad de siembra con la densidad de semillas no enterradas en experimentos de campo. La presencia de curvas de nivel es una variable que, según nuestro conocimiento, no había sido considerada. Relacionada a las condiciones del suelo, la presencia de curvas de nivel es un indicador de diferencias de niveles en el suelo, las cuales probablemente afectan el proceso de perforación, factor que impacta en la densidad de semillas sin enterrar (De Snoo y Luttik, 2004), entre muchos otros.

Tanto en el estudio de campo a escala experimental (capítulo 4) como el estudio de campo a escala comercial (capítulo 5), la mayor parte de las aves observadas consumen semillas en alguna proporción de sus dietas según la revisión bibliográfica

realizada, y, por lo tanto, potencialmente expuestas a los neonicotinoides usados en los tratamientos de semillas. La abundancia de aves comedoras de semillas fue mayor en campos de maíz que en campos de sorgo y soja. Además, al menos en los campos de soja a escala experimental, la abundancia y la riqueza de aves durante y después de la siembra fue menor a la observada antes de la siembra. Esto sugiere un efecto disuasivo de la siembra con semillas tratadas, dado que aves como las palomas serían atraídas por cultivos recién sembrados según McKay et al. (1999a).

De los tres cultivos estudiados, se encontró mayor proporción de maíz, luego soja y, por último, sorgo en los t.g.i. de las torcazas cazadas (capítulo 5). Esto coincide con lo hallado por Calvo-Silvera (2006) en bucheros de torcazas cazadas entre septiembre 2003 y agosto de 2004 en el norte de la provincia de Córdoba, donde también el ítem dominante fue maíz. Sin embargo, estas proporciones encontradas en los t.g.i. (maíz>soja>sorgo) son opuestas a los consumos observados a lo largo de todos los experimentos de esta tesis en las torcazas cautivas (sorgo>soja≈maíz) porque, aunque no se realizó un experimento en cautiverio de consumo de maíz, la no preferencia de esa semilla en cautiverio se evidenció al quedar siempre intactos los trozos o las semillas de maíz enteras en los restos de la comida de mantenimiento al final del día. Estas diferencias de tipo de semillas consumidas en el campo respecto al aviario dan cuenta de la importancia de los trabajos de campo donde la cantidad de superficie sembrada de los distintos cultivos evidentemente influye en el consumo de las aves.

El único neonicotinoide presente en el t.g.i. de las torcazas fue imidacloprid. También el imidacloprid fue el único neonicotinoide detectado en sangre de búhos reales del sureste de España (Taliensky-Chamudis et al., 2017). Esto podría indicar una preferencia de uso de imidacloprid respecto a clotianidín y tiametoxam por parte de los productores o las empresas productoras de semillas y/o una menor capacidad de metabolización/eliminación de este químico por parte de las aves respecto al resto de neonicotinoides como consecuencia de sus diferencias químicas estructurales, dado que los sustituyentes individuales determinan la biodegradabilidad y los metabolitos formados (Casida, 2011). Por otra parte, la presencia de imidacloprid en las torcazas demuestra la exposición de estas aves al químico, confirmando la elección adecuada de estas aves como especie focal. La idea que las torcazas pueden alcanzar fácilmente la DL50 de imidacloprid en un día con semillas de sorgo tratadas en el campo resultante de las estimaciones realizadas en el capítulo 1 fue compatible con los índices TER agudos estimados en el capítulo 5, resultantes de dietas que involucraron maíz y/o sorgo, implicando un alto riesgo de intoxicación por imidacloprid en torcazas. Estos hallazgos confirman el uso de “curasemillas” neonicotinoides como una ruta potencial

de intoxicación aguda en un escenario productivo sudamericano, dada la cantidad de especies de aves comedoras de semillas observada en los campos y el hecho de que las semillas preferidas por aves como la torcaza (maíz y sorgo) estén siempre tratadas con neonicotinoides al momento de su siembra.

Los datos y las estimaciones obtenidas en esta tesis evidencian un actual mayor riesgo para las aves de los cultivos de maíz y sorgo tratados con neonicotinoides, particularmente imidacloprid, para las aves comedoras de semillas en comparación con el cultivo de soja. Sin embargo, esto no debería interpretarse como una promoción o preferencia del cultivo de soja en desmedro de los otros al momento de la toma de decisiones de siembra. Las plagas son un síntoma de perturbación ecológica más que una causa (Ramanjaneyulu et al., 2009) y un enfoque de monocultivos de alta productividad a gran escala contribuye a condiciones ecológicas dañinas en los sistemas agrícolas (Weituschat et al., 2022). Mas bien, estos resultados alientan a considerar la opción de contar con semillas comerciales de maíz y sorgo libres de neonicotinoides para que el productor, en función de la situación particular de su campo, pueda decidir el uso o no de estos insecticidas. Tal decisión debería tomar en cuenta que las plagas también podrían manejarse de manera efectiva mediante el uso de recursos locales y la acción oportuna (Jactel et al., 2019; Ramanjaneyulu et al., 2009), y que la ubicuidad de los neonicotinoides representa una amenaza para especies no blanco (Tooker y Pearsons, 2020). Tal es la ubicuidad de la contaminación por neonicotinoides que, no sólo las especies asociadas a los cultivos sino incluso especies de sistemas acuáticos continentales (Borsuah et al., 2020) y marinos reportan residuos de neonicotinoides (Distefano et al., 2022), como consecuencia de su lixiviación a cuerpos de agua y posteriores aportes fluviales al mar (Naumann et al., 2022). Para Tooker y Pearson (2009), muchas preocupaciones ecológicas atribuibles a los neonicotinoides disminuirían enormemente si los neonicotinoides simplemente se usaran con menos frecuencia y en áreas más pequeñas. La evitación del uso profiláctico de neonicotinoides contribuiría también a reducir la aparición de resistencias de las plagas, las cuales ya han aparecido (Bass et al., 2015; Erdogan et al., 2021).

Es importante tener presente que la producción de cultivos comerciales de granos tiene como finalidad, además de proveer alimento, obtener ganancias legítimas del trabajo, las cuales pueden verse muy afectadas ante rendimientos excesivamente bajos a causa de plagas. Por ese motivo y para disminuir los posibles impactos ambientales, urgen evaluaciones de la rentabilidad del uso de los neonicotinoides, dado que hay antecedentes de que serían innecesarios para determinadas situaciones del cultivo de soja, por ejemplo (Myers, 2014). En los casos en que se determine que los

neonicotinoides sean la mejor y única opción disponible para controlar un problema grave de plagas, será necesario contar con métodos para mitigar los impactos, es decir, para minimizar del polvo durante la siembra, evitar y/o eliminar los derrames de semillas, reducir la densidad de semillas sin enterrar, reducir la escorrentía, contar con barreras vegetales (Hladik et al., 2018), entre otras posibles alternativas.

Por todo lo anteriormente planteado y en función de los hallazgos aquí obtenidos, más que prohibiciones de uso de neonicotinoides para los productores, sería necesario que instituciones o entes públicos o privados, nacionales o internacionales, preocupados de la salud del ambiente y promotores de una producción sustentable faciliten financiamiento adecuado para llevar a cabo investigaciones y acciones tendientes a:

- 1) Conocer el funcionamiento y los componentes del agroecosistema particular en el que se interviene con fines productivos para evitar la estrategia química como primera opción, manejando las perturbaciones que promueven o producen niveles de organismos perjudiciales causantes de daños económicos a través de prácticas y acciones preventivas.
- 2) Determinar la rentabilidad de los “curasemillas” neonicotinoides en los diferentes cultivos
- 3) Comprender mejor los impactos sobre las especies no blanco por la exposición crónica a neonicotinoides y a mezclas que los contengan
- 4) Realizar biomonitoreos para vigilancia toxicológica en diferentes ambientes
- 5) Idear e implementar medidas de mitigación de las consecuencias negativas del uso de neonicotinoides
- 6) Realizar ajustes en el sistema regulatorio actual para evitar fallas en la prevención de efectos negativos de éstos y otros plaguicidas.

Conciliar una producción de alimento abundante y eficiente con la conservación de los recursos y la vida que nos rodea es un gran desafío actual y una meta conveniente, con implicancias prácticas, económicas, políticas, sociales y éticas. Pero esta conciliación resultará imposible si dominan posiciones excluyentes en los grupos de poder y en la sociedad en general, la cual hoy es esencialmente urbana (Roser, 2013). Resulta, por lo tanto, crucial pasar de un abordaje del problema desde una perspectiva ganar-perder o perder-ganar (dicotomía culpable-víctima) a una perspectiva ganar-ganar, en la que el conocimiento productivo y el conocimiento ambiental interactúen y se complementen, evitando caer en trampas económicas o ideológicas,

asumiendo los costos y beneficios responsablemente y siendo coherentes con la forma de vida individual y social que tenemos o queremos. Esta tesis aporta conocimiento y evidencias de externalidades de una práctica específica como es el tratamiento de semillas de cultivos de granos estivales con neonicotinoides, ameritando una revisión de la misma en la que se sopesen aspectos económicos, sociales, productivos y ambientales, para que la reducción de costos y el aumento de los rendimientos a corto plazo del uso profiláctico de estos químicos no implique aumento de costos y reducción de rendimientos a mediano y largo plazo. Próximos estudios deberían enfocarse en profundizar el conocimiento sobre el riesgo crónico de neonicotinoides para las aves, analizar la relación beneficio:costo del uso profiláctico de estos químicos y en probar alternativas que permitan altos rendimientos con nulas o mínimas externalidades negativas.

