

Estudio de alcaloides pirrolizidínicos, toxicidad, presencia y determinación en especies herbáceas de *Echium* de Canarias con potencial como forrajeras

Study of pyrrolizidine alkaloids, toxicity, presence and determination in herbaceous *Echium* species from the Canary Islands with potential as forages



Trabajo de Fin de Grado
SAIOA EXPÓSITO RINCÓN

Tutorizado por Rafael Zárate Méndez y Ana Bolaños Martín
Grado en Biología. Julio 2023

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Estructura química de PAs	3
Metabolismo de PAs.....	5
Toxicidad de PAs.....	5
Objetivos	7
Material y Métodos	8
Recolección y preparación de muestras.....	8
Extracción de alcaloides	8
Empleo y uso del equipo de HPLC	11
Cuantificación de PAs empleando la técnica de HPLC	13
Análisis de datos.....	15
Resultados	16
Echium lancerottense (EL)	16
Echium callithyrsum (ECH)	17
Echium hierrense (hoja) (EHH).....	17
Echium hierrense (tallo) (EHT).....	18
Echium bonnetti (EB).....	18
Echium plantagineum (EPL)	19
Discusión.....	22
Conclusiones:	24
Conclusions:	25
Bibliografía.....	26

Agradecimientos

Esta investigación ha sido respaldada por el proyecto “Valorización de especies vegetales endémicas de Canarias del género *Echium* como alimento funcional para el ganado autóctono y evaluación de la calidad de sus producciones” del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) junto con la participación de las Universidades de La Laguna, de Stirling y el Instituto Canario de Investigación del Cáncer, financiado por la Fundación CajaCanarias.

En primer lugar, deseo agradecer a mi tutor externo, el Dr. Rafael Zárate Méndez, por las extracciones de las muestras vegetales, consejos e importantes contribuciones en aquellos momentos difíciles en el laboratorio, además de su apoyo y valiosas sugerencias para la redacción de esta memoria. También a mi tutora académica la Dra. Ana Bolaños Martín por evaluar la presente memoria y darle el visto bueno para que el trabajo siguiera avanzando. Seguidamente, quiero reconocer la gran labor del Departamento de Fisiología Animal de la Sección de Biología, de la Universidad de La Laguna, por brindarnos en todo momento sus instalaciones y equipos para poder desarrollar el estudio. A los compañeros de grado que me escucharon en aquellos momentos de frustración, me aconsejaron y dieron alternativas para una solución. Finalmente, a mi familia por acompañarme durante mi etapa universitaria y darme la motivación necesaria para sobrellevar los momentos no tan buenos. Gracias. Gracias a todos por contribuir en menor o mayor medida en este camino profesional que comienza y que espero que siga creciendo.

Resumen

El potencial uso de una variedad de especies herbáceas del género *Echium*, endémicas de Canarias, como forraje para la alimentación del ganado caprino y aviar supondría un avance en la obtención de recursos ya que pueden ser explotadas en las islas. No obstante, como aparece en la literatura científica, el consumo de especies vegetales o de productos derivados de éstas, que puedan contener alcaloides pirrolizidínicos (PAs, del inglés pyrrolizidine alkaloids) que, en ocasiones, tienen efectos adversos para la salud de humanos o animales. Por ello, se evaluó y cuantificó la presencia de PAs en muestras de diferentes especies herbáceas de *Echium* tomadas en diversos estadios fenológicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés high performance liquid chromatography) para así, determinar si las concentraciones presentes pudieran generar efectos negativos en los animales alimentados con estos forrajes.

Palabras clave: Alcaloides pirrolizidínicos, Boraginaceae, cuantificación, *Echium*, HPLC, echimidina.

Abstract

The potential use of a variety of herbaceous species of the genus *Echium*, endemic to the Canary Islands, as a forage for feeding goats and poultry would mean an advance in obtaining resources because they can be exploited on the islands. However, as it appears in the scientific literature, the consumption of plant species or products derived from them, that may contain pyrrolizidine alkaloids (PAs) that, sometimes, have adverse effects on the health of human or animals. Therefore, the presence of PAs in samples of different herbaceous species of *Echium* taken in different phenological stages by high performance liquid chromatography (HPLC) was evaluated and quantified, in order to determine if the concentrations present can generate negative effects in animals that may be fed with these forages.

Keywords: Pyrrolizidine alkaloids, Boraginaceae, quantification, *Echium*, HPLC, echimidine.

Introducción

La gran mayoría de las plantas sintetizan metabolitos secundarios que, en muchos casos, sirven como mecanismos de defensa ante determinadas amenazas, como por ejemplo herbívoros (Pechi Santana and Fernández Bonino 2018). Los PAs y sus formas N-óxidos (PANO, del inglés pyrrolizidine alkaloids N-oxides) son una muestra de ello pues actúan generando toxicidad, generalmente a nivel hepático, en aquellos animales que ingieren este tipo de sustancias. También se han descrito como cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos y neumotóxicos (He et al. 2020; Rizzo et al. 2023; Wei, Ruan, and Vrieling 2021). En algunas ocasiones incluso llegando a provocar la muerte (Casado, Morante-Zarcelo, and Sierra 2022). Su presencia se ha determinado en una variedad de especies pertenecientes a diferentes familias botánicas, principalmente *Asteraceae*, *Boraginaceae* y *Fabaceae* (Casado et al. 2022; El-Shazly, Abdel-Ghani, and Wink 2003).

En particular, el género *Echium* (Boraginaceae) conformado por 66 especies distribuidas entre África, Europa, los archipiélagos macaronésicos, la Península Ibérica y el Mediterráneo oriental. De ellas, 27 especies son endémicas de los archipiélagos macaronésicos (Madeira, Azores, Canarias y Cabo Verde): dos en Madeira, tres en Cabo Verde y las veinte y dos restantes en Canarias. Varias especies fuera del ámbito macaronésico han sido estudiadas y se ha visto que contienen PAs tóxicos, como *Echium plantagineum* (Carvalho et al. 2013). Sin embargo, existen escasos estudios de la presencia y evaluación de PAs en especies canarias (Domínguez et al. 2008; Roeder, Liu, and Bourauel 1991).

En la literatura científica se han reportado numerosos casos de intoxicación en humanos y ganado. Así entre 1903 y 1904 se determinó que *Senecio jacobea* (Asteraceae) provocaba una enfermedad hepática crónica en el ganado. Posteriormente, en 1956, dos investigadores dieron a conocer otro género que también producía PAs, *Crotalaria* (Bull and Dick 1959). En 1920 una enfermedad hepática generalizada fue diagnosticada como consecuencia del consumo de pan contaminado con semillas de *Senecio*. El caso más grave se dio en Afganistán y Tayikistán en 1975, donde 8000 personas enfermaron tras el consumo de cereales contaminados por *Heliotropium popovii* y de ellas, 3000 fallecieron (Helmut Wiedenfeld 2011). Así, en el año 1989 en el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS), organización compuesta por la OMS, la FAO y la OIT se dictó que “el consumo de granos contaminantes o el uso de plantas que contienen PAs como hierbas medicinales, bebidas, o el pastoreo de animales en

pastos contaminados, pueden causar enfermedades agudas o crónicas” (Helmut Wiedenfeld 2011).

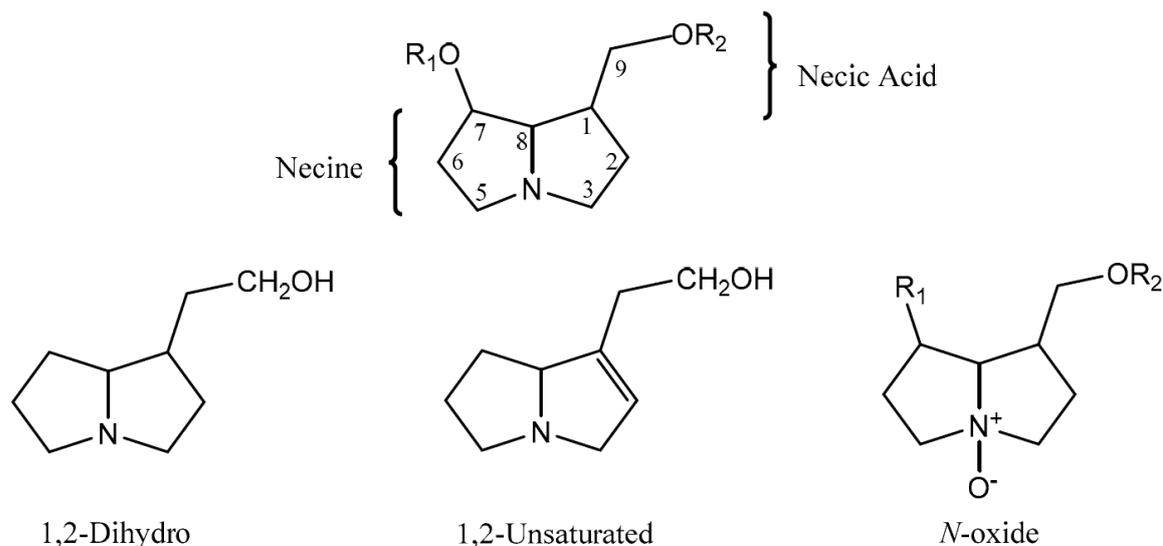
Por ello, la producción animal debe llevar un seguimiento del alimento que se le administra al ganado, pues se ha comprobado que también la leche, huevos y carnes pueden contener PAs tóxicos si el animal se alimenta de vegetación que contenga estos alcaloides (Ma et al. 2018). En humanos también se han dado casos de intoxicación en recién nacidos alimentados con leche materna. La miel suele ser uno de los principales focos de PAs en alimentos, debido al origen del polen que usan las abejas para producirla (De Jesus Inacio et al. 2020; Wang et al. 2019). Finalmente, también se han dado casos en el ganado aviar con huevos contaminados por los granos de cereal, que contenían otros restos vegetales que contenían PAs (Helmut Wiedenfeld 2011).