CONCLUSIONES GENERALES



1. Imidacloprid es moderadamente tóxico (DL50= 59 mg/kg PC) y clotianidin y tiametoxam son prácticamente no tóxicos (DL50>2000 mg/kg PC) para torcazas. La intoxicación aguda con neonicotinoides en torcazas se caracteriza por una pérdida de vitalidad y movimiento, sin temblores ni movimientos bruscos. El imidacloprid produce signos de intoxicación más intensos a dosis mucho más bajas y las aves mueren más rápidamente que con con clotianidin y tiametoxam, pero los tiempos de recuperación total de estos últimos son en general muy largos.
2. Imidacloprid en dosis subletales produce un efecto excitatorio en la respuesta pasiva antidepredador en perdices rojas.
3. Las semillas de sorgo y soja tratadas con neonicotinoides son fuertemente evitadas por las torcazas, pero dicha evitación es insuficiente para prevenir la muerte de algunas aves en el caso de sorgo tratado con imidacloprid. La soja (semillas y cotiledones) no es un alimento apetecible para las torcazas en cautiverio.
4. El tratamiento de semillas de soja con imidacloprid produce evitación de las semillas que quedan sin enterrar y de los cotiledones en las aves
5. El cultivo de soja es el cultivo más sembrado y el que presenta mayor densidad de semillas sin enterrar disponibles para las aves después de la siembra respecto al sorgo y al maíz. Pero, a su vez, la concentración de neonicotinoides en las semillas de soja es mucho menor que la concentración de neonicotinoides en maíz y sorgo. Las semillas de los tres cultivos son ingeridas por torcazas, siendo el sorgo y el maíz tratados con imidacloprid los cultivos que implican un riesgo de intoxicación aguda alto para las aves.
6. Entre los neonicotinoides, imidacloprid usado como tratamiento de semillas de sorgo y maíz reviste alto riesgo de intoxicación aguda para las aves, las cuales están expuestas al químico en la época de siembra de estos cultivos.

Bibliografía

- Abs, M., 1983. Physiology and behaviour of the pigeon. Academic Press.
- Abu Zeid, E.H., Alam, R.T.M., Ali, S.A., Hendawi, M.Y., 2019. Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.121>
- Addy Orduna, L., Zaccagnini, M.E., Canavelli, S., Mineau, P., 2011. Formulated Beta-Cyfluthrin shows wide divergence in toxicity among bird species. *J. Toxicol.* 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/803451>.
- Addy-Orduna, L., Cazenave, J., Mateo, R., 2022. Avoidance of neonicotinoid-treated seeds and cotyledons by captive eared doves (*Zenaida auriculata*, Columbidae). *Environ. Pollut.* 304, 119237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119237>
- Addy-Orduna, L.M., Brodeur, J.C., Mateo, R., 2019. Oral acute toxicity of imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin in eared doves: A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds. *Sci. Total Environ.* 650, 1216–1223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.112>
- Alburaki, M., Boutin, S., Mercier, P.L., Loublier, Y., Chagnon, M., Derome, N., 2015. Neonicotinoid-coated *Zea mays* seeds indirectly affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials. *PLoS ONE* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125790>
- Alford, A., Krupke, C., 2017. Translocation of the neonicotinoid seed treatment clothianidin in maize. *PLoS ONE* 12, e0173836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173836>
- Allgoewer, A., Mayer, B., 2017. Sample size estimation for pilot animal experiments by using a Markov Chain Monte Carlo Approach. *Altern. Lab. Anim.* 45, 83–90. <https://doi.org/10.1177/026119291704500201>
- Aramburú, R.M., Bucher, E.H., 1999. Preferencias alimentarias de la cotorra *Myiopsitta monachus* (Aves: Psittacidae) en cautividad. *Ecol. Austral* 9, 11–14.
- Araújo, C.V.M., Laissaoui, A., Silva, D.C.V.R., Ramos-Rodríguez, E., González-Ortegón, E., Espíndola, E.L.G., Baldó, F., Mena, F., Parra, G., Blasco, J., López-Doval, J., Sendra, M., Banni, M., Islam, M.A., Moreno-Garrido, I., 2020. Not only toxic but repellent: What can organisms' responses tell us about contamination and what are the ecological consequences when they flee from an environment? *Toxics* 8. <https://doi.org/10.3390/toxics8040118>
- Avery, M., Decker, D., Fischer, D., Stafford, T., 1993. Responses of captive blackbirds to a new insecticidal seed treatment. *J. Wildl. Manag.*, 3 57, 652–656.

- Avery, M.L., 1994. Finding good food and avoiding bad food: Does it help to associate with experienced flockmates? *Anim. Behav.* 48, 1371–1378.
- Avery, M.L., Decker, D.G., Fischer, D.L., 1994. Cage and flight pen evaluation of avian repellency and hazard associated with imidacloprid-treated rice seed. *Crop Prot.* 13, 535–540.
- Avery, M.L., Decker, D.G., Humphrey, J.S., Hayes, A.A., Laukert, C.C., 1995. Color, size, and location of artificial fruits affect sucrose avoidance by cedar waxwings and european starlings. *Auk* 112, 436–444.
- Avery, M.L., Fischer, D.L., Primus, T.M., 1997. Assessing the hazard to granivorous birds feeding on chemically treated seeds. *Pestic. Sci.* 49, 362–366.
- Balani, T., Agrawal, S., Thaker, A.M., 2011. Hematological and biochemical changes due to short-term oral administration of imidacloprid. *Toxicol. Int.* 18, 2–4.
- Balfour, N.J., Carreck, N.L., Blanchard, H.E., Ratnieks, F.L.W., 2016. Size matters: Significant negative relationship between mature plant mass and residual neonicotinoid levels in seed-treated oilseed rape and maize crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* 215, 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.020>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Insectic. Acaric. Modes Action Their Role Resist. Its Manag.* 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Batista, N.R., Oliveira, V.E.S. de, Crispim, P.D., Nocelli, R.C.F., Antonialli-Junior, W.F., 2022. Is the social wasp *Polybia paulista* a silent victim of neonicotinoid contamination? *Environ. Pollut.* 308, 119682. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119682>
- BCR, Bolsa de Comercio de Rosario, 2018. Cuadros de normas de calidad para la comercialización. Cámara Arbitral de Cereales, Rosario. Santa Fe. Argentina.
- Beltzer, A.H., 1990a. Biología alimentaria del verdón común *Embernagra platensis platensis* (Aves: Emberizidae) en el valle aluvial del Río Paraná Medio, Argentina. *Ornitol. Neotropical* 1, 25–30.
- Beltzer, A.H., 1990b. Biología alimentaria del halconcito común *Falco sparverius* en el valle aluvial del Río Paraná Medio, Argentina. *Hornero* 13, 133–136.
- Beltzer, A.H., Ríos de Salusso, M.L., Bucher, E.H., 1988. Alimentación del Ñacunda (*Podager nacunda*) en Paraná (Entre Ríos). *Hornero* 13, 47–52.
- Bennett, R. S., 1989. Factors influencing discrimination between insecticide-treated and untreated foods by northern bobwhite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 697–705.

- Bennett, R.S., 1989. Role of dietary choices in the ability of bobwhite to discriminate between insecticide-treated and untreated foods. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 731–738.
- Berny, P.J., Buronfosse, F., Videmann, B., Buronfosse, T., 1999. Evaluation of the toxicity of imidacloprid in wild birds. A new high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the analysis of liver and crop samples in suspected poisoning cases. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22, 1547–1559. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101750>
- Beutler, E., 1982. Catalase. *Red Cell Metab. Man. Biochem. Methods.* Grune and Stratton Inc.
- Bhardwaj, S., Srivastava, M.K., Kapoor, U., Srivastava, L.P., 2010. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.009>
- Bibby, C.J., Burgess, N.M., Hill, D.A., Mustoe, S.H., 2000. *Bird census techniques*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Binazzi, R., Zaccaroni, M., Nespoli, A., Massolo, A., Dessí-Fulgheri, F., 2011. Anti-predator behaviour of the red-legged partridge *Alectoris rufa* (Galliformes: Phasianidae) to simulated terrestrial and aerial predators. *Ital. J. Zool.* 78, 106–112. <https://doi.org/10.1080/11250003.2010.509136>
- Bishop, C.A., Woundneh, M.B., Maisonneuve, F., Common, J., Elliott, J.E., Moran, A.J., 2020. Determination of neonicotinoids and butenolide residues in avian and insect pollinators and their ambient environment in Western Canada (2017, 2018). *Sci. Total Environ.* 737, 139386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139386>
- Blendinger, P.G., 2005. Abundance and diversity of small-bird assemblages in the Monte desert, Argentina. *J. Arid Environ.* 61, 567–587. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.09.017>
- Boatman, N.D., Brickle, N.W., Hart, J.D., Milsom, T.P., Morris, A.J., Murray, A.W.A., Murray, K.A., Robertson, P.A., 2004. Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis* 146, 131–143.
- Bohonak, A., van der Linde, K., 2004. RMA: software for reduced major axis regression, Java version.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2014. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>

- Bonmatin, J.M., Marchand, P.A., Charvet, R., Moineau, I., Bengsch, E.R., Colin, M.E., 2005. Quantification of Imidacloprid Uptake in Maize Crops. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5336–5341. <https://doi.org/10.1021/jf0479362>
- Bonmatin, J.-M., Noome, D.A., Moreno, H., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., Soumana, O.S., Bijleveld van Lexmond, M., Sánchez-Bayo, F., 2019. A survey and risk assessment of neonicotinoids in water, soil and sediments of Belize. *Environ. Pollut.* 249, 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.099>
- Bonmatin, J.-M.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Borsuah, J.F., Messer, T.L., Snow, D.D., Comfort, S.D., Mittelstet, A.R., 2020. Literature Review: Global Neonicotinoid Insecticide Occurrence in Aquatic Environments. *Water* 12. <https://doi.org/10.3390/w12123388>
- Botha, C.J., du Plessis, E.C., Coetser, H., Rosemann, M., 2018. Analytical confirmation of imidacloprid poisoning in granivorous Cape spurfowl (*Pternistis capensis*). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 89, 1–5.
- Bou, N., Dardanelli, S., Olivera, L., Tellechea, G., Addy Orduna, L., Canavelli, S., Rodríguez, E., 2016. Development of a method for assessing damage caused by birds in sprouting soybean in commercial crops. *Idesia* 34. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000036>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bro, E., Decors, A., Millot, F., Soyez, D., Moinet, M., Berny, P., Mastain, O., 2010. Intoxication des perdrix grises en nature. Nouveau bilan de la surveillance « SA-GIR ». *Faune Sauvage* 26–32.
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., Decors, A., 2016. Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9559–9573. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6093-7>
- Brooks, M.E., Kristensen, K., van Benthem, K.J., Magnusson, A., Berg, C.W., Nielsen, A., Skaug, H.J., Maechler, M., Bolker, B.M., 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R J.* 9, 378–400.

- Bruggers, R.L., Rodriguez, E., Zaccagnini, M.E., 1998. Planning for bird pest problem resolution: A case study. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 173–184. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00046-8)
- Bucher, E.H., 1982. Colonial breeding on the eared dove (*Zenaida auriculata*) in north-eastern Brazil (Caatinga, Croton). *Biotropica* 14, 255–261.
- Bucher, E.H., Martin, L.F., Martella, M.B., Navarro, J.L., 1991. Social behaviour and population dynamics of the Monk Parakeet. *Acta XX Congr. Int. Ornithol.* II, 681–689. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.143160>
- Bucher, E.H., Nores, M., 1976. Ecología de la alimentación de la paloma *Zenaida auriculata*. *Physis Secc C* 35, 17–32.
- Bucher, E.H., Ranvaud, R.D., 2006. S31-4 Eared dove outbreaks in South America: patterns and characteristics. *Acta Zoologica Sinica* 52, 564–567.
- Bullard, R.W., Garrison, M.V., Kilburn, S.R., York, J.O., 1980. Laboratory comparisons of polyphenols and their repellent characteristics in bird-resistant sorghum grains. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1006–1011. <https://doi.org/10.1021/jf60231a015>
- Bump, G., Bump, J.W., 1969. A study of the spotted tinamous and the pale spotted tinamous of Argentina (No. 120). US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- Burkart, R., Bárbaro, N.O., Sánchez, R.O., Gómez, D.A., 1999. Eco-regiones de la Argentina. Presidencia de la Nación-Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable-Administración de Parques Nacionales.
- Burke, A.P., 2016. A Neurodevelopmental Study of Mice following In Utero and Early Postnatal Exposure to Imidacloprid, A Neonicotinoid Pesticide.
- Butler, S., Vickery, J., Norris, K., 2007. Farmland biodiversity and the footprint of agriculture. *Science* 315, 381–384.
- Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., Goulson, D., 2018. First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Sci. Total Environ.* 639, 929–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>
- Caballero-Sadi, D., Rocca, P., Achaval, F., Clara, M., 2007. Dieta del Tero *Vanellus chilensis* y abundancia de presas en el Aeropuerto Internacional de Carrasco, Canelones, Uruguay, Informe Técnico N° 2 Para el Comité Nacional de Peligro Aviarío (Uruguay).
- Calvo-Silvera, M., 2006. Alimentación de la Paloma torcaza (*Zenaida auriculata*) en relación con las prácticas agrícolas en Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

- Camperi, A.R., Cicchino, A.C., Darrieu, C.A., 1998. Ecología alimentaria de *Sturnella supercilialis* (Bonaparte 1850) (AVES, EMBERIZIDAE, ICTERINAE), en ambientes ribereños del Nordeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Com. Investig. Científicas Prov. B. Aires 1–12.
- Canavelli, S.B., 2011. Ecological and human dimensions of the monk parakeet damage to crops in Argentina (Thesis for the degree of Doctor of Philosophy). University of Florida, Gainesville.
- Cândido Jr, J.F., Snak, C., Castaldelli, A.P.A., Brocardo, C.R., Model, K.J., 2008. Dieta de avoantes (*Zenaida auriculata* Des Murs, 1847) atropeladas na BR-277 entre Cascavel e Foz do Iguaçu-PR e implicações para seu manejo. Rev. Bras. Biociências 6.
- Cândido-jr, J.F., Snak, C., Castaldelli, A.P.A., Brocardo, C.R., Model, K.J., 2008. Dieta de avoantes (*Zenaida auriculata* Des Murs, 1847) atropeladas na BR-277 entre Cascavel e Foz do Iguaçu - PR e implicações para seu manejo. Rev. Bras. Biociências 6, 68–69.
- Carcedo, A.J.P., Gambin, B.L., 2019. Sorghum drought and heat stress patterns across the Argentinean temperate central region. Field Crops Res. 241, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.06.009>
- Cartereau Alison, Martin Carine, Thany Steeve H, 2017. Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. Br. J. Pharmacol. 175, 1987–1998. <https://doi.org/10.1111/bph.14018>
- CASAFE, 2013. Guía de productos fitosanitarios, décimosexta edición 2013-2015. ed. LARA Producciones Editoriales, Buenos Aires, Argentina.
- Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid metabolism: Compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. J. Agric. Food Chem. 59, 2923–2931.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects, Annual Review of Entomology.
- Casuso, V.M., Tarragó, J.R., Jiménez, J.O., Dardanelli, S., Pérez, G.A., 2016. Evaluación De Daño Por Aves En Cultivares De Sorgo (*Sorghum bicolor*) En Las Breñas, Provincia Del Chaco. FAVE Sección Cienc. Agrar. 15, 13–24. <https://doi.org/10.14409/fa.v15i1.5868>
- Cavallaro, M.C., Morrissey, C.A., Headley, J.V., Peru, K.M., Liber, K., 2017. Comparative chronic toxicity of imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam to *Chironomus dilutus* and estimation of toxic equivalency factors. Environ. Toxicol. Chem. 36, 372–382. <https://doi.org/10.1002/etc.3536>

- Chagnon, M., Kreuzweiser, D., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Van der Sluijs, J.P., 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 119–134. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x>
- Chaudhry, T., 2019. Measuring the Exposure of Songbird Nestlings To Neonicotinoids in Natural and agricultural nest sites. York University, Toronto, Ontario.
- Christopher Cutler, G., Scott-Dupree, C.D., 2014. A field study examining the effects of exposure to neonicotinoid seed-treated corn on commercial bumble bee colonies. *Ecotoxicology* 23, 1755–1763. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1340-5>
- Clapperton, B.K., Porter, R.E., Day, T.D., Waas, J.R., Matthews, L.R., 2012. Designer repellents: combining olfactory, visual or taste cues with a secondary repellent to deter free-ranging house sparrows from feeding. *Pest Manag. Sci.* 68, 870–877. <https://doi.org/10.1002/ps.3244>
- Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R., 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Anim. Behav.* 68, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.004>
- Codesido, M., Drozd, A.A., Gado, P.A., Bilenca, D., 2009. Respuestas de un ensamble de aves a la remoción manual de arbustos en un Bosque subtropical semiárido del chaco Argentino. *Ornitol. Neotropical* 20, 47–60.
- Codling, G., Naggari, Y.A., Giesy, J.P., Robertson, A.J., 2018. Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. *Ecotoxicology* 27, 122–131. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1876-2>
- Colgan, T.J., Fletcher, I.K., Arce, A.N., Gill, R.J., Ramos Rodrigues, A., Stolle, E., Chittka, L., Wurm, Y., 2019. Caste- and pesticide-specific effects of neonicotinoid pesticide exposure on gene expression in bumblebees. *Mol. Ecol.* 28, 1964–1974. <https://doi.org/10.1111/mec.15047>
- Conway, R.W., Maxwell, W.L., 1962. A queuing model with state dependent service rates. *J. Ind. Eng.* 12, 132–136.
- Cox, C., 2001. Insecticide factsheet: imidacloprid. *J Pestic Reform* 21, 15–21.
- Craddock, H.A., Huang, D., Turner, P.C., Quirós-Alcalá, L., Payne-Sturges, D.C., 2019. Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999–2015. *Environ. Health* 18, 7. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0441-7>
- Cresswell, J.E., Desneux, N., vanEngelsdorp, D., 2012. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Manag. Sci.* 68, 819–827. <https://doi.org/10.1002/ps.3290>