La intoxicación del ganado por granos contaminados se ha intentado disuadir de múltiples maneras, por ejemplo, eliminando completamente las semillas que contengan PAs (método no tan interesante para las grandes productoras ganaderas); o mezclando los granos que contengan PAs con los que no para diluir el contenido de PAs. No obstante, cualquier contenido de PAs por muy bajo que este pueda ser, puede provocar efectos tóxicos en el organismo, por ello, se hace necesario que las concentraciones de estos compuestos en granos con los que luego se alimenta a animales sea mínimo o incluso ausente (Casado et al. 2022).

Estructura química de PAs

Los PAs son un grupo de alcaloides derivados de la ornitina. Éstos comúnmente se encuentran como ésteres (mono-, di- o macrocíclicos diésteres) formados por una base de necina (aminoalcohol) y uno o más ácidos néricos (ácidos alifáticos mono o dicarboxílicos) (Figura 1) con una longitud de 5 a 10 átomos de carbono. Estos ácidos son derivados de aminoácidos ramificados como valina, treonina, leucina o isoleucina (Hartmann and Ober 2000).

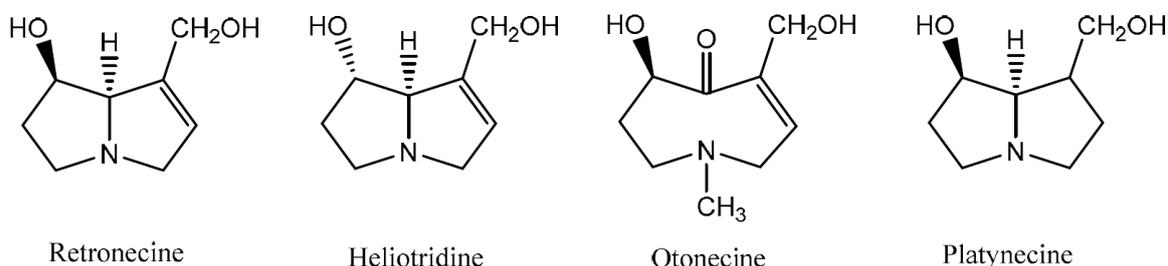
Figura 1.- Estructura de un PA y sus diferentes formas. R1 y R2 corresponden a ácidos néricos (Moreira et al. 2018).



A su vez, las bases de necina derivan de la pirrolizidina. El núcleo de ésta consta de dos anillos saturados de cinco miembros con un átomo de nitrógeno entre ellos, pudiendo a veces tener un doble enlace en la posición 1,2, lo que da como resultado una mayor toxicidad (Moreira et al. 2018) (Figura 1).

Por ende, existen tres tipos de PAs según el grado de saturación y la estereoquímica de la base de necina: los de tipo retronecina, tipo heliotridina, tipo otonecina y tipo platinecina. Los tres primeros con un doble enlace en las posiciones C1 y C2 (Figura 2) por lo que se cree que son altamente tóxicos, mientras que los de tipo platinecina con la base de necina saturada podría ser débilmente tóxica o no serlo (Ma et al. 2018; Moreira et al. 2018; Wei et al. 2021).

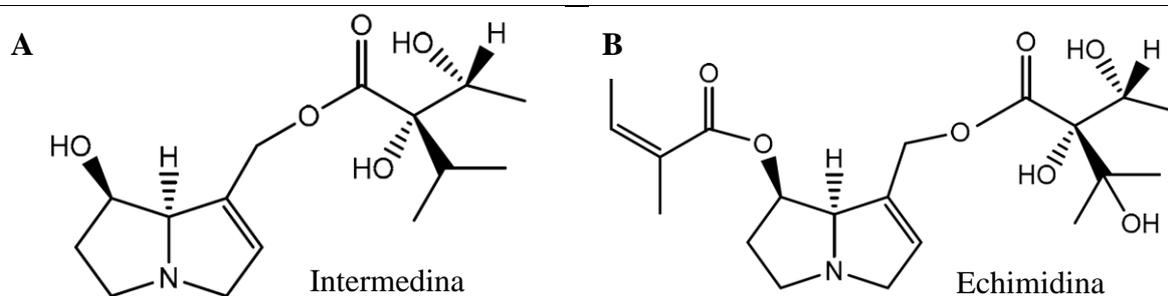
Figura 2.-Estructura de PAs según el grado de saturación y la estereoquímica de la necina (Moreira et al. 2018)



La combinación de las estructuras mencionadas anteriormente da como resultado una gran diversidad estructural en PAs. Así, dentro de los ácidos monocarboxílicos por ejemplo, característicos de la familia Boraginaceae, algunos tienen un grupo hidroxilo en C-9 esterificado por un ácido hidroxiiisopropilbutanoico, como intermedina (Figura 3). En otros,

tienen un segundo ácido néxico, normalmente en el grupo hidroxilo del C-7, como un ácido angélico o ácido tíglico, como por ejemplo la echimidina (Figura 3).

Figura 3.-Estructura química de Intermedina y Echimidina. (Moreira et al. 2018)



A. Éster de ácido monocarboxílico. B. Diéster de ácido monocarboxílico

Metabolismo de PAs

Los alcaloides pirrolizidínicos se pueden encontrar en dos formas moleculares, como bases de necina libre o como sus formas N-óxidos, estos últimos no tóxicos. En las plantas, los PAs se encuentra como N-óxidos (Hartmann and Ober 2000), que se reducen cuando llegan al intestino de herbívoros y se absorben por difusión como base libre. Éstas se metabolizan por las oxidasas del citocromo P-450 de los hepatocitos, generando como resultado una bioactivación mediante la formación de intermedios de pirrol reactivos (Orantes-Bermejo et al. 2013).

Sin embargo, cabe destacar la variación en la sensibilidad a PAs entre los distintos animales. Por ejemplo, se sabe que aquellos que son rumiantes poseen unos microorganismos en el rumen que destruyen los PAs. Hecho que hace que sean más resistentes que aquellas especies monogástricas. Así, los caballos suelen ser sensibles a la intoxicación mientras que el ganado caprino y bovino no, tolerando dosis de PAs mucho más altas (Pechi Santana and Fernández Bonino 2018).

Toxicidad de PAs

El incremento del envenenamiento por PAs en los últimos años llevó a que estos compuestos se regularizaran en muchos países: en EEUU, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) prohibió aquellos medicamentos naturales que contenían PAs. Análogamente, en Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una asociación entre padecer una enfermedad veno oclusiva o cáncer con la ingesta de PAs tóxicos; Alemania fue uno de los pioneros en establecer los valores límites que no serían perjudiciales para la

salud, siendo 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ o tomar PAs cada 6 semanas son los parámetros definidos. Sin embargo, si la dosis se prolonga en el tiempo, el valor límite disminuye a 0.1 $\mu\text{g}/\text{día}$. En el embarazo no se permite el consumo de PAs. Países Bajos estableció la dosis límite en medicamentos y alimentos como 1 μg PAs/kg o 1 μg PAs/L (Helmut Wiedenfeld 2011). El Instituto Federal Alemán para la Evaluación de Riesgos (BfR) y el Comité sobre Toxicidad de Productos Químicos en Alimentos, Productos de Consumo y Medio Ambiente de Reino Unido (COT) han sugerido un límite de exposición de diferentes alimentos de 0,007 μg de PA/kg de peso corporal al día (Sixto, Niell, and Heinzen 2019).

Sin embargo, en aquellos aspectos como la producción de leche, carne o huevos no existen niveles máximos establecidos para alcaloides de pirrolizidina (EFSA-European Food Safety Authority 2016). No obstante, según datos científicos recabados donde se evaluó la presencia de PAs y PANO en productos derivados de animales como la miel, cereales, harinas, leche y productos lácteos, huevos, carne y productos cárnicos se ha determinado que no es frecuente encontrar contaminación de PAs en productos de origen animal, y si se da el caso los niveles de concentración encontrados son tan bajos que no suponen un riesgo para el ser humano (Casado et al. 2022).

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo el análisis del contenido de PAs en diversas muestras herbáceas de *Echium* (*E. bonnetii*, *E. callithyrsus*, *E. hiérrense*, *E. lancerottense* y *E. plantagineum*), para determinar su posible utilización como alimento funcional para el ganado aviar y caprino sin acarrear los posibles problemas de toxicidad.

Para la consecución del mismo, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. La evaluación y determinación de PAs en las muestras objeto de estudio.
2. La cuantificación de PAs mediante HPLC en las muestras de diferentes especies del género *Echium* cultivadas y tomadas en diversos estudios de desarrollo.
3. Consultar el posible efecto toxico de dichos alcaloides en animales, así como identificar con los datos de la literatura científica los límites de concentración tolerables.
4. Definir la posible capacidad de estas especies forrajeras como alimentación animal.

Material y Métodos

Recolección y preparación de muestras

Las muestras estudiadas de *Echium lancerottense*, *Echium callithyrsium*, *Echium hierrense*, *Echium bonnetti* y *Echium plantagineum* fueron tomadas de plantas cultivadas en diferentes parcelas de la finca El Pico del ICIA. Cada una fue recogida en diferentes etapas fenológicas y se le asignó un código para identificarlas. De este modo, para *E. lancerottense* se recogió la planta entera (código EL); para *E. callithyrsium* se tomaron hojas (código ECH); de *E. hierrense* se seleccionaron tanto las hojas (código EHH), como tallos (código EHT); para *E. bonnetti* se obtuvo la planta entera (código EB); finalmente *E. plantagineum* (no endémica) se identificó como EPL.

Asimismo, para cada muestra se le asignó las letras EP de Echium Project junto al número de muestra estudiándose un total de 16 (ver Tabla 1).

Extracción de alcaloides

Las extracciones del material vegetal objeto de estudio ya habían sido realizadas previamente a mi asignación del trabajo experimental, por lo que no se realizaron de primera mano.