- Dardanelli, S., Calamari, N.C., Canavelli Gariboldi, S.B., Zaccagnini, M.E., 2012. Biología y ecología de la paloma mediana [*Zenaida auriculata*], manchada [*Patagioenas maculosa*] y picazuró [*Patagioenas picazuro*]. Ser. Extensión EEA Paraná.
- Dardanelli, S., Nores, M.L., Nores, M., 2006. Minimum area requirements of breeding birds in fragmented woodland of Central Argentina. *Divers. Distrib.* 12, 687–693. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00266.x>
- Darrieu, C.A., Camperi, A.R., Cicchino, A.C., 1996. Ecología alimentaria de *Pseudoleistes virescens* (Vieillot 1819) (Aves, Icteridae), en ambientes ribereños del Nordeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (No. Serie Informe N°51). Museo de la Plata, La Plata.
- Dávila, S.G., Cuenca, O.T., Gil, M.G., Toledano-Díaz, O.A., Castaño, C., Santiago-Moreno, J., Campo, J.L., 2019. Anti-predator behavior in pure and hybrid red-legged partridges. *Poult. Sci.* 98, 3085–3092. <https://doi.org/10.3382/ps/pez075>
- de Faria, D.B.G., Montalvão, M.F., Chagas, T.Q., Araújo, A.P.C., Souza, J.M. de, Mendes, B.O., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G., 2018. Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. *Sci. Total Environ.* 636, 1553–1564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.293>
- De la Peña, M.R., 2011. Observaciones de campo en la alimentación de las aves. *Rev. Conserv. Biológica Mus. Prov. Cienc. Nat. Florentino Ameghino Edición especial.*
- De la Peña, M.R., Pensiero, J.F., 2017. Las plantas como recurso alimenticio de las aves, Ediciones. ed. Santa Fe.
- De la Peña, M.R., Salvador, S., 2016a. AVES ARGENTINAS: DESCRIPCIÓN , COMPORTAMIENTO , REPRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN. Charadriidae a Trochilidae. *Comun. Mus. Prov. Cienc. Nat. "Florentino Ameghino" Nueva Ser., Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"* 20, 1–627.
- De la Peña, M.R., Salvador, S., 2016b. AVES ARGENTINAS: DESCRIPCIÓN , COMPORTAMIENTO , REPRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN. Ciconiidae a Heliornithidae. *Comun. Mus. Prov. Cienc. Nat. "Florentino Ameghino" Nueva Ser., Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"* 20, 1–436.
- de Leeuw, J., 1995. Risk of granules and treated seeds to birds on arable fields.
- de Leeuw, J., Gorree, M., de Snoo, G.R., Jamis, W.L.M., van der Poll, R.J., Luttik, R., 1995. Risks of granules and treated seeds to birds on arable fields. *GML Rep.* No 118 131 pp.

- de Lima e Silva, C., van Haren, C., Mainardi, G., de Rooij, W., Ligtelijn, M., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., 2021. Bringing ecology into toxicology: Life-cycle toxicity of two neonicotinoids to four different species of springtails in LUFA 2.2 natural soil. *Chemosphere* 263, 128245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128245>
- de Melo, C., Cheschini, J., 2012. Daños Causados por Las Aves en Sorgo (*Sorghum bicolor*) en Brasil Central. *Bioagro* 24, 33–38.
- de Montaigu, C.T., Goulson, D., 2022. Field evidence of UK wild bird exposure to fludioxonil and extrapolation to other pesticides used as seed treatments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 22151–22162. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17097-y>
- De Snoo, G.R., Luttik, R., 2004. Availability of pesticide-treated seed on arable fields. *Pest Manag. Sci.* 60, 501–506.
- de Souza, J.M., Rabelo, L.M., de Faria, D.B.G., Guimarães, A.T.B., da Silva, W.A.M., Rocha, T.L., Estrela, F.N., Chagas, T.Q., de Oliveira Mendes, B., Malafaia, G., 2018. The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. *Sci. Total Environ.* 628–629, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.040>
- Di Giacomo, A.S., López de Casenave, J., 2010. Use and Importance of Crop and Field-Margin Habitats for Birds in A Neotropical Agricultural Ecosystem. *The Condor* 112, 283–293. <https://doi.org/10.1525/cond.2010.090039>
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18466–18471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110>
- Distefano, G.G., Zangrando, R., Basso, M., Panzarin, L., Gambaro, A., Volpi Ghirardini, A., Picone, M., 2022. The ubiquity of neonicotinoid contamination: Residues in seabirds with different trophic habits. *Environ. Res.* 206, 112637. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112637>
- Divito, G.A., Echeverría, H.E., Andrade, F.H., Sadras, V.O., 2016. Soybean shows an attenuated nitrogen dilution curve irrespective of maturity group and sowing date. *Field Crops Res.* 186, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.11.004>
- Douglas, M.R., Tooker, J.F., 2015. Large-Scale Deployment of Seed Treatments Has Driven Rapid Increase in Use of Neonicotinoid Insecticides and Preemptive Pest Management in U.S. Field Crops. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5088–5097. <https://doi.org/10.1021/es506141g>
- Dunning Jr, J.B., 2007. CRC handbook of avian body masses. CRC press.

- EFSA, 2009. Guidance of EFSA Risk Assessment for Birds and Mammals. EFSA J. 7, 1438.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R., 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. Pest Manag. Sci. 64, 1099–1105.
- Elbert, A., Overbeck, H., Iwaya, K., Tsuboi, S., 1990. Imidacloprid, a novel systemic nitromethylene analogue insecticide for crop protection., in: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases - 1990. Vol. 1. British Crop Protection Council, Thornton Heath, pp. 21–28.
- Elmeros, M., Winbladh, J.K., Andersen, P.N., Madsen, A.B., Christensen, J.T., 2011. Effectiveness of odour repellents on red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*): A field test. Eur. J. Wildl. Res. 57, 1223–1226. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0517-y>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2019. A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. Science 365, 1177. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9419>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2017. Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. Sci. Rep. 7, 15176. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- Erdogan, C., Velioglu, A.S., Gurkan, M.O., Denholm, I., Moores, G.D., 2021. Detection of resistance to pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) (Hemiptera: Aleyrodidae). Crop Prot. 146, 105661. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105661>
- Ertl, H.M., Mora, M.A., Boellstorff, D.E., Brightsmith, D., Carson, K., 2018. Potential effects of neonicotinoid insecticides on northern bobwhites. Wildl. Soc. Bull. 42, 649–655. <https://doi.org/10.1002/wsb.921>
- Espaillet, J.E., Mason, J.R., 1990a. Differences in taste preference between red-winged blackbirds and European starlings. Wilson Bull., 2 102, 292–299.
- Espaillet, J.E., Mason, J.R., 1990b. Red-Winged Blackbirds and European Starlings. Measurement 102, 292–299.
- European Commission, 2003. Technical guidance document on risk assessment in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part I–IV, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau. ed. European Communities, Italia.

- Fair, J.M., Paul, E., Jones, J., Clark, A.B., Davie, C., Kaiser, G., 2010. Guidelines to the Use of Wild Birds in Research, Fair, J., E. Paul, and J. Jones. ed. Ornithological Council, Washington, D.C.
- FAO-AMIS, A.M.I.S., 2021. Market Database. URL <https://app.amis-outlook.org/#/market-database/supply-and-demand-overview>
- Farfán, M. Á., Duarte, J., Meriggi, A., Reino, L., Viñuela, J., & Vargas, J. M., 2022. The red-legged Partridge: A historical overview on distribution, status, research and hunting. En: *The Future of the Red-Legged Partridge: Science, Hunting and Conservation*. p. 1-19. Ed. Springer International Publishing.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., 1977. Stages of soybean development. Iowa State University, Iowa.
- Fernández-Juricic, E., Baumhardt, P.E., Tyrrell, L.P., Elmore, A., DeLiberto, S.T., Werner, S.J., 2019. Vision in an abundant North American bird: The Red-winged Blackbird. *The Auk* 136, ukz039.
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.-K., Greggers, U., Grünewald, B., Menzel, R., 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS ONE* 9.
- Flores, J.M., Gámiz, V., Gil-Lebrero, S., Rodríguez, I., Navas, F.J., García-Valcárcel, A.I., Cutillas, V., Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., 2021. A three-year large scale study on the risk of honey bee colony exposure to blooming sunflowers grown from seeds treated with thiamethoxam and clothianidin neonicotinoids. *Chemosphere* 262, 127735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127735>
- Ford, A.T., Ågerstrand, M., Brooks, B.W., Allen, J., Bertram, M.G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J.M., Ledesma, M., Melvin, S.D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G.G., Scholz, S., Saaristo, M., Smit, E., Steevens, J.A., van den Berg, S., Kloas, W., Wong, B.B.M., Ziegler, M., Maack, G., 2021. The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environ. Sci. Technol.* 55, 5620–5628. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493>
- Ford, K.A., Casida, J.E., 2006. Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/tx0601859>
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.-C., Canali, E., Jones, R.B., 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Stress Welf. Farm Anim.* 92, 340–374. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.016>
- Franzen-Klein, D., Jankowski, M., Roy, C.L., Nguyen-Phuc, H., Chen, D., Neuman-Lee, L., Redig, P., Ponder, J., 2020. Evaluation of neurobehavioral abnormalities and

- immunotoxicity in response to oral imidacloprid exposure in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J. Toxicol. Environ. Health - Part Curr. Issues* 83, 45–65. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1723154>
- Fryday, S.L., Chandler-Morris, S.A., Hart, A.D.M., 2001. Robust tests for the acceptance of bait and treated seed by birds (No. FL3900). CENTRAL SCIENCE LABORATORY, York, UK.
- Fryday, S.L., Chandler-Morris, S.A., Hart, A.D.M., 1998. Presentation method and the avoidance of fonofos-treated seed by captive birds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 448–454.
- Fryday, S.L., Chandler-Morris, S.A., Tarrant, K.A., Hart, A.D.M., 1999. Validation of methods for testing the avoidance of treated seeds by birds. Draft final report (No. FL6400). CENTRAL SCIENCE LABORATORY, York, UK.
- Geo Inta, 2014. Cartas de Suelos de Entre Ríos.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Goijman, A.P., Zaccagnini, M.E., 2008. The effects of habitat heterogeneity on avian density and richness in soybean fields in Entre Ríos, Argentina. *Hornero* 23, 67–76.
- Goulson, D., 2014. Ecology: Pesticides linked to bird declines. *Nature* 511, 295–296.
- Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.
- Graves, S., Piepho, H.-P., Selzer, L., Dorai-Raj, S., 2019. multcompView: Visualizations of Paired Comparisons.
- Greatti, M., Sabatini, A.G., Barbattini, R., Rossi, S., Stravisi, A., 2003. Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *Bull. Insectology* 56, 69–72.
- GREIG-SMITH, P.W., Greig-Smith, P.W., 1987. Aversions of Starlings and Sparrows to Unfamiliar, Unexpected or Unusual Flavours and Colours in Food, *Ethology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1987.tb00928.x>
- Greig-Smith, P.W., Rowney, C.M., 1987. Effects of colour on the aversions of starlings and house sparrows to five chemical repellents. *Crop Prot.* 6, 402–409.
- Grue, C.E., Gibert, P.L., Seeley, M.E., 1997. Neurophysiological and Behavioral Changes in Non-Target Wildlife Exposed to Organophosphate and Carbamate Pesticides: Thermorégulation, Food Consumption, and Reproduction. *Am. Zool.* 37, 369–388. <https://doi.org/10.1093/icb/37.4.369>

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., De Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341–343.
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., Morrissey, C.A., 2018. Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Sci. Total Environ.* 644, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>
- Hart, A., Fraday, S., McKay, H., Pascual, J., Prosser, P., 1999. Understanding risks to birds from pesticide-treated seeds, in: Adams, N.J., Slotow, R.H. (Eds.), 22 Int. Ornithol. Congr. Johannesburg, pp. 1070–1087.
- Hartig, F., 2021. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models.
- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
- Hirano, T., Yanai, S., Omotehara, T., Hashimoto, R., Umemura, Y., Kubota, N., Minami, K., Nagahara, D., Matsuo, E., Aihara, Y., Shinohara, R., Furuyashiki, T., Mantani, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Hoshi, N., 2015. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1207–1215. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0188>
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., 2016. First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. *Environ. Chem.* 13, 12–20.
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M., 2014. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.033>
- Hladik, M.L., Main, A.R., Goulson, D., 2018. Environmental Risks and Challenges Associated with Neonicotinoid Insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3329–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06388>
- Humann-Guilleminot, S., Binkowski, Ł.J., Jenni, L., Hilke, G., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019a. A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. *J. Appl. Ecol.* 56, 1502–1514. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13392>

- Humann-Guilleminot, S., Clément, S., Desprat, J., Binkowski, Ł.J., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019b. A large-scale survey of house sparrows feathers reveals ubiquitous presence of neonicotinoids in farmlands. *Sci. Total Environ.* 660, 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.068>
- Humann-Guilleminot, S., Laurent, S., Bize, P., Roulin, A., Glauser, G., Helfenstein, F., 2021. Contamination by neonicotinoid insecticides in barn owls (*Tyto alba*) and Alpine swifts (*Tachymarptis melba*). *Sci. Total Environ.* 785, 147403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147403>
- Ivanova, R., Hristev, H., Hoha, G.V., 2013. Study on the effect of Actara and Confidor on birds submitted to chronic intoxication. *Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Iasi* 244–246.
- Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A.J., Gachet, E., Desneux, N., 2019. Alternatives to neonicotinoids. *Environ. Int.* 129, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.045>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Jones, A., Harrington, P., Turnbull, G., 2014. Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years. *Pest Manag. Sci.* 70, 1780–1784. <https://doi.org/10.1002/ps.3836>
- Kammon, A.M., Biar, R.S., Banga, H.S., Sodhi, S., 2010. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Vet. Arh.* 80, 663–672.
- King, J.R., 1973. The annual cycle of the Rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) in three biotopes in north-western Argentina. *J. Zool.* 170, 163–188. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1973.tb01373.x>
- Kononen, D.W., Hochstein, J.R., Ringer, R.K., 1987. Avoidance behavior of mallards and northern bobwhite exposed to carbofuran-contaminated food and water. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 41–50.
- Kononen, D.W., Hochstein, J.R., Ringer, R.K., 1986. A quantitative method for evaluating avian food avoidance behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 823–830.
- Larson, J.L., Redmond, C.T., Potter, D.A., 2013. Assessing Insecticide Hazard to Bumble Bees Foraging on Flowering Weeds in Treated Lawns. *PLoS ONE* 8.
- Latino, S., Beltzer, A.H., 1999. Ecología trófica del benteveo *Pitangus sulphuratus* (aves: Tyrannidae) en el valle de inundación del río Paraná, Argentina. *Orsis Org. Sist. Rev. Botànica Zool. Ecol.* 69–78.
- Lennon, R.J., Isaac, N.J.B., Shore, R.F., Peach, W.J., Dunn, J.C., Pereira, M.G., Arnold, K.E., Garthwaite, D., Brown, C.D., 2019. Using long-term datasets to assess the impacts of dietary exposure to neonicotinoids on farmland bird populations in

- England. PLOS ONE 14, e0223093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223093>
- Lennon, Rosie J, Peach, W.J., Dunn, J.C., Shore, R.F., Pereira, M.G., Sleep, D., Dodd, S., Wheatley, C.J., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020. From seeds to plasma: Confirmed exposure of multiple farmland bird species to clothianidin during sowing of winter cereals. *Sci. Total Environ.* 138056.
- Lennon, Rosie J., Shore, R.F., Pereira, M.G., Peach, W.J., Dunn, J.C., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020. High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Sci. Total Environ.* 742, 140493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140493>
- Lenth, R.V., 2016. Least-Squares Means: The {R} Package {lsmeans}. *J. Stat. Softw.* 69, 1–33. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>
- Leveau, L.M., Leveau, C.M., 2004. Riqueza Y Abundancia De Aves En Agroecosistemas Pampeanos Durante El Período Post-Reproductivo. *Ornitol. Neotropical* 15, 371–380.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 22, 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Limay-Rios Victor, Forero Luis Gabriel, Xue Yingen, Smith Jocelyn, Baute Tracey, Schaafsma Arthur, 2015. Neonicotinoid insecticide residues in soil dust and associated parent soil in fields with a history of seed treatment use on crops in southwestern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 303–310. <https://doi.org/10.1002/etc.3257>
- López de Casenave, J., Pelotto, J.P., Caziani, S.M., Mermoz, M., Protomastro, J., 1998. Responses of avian assemblages to a natural edge in a Chaco Semiarid Forest in Argentina. *The Auk* 115, 425–435.
- Lopez-Antia, A., Feliu, J., Camarero, P.R., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2016. Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data. *J. Appl. Ecol.* 53, 1373–1381. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12668>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Camarero, P.R., Mougeot, F., Mateo, R., 2015. Assessing the Risk of Fipronil-Treated Seed Ingestion and Associated Adverse Effects in the Red-Legged Partridge. *Environ. Sci. Technol.* 49, 13649–13657. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03822>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2014. Experimental approaches to test pesticide-treated seed avoidance by birds under a simulated diversification of food sources. *Sci. Total Environ.* 496, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.031>

- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2015. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* 136, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.023>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138.
- Lüdecke, D., Ben-Shachar, M.S., Patil, I., Waggoner, P., Makowski, D., 2021. performance: An {R} Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. *J. Open Source Softw.* 6, 3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>
- Luttik, R., Hart, A., Roelofs, W., Craig, P., Mineau, P., 2011. Variation in the level of protection afforded to birds and crustaceans exposed to different pesticides under standard risk assessment procedures. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 459–465.
- Mace, G.M., Harvey, P.H., 1983. Energetic Constraints on Home-Range Size. *Am. Nat.* 121, 120–132.
- MAGyP, M. de A., Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2021. Estimaciones Agrícolas. URL <https://datosestimaciones.magyp.gob.ar/repo>
- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A., 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. *PLoS ONE* 9.
- Main, A.R., Michel, N.L., Cavallaro, M.C., Headley, J.V., Peru, K.M., Morrissey, C.A., 2016. Snowmelt transport of neonicotinoid insecticides to Canadian Prairie wetlands. *Agric. Ecosyst. Environ.* 215, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.011>
- Main, A.R., Webb, E.B., Goyne, K.W., Abney, R., Mengel, D., 2021. Impacts of neonicotinoid seed treatments on the wild bee community in agricultural field margins. *Sci. Total Environ.* 147299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147299>
- Manjon, C., Troczka, B.J., Zaworra, M., Beadle, K., Randall, E., Hertlein, G., Singh, K.S., Zimmer, C.T., Homem, R.A., Lueke, B., Reid, R., Kor, L., Kohler, M., Benting, J., Williamson, M.S., Davies, T.G.E., Field, L.M., Bass, C., Nauen, R., 2018. Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. *Curr. Biol.* 28, 1137-1143.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.045>
- Martin, P., Bateson, P., 1993. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge university press.
- Mason, J.R., Bonwell, W.R., 1993. Evaluation of turpentine as a bird-repellent seed treatment. *Crop Prot.* 12, 453–457.