Se probaron tres métodos diferentes empleando por su abundancia y disponibilidad biomasa de *E. plantagineum* con el objetivo de determinar cuál de ellos era el más adecuado para cuantificar los PAs en el resto de las especies endémicas. Todas presentan porte herbáceo interesante para su potencial uso como forrajera.

Método 1: se pesaron 25 g de material seco para la extracción, se trituraron y se pasaron a un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad. Se preparó una solución 2% de ácido fórmico (CH_2O_2) en 75% metanol (MeOH), es decir, 750 mL MeOH, 230 mL H_2O y 20 mL CH_2O_2 . De esta solución se añadieron 300 mL al material vegetal seco triturado (12-15 mL de solución orgánica por gramos del material seco). Se agitó durante 1 hora en un agitador magnético y seguidamente se almacenó a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente se filtró el extracto a través de papel de filtro con el uso de un Kitasato. De dicho filtrado se tomó el residuo y se repitió el proceso de extracción. Luego, se combinaron los dos extractos resultantes que se evaporaron con el uso de un rotaevaporador. Al extracto – residuo seco se le añadieron 400 mL de solución 1% CH_2O_2 (16-18 mL por gramo de materia seca) y se ajustó el pH a 2 usando

ácido clorhídrico (HCl) 6M. A continuación, se realizó la extracción líquido - líquido empleando un embudo de decantación, para ello se añadieron dos veces seguidas 100 mL de diclorometano (DCM) y una vez con 50 mL de DCM. Posteriormente, se eliminó la fase de DCM y se procedió con la fase acuosa. Dicha fase se centrifugó y se tomó el sobrenadante, al cual se le adicionó una solución de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 1M en H_2O (10 mL/100 mL de fase acuosa). Posteriormente, se agitó y se dejó reposar 1-2 horas. A continuación, se elevó el pH a 10 utilizando una solución de hidróxido de amonio (NH_4OH) al 20-25%. Se repitieron los pasos de la extracción líquido - líquido dos veces con 100 mL de DCM y luego 50 mL. Tras los tres pasos se separaron las fases mostrando una fase inferior de DCM y una superior de H_2O , tomándose en todos ellos la fracción de DCM. Posteriormente, para retirar los posibles restos de agua del DCM se añadieron 8-10 g de sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4), se agitó y decantó el exceso de sulfato. Finalmente, la solución de DCM se filtró a través de papel de filtro y se evaporó el disolvente con el uso de un rotaevaporador sobre un baño de agua a 40°C. Se tomó la muestra final tras resuspenderla en 1-2 mL de metanol de grado HPLC que se traspasó a viales de HPLC pesados para conocer los mg extraídos, se almacena a -20°C hasta su uso.

Método 2: se trituró el material vegetal seco (25 g), se le añadió 300 mL de MeOH (entre 12 - 14 mL por gramo de material seco). La mezcla se agitó en un agitador orbital durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, la solución se filtró a través de papel de filtro empleando un Kitasato. Se recuperó el residuo sólido y se repitió la extracción pero esta vez con 150 mL de MeOH. Se combinaron ambas extracciones que se secaron empleando un rotaevaporador sobre un baño de agua a 45-50°C. Seguidamente, el extracto se resuspendió con 100-150 mL de DCM y posteriormente se le añadieron 150 mL de H_2SO_4 0.5M. Se pasó a un embudo de decantación, se agitó obteniendo dos fases sacando la de DCM. Repetimos este proceso 3 veces para lavar la fase acuosa. Luego se continuó con la fase acuosa, ajustando a pH 9 añadiendo unas gotas de NH_4OH al 20-25%. Se extrajeron los PAs lavando y agitando tres veces con 150 mL de DCM que se secaron con un rotaevaporador. Igualmente, la fase acuosa ya lavada, se extrajo tres veces utilizando n-butanol (C_4H_{10}). Para ambas fracciones, se eliminó el exceso de agua añadiendo sulfato sódico anhidro, se filtraron y secaron, calculando los mg extraídos. Se observó que el n-butanol disolvía el sulfato sódico añadido quedando una solución blanquecina y generando una alta cantidad de mg extraídos que no correspondían a los PAs presentes. Finalmente, los PAs se resuspendieron en 1 - 2 mL de MeOH de grado HPLC y se guardaron a -20°C hasta su uso (Domínguez et al. 2008).

Método 3: proceso similar al método II con extracción repetida con MeOH. Sin embargo, una vez secadas ambas extracciones iniciales en el rotaevaporador, se resuspendió y acidificó el extracto con 225 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.1N. Se agitó durante 15 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo la extracción de esta solución acidificada utilizando para ello 150 mL de DCM, repitiendo la extracción 3 veces. A continuación, se evaporó el DCM a una presión reducida con un rotaevaporador sobre baño de agua a 40°C, fracción guardada aunque no debe presentar PAs. La fase acuosa ácida anterior se ajustó a pH 10 con la adición de unas gotas de NH₄OH al 25%. Seguidamente se realizó la extracción líquido - líquido con 150 mL de éter dietílico 3 veces, se evaporó y conservó la muestra hasta su utilización en el HPLC. Además, la fase acuosa a pH 10 también se extrajo tanto con 150 mL de DCM como con 150 mL de n-butanol, 3 veces para ambos casos, para luego combinar los extractos separadamente, secarlos con el rotaevaporador, pesarlos y conservarlos a - 20°C (Carvalho et al. 2013).

Tras probar con *Echium plantagineum* cada uno de los métodos de extracción, se seleccionó el método 2 para extraer los PAs en el resto de especies endémicas objeto de estudio, como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1.- Peso de las muestras antes y después de las extracciones

Muestra	Código identificativo	Peso seco (g)	Peso extracto (mg)	Método extracción	Rendimiento extracción (%)
EP13	EPL M1 DCM_F w. PA	25	18.5	M1	0.07
EP14	EPL M1 butanol w. PA	25	37.2	M1	0.15
EP16	EPL M2 DCM_F w. PA	25	6.0	M2	0.02
EP17	EPL M2 butanol w. PA	25	45.3	M2	0.18
EP19	EPL M3 DCM_F w. PA	25	4.9	M3	0.02
EP20	EPL M3 butanol w. PA	25	17.8	M3	0.07
EP21	EPL M3 diethyl ether w. PA	25	9.0	M3	0.04
EP25	EL DCM_F w. PA	25	7.39	M2	0,03
EP26	EL butanol w. PA	25	162.7	M2	0.65
EP28	ECH DCM_F w. PA	25	3.8	M2	0.02
EP29	ECH butanol w. PA	25	82.5	M2	0.33
EP31	EHH DCM_F w. PA	25	63.49	M2	0.25
EP34	EHT DCM_F w. PA	25	63.0	M2	0.25
EP35	EHT butanol w. PA	25	169.6	M2	0.68

EP37	EB DCM_F w. PA	25	12.2	M2	0.05
EP38	EB butanol w. PA	25	347.7	M2	1.39

Nota: Datos cedidos por el Dr. Rafael Zárate Méndez.

Empleo y uso del equipo de HPLC

Previamente a la inyección de las muestras en el equipo de HPLC (Thermo Scientific modelo Accela UHPLC, equipado con detector PDA = photodiode array) se realizaron una serie de tareas preliminares tanto para el equipo como para las muestras.

Preparación de los disolventes para la fase móvil

La fase móvil estaba formada por mezcla en gradiente de acetonitrilo grado HPLC (ACN) y tampón fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0.05M ajustado a pH 3 con la adición de unas gotas de ácido fosfórico. Ambos se sonicaron separadamente durante 6-8 minutos para eliminar burbujas de aire que pudieran afectar al equipo de HPLC.

Comprobación de la columna de HPLC

La columna es una de las partes más importante en un cromatógrafo líquido de alta resolución, por ende, es necesario el buen cuidado y mantenimiento de ésta para evitar daños y resultados irreales en el análisis. En este estudio se empleó una columna de fase reversa Xbridge Premier BEH C18 de 4,6x100 mm, empaquetada con partículas de 2,5 μm y 130 Å (Waters, España). Se comprobó el comportamiento de la columna siguiendo las indicaciones del fabricante empleando 3 estándares preparados a una concentración de 1 mg/mL (acenaphthene, naphthalene, thiurea, Sigma - Aldrich) evaluados a un flujo de 1 mL/min de una fase móvil isocrática compuesta de 70% ACN y 30% H_2O , se inyectaron 5 μL de cada estándar y se registró con una detección a 254 nm.

Comprobación del flujo de fase móvil

Antes de cada sesión de análisis se comprobó el flujo de la fase móvil confirmando el correcto funcionamiento de las bombas del equipo HPLC. Para ello se pasó un flujo de 1 mL/min comprobado mediante uso de una probeta de 10 mL situada en la salida de la manguera y cronometró. Se verificó que el volumen de fase móvil en la probeta coincide con 1 mL por minuto.

Preparación de estándares de PAs

Los estándares de tres PAs, heliotrina, echimidina y echimidina N-oxide se prepararon a una concentración de 1 mg/mL disueltos en etanol (EtOH) para el caso de heliotrine, y en MeOH para los otros dos PAs. Éstos se conservaron en viales de HPLC a - 20°C hasta su uso.