- Mason, J.R., Reidinger, R.F., 1982. Observational learning of food aversions in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *The Auk*, 3 99, 548–554.
- Mason, R., Tennekes, H., Sánchez-Bayo, F., Jepsen, P.U., 2013. Immune Suppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines. *J. Environ. Immunol. Toxicol.* 1, 3–12.
- Mateo, R., Martínez-Haro, M., López-Antia, A., Vallverdú-Coll, N., Fernández-Vizcaíno, E., Mougeot, F., Ortiz-Santaliestra, M.E., 2022. Ecotoxicology Relevant to the Red-Legged Partridge and Other Galliformes, in: Casas, F., García, J.T. (Eds.), *The Future of the Red-Legged Partridge: Science, Hunting and Conservation*. Springer International Publishing, Cham, pp. 175–224. https://doi.org/10.1007/978-3-030-96341-5_8
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B., 2001. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573–580.
- Matsumoto, T., 2013. Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. *Bull. Insectology* 66, 1–9.
- Matteucci, S.D., 2012. Ecorregión Espinal. *Ecorregiones Complejos Ecosistémicos Argent. Orientación Gráfica Ed. SRL B. Aires Argent.* 349–390.
- Matteucci, S., 2012. Ecorregión Pampa. *Ecorregiones Complejos Ecosistémicos Argent.* 391–446.
- McGee, S., Whitfield-Aslund, M., Duca, D., Kopysh, N., Dan, T., Knopper, L., Brewer, L., 2018. Field evaluation of the potential for avian exposure to clothianidin following the planting of clothianidin-treated corn seed. *PeerJ* 2018, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.5880>
- McKay, H.V., Prosser, P.J., Hart, A.D., Langton, S.D., Jones, A., McCoy, C., Chandler-Morris, S.A., Pascual, J.A., 1999. Do wood-pigeons avoid pesticide-treated cereal seed? *J Appl Ecol* 36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.1999.00398.x>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., Bro, E., 2017. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5469–5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Mills, A.D., Crawford, L.L., Domjan, M., Faure, J.M., 1997. The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00028-0)
- Mineau, P., 2011. Barking up the wrong perch: Why we should stop ignoring non-dietary routes of pesticide exposure in birds. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 297–299.

- Mineau, P., 2003. Avian Species, in: Encyclopedia of Agrochemicals. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/047126363X.agr029>
- Mineau, P., Callaghan, C., 2018. Neonicotinoid insecticides and bats - An assessment of the direct and indirect risks (Technical Report). Canadian Wildlife Federation, Kanata, Ontario, Canada.
- Mineau, P., Palmer, C., 2013. The impact of the nation's most widely used insecticides on birds. Neonicotinoid insecticides and birds.
- Mineau, P., Whiteside, M., 2013. Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification. PLoS One 8, e57457.
- Moffat, C., Buckland, S.T., Samson, A.J., McArthur, R., Chamosa Pino, V., Bollan, K.A., Huang, J.T.-J., Connolly, C.N., 2016. Neonicotinoids target distinct nicotinic acetylcholine receptors and neurons, leading to differential risks to bumblebees. Sci. Rep. 6, 24764.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. Environ. Int. 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- Murton, R., Bucher, E., Nores, M., Reartes, J., 1974. The ecology of the Eared Dove (*Zenaida auriculata*) in Argentina. Condor 76, 80–88.
- Murton, R.K., 1963. The feeding behaviour of the woodpigeon. Anim. Behav. 11, 606–607.
- Myers, C., 2014. Benefits of Neonicotinoid Seed Treatments to Soybean Production. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Nagy, K., Duca, R.C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P.T.J., Godderis, L., Ádám, B., 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. Environ. Res. 181, 108926. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
- Nagy, K.A., Girard, I.A., Brown, T.K., 1999. ENERGETICS OF FREE-RANGING MAMMALS, REPTILES, AND BIRDS. Annu. Rev. Nutr. 19, 247–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.247>
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. Pestic. Biochem. Physiol. 76, 55–69. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)

- Naumann, T., Bento, C.P.M., Wittmann, A., Gandrass, J., Tang, J., Zhen, X., Liu, L., Ebinghaus, R., 2022. Occurrence and ecological risk assessment of neonicotinoids and related insecticides in the Bohai Sea and its surrounding rivers, China. *Water Res.* 209, 117912. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117912>
- Norton, S.B., van der Schalie, W.H., Sergeant, A., Blake-Hedges, L., Wentzel, R., Serveiss, V.B., Marcy, S.M., Cirone, P.A., Rodier, D.J., Orr, R.L., Wharton, S., 2003. Ecological Risk Assessment: U.S. EPA's Current Guidelines and Future Directions, in: *Handbook of Ecotoxicology*, Second Edition. CRC Press LLC, Florida, USA, pp. 951–983.
- OECD, O. for E.C. and D., 2011. OECD Draft guidance document on avoidance testing of birds.
- OECD, O. for E.C. and D., 2009. OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposal for a new test guideline 223. Avian acute oral toxicity test.
- Olguín, P.F., Siamonetti, P., Leon, E.J., Beltzer, A.H., Lorenzon, R.E., 2017. Biología alimentaria de *Syrigma sibilatrix* (aves: Ardeidae) en un humedal del Río Paraná Medio, Argentina. *UNED Res. J.* 9, 91–96. <https://doi.org/10.22458/urj.v9i1.1683>
- OMS, 2020. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019 [WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Ottinger, M.A., Wu, J.M., Hazelton, J.L., Abdelnabi, M.A., Thompson, N., Quinn Jr., M.L., Donoghue, D., Schenck, F., Ruscio, M., Beavers, J., Jaber, M., 2005. Assessing the consequences of the pesticide methoxychlor: Neuroendocrine and behavioral measures as indicators of biological impact of an estrogenic environmental chemical. *Brain Res. Bull.* 65, 199–209.
- Pan, C., Yu, J., Yao, Q., Lin, N., Lu, Z., Zhang, Y., Zhao, S., Wang, Z., Lei, X., Tian, Y., Gao, Y., 2022. Prenatal neonicotinoid insecticides Exposure, oxidative Stress, and birth outcomes. *Environ. Int.* 163, 107180. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107180>
- Pandey, S.P., Mohanty, B., 2015. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere* 122, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.061>

- Pascual, J.A., Fryday, S.L., Hart, A.D.M., 1999a. Effects of food restriction on food avoidance and risk of acute poisoning of captive feral pigeons from fonofos-treated seeds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 115–124.
- Pascual, J.A., Hart, A.D.M., Fryday, S.L., 1999b. Incidence of lethal bird poisoning reduced by regurgitation of pesticide-treated food. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 247–253.
- Pascual, J.A., Hart, A.D.M., Saunders, P.J., McKay, H.V., Kilpatrick, J., Prosser, P., 1999c. Agricultural methods to reduce the risk to birds from cereal seed treatments on fenlands in eastern England. I. Sowing depth manipulation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 72, 59–73.
- Pascual, J.A., Saunders, P.J., Hart, A.D.M., Mottram, J., 1999d. Agricultural methods to reduce the risk to birds from cereal seed treatments on fenlands in eastern England. II. Rolling and harrowing as post-sowing cultivations. *Agric. Ecosyst. Environ.* 72, 75–86.
- Peakall, D.B., 1985. Behavioral responses of birds to pesticides and other contaminants, *Residue Reviews*. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5140-8_3
- Peig, J., Green, A.J., 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: The scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Peltzer, H.F., 2001. Importancia de la elección del cultivar de soja en distintas épocas de siembra. INTA EEA Paraná, Actualización Técnica – Soja 53–57.
- Peterson, E.K., Buchwalter, D.B., Kerby, J.L., Lefauve, M.K., Varian-Ramos, C.W., Swaddle, J.P., 2017. Integrative behavioral ecotoxicology: Bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Curr. Zool.* 63, 185–194. <https://doi.org/10.1093/cz/zox010>
- Picciotto, M.R., Caldarone, B.J., Brunzell, D.H., Zachariou, V., Stevens, T.R., King, S.L., 2001. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol. Ther.* 92, 89–108. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00161-9)
- Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., Tornier, I., 2013. A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. *PLoS ONE* 8.
- Pinowski, J., Kendeigh, S.C., 2012. Granivorous birds in ecosystems: their evolution, populations, energetics, adaptations, impact and control. Cambridge University Press.
- Pisa, L., Goulson, D., Yang, E.-C., Gibbons, D., Sánchez-Bayo, F., Mitchell, E., Aebi, A., van der Sluijs, J., MacQuarrie, C.J.K., Giorio, C., Long, E.Y., McField, M.,

- Bijleveld van Lexmond, M., Bonmatin, J.-M., 2021. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 11749–11797. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0341-3>
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Pistorius, J., Wehner, A., Kriszan, M., Bargen, H., Knäbe, S., Klein, O., Frommberger, M., Stähler, M., Heimbach, U., 2015. Application of predefined doses of neonicotinoid containing dusts in field trials and acute effects on honey bees. *Bull. Insectology* 68, 161–172.
- Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibałto, K., Teper, D., Kołtowski, Z., Skubida, M., Zdańska, D., Bober, A., 2012. Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *J. Apic. Sci.* 56, 115–134.
- Poliserpi, M.B., Cristos, D., Pérez-Iglesias, J.M., Brodeur, J.C., 2021. Tissue distribution and sublethal effects of imidacloprid in the South American grayish baywing (*Agelaioides badius*). *Chemosphere* 284, 131327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131327>
- Poliserpi, M.B., Cristos, D.S., Brodeur, J.C., 2020. Imidacloprid seed coating poses a risk of acute toxicity to small farmland birds: A weight-of-evidence analysis using data from the grayish baywing *Agelaioides badius*. *Sci. Total Environ.* 142957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142957>
- Prosser, P.J., Hart, A.D.M., Langton, S.D., McKay, H.V., Cooke, A.S., 2006. Estimating the rate of poisoning by insecticide-treated seeds in a bird population. *Ecotoxicology* 15, 657–664.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Radolinski, J., Wu, J., Xia, K., Stewart, R., 2018. Transport of a neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, from artificial seed coatings. *Sci. Total Environ.* 618, 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.031>
- Raffo, F.C., de la Peña, M.R., Laenen Silva, R., Capuccio Martinez, G., Bonín, L.M., 2014. Aves del Rio Uruguay.

- Ralph, C.J., Geupel, G.R., Pyle, P., Martin, T.E., Desante, D.F., Milá, B., 1996. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres, Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-159 Pacific Southwest Research Station. Albany, California.
- Ramanjaneyulu, G.V., Chari, M.S., Raghunath, T.A.V.S., Hussain, Z., Kuruganti, K., 2009. Non Pesticidal Management: Learning from Experiences, in: Integrated Pest Management: Innovation-Development Process. Springer International Publishing, India, pp. 543–573.
- Ranvaud, R., De Freitas, K.C., Bucher, E.H., Dias, H.S., Avanzo, V.C., Alberts, C.C., 2001a. Diet of eared doves (*Zenaida auriculata*, Aves, Columbidae) in a sugarcane colony in South-Eastern Brazil | Dieta de pombas *Zenaida auriculata* (Aves, Columbidae) de uma colônia em um canavial do Sudeste brasileiro. *Braz. J. Biol.* 61, 651–660. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842001000400015>
- Ranvaud, R., De Freitas, K.C., Bucher, E.H., Dias, H.S., Avanzo, V.C., Alberts, C.C., 2001b. Diet of eared doves (*Zenaida auriculata*, Aves, Columbidae) in a sugarcane colony in South-Eastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 61, 651–660.
- Rawi, S.M., Al-Logmani, A.S., Hamza, R.Z., 2019. Neurological alterations induced by formulated imidacloprid toxicity in Japanese quails. *Metab. Brain Dis.* 34, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0377-1>
- Reales, C., Urich, G., Deshayes, N., Medrano, J., Alessio, V., Leon, E., Beltzer, A., Quiroga, M., 2009. Contribución al Conocimiento de los Gremios Tróficos en un Ensemble de Aves de Cultivo del Paraná Medio. *FAVE Sección Cienc. Vet.* 8, 57–65. <https://doi.org/10.14409/favecv.v8i1.1480>
- Reglero, M.M., Taggart, M.A., Monsalve-González, L., Mateo, R., 2009. Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: Effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environ. Pollut.* 157, 1388–1395. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.036>
- Reidinger Jr, R.F., Mason, J.R., 1983. Exploitable characteristics of neophobia and food aversions for improvements in rodent and bird control, in: *Vertebrate Pest Control and Management Materials: Fourth Symposium*. pp. 20–39.
- Rexrode, M., Barret, M., Ellis, J., Patrick, G., Vaughan, A., Felkel, J., Melendez, J., 2003. EFED Risk Assessment for the Seed Treatment of Clothianidin 600FS on Corn and Canola (No. PC 044309). United States Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Ritchie, E.E., Maisonneuve, F., Scroggins, R.P., Princz, J.I., 2019. Lethal and Sublethal Toxicity of Thiamethoxam and Clothianidin Commercial Formulations to Soil Invertebrates in a Natural Soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 2111–2120. <https://doi.org/10.1002/etc.4521>

- Rodrigues, K.J.A., Santana, M.B., Do Nascimento, J.L.M., Picanço-Diniz, D.L.W., Maués, L.A.L., Santos, S.N., Ferreira, V.M.M., Alfonso, M., Durán, R., Faro, L.R.F., 2010. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.021>
- Rogers, J.G., Jr., 1978. Some Characteristics of Conditioned Aversion in Red-Winged Blackbirds. *The Auk* 95, 362–369. <https://doi.org/10.2307/4085454>
- Rogers, K.H., McMillin, S., Olstad, K.J., Poppenga, R.H., 2019. Imidacloprid Poisoning of Songbirds Following a Drench Application of Trees in a Residential Neighborhood in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1724–1727. <https://doi.org/10.1002/etc.4473>
- Roser, M., 2013. Employment in Agriculture. Our World Data.
- Roy, C.L., Chen, D., 2022. High population prevalence of neonicotinoids in sharp-tailed grouse and greater prairie-chickens across an agricultural gradient during spring and fall. *Sci. Total Environ.* 159120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159120>
- Roy, C.L., Coy, P.L., 2020. Wildlife consumption of neonicotinoid-treated seeds at simulated seed spills. *Environ. Res.* 190. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109830>
- Roy, Charlotte L., Coy, P.L., 2020. Wildlife consumption of neonicotinoid-treated seeds at simulated seed spills. *Environ. Res.* 190, 109830. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109830>
- Roy, C.L., Coy, P.L., Chen, D., Ponder, J., Jankowski, M., 2019a. Multi-scale availability of neonicotinoid-treated seed for wildlife in an agricultural landscape during spring planting. *Sci. Total Environ.* 682, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.010>
- Roy, C.L., Coy, P.L., Chen, D., Ponder, J., Jankowski, M., 2019b. Multi-scale availability of neonicotinoid-treated seed for wildlife in an agricultural landscape during spring planting. *Sci. Total Environ.* 682, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.010>
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M., Arnold, K.E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181297. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1297>

- Sales, J., Janssens, G.P.J., 2003. Nutrition of the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). *Worlds Poult. Sci. J.* 59, 221–232. <https://doi.org/10.1079/WPS20030014>
- Salvador, A.S., Salvador, A.L., Ferrari, C., 2017. Aves de la provincia de Córdoba, Argentina. *Distribución e Historia Natural*. DP Argentina SA, Buenos Aires, Argentina.
- Sánchez-Bayo, F., 2014. The trouble with neonicotinoids. *Science* 346, 806–807. <https://doi.org/10.1126/science.1259159>
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2014. Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE* 9.
- Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L.G., Fauser-Misslin, A., Potts, S.G., Neumann, P., 2014. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS ONE* 9.
- Sasidhar, B.N., Anand, K.A., Gopala, R.A., Amaravathi, P., Hemanth, I., Sasidhar Babu, N., Kumar, A.A., Reddy, A.G., Amaravathi, P., Hemanth, I., 2014. Chronic experimental feedong of imidacloprid induced oxidative stress and amelioration with vitamin C & *Withania somnifera* in layer birds. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 3, 1679–1684.
- Saunders, S.P., Wei, T., Ong, Y., Cuthbert, F.J., 2013. Auditory and visual threat recognition in captive-reared Great Lakes piping plovers (*Charadrius melodus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 144, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.01.009>
- Sayre, R.W., Clark, L., 2001. Effect of primary and secondary repellents on European starlings: An initial assessment. *J. Wildl. Manag.* 65, 461–469.
- Schafer Jr., E.W., Bowles Jr., W.A., Hurlbut, J., 1983. The acute oral toxicity, repellency, and hazard potential of 998 chemicals to one or more species of wild and domestic birds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 355–382.
- Scholer, J., Krischik, V., 2014. Chronic exposure of imidacloprid and clothianidin reduce queen survival, foraging, and nectar storing in colonies of *bombus impatiens*. *PLoS ONE* 9.
- Seccia, S., Fidente, P., Montesano, D., Morrica, P., 2008. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* 1214, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.088>
- Serié, P., 1921. Sobre la alimentación de la Perdiz Común *Nothura maculosa*. *Hornero* 002, 230–232.