Inyección de estándares y ajuste de método cromatográfico

Se evaluaron diferentes métodos cromatográficos tomados de diferentes publicaciones, así como modificaciones de éstos para conseguir una adecuada separación de los picos registrados en los cromatogramas (Avula et al. 2015; Mädge et al. 2020; These et al. 2013). Antes de realizar las mediciones de las muestras tuvimos que configurar el método cromatográfico de forma que los picos del cromatograma en la medida de lo posible estuvieran lo más separado posible unos de otros. De esta manera el método finalmente empleado en el estudio tuvo una duración de 21 minutos y un flujo de 600 µL/min. El gradiente llevado a cabo fue una proporción inicial de 5% ACN (solvente A) y 95% 50 mM de KH₂PO₄ (solvente C) a un flujo de 600 µL/min durante los cuatro primeros minutos, al 4 minuto pasó a 15% A y 85% C hasta los 6 minutos que varió a 25% y 75% respectivamente. En el minuto 8 se modificó nuevamente la proporción a 30% A y 70% C. Desde los 10 hasta los 14 minutos se mantuvo a 35% A y 65% C, luego se cambió a 40% A y 60% C durante 2 minutos. A los 16 minutos 35% A y 65% C. Luego, en el minuto 18 fue de un 20% A y 80% C. Al minuto 19 cambió a 10% A y 90% C. Finalmente, a partir del minuto 20 los porcentajes variaron a las condiciones de partida 5% A y 95% C (Tabla 2).

Tabla 2.- Gradiente empleado en el método cromatográfico

Tiempo (min)	A%	B%	C%	D%	Flujo (µL/min)
0.00	5.0	0.0	95.0	0.0	600.0
2.00	5.0	0.0	95.0	0.0	600.0
4.00	15.0	0.0	85.0	0.0	600.0
6.00	25.0	0.0	75.0	0.0	600.0
8.00	30.0	0.0	70.0	0.0	600.0
10.00	35.0	0.0	65.0	0.0	600.0
12.00	35.0	0.0	65.0	0.0	600.0
14.00	40.0	0.0	60.0	0.0	600.0
16.00	35.0	0.0	65.0	0.0	600.0
18.00	20.0	0.0	80.0	0.0	600.0
19.00	10.0	0.0	90.0	0.0	600.0
20.00	5.0	0.0	95.0	0.0	600.0

Se usaron como solventes A: ACN grado HPLC y C: KH₂PO₄ 0.05M ajustado a pH 3.

Cuantificación de PAs empleando la técnica de HPLC

Inyección de estándares para generar una recta de calibrado

Una vez se ajustó el método y comprobado el buen estado del equipo y columna se procedió a inyectar la secuencia de los estándares a una concentración de 1 mg/mL y a diferentes volúmenes (3, 5 y 10 μ L) con dos repeticiones para cada uno de ellos. En este estudio se contó con un total de 3 estándares: heliotrina, echimidina y echimidina N-oxide (Phytolab, Alemania). Se registraron todos los cromatogramas, que se procesaron como se indica más abajo.

Finalmente, de forma rutinaria tras cada sesión de análisis, la columna se lavó corriendo MeOH grado HPLC durante unos 30 minutos.

Integración de estándares

Una vez inyectados los estándares, el software nos expresa los cromatogramas correspondientes, sobre los cuales debemos identificar el pico que corresponda al compuesto de interés e integrarlo, conociendo así el valor del área de los picos presentes en el cromatograma. Además, del registro del tiempo de retención y el espectro de absorbancia UV. Así, con estos datos y la concentración conocida del estándar inyectado se elaboró una recta de calibrado en Excel que fue empleada para calcular la concentración de PAs de las muestras de estudio.

Espectros UV-Visible estándares

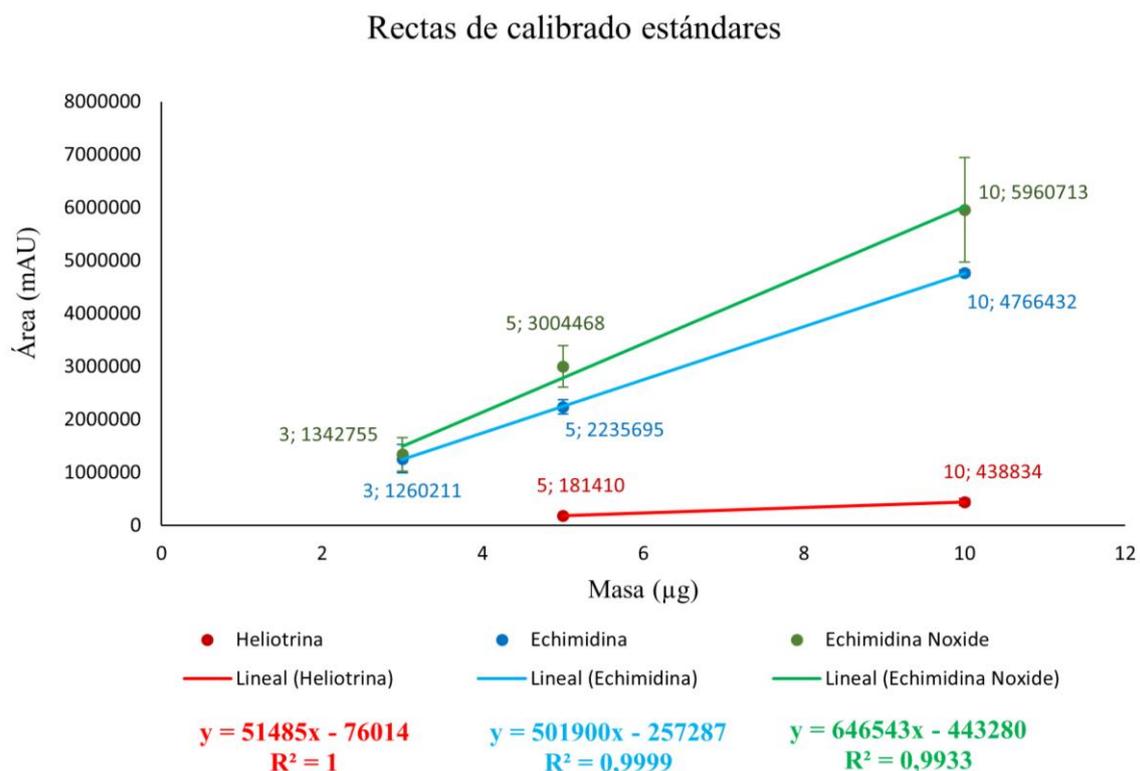
El detector PDA del equipo HPLC permite obtener el espectro de absorbancia de cada pico registrado en el cromatograma, herramienta útil para ayudar en la identificación de los compuestos sobretodo cuando se dispone de estándares de éstos. De los datos registrados, se extrajeron los espectros UV-Visible de cada estándar para posteriormente compararlo con los que aparezcan en las muestras problemas e identificar los compuestos presentes en la misma.

Rectas de calibrado

Se elaboró una curva de calibrado para cada uno de los estándares inyectados. En este sentido, para cada uno de los estándares. en una hoja Excel se representó gráficamente los valores de la concentración conocida frente a los del área media obtenida de las repeticiones. Además, se calculó la desviación estándar para cada concentración.

Subsiguientemente se definió la ecuación de la recta, necesaria para determinar la concentración de PAs de las muestras objeto de estudio; y el coeficiente de determinación (R^2), en todos los casos con valor cercano a 1, es decir, el modelo se ajusta significativamente bien al conjunto de datos estudiados (Figura 4).

Figura 4.- Rectas de calibrado obtenidas de los estándares comerciales, se muestran los valores medios y las desviaciones típicas. Además, de las ecuaciones de la recta para cada compuesto con su R^2 .



Inyección de las muestras en estudio

Se analizaron un total de 16 muestras que previamente habían sido preparadas en viales de HPLC con inserciones para no sacrificar mucho volumen de muestra. En cada medida se pincharon 10 µL, con tiempo de inyección y análisis de 21 minutos, un flujo de 600 µl/min y empleo del método cromatográfico descrito.

Integración de las muestras.

Se integraron todos los picos presentes en los cromatogramas de las muestras para extraer los valores de las áreas y tiempos de retención. Se siguió la misma sistemática que para la integración de los estándares comerciales.

Espectros UV-Visible muestras problema.

Además, de cada pico se registró también el espectro UV-Visible, se contrastó con los espectros de los estándares comerciales y se verificó si se trataba de alguno de ellos.

Cabe señalar que, dado que solo había físicamente tres estándares, citados anteriormente, para trabajar con las muestras, la misma casa comercial nos facilitó los espectros de absorbancia de otros tres PAs: echiumina, intermedina y licopsamina (Phytolab, Alemania). Con ello, se pudo comprobar si se registraron estos compuestos en las muestras en base a los espectros extraídos de éstas y contrastando si pertenecían a alguno de estos compuestos.

Análisis de datos

Para todas las muestras de nuestros endemismos y *E. plantagineum* se examinaron y registraron los tiempos de retención, el área y los espectros de cada pico integrado y se comparó con los estándares, también con intermedine, licopsamine y echiumina.

Sin embargo, se observó que estos alcaloides solo se encontraron en las muestras extraídas con DCM y la de dietil éter. Las muestras de butanol no tenían el nivel de pureza requerido para la cuantificación de estas moléculas y, por ende, no se pudieron identificar PAs.

Seguidamente, con los picos identificados se calculó la cantidad de los compuestos en mg/g peso seco de cada muestra. Para ello, se usó la ecuación de la recta de calibrado sustituyendo el valor de “y” por el del área de pico registrada obteniendo así la masa del alcaloide en μg . Para conocer la masa presente en los 10 μL de muestra inyectado se dividió el valor de la masa obtenida mediante interpolación entre 10. Seguidamente, como las muestras inyectadas procedían a su vez de extractos tomados con 1 mL de MeOH se multiplicó el valor $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 1000. Finalmente, para conocer los μg originalmente presentes en los 25g de material vegetal seco, empleados para iniciar la extracción, se dividió entre los 25 g originales.

Veamos a modo de ejemplo el pico n° 1 de la Tabla 3. Como tenemos un área de 1679104 mAU entonces: $X (\mu\text{g}) = \frac{1679104 + 257287}{501900}$; $X = 3.858 \mu\text{g}$; $\frac{3,858 \mu\text{g}}{10 \mu\text{L inyectados}} = 0,3858 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; $0,3858 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 385.8 \mu\text{g}/\text{mL}$; $\frac{385,8 \mu\text{g}}{25 \text{ g material vegetal seco}} = 15,432 \mu\text{g echimidina/g peso seco}$.

Resultados

Se presentan los resultados de la fracción final de DCM de las muestras donde mayormente están presentes los PAs extraídos. Igualmente, también se presentan los datos de la especie no endémica *E. plantagineum*, misma fracción de DCM y mismo método de extracción, especie que ha sido más frecuentemente estudiada para poder realizar alguna comparación con los valores de las muestras endémicas obtenidos.

Cabe señalar que, dado el número limitado de páginas para la elaboración de esta memoria los resultados se han tenido que sintetizar presentando en las tablas aquellos picos que se consideraron más relevantes, pues se trata posiblemente de los PAs de interés. No obstante, en los cromatogramas figuran todos los picos con sus tiempos de retención, áreas y % de área respectivamente.

Echium lancerottense (EL)

Figura 5.- Cromatograma de la muestra EP25 DCM_F a una λ de 233 nm

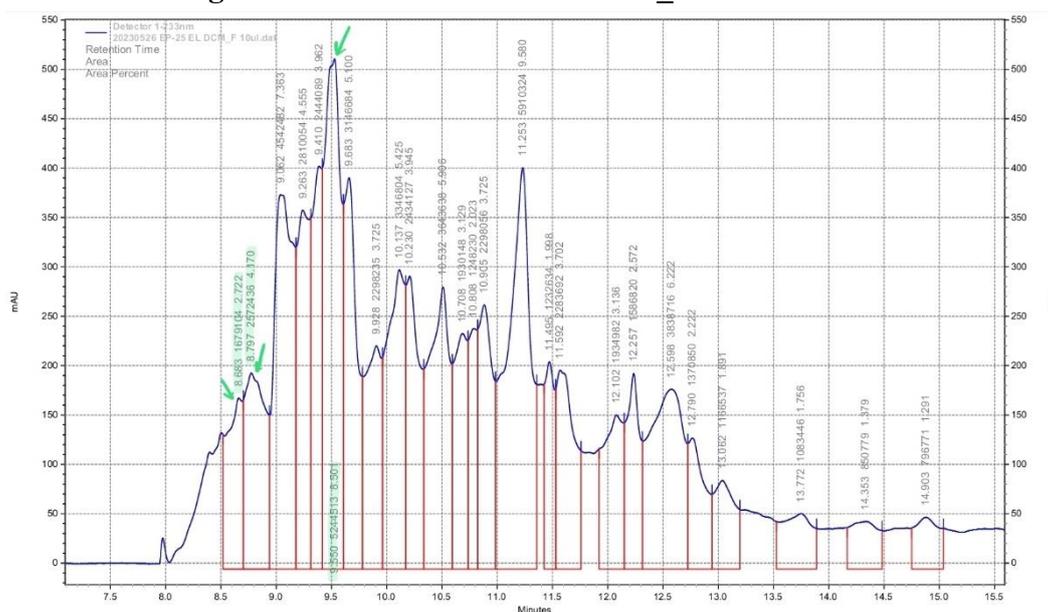


Tabla 3.- Resultados de la muestra EP25 DCM_F a una λ de 233 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	8,683	1679104	2,72	3,858	15,432	Echimidine
2	10	8,797	2572436	4,17	4,664	18,666	E. Noxide
5	10	9,550	5244513	8,50	10,962	43,848	Echiumina estimada

Echium callithyrsum (ECH)

Figura 6.- Cromatograma de la muestra EP28 DCM_F a una λ de 233 nm

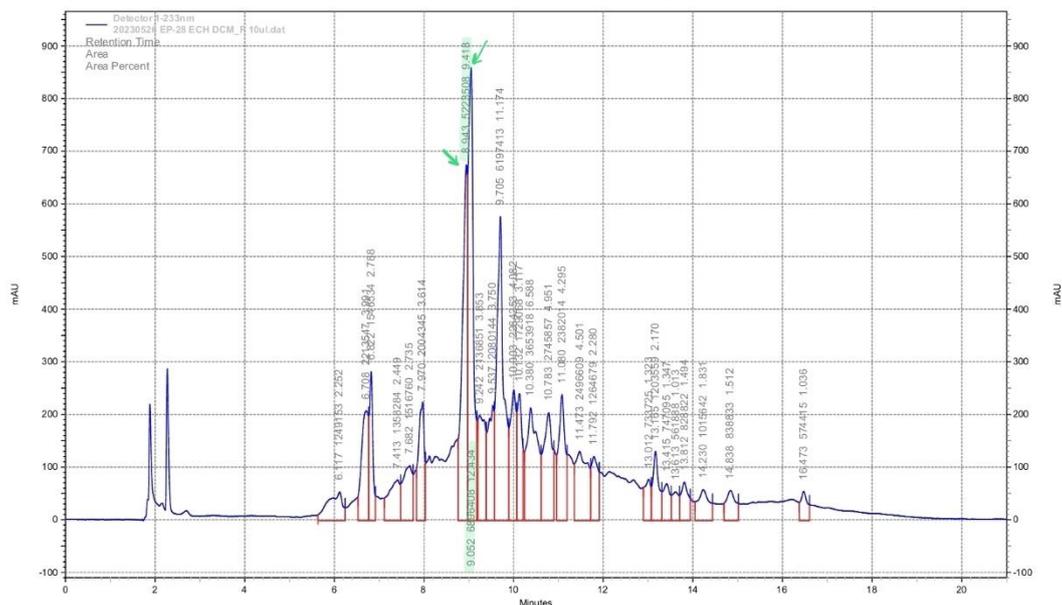


Tabla 4.- Resultados de la muestra EP28 DCM_F a una λ 233 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	8,943	5223508	9,42	8,764	35,056	E. Noxide
2	10	9,052	6896408	12,43	14,253	57,012	Echiumine estimada

Echium hierrense (hoja) (EHH)

Figura 7.- Cromatograma de la muestra EP31 DCM_F a una λ de 233 nm

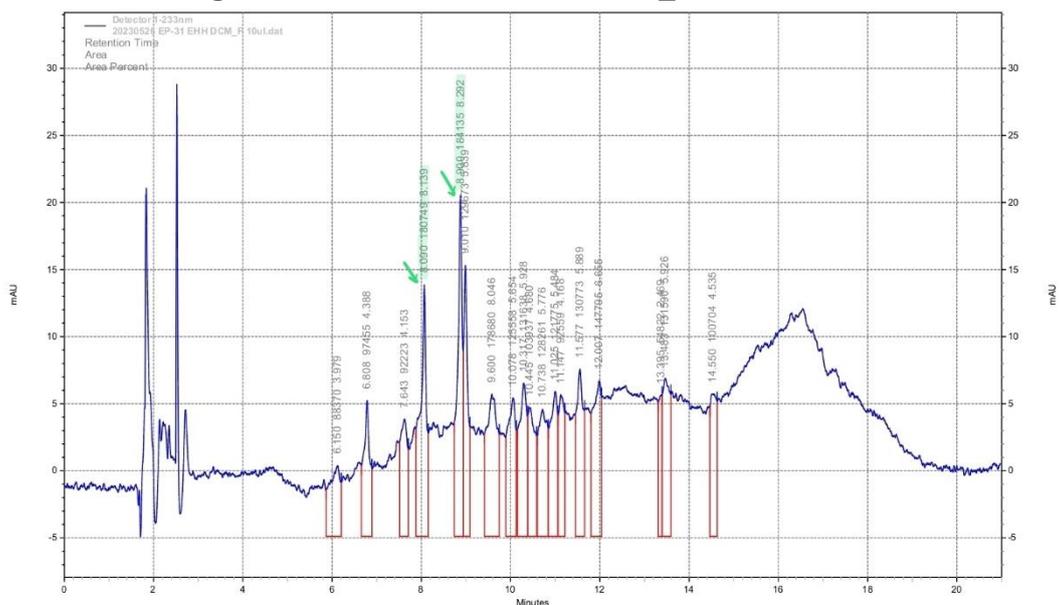


Tabla 5.1- Resultados de la muestra EP31 DCM_F a una λ 233 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	8,090	180749	8,14	0,872	3,488	Echimidina
2	10	8,900	184135	8,29	0,970	3,880	E. Noxide

Tabla 5.2- Resultados de la muestra EP31 DCM_F a una λ 190 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	16,765	866651	63,84	18,310	73,240	Licopsamina estimada

Echium hierrense (tallo) (EHT)

Figura 8.- Cromatograma de la muestra EP34 DCM_F a una λ de 233 nm

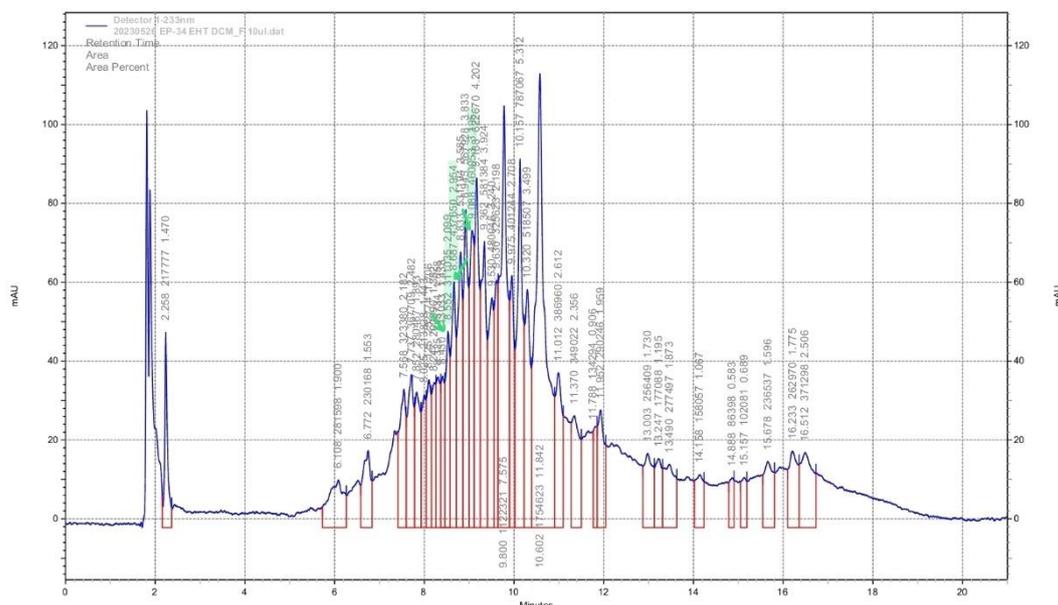


Tabla 6.1 - Resultados de la muestra EP34 DCM_F a una λ 233 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	8,552	311035	2,10	1,132	4,528	Echimidina
2	10	8,687	437650	2,95	1,362	5,448	E. Noxide
3	10	9,088	460053	3,10	1,429	5,716	Echiumine estimada