- Shao, X., Xia, S., Durkin, K.A., Casida, J.E., 2013. Insect nicotinic receptor interactions in vivo with neonicotinoid, organophosphorus, and methylcarbamate insecticides and a synergist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17273–17277.
- Sheets, L.P., Li, A.A., Minnema, D.J., Collier, R.H., Creek, M.R., Peffer, R.C., 2016. A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 46, 153–190. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1090948>
- Shmueli, G., Minka, T.P., Kadane, J.B., Borle, S., Boatwright, P., 2005. A useful distribution for fitting discrete data: revival of the Conway–Maxwell–Poisson distribution. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 54, 127–142. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9876.2005.00474.x>
- Shore, R.F., Crocker, D.R., Akcakaya, H.R., Bennett, R.S., Chapman, P.F., Clook, M., Crane, M., Dewhurst, I.C., Edwards, P.J., Fairbrother, A., Person, S., Fischer, D., Hart, A.D.M., Holmes, M., Hooper, M.J., Lavine, M., Leopold, A., Luttik, R., Mineau, P., Moore, D.R.J., Mortenson, S.R., Noble, D.G., O'Connor, R.J., Roelofs, W., Sibly, R.M., Smith, G.C., Spendiff, M., Springer, T.A., Thompson, H.M., Topping, C., 2005. Case study part 1: How to calculate appropriate deterministic long-term toxicity to exposure ratios (TERs) for birds and mammals. *Ecotoxicol.* 14, 877–893.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Smits, J.E., Fernie, K.J., 2013. Avian wildlife as sentinels of ecosystem health. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 333–342.
- Solari, L.M., Zaccagnini, M.E., 2009. Efecto de bordes arboreos y terrazas sobre la riqueza y densidad de aves en lotes de soja de entre rios, argentina. *BioScriba* 2, 90–100.
- Sosa, R.A., 2008. Efectos de la fragmentación del bosque de caldén sobre las comunidades de aves en el centro-este de La Pampa (Doctoral dissertation). Universidad de Buenos Aires.
- Stanton, R.L., Morrissey, C.A., Clark, R.G., 2018. Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>

- Staveley, J.P., Law, S.A., Fairbrother, A., Menzie, C.A., 2014. A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). *Hum. Ecol. Risk Assess.* 20, 566–591.
- Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., 2017. Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Sci. Total Environ.* 595, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>
- Tennekes, H.A., Sánchez-Bayo, F., 2011. Time-dependent toxicity of neonicotinoids and other toxicants: Implications for a new approach to risk assessment. *J Environ. Anal. Toxicol* S4:001. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-001>
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebše, P., 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76, 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.002>
- Tobajas, J., Gómez-Ramírez, P., María-Mojica, P., Navas, I., García-Fernández, A.J., Ferreras, P., Mateo, R., 2019. Selection of new chemicals to be used in conditioned aversion for non-lethal predation control. *Behav. Processes* 166, 103905. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.103905>
- Tobajas, Jorge, Gómez-Ramírez, P., María-Mojica, P., Navas, I., García-Fernández, A.J., Ferreras, P., Mateo, R., 2019. Conditioned food aversion mediated by odour cue and microencapsulated levamisole to avoid predation by canids. *Eur. J. Wildl. Res.* 65. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1271-9>
- Tokumoto, J., Danjo, M., Kobayashi, Y., Kinoshita, K., Omotehara, T., Tatsumi, A., Hashiguchi, M., Sekijima, T., Kamisoyama, H., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Hoshi, N., 2013. Effects of exposure to clothianidin on the reproductive system of male quails. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 755–760.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid insecticides: Highlights of a symposium on strategic molecular designs. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2883–2886.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2004. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomlin CDS, ed., 2004. *The e-Pesticide Manual*, 13th, version 3.1. ed. British Crop Protection Council, Surrey UK.
- Tooker, J.F., Pearsons, K.A., 2020. Journal Pre-proof Newer characters, same story: neonicotinoid insecticides disrupt food webs through direct and indirect effects

- Newer characters, same story: neonicotinoid insecticides disrupt food webs through direct and indirect effects. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.02.013>
- Tosi, S., Burgio, G., Nieh, J.C., 2017. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Sci. Rep.* 7, 1201. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01361-8>
- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H.S., Malena, D.A., Gajiwala, P.H., Maciukiewicz, P., Fournier, V., Zayed, A., 2017. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* 356, 1395. <https://doi.org/10.1126/science.aam7470>
- Turaga, U., Peper, S.T., Dunham, N.R., Kumar, N., Kistler, W., Almas, S., Presley, S.M., Kendall, R.J., 2016. A survey of neonicotinoid use and potential exposure to northern bobwhite (*Colinus virginianus*) and scaled quail (*Callipepla squamata*) in the Rolling Plains of Texas and Oklahoma. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1511–1515. <https://doi.org/10.1002/etc.3305>
- USEPA, U.S.E.P.A., 2016. Refinements for Risk Assessment of Pesticide Treated Seeds – Interim Guidance (Memorandum). United States Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- van der Sluijs, J.P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bijleveld van Lexmond, M.F.I.J., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., Downs, C.A., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., van Praagh, J., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 148–154. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3229-5>
- Van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M., Belzunces, L.P., 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 5, 293–305.
- van Dijk, T.C., van Staalduinen, M.A., van der Sluijs, J.P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One* e62374.
- van Lexmond, M., Bonmatin, J.-M., Goulson, D., Noome, DominiqueA., 2014. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–4. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3220-1>
- Vandenberg, L.N., Welshons, W.V., vom Saal, F.S., Toutain, P.-L., Myers, J.P., 2014. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? *Environ. Health* 13, 46. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-46>

- Vijver, M.G., Van Den Brink, P.J., 2014. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid: A rebuttal and some new analyses. *PLoS ONE* 9.
- Walker, C.H., 2003. Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology* 12, 307–316. <https://doi.org/10.1023/A:1022523331343>
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., Martínez, M.-A., 2018. Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 471–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>
- Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience* 51, 209. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0209:eocobb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0209:eocobb]2.0.co;2)
- Weituschat, C.S., Pascucci, S., Materia, V.C., Tamas, P., de Jong, R., Trienekens, J., 2022. Goal frames and sustainability transitions: how cognitive lock-ins can impede crop diversification. *Sustain. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11625-022-01156-5>
- Werner, S.J., Carlson, J.C., Tupper, S.K., Santer, M.M., Linz, G.M., 2009. Threshold concentrations of an anthraquinone-based repellent for Canada geese, red-winged blackbirds, and ring-necked pheasants. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 121, 190–196.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351–352.
- WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009, World Health Organization. ed. WHO Press, Germany.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.
- Williamson, S.M., Willis, S.J., Wright, G.A., 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees.
- Wilson, S., Mitchell, G.W., Pasher, J., McGovern, M., Hudson, M.A.R., Fahrig, L., 2017. Influence of crop type, heterogeneity and woody structure on avian biodiversity in agricultural landscapes. *Ecol. Indic.* 83, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.059>
- Wood, T.J., Goulson, D., 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 17285–17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>

- Woodcock, B.A., Ridding, L., Pereira, M.G., Sleep, D., Newbold, L., Oliver, A., Shore, R.F., Bullock, J.M., Heard, M.S., Gweon, H.S., Pywell, R.F., 2021. Neonicotinoid use on cereals and sugar beet is linked to continued low exposure risk in honeybees. *Agric. Ecosyst. Environ.* 308, 107205. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107205>
- Wu, M.-C., Chang, Y.-W., Lu, K.-H., Yang, E.-C., 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 88, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>
- Xiao, Z., Li, X., Wang, X., Shen, J., Ding, S., 2011. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine tissues by pressurized solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 879, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.008>
- Yagi, K., 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15, 212–216. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(76\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0006-2944(76)90049-1)
- Zaccagnini, M.E., Canavelli, S.B., Calamari, N.C., Schrag, A.M., 2010. Regional bird monitoring as a tool for predicting the effects of land use and climate change on pampas biodiversity. *Clim. Change Biodivers. Sustain. Am. Impacts Adapt.* 39–56.
- Zala, S.M., Penn, D.J., 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: A review of the evidence and new challenges. *Anim. Behav.* 68, 649–664.
- Zhang, C., Yi, X., Xie, L., Liu, H., Tian, D., Yan, B., Li, D., Li, H., Huang, M., Ying, G.-G., 2021. Contamination of drinking water by neonicotinoid insecticides in China: Human exposure potential through drinking water consumption and percutaneous penetration. *Environ. Int.* 156, 106650. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106650>
- Zhang, D., Lu, S., 2022. Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review. *Environ. Int.* 163, 107201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107201>
- Zotta, Á., 1940. Lista sobre el contenido estomacal de las aves argentinas. *Hornero* 007, 402–411.
- Zufiaurre, E., Codesido, M., Abba, A.M., Bilenca, D., 2016. Differential use of crop and livestock fields by land birds in the Pampas region, Argentina. *Hornero* 31.