Tabla 6.2- Resultados de la muestra EP34 DCM_F a una λ 190 nm

Nº pico	Vol. inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	7,323	415950	6,73	9,555	38,220	Heliotrine

Echium bonnetii (EB)

Figura 9.- Cromatograma de la muestra EP37 DCM_F a una λ de 233 nm

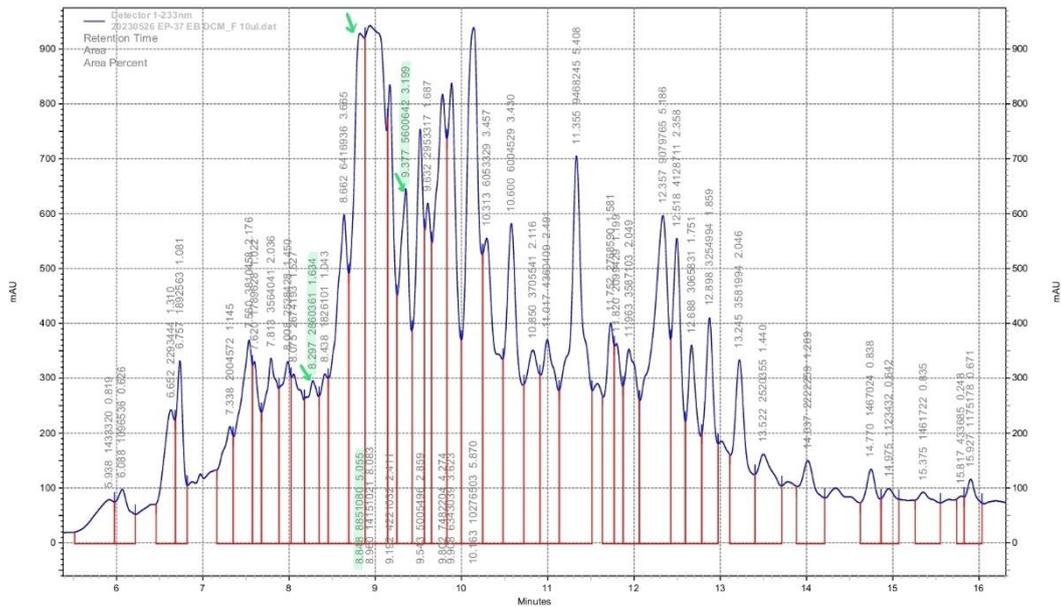


Tabla 7.- Resultados de la muestra EP37 DCM_F a una λ 233 nm

Nº pico	Vol. Inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	8,297	2860361	1,63	6,211	24,844	Echimidina
2	10	8,848	8851080	5,06	14,375	57,500	E. Noxide
3	10	9,377	5600642	3,20	11,672	46,688	Echiumine estimada

Echium plantagineum (EPL)

Figura 10.- Cromatograma de la muestra EP13 DCM_F a una λ de 233 nm

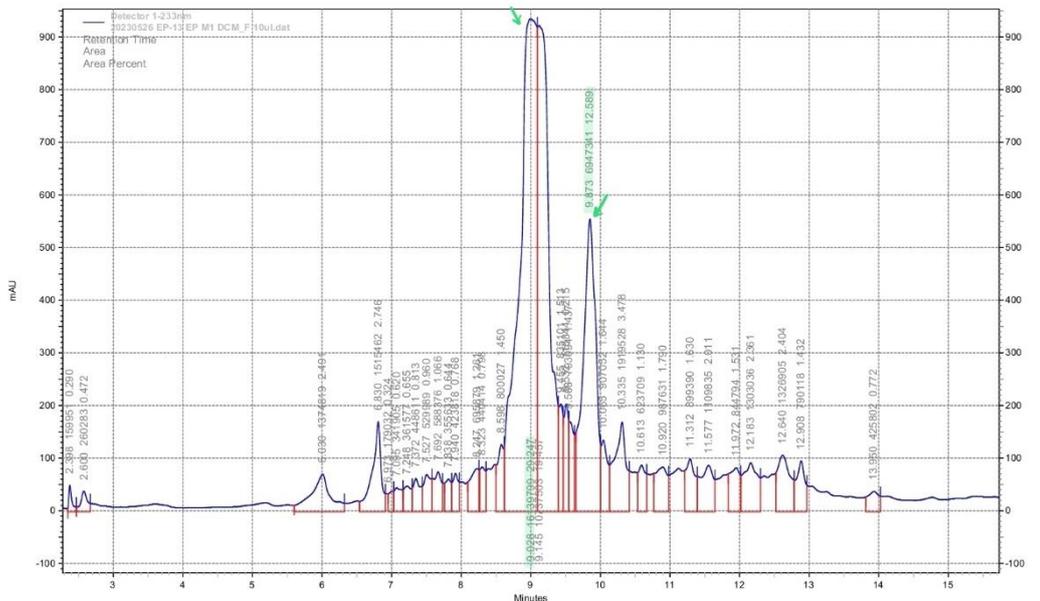


Tabla 8.- Resultados de la muestra EP13 DCM_F a una λ 233 nm

Nº pico	Vol. Inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Cantidad final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	9,028	16139799	29,25	25,649	102,596	E. Noxide

2

10

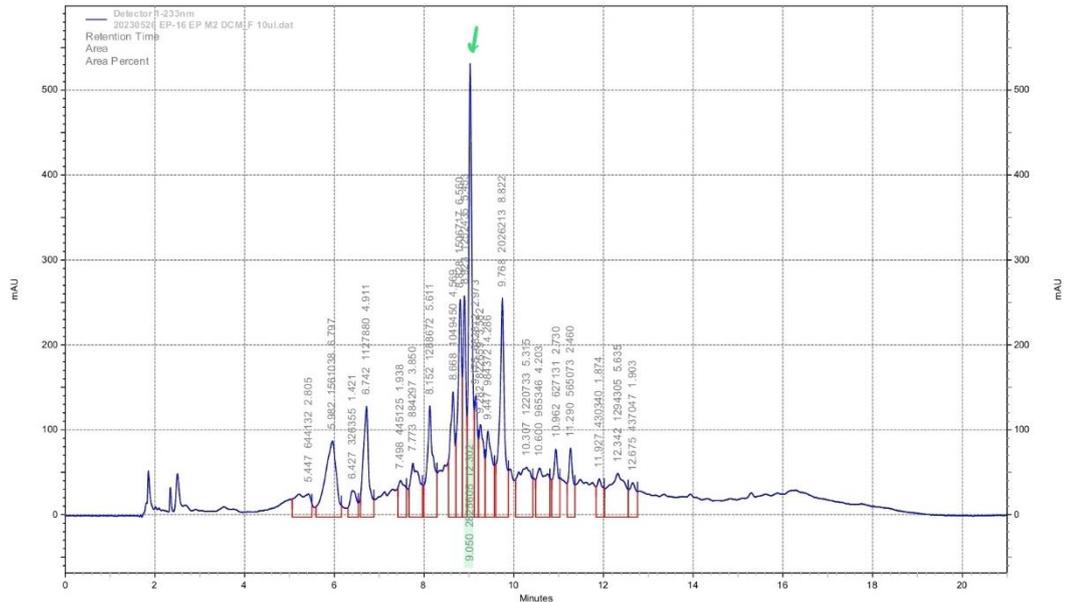
9,873

6947341

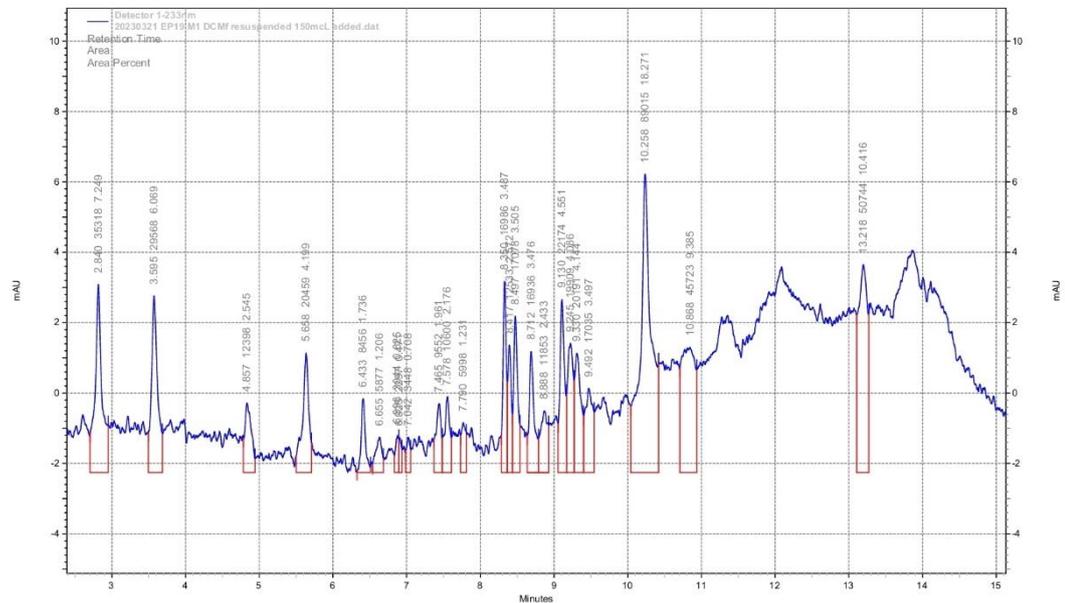
12,59

14,355

57,420

Echiumine
estimada**Figura 11.- Cromatograma de la muestra EP16 DCM_F a una λ de 233 nm****Tabla 9.- Resultados de la muestra EP16 DCM_F a una λ 233 nm**

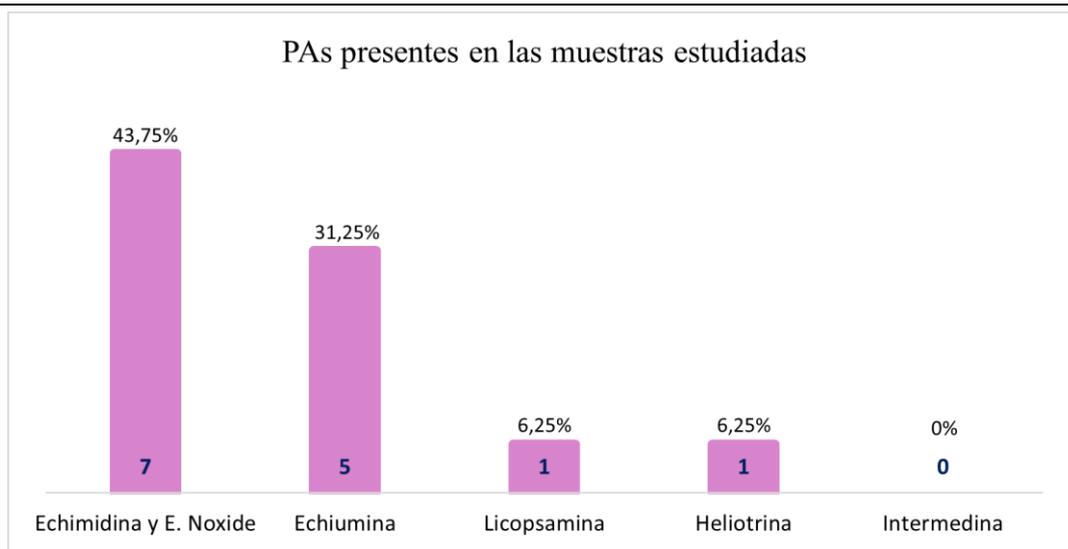
Nº pico	Vol. Inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
1	10	9,050	2825605	12,30	5,056	20,224	E. Noxide

Figura 12.- Cromatograma de la muestra EP19 DCM_F a una λ de 233 nm**Tabla 10.- Resultados de la muestra EP19 DCM_F a una λ 233 nm**

Nº pico	Vol. Inyección (µL)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área	Masa inyectada (µg)	Masa final (µg/g peso seco)	Compuesto
-	-	-	-	-	-	-	Sin identificación

Con estos datos concluimos que, de las 16 muestras iniciales solo en 8 (50%) se pudieron identificar PAs. A su vez, en éstas se vio que Echimidina y su forma Noxide fue el alcaloide más abundante, apareciendo en 7 de las muestras (43,75%); le sigue Echiumina presente en 5 muestras (31,25%); Licopsamina en 1 muestra (6,25%); Heliotrina también en 1 muestra (6,25%); y finalmente Intermedina estuvo ausente en todas las muestras (0%) (Figura 13).

Figura 13.- PAs identificados en las muestras estudiadas.



El número inferior indica el número de veces que apareció el compuesto en las muestras. Arriba, expresado en porcentaje.

Discusión

Del total de las muestras finalmente analizadas, las 8 presentaban concentraciones de PAs que oscilaron entre 3,488 - 73,240 $\mu\text{g/g}$ peso seco para las especies endémicas, mientras que para el caso *E. plantagineum* fue de 102,596 $\mu\text{g/g}$ peso seco siendo de 1,4 a 29,4 veces más elevado que la cantidad registrada para las especies endémicas. No obstante, a pesar de estas claras diferencias, se reveló en todos los casos valores muy por encima de los límites de toxicidad establecidos de 0,237 $\mu\text{g/g}$ peso seco (Knutsen et al. 2017), resultados en concordancia con (De Jesus Inacio et al. 2020). Por ello, podemos considerar que estas especies de *Echium* podrían ser nocivas para la salud del ganado caprino, aviar y, por ende, del ser humano.

En líneas generales podemos concluir que *E. hierrense* es el endemismo con menos concentración de PAs (valor mínimo 3,488 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Le siguen *E. lancerottense* (15,432 $\mu\text{g/g}$ peso seco), *E. bonnetti* (24,844 $\mu\text{g/g}$ peso seco) y *E. callithyrsium* (35,056 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Por su parte, *E. plantagineum* es la especie con mayor concentración (102,596 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Dato corroborado con el artículo de (Lorena et al. 2016) donde se comparan entre diversas especies de *Echium* no endémicas de las islas y se afirma que aquellas de España e Italia son las que presentaban mayores concentraciones (media de 25 $\mu\text{g/kg}$ y máxima de 225 $\mu\text{g/kg}$) Hasta ahora no hay estudios similares contrastables para el caso exclusivo de Canarias.

Sin embargo, consultando la literatura científica existen amplios estudios, destacando entre otros uno en Cabo Verde y otro en Canarias, donde las concentraciones de *Echium* eran considerablemente más reducidas que las obtenidas en nuestro estudio (para *Echium* entre 0.01 - 0,07% y para *Senecio* spp entre 0,09 - 0,18%) (Carvalho et al. 2013; Domínguez et al. 2008; Lorena et al. 2016). En otros estudios se obtuvieron para *Senecio* spp valores entre 0.09 y 4.63 mg/g (Zwerger, Zelger, and Ganzera 2023). Así como investigaciones en mieles de *E. plantagineum* con valores entre 45 - 56 $\mu\text{g/kg}$ (Sixto et al. 2019; Wang et al. 2019).

Otros estudios sobre la resistencia de PAs al proceso de elaboración de la miel muestran que estos son capaces de mantener su estructura intacta, sobretodo echimidina, contaminando así la miel producida (Cao, Colegate, and Edgar 2013). En productos como leche, huevo o carne también se vio esta resistencia (Casado et al. 2022). En consecuencia, se hace necesario un control estricto por parte de las autoridades competentes de este tipo de compuestos en los alimentos, así como el desarrollo de más estudios científicos pues es un tema todavía en auge.

No obstante, (H. Wiedenfeld 2011) estudió si el contenido de PAs disminuía a través de proceso de conservación de forraje (ensilaje), dando como resultado que el contenido de PAs disminuía un 10% si se realizaba esta práctica. Así, este hecho práctico pudiera trasladarse a nuestro caso para que el contenido de PAs que reciban los animales alimentados de estas especies vegetales sean algo inferiores. También hay que mencionar que como forrajera o ingrediente para la fabricación de piensos, el porcentaje de contenido de este forraje cabe esperar que sea como las grasas que se añaden en el estudio de (Varona Sánchez 2021), sobre un 2 - 7%. Por lo tanto, la toxicidad se vería notablemente reducida y, por ende, los casos de intoxicación en animales, o incluso no presentarse por este efecto de dilución.

Por otro lado, se ha evidenciado que el aceite de las semillas de especies como *Echium plantagineum* es rico en ácido estearidónico (SDA) e incluye en sus ácidos grasos n-6 ácido gamma linoleico (GLA, 18:3n-6), este último implicado en la producción de eicosanoides antiinflamatorios (Kitessa, Nichols, and Abeywardena 2011). Como resultado, se ha utilizado el aceite de *E. plantagineum* para la elaboración de piensos en los que son más los efectos positivos que los negativos inducidos por PAs

Igualmente, me gustaría señalar como caso curioso a los insectos, estos invertebrados a lo largo de su historia evolutiva han desarrollado mecanismos que les han conferido la capacidad bioquímica de incorporar estos PAs tóxicos en su organismo y usarlos como defensa frente a depredadores. Escarabajos como los del género *Oreina* pueden llegar a concentrar en sus secreciones defensivas hasta 0.3 mol/L (Hartmann 2004). Quién sabe si en el futuro, los herbívoros sean capaces de poder asimilar estos PAs y usarlos para defenderse de sus posibles depredadores.

Finalmente, con todo esto consideramos que el género *Echium*, sobretodo de aquellas especies endémicas de Canarias, poseen el potencial para usarse como forrajeras en las dietas del ganado caprino y aviar a pesar de los resultados obtenidos. Ya que utilizando las técnicas mencionadas o aplicarlas a piensos como un ingrediente de su elaboración disminuiría las concentraciones de PAs solventando de esta manera que se dé una intoxicación

Conclusiones:

1. Es posible la intoxicación del ganado aviar y caprino al suministrarles exclusivamente especies de *Echium* como alimentación sin mezclarlas previamente con otras especies vegetales ausentes en este tipo de toxicidad.
2. Probablemente, por los datos consultados en la literatura científica, el ganado caprino sea más tolerante a una posible contaminación por su doble estómago y flora microbiana y su efecto, pues comprometen la estabilidad de los PAs.
3. El tratamiento del forraje mediante ensilado previamente a la administración en animales reducirá el efecto tóxico del contenido de PAs.
4. A la vista de estos resultados iniciales, es necesario continuar investigando la presencia de estos PAs empleando diferentes metodologías como GC-MS que permitieran recabar más información relevante de todos o la mayoría de los picos registrados. Además, se puede conseguir mejoras en los métodos de extracción para el aislamiento de PAs. Así como mejoras en la accesibilidad a estándares comerciales que permitan el avance en este aspecto.

Conclusions:

1. Poisoning of poultry and goats is possible by feeding them exclusively *Echium* species as feed without first mixing them with other plant species absent in this type of toxicity.
2. Probably, according to the data consulted in the scientific literature, goats are more tolerant to possible contamination due to their double stomach and microbial flora and their effect, as they compromise the stability of PAs.
3. Treatment of forage by silage prior to administration to animals will reduce the toxic effect of the content of PAs.
4. In view of these initial results, it is necessary to continue investigating the presence of these PAs using different methodologies such as GC-MS that would allow collecting more relevant information from all or most of the peaks recorded. In addition, improvements in extraction methods for PA isolation can be achieved. As well as improvements in accessibility to commercial standards that allow progress in this aspect.

Bibliografía

- Avula, Bharathi, Satyanarayanaraju Sagi, Yan-Hong Wang, Jerry Zweigenbaum, Mei Wang, and Ikhlas A. Khan. 2015. "Characterization and Screening of Pyrrolizidine Alkaloids and N-Oxides from Botanicals and Dietary Supplements Using UHPLC-High Resolution Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 178:136–48. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.053.
- Bull, L. B., and A. T. Dick. 1959. "The Chronic Pathological Effects on the Liver of the Rat of the Pyrrolizidine Alkaloids Heliotrine, Lasiocarpine, and Their N-Oxides." *The Journal of Pathology and Bacteriology* 78(2):483–502. doi: 10.1002/path.1700780215.
- Cao, Y., S. M. Colegate, and J. A. Edgar. 2013. "Persistence of Echimidine, a Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloid, from Honey into Mead." *Journal of Food Composition and Analysis* 29(2):106–9. doi: 10.1016/j.jfca.2012.11.005.
- Carvalho, José Carlos B., Henrique dos Santos Almeida, Jonathas Felipe Revoredo Lobo, José Luiz Pinto Ferreira, Adriana Passos Oliveira, and Leandro Rocha. 2013. "Pyrrolizidine Alkaloids in Two Endemic Capeverdean Echium Species." *Biochemical Systematics and Ecology* 50:1–6. doi: 10.1016/j.bse.2013.03.026.
- Casado, Natalia, Sonia Morante-Zarcero, and Isabel Sierra. 2022. "The Concerning Food Safety Issue of Pyrrolizidine Alkaloids: An Overview." *Trends in Food Science & Technology* 120:123–39. doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.007.
- Domínguez, Dulce M., Matías Reina, Arnoldo Santos-Guerra, Omar Santana, Teresa Agulló, Carmen López-Balboa, and Azucena Gonzalez-Coloma. 2008. "Pyrrolizidine Alkaloids from Canarian Endemic Plants and Their Biological Effects." *Biochemical Systematics and Ecology* 36(3):153–66. doi: 10.1016/j.bse.2007.08.015.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2016. "Dietary Exposure Assessment to Pyrrolizidine Alkaloids in the European Population." *EFSA Journal* 14(8). doi: 10.2903/j.efsa.2016.4572.
- El-Shazly, Assem, Afaf Abdel-Ghani, and Michael Wink. 2003. "Pyrrolizidine Alkaloids from *Onosma Arenaria* (Boraginaceae)." *Biochemical Systematics and Ecology* 31(5):477–85. doi: 10.1016/S0305-1978(02)00177-1.

- Hartmann, Thomas. 2004. "Plant-Derived Secondary Metabolites as Defensive Chemicals in Herbivorous Insects: A Case Study in Chemical Ecology." *Planta* 219(1):1–4. doi: 10.1007/s00425-004-1249-y.
- Hartmann, Thomas, and Dietrich Ober. 2000. "Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores." Pp. 207–43 in.
- He, Yisheng, Lin Zhu, Jiang Ma, Lailai Wong, Zhongzhen Zhao, Yang Ye, Peter P. Fu, and Ge Lin. 2020. "Comprehensive Investigation and Risk Study on Pyrrolizidine Alkaloid Contamination in Chinese Retail Honey." *Environmental Pollution* 267:115542. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115542.
- De Jesus Inacio, Luciana, Roberta Merlanti, Lorena Lucatello, Vittoria Bisutti, Barbara Contiero, Lorenzo Serva, Severino Segato, and Francesca Capolongo. 2020. "Pyrrolizidine Alkaloids in Bee Pollen Identified by LC-MS/MS Analysis and Colour Parameters Using Multivariate Class Modeling." *Heliyon* 6(3):e03593. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03593.
- Kitessa, Soressa M., Peter D. Nichols, and Mahinda Abeywardena. 2011. "Purple Viper's Bugloss (*Echium Plantagineum*) Seed Oil in Human Health." Pp. 951–58 in *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier.
- Knutsen, Helle Katrine, Jan Alexander, Lars Barregård, Margherita Bignami, Beat Brüsweiler, Sandra Ceccatelli, Bruce Cottrill, Michael Dinovi, Lutz Edler, Bettina Grasl-Kraupp, Christer Hogstrand, Laurentius (Ron) Hoogenboom, Carlo Stefano Nebbia, Isabelle P. Oswald, Annette Petersen, Martin Rose, Alain-Claude Roudot, Tanja Schwerdtle, Christiane Vleminckx, Günter Vollmer, Heather Wallace, José Angel Gomez Ruiz, and Marco Binaglia. 2017. "Risks for Human Health Related to the Presence of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey, Tea, Herbal Infusions and Food Supplements." *EFSA Journal* 15(7). doi: 10.2903/j.efsa.2017.4908.
- Lorena, Lucatello, Merlanti Roberta, Rossi Alessandra, Montesissa Clara, and Capolongo Francesca. 2016. "Evaluation of Some Pyrrolizidine Alkaloids in Honey Samples from the Veneto Region (Italy) by LC-MS/MS." *Food Analytical Methods* 9(6):1825–36. doi: 10.1007/s12161-015-0364-7.
- Ma, Chuanhui, Yang Liu, Lin Zhu, Hong Ji, Xun Song, Hui Guo, and Tao Yi. 2018. "Determination and Regulation of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Food: A Critical

- Review of Recent Research.” *Food and Chemical Toxicology* 119:50–60. doi: 10.1016/j.fct.2018.05.037.
- Mädge, Inga, Matthias Gehling, Cindy Schöne, Peter Winterhalter, and Anja These. 2020. “Pyrrolizidine Alkaloid Profiling of Four Boraginaceae Species from Northern Germany and Implications for the Analytical Scope Proposed for Monitoring of Maximum Levels.” *Food Additives & Contaminants: Part A* 37(8):1339–58. doi: 10.1080/19440049.2020.1757166.
- Moreira, Rute, David Pereira, Patrícia Valentão, and Paula Andrade. 2018. “Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(6):1668. doi: 10.3390/ijms19061668.
- Orantes-Bermejo, F. J., J. Serra Bonvehí, A. Gómez-Pajuelo, M. Megías, and C. Torres. 2013. “Pyrrolizidine Alkaloids: Their Occurrence in Spanish Honey Collected from Purple Viper’s Bugloss (*Echium Spp.*)” *Food Additives & Contaminants: Part A* 30(10):1799–1806. doi: 10.1080/19440049.2013.817686.
- Pechi Santana, Braihan Gustavo, and Valentín José Fernández Bonino. 2018. “Estudio de La Toxicidad de *Echium Plantagineum* En Bovinos.”
- Rizzo, Serena, Rita Celano, Anna Lisa Piccinelli, Mariateresa Russo, and Luca Rastrelli. 2023. “Target Screening Method for the Quantitative Determination of 118 Pyrrolizidine Alkaloids in Food Supplements, Herbal Infusions, Honey and Teas by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry.” *Food Chemistry* 423:136306. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136306.
- Roeder, E., K. Liu, and T. Bourauel. 1991. “Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium Pimpinana*.” *Phytochemistry* 30(9):3107–10. doi: 10.1016/S0031-9422(00)98263-3.
- Sixto, Alexandra, Silvina Niell, and Horacio Heinzen. 2019. “Straightforward Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey through Simplified Methanol Extraction (QuPPE) and LC-MS/MS Modes.” *ACS Omega* 4(27):22632–37. doi: 10.1021/acsomega.9b03538.
- These, Anja, Dorina Bodi, Stefan Ronczka, Monika Lahrssen-Wiederholt, and Angelika Preiss-Weigert. 2013. “Structural Screening by Multiple Reaction Monitoring as a New Approach for Tandem Mass Spectrometry: Presented for the Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(29):9375–83. doi: 10.1007/s00216-013-7365-4.

- Varona Sánchez, Elisa. 2021. “Utilización de Aceites Ácidos y Ácidos Grasos Destilados En Alimentación Animal: Caracterización de Estos Subproductos y Repercusiones de Su Uso En La Estabilidad Oxidativa de Piensos y Carne de Pollo.” *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- Wang, Tingting, Henrik Lauritz Frandsen, Natasha Roed Christiansson, Sofie Elisabeth Rosendal, Mikael Pedersen, and Jørn Smedsgaard. 2019. “Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Quantification with and without Standards.” *Food Control* 98:227–37. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.033.
- Wei, Xianqin, Weibin Ruan, and Klaas Vrieling. 2021. “Current Knowledge and Perspectives of Pyrrolizidine Alkaloids in Pharmacological Applications: A Mini-Review.” *Molecules* 26(7):1970. doi: 10.3390/molecules26071970.
- Wiedenfeld, H. 2011. “Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: Toxicity and Problems.” *Food Additives & Contaminants: Part A* 28(3):282–92. doi: 10.1080/19440049.2010.541288.
- Wiedenfeld, Helmut. 2011. “Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids-a Serious Health Problem.” *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences* (2).
- Zwerger, Michael, Judith Zelger, and Markus Ganzera. 2023. “Separation of Pyrrolizidine Alkaloids in Different Senecio Species Using Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 228:115310. doi: 10.1016/j.jpba.2023.115310